

UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE

---



ANNEE 2003

THESE N° 322/1

RESVERATROL ET CANCERS :  
LA SANTE AU FOND DU VERRE ?

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 112122 3

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---

présentée et soutenue publiquement le 6 Juin 2003

PAR

Isabelle REBEYROL

née le 17 Février 1977 à Brive la Gaillarde (19)

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Albert CHULIA  
Mme Daovy ALLAIS, Maître de conférence  
M. Bernard CHAPOU, Docteur en pharmacie

Président  
Juge  
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

---

DOYEN DE LA FACULTE  
ASSESEURS

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard  
Madame le Professeur CHULIA Dominique

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE-BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-PARASITOLOGI
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE-CRYPTOLOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACIE GALENIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE-CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE-CHIMIE MINERALE
DREYFFUS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE-CRYPTOLOGAMIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT
LOUDARD Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES  
ADMINISTRATIFS

Madame ROCHE Doriane

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDA Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFFUS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUE

SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
-----------------	---------------------

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
----------------------	---------

ATER

POUGET Christelle	CHIMIE THERAPEUTIQUE
RIAH DEHKORDI Homayoun	PHYSIOLOGIE-PARASITOLOGIE
TALLET Dominique	PHARMACOLOGIE

## REMERCIEMENTS :

A mon Directeur de Thèse, Monsieur A. CHULIA,  
Merci d'avoir accepté de juger mon travail.

A Mme D. ALLAIS,  
Je vous remercie de votre accueil et de vos conseils et merci pour vos encouragements.  
Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail.  
Merci de m'avoir consacré du temps.  
Merci de votre patience.

A M. B. CHAPOU,  
Merci d'avoir accepté très gentiment de juger mon travail.  
Merci de m'avoir accueilli dans votre officine pendant mes années d'étude.

A mes parents et ma soeur, Emilie,  
Merci pour votre soutien et vos encouragements tout le long de mes études.

A JULIEN,  
Merci pour tout le soutien que tu m'as apporté, merci pour l'aide logistique ...

A mes amies de promotion, et tout particulièrement à Marie, Hanane, Sandrine,  
pour leur amitié et pour tous les bons et mauvais moments passés ensemble.

## ABREVIATIONS

Ahr : arylhydrocarbure

AIF : facteur inducteur de l'apoptose

AZT : azidothymidine

B(a)P : benzo(a)pyrène

BEP2D : lignée de cellules cancéreuses épithéliales bronchiques humaines

BPAAE : cellules endothéliales bovines de l'artère pulmonaire

CaCo2 : lignée de cellules cancéreuses du colon

CAT : catalase

COX : cyclooxygénase

DMBA : 7,12-diméthylbenz(a)anthracene

EBV : Epstein Barr virus

ED50 : dose moyenne effective

EGF : facteur de croissance

ERK : extracellulaire regulated kinase

EROD : ethoxyrésorufine

GC : guanylate cyclase

GPx : glutathion peroxydase

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

GST : glutathion S-transférase

GTP : guanosine triphosphate

HBV : Virus de l'hépatite B

HEPA 1C1C7 : cellules cancéreuses murines du foie

HHV2 : Virus herpes de type 2

HPLC : chromatographie liquide haute performance

HSV : herpes simplex virus

HTLV-1 : Virus à lymphocytes T humain

ICP4 : protéine régulatrice virale précoce

Ig : immunoglobuline

LDL : lipoprotéine de faible densité

LMC : leucémie myéloïde chronique

LNCaP : cellules cancéreuses de la prostate

LPS : lipopolysaccharide bactérien

MAP kinase : mitogen activated protéine kinase

MCF7 : lignée cellulaire cancéreuse du sein à récepteurs estrogéniques positifs

MCF10F : lignée cellulaire cancéreuse du sein ne possédant pas de récepteurs estrogéniques

MCP-1 : monocyte chemoattractive protéine 1

MDAMB231 ou MDA-231 : lignée cellulaire du cancer du sein ne possédant pas de récepteurs estrogéniques

mEH : epoxide hydrolase microsomiale

MPO : myéloperoxydase

NADPH : nicotinamide adénine phosphate

NFkB : facteur nucléaire kB

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

ODC : ornithine décarboxylase

OPC : oligomères procyanoliques

PAH : hydrocarbure aromatique polycyclique

PBMNC : cellules mononucléées isolés du sang périphérique de donneurs sains

PCNA : antigène de noyau cellulaire proliférant

PKC : protéine kinase C

PSA : antigène spécifique de la prostate

RE : récepteur aux estrogènes

ROS : formes réactives de l'oxygène

SHSY5Y : lignée cellulaire de neuroblastome humain

SOD : superoxyde dismutase

TAF : tumor angiogenic factor

TCDD : 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

THP-1 : lignée de cellules monocytaires leucémiques humaines

TNF : facteur de nécrose tumoral

TPA : tetradecanoyl phorbol acétate



## TABLE DES MATIERES

<b>I. LE CANCER</b>	<b>13</b>
I.1. INTRODUCTION	13
I.2. DEFINITION	13
I.3. CLASSIFICATION ANATOMOPATHOLOGIQUE	14
I.4. LA CELLULE CANCEREUSE	15
I.5. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA CARCINOGENESE	16
I.6. MECANISME MOLECULAIRE DE L'ONCOGENESE	17
I.7. NOTIONS DE CROISSANCE TUMORALE	21
I.8. MODES DE PROPAGATION DES TUMEURS	22
<b>II. LES MECANISMES DE LA CANCEROGENESE</b>	<b>23</b>
II.1. LA PHASE D'INITIATION	24
II.2. LA PHASE DE PROMOTION	25
II.3. PHASE DE PROGRESSION ET D'INVASION	26
II.4. INTERACTIONS DES FACTEURS ALIMENTAIRES AVEC LES MECANISMES DE LA CANCEROGENESE	27
<b>III. EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS</b>	<b>28</b>
III.1. EVOLUTION DE LA MORTALITE PAR CANCER EN FRANCE AU COURS DES QUARANTE DERNIERES ANNEES	28
III.2. SITUATION DE LA FRANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES PAYS OCCIDENTAUX	34
III.3. LE CANCER AUJOURD'HUI	35

<b>IV. LE RESVERATROL</b>	<b>39</b>
IV.1. INTRODUCTION	39
IV.2. DECOUVERTE DE LA MOLECULE DE RESVERATROL	40
IV.3. LE RESVERATROL DANS LE VIN	42
IV.4. NATURE CHIMIQUE DU RESVERATROL	54
IV.5. PLANTES CONTENANT DU RESVERATROL	59
<b>V. EXTRACTION, PURIFICATION ET SYNTHÈSE DU RESVERATROL</b>	<b>68</b>
V.1. EXTRACTION ET PURIFICATION	68
V.2. SYNTHÈSE DU RESVERATROL	70
<b>VI. PHARMACOCINÉTIQUE DU RESVERATROL DANS L'ORGANISME</b>	<b>75</b>
<b>VII. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DU RESVERATROL</b>	<b>75</b>
VII.1. ACTIVITÉ CHIMIOPREVENTIVE DU RESVERATROL	76
VII.1.1. PROPRIÉTÉS ANTI-OXYDANTES DU RESVERATROL	76
VII.1.2. ACTION DU RESVERATROL SUR LES 3 ÉTAPES DU MÉCANISME DE LA CANCÉROGÈNESE	85
VII.1.3. ACTION SUR LE NO	99
VII.2. EFFETS CHIMIOTHERAPEUTIQUES DU RESVERATROL : ACTION SUR LE CYCLE CELLULAIRE, LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE ET L'APOPTOSE	103
VII.2.1. LE CYCLE CELLULAIRE	103
VII.2.2. ACTION SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE	105
VII.2.3. RESVERATROL ET APOPTOSE	119
VII.3. ACTIVITÉ HORMONALE DU RESVERATROL	133
VII.3.1. ACTION SUR LES CELLULES DÉPENDANT DES ESTROGÈNES	133

VII.3.2. ACTION SUR LES CELLULES DEPENDANT DES ANDROGENES	138
VII.4. RESVERATROL ET COSMETIQUE	139
VII.4.1. LE RESVERATROL, UN NOUVEL ACTIF ANTI-AGE	139
VII.4.2. ACTION SUR LES KEROTINOCYTES	140
VII.5. AUTRE PROPRIETES ATTRIBUEES AU RESVERATROL	141
VII.6. LES DERNIERES DECOUVERTES	141
CONCLUSION	146
LISTE DES TABLEAUX ET GRAPHIQUES	148
BIBLIOGRAPHIE	151
SERMENT DE GALIEN	166

## INTRODUCTION

Chaque année, sept à huit millions de nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués dans le monde. Le diagnostic précoce et la prévention primaire restent les grandes voies d'approche pour lutter efficacement contre la maladie. C'est dans ce cadre que s'inscrit le problème des relations possibles entre nutrition et cancer.

Parmi les quelques deux cents polyphénols contenus dans le vin, le resvératrol est sans doute la molécule la plus intéressante pour la santé.

Alors que sa découverte dans le vin par les chercheurs américains Siemann et Creasy remonte seulement à 1992, on l'utilise en Asie depuis des siècles en médecine traditionnelle. Le resvératrol est le composant d'un remède chinois préconisé pour lutter contre l'athérosclérose et préparé à partir de racines d'une plante appelée *Polygonum cuspidatum*.

Ses propriétés anticancéreuses ont été mises en évidence pour la première fois en 1997 à Chicago par une équipe dirigée par le professeur Pezzuto, qui a examiné des centaines de plantes pendant plusieurs années afin de trouver de nouveaux agents anticancéreux. Même si aucune étude clinique n'a encore vérifié chez l'homme le potentiel de ce composé, il pourrait s'avérer prometteur. En effet de nombreux mécanismes d'action du resvératrol répertoriés dans ce travail tendent à prouver une action de ce 3,5,4'-trihydroxystilbène dans le cancer et sa prévention.

La première partie de cet exposé concernera la maladie cancéreuse, s'en suivra une présentation du resvératrol et enfin l'intérêt que cette molécule peut avoir pour la santé et notamment dans le cancer et sa prévention.

# I. LE CANCER

## I.1. INTRODUCTION

Les mécanismes qui provoquent la transformation cellulaire d'une cellule normale en une cellule cancéreuse étaient totalement inconnus en 1975.

Certes, depuis le début du siècle, ont été identifiés des agents capables de provoquer l'apparition de cancers chez l'animal, mais on se contentait de constater le cancer ; on n'en connaissait pas les causes à l'échelle cellulaire. Un gigantesque pas a été franchi depuis.

Grâce à la recherche épidémiologique, de nombreuses causes de cancers humains ont été identifiées et, simultanément, grâce aux fulgurants progrès de la biologie moléculaire, les modifications à l'échelle moléculaire qui déterminent cette transformation ont commencé à être identifiées.

Cependant les liens entre les observations cliniques et la biologie moléculaire restent imprécis et il est difficile de faire correspondre l'évolution vers un cancer avec les modifications du génome.

Il reste ainsi beaucoup de chemin à parcourir et de questions qui restent sans réponses.

## I.2. DEFINITION

Le terme « cancer » vient du grec « cancos » qui signifie « crabe ». C'est Hippocrate, au V<sup>ème</sup> siècle avant JC, le père de la médecine grecque, qui décrit les tumeurs du sein en leur donnant le nom de cancer car les médecins grecs comparaient la douleur ressentie par les femmes au stade terminal du cancer du sein à celle que provoque le pincement d'un crabe (TUBIANA M.).

De façon plus scientifique, le cancer est défini comme le résultat de la prolifération d'une famille, d'un clône de cellules anormales. Il s'agit donc d'un ensemble de cellules au sein d'un organisme pluri-cellulaire, échappant aux mécanismes de régulation.

Les cellules cancéreuses possèdent des caractéristiques qui vont permettre de les différencier par rapport aux cellules saines.

Elles ont en effet une histologie moins différenciée que le tissu d'origine, des limites peu nettes avec les tissus avoisinants, une tendance à l'envahissement et à la destruction, une activité proliférative importante, une morphologie cellulaire

anormale, une croissance théoriquement illimitée et une tendance à métastaser (LEVY V., LEVY-SOUSSAN M.).

Pour comprendre les différents types de cancers, il est nécessaire d'établir une classification selon la nature du tissu atteint par le phénomène cancéreux.

### I.3. CLASSIFICATION ANATOMOPATHOLOGIQUE (LARRA F.)

#### I.3.1. Les carcinomes ou épithélioma

On dénombre en général trois types de carcinome :

- les carcinomes épidermoïdes qui sont développés aux dépens d'un épithélium malpighien comme celui des bronches, de l'oropharynx ou du col utérin,
- les adénocarcinomes qui sont développés aux dépens d'un épithélium glandulaire comme celui du sein, du pancréas ou du tube digestif,
- les carcinomes paramalpighiens qui sont développés aux dépens d'un épithélium transitionnel comme celui des voies excrétrices urinaires.

#### I.3.2. Les sarcomes

Ils sont développés à partir du tissu mésenchymateux. Ils sont classés en fonction de leur tissu d'origine comme l'ostéosarcome pour l'os, le liposarcome pour le tissu graisseux, le fibrosarcome pour le tissu conjonctif.

#### I.3.3. Les tumeurs d'origine ectodermique

Parmi les tumeurs ectodermiques, on va distinguer :

- les tumeurs neuro-ectodermiques : ce sont les gliomes, les épendymomes, ou les tumeurs des plexus choroïdes,
- les tumeurs méso-ectodermiques : ce sont les méningiomes, les ganglioneuromes, les sympathoblastomes, ou encore les mélanomes par exemple.

#### I.3.4. Les tumeurs embryonnaires

On les classe selon leur degré de différenciation et on citera :

- les tumeurs peu différenciées comme le neuroblastome, le néphroblastome (tumeur de l'enfant), ou encore les choriocarcinomes (placentaires, testiculaires, ovariens) ;
- les tumeurs bien différenciées nommées tératomes.

#### I.3.5. Les tumeurs mixtes

Ce sont des tumeurs associant des structures diverses, elles sont plutôt rares.

### I.4. LA CELLULE CANCEREUSE

La cellule cancéreuse va se distinguer d'une cellule saine d'une part par ses anomalies morphologiques mais aussi par ses caractères dynamiques, et d'autre part par des anomalies de sa biochimie (LEVY V., LEVY-SOUSSAN M.).

#### I.4.1 La morphologie

Plusieurs anomalies morphologiques vont permettre de repérer le caractère cancéreux d'une cellule ou d'un groupe de cellules telles :

- les anomalies du noyau : il est souvent volumineux, irrégulier, multiple. Les nucléoles sont visibles et les anomalies chromosomiques sont fréquentes et souvent à type d'hyperploïdie ;
- les anomalies de la taille des cellules : elle est variable et hétérogène au sein d'une même tumeur ;
- les anomalies cytoplasmiques : le cytoplasme est souvent très basophile et il y a augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique ;
- les anomalies des mitoses : elles sont en général plus volumineuses que dans le tissu normal, avec désorientation du fuseau de division, voire divisions multipolaires ;
- les anomalies de la membrane cytoplasmique : il y a une perte de l'inhibition de contact (en culture les cellules continuent à proliférer et se chevauchent

même lorsque la surface de culture est couverte), modification de l'adhésivité (cela favoriserait le processus métastatique) et enfin, modification des antigènes de surface.

#### I.4.2. Caractères dynamiques

Le taux de multiplication des cellules cancéreuses est anormal, élevé, autonome, anarchique, fragile (importante mort cellulaire par hypoxie) et indéfini.

#### I.4.3. Anomalies biochimiques

L'activité de synthèse, de sécrétion, d'excrétion de la cellule cancéreuse est en général moindre que celle de la cellule normale du tissu d'origine (moindre différenciation).

Par ailleurs la dérégulation de certains gènes peut aboutir à la synthèse de substances en quantité et/ou qualité anormale (immunoglobulines (Ig)), hormones), ou de substances de type embryonnaire.

Des anomalies quantitatives des enzymes cellulaires normaux ont été décrites ainsi que des troubles de l'induction enzymatique et le phénomène de Warburg (accumulation d'acide lactique par glycolyse anaérobie et ce, même si la cellule est en condition d'oxygénation optimale).

### I.5 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA CARCINOGENESE

On définit le cancer comme une maladie, d'une part multifactorielle parce que de nombreux facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux peuvent concourir à son déclenchement et d'autre part multiphasique puisque le développement de la maladie est un phénomène prolongé dans le temps pouvant comporter plusieurs étapes.

Les facteurs étiologiques peuvent être des facteurs chimiques (tabac, alcool, alimentation, des facteurs professionnels (benzène, amines aromatiques, amiante, nickel, cadmium, chrome, hydrocarbures polycycliques, chlorure de vinyle, poussière de bois).

Il peut s'agir également de radiations ionisantes (rayons X et radiations émises par les corps radioactifs), de virus oncogènes (EBV, VHB, HTLV-1, HHV2, papillomavirus), de facteurs génétiques ou hormonaux (un déséquilibre hormonal peut par exemple être à l'origine d'un cancer du sein).



## I.6 MECANISMES MOLECULAIRES DE L'ONCOGENESE

### I.6.1 Les oncogènes et proto-oncogènes (ETIENNE J.)

Un oncogène est un gène capable de conférer le phénotype cancéreux à une cellule eucaryote.

Un proto-oncogène est un gène cellulaire capable d'être transformé, par suite d'une modification quantitative ou qualitative (mutation, translocation chromosomique) en oncogène. Nous possédons tous à l'état normal des proto-oncogènes qui pourront coder pour des protéines qui ne sont pas encore toutes connues à l'heure actuelle. L'action d'un proto-oncogène ou d'un oncogène est due à la protéine codée par ce segment d'ADN.

Chaque fois qu'un proto-oncogène est identifié, on va alors se poser les questions suivantes :

- Quelle protéine est codée par ce proto-oncogène dans les conditions normales ?
- Quel est à l'état physiologique, le rôle de cette protéine codée par le proto-oncogène ?
- Quelle sorte de modification (qualitative ou quantitative) peut transformer une protéine normale en une protéine oncogène ?

### I.6.2 Quelles sont les fonctions des protéines induites ? (TUBIANA M.)

La plupart des produits des oncogènes ou oncoprotéines représentent des formes anormales (par la quantité ou la qualité) de protéines intervenant dans l'une des étapes du contrôle de la prolifération et de la différenciation.

On peut classer les oncoprotéines en familles ou groupes selon leur localisation cellulaire et leur activité (ETIENNE J.).

On trouve :

#### 1. La famille des facteurs de croissance : sis

Un oncogène peut agir en codant la synthèse d'un facteur de croissance. Dans les tissus normaux, ceux-ci sont sécrétés par d'autres cellules que celles sur lesquelles ils agissent.

La cellule cancéreuse peut sécréter son propre facteur de croissance (stimulation autocrine), ce qui la rend autonome et court-circuite les mécanismes de régulation.

La sécrétion d'un facteur de croissance est observée au début de l'évolution de nombreux cancers.

## 2. La famille des récepteurs de facteurs de croissance : erb-B1, erb-B2, fms, kit

Certains oncogènes codent la synthèse d'un récepteur de facteur de croissance.

Il existe plusieurs variétés de récepteurs anormaux. Dans certaines tumeurs, le récepteur est tronqué et émet le signal même en l'absence de facteurs de croissance ; c'est le cas de l'oncogène erb-B1, qui est homologue du gène du récepteur de l'EGF, facteur de croissance jouant un rôle essentiel dans l'organisme.

## 3. La famille des protéines membranaires liant le GTP : ras et la famille des protéines non récepteurs à activité tyrosine kinase : src, abl

Ce troisième groupe d'oncogènes code pour les protéines impliquées dans la transduction du message de la membrane jusqu'au noyau.

En effet la fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur provoque dans la cellule une cascade de phénomènes biologiques que l'on groupe sous le nom de transduction et qui assurent le cheminement et l'amplification du signal entre le récepteur membranaire et l'ADN du noyau.

On distingue 2 sous-groupes :

- Le premier correspond aux protéines qui interviennent au niveau de la membrane.
- Le deuxième comprend plusieurs oncogènes qui codent pour des protéines kinases très voisines de celles intervenant normalement dans la transduction du signal et dont l'altération perturbe la transmission du signal.

Ces travaux ont mis en évidence l'importance cruciale des tyrosines kinases qui agissent sur plusieurs protéines et dont on ne mesurait pas l'importance dans la division cellulaire.

D'autres protéines kinases se trouvent placées à l'intersection de plusieurs circuits de transmission des signaux intracellulaires et leur perturbation désorganise plusieurs systèmes intervenant dans la régulation de la division cellulaire.

4. La famille des protéines nucléaires : cette famille regroupe des protéines qui agissent au niveau du noyau, ce sont des facteurs de transcription : jun, erb-A, myc, fos, myb, ski

Ce groupe d'oncogènes code pour des protéines intranucléaires qui se lient à l'ADN et contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la division et la différenciation cellulaire, jouant un rôle de chef d'orchestre.

On connaît aujourd'hui une douzaine d'oncogènes, tels les gènes myc et fos.

Le gène myc module par exemple l'expression d'un grand nombre de gènes. La transfection de ce gène dans des cellules à certaines phases de leur maturation bloque leur différenciation et stimule leur prolifération.

Le gène fos paraît intervenir dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans l'embryogenèse en modifiant l'expression de nombreux gènes.

5. La famille des protéines impliquées dans l'apoptose : bcl-2, fas

Le rôle de ces deux protéines sera détaillé plus loin.

### I.6.3. Le mécanisme d'activation des oncogènes (ETIENNE J.)

L'activation des oncogènes peut se faire par :

1. Intégration virale :

Par exemple dans le cas du virus de l'hépatite B (VHB), le virus s'insère au niveau d'un gène régulateur, et ceci aboutit à la formation d'un gène chimère donc d'une protéine hybride. L'apparition du carcinome hépatocellulaire survient plusieurs années après.

2. Mutation ponctuelle :

Elle peut avoir lieu dans une séquence codante pour un proto-oncogène.

Elle aboutit à des modifications fonctionnelles d'oncoprotéines.

3. Transposition/activation :

Cela aboutit à la recombinaison (lymphome de Burkitt) ou à la fusion de gènes (chromosome Philadelphie de la leucémie myéloïde chronique (LMC) faisant fusionner le gène bcr et le proto-oncogène c-abl).

#### 4. Amplification génique :

C'est la multiplication du nombre de copies d'un oncogène par 10 ou 100, aboutissant à une surexpression.

#### I.6.4 La régulation du cycle cellulaire (ETIENNE J.)

La progression de la cellule dans les différentes étapes du cycle cellulaire (synthèse d'ADN, préparation de la mitose, mitose) est contrôlée d'une part par une série de complexes protéiques associant une protéine kinase (il en existe 7) et une cycline (il en existe 8) et d'autre part par des inhibiteurs.

Ces systèmes garantissent que chaque phase importante du cycle soit terminée avant que la suivante ne commence.

Plusieurs gènes codant des cyclines sont des proto-oncogènes, par exemple les gènes prédisposant au mélanome codent normalement pour des inhibiteurs.

#### I.6.5 Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs (Etienne J.)

La présence des oncogènes est nécessaire pour qu'une cellule soit transformée et inversement, la présence dans une cellule de gènes suppresseurs empêche la cellule de devenir cancéreuse même si elle contient des oncogènes. La disparition de ces gènes constitue donc une étape capitale dans la carcinogénèse.

On connaît une dizaine de gènes suppresseurs. Le mécanisme d'action de certains d'entre eux est élucidé.

Un gène suppresseur, celui codant la protéine p53 est altéré dans 60% des tumeurs humaines.

La protéine p53 agit en régulant la transcription de plusieurs gènes. En cas d'agression génotoxique, la protéine p53 s'accumule dans les cellules, ce qui a plusieurs effets bénéfiques.

Elle permet tout d'abord le blocage de la cellule dans le cycle en raison de la synthèse de la protéine p21. Cet arrêt de la progression de la cellule dans le cycle cellulaire donne à la cellule le temps de réparer les lésions de l'ADN.

Quand les lésions de la cellule ne sont pas réparées, les effets de la p53 protègent l'organisme par un autre mécanisme, en provoquant la mort cellulaire par apoptose.

En outre la p53 intervient dans la détection et la réparation de certaines lésions de l'ADN.

La mutation de la p53 fait disparaître ce rôle protecteur et induit une instabilité génétique favorisant l'apparition de lésions du génome. De plus la forme

mutante peut avoir des propriétés de promotion et favoriser l'évolution vers un cancer.

Un autre proto-oncogène, bcl 2 est un facteur de survie cellulaire, il inhibe l'apoptose. Sa dérégulation favorise l'accumulation de mutations dans une cellule.

#### I.6.6 Systèmes de réparation de l'ADN (ETIENNE J.)

A côté des oncogènes et des gènes suppresseurs, une troisième classe de gènes joue un rôle important dans la cancérogénèse, ceux qui interviennent dans la réparation de l'ADN.

La rareté des mutations dans les cellules normales est due à l'existence de mécanismes de contrôles sévères.

L'accroissement de la mutabilité et des erreurs est dû à une altération des mécanismes de détection et de réparation des erreurs survenues au cours de la synthèse d'ADN.

En effet les cellules normales sont constamment exposées à des agents mutagènes endogènes (radicaux libres et autres agents d'oxydation formés au cours du métabolisme cellulaire normal) et exogènes (colorants de l'alimentation, solvants, fumée de tabac, radiations ionisantes, polluants de l'environnement) ; avec l'âge les systèmes de réparations sont moins efficaces, les gènes responsables sont altérés et les lésions qui auraient été réparées ne le sont pas et sont fixées dans le génome.

En conclusion, le cancer apparaît comme un phénomène essentiellement plurifactoriel, aboutissement de la coopération entre de nombreux gènes, conférant à la cellule un phénotype original.

A l'origine monoclonale, la prolifération tumorale, par de nombreuses mutations, devient hétérogène, acquérant des capacités de pouvoir d'invasion, de métastases, de résistance à la chimiothérapie.

#### I.7 NOTIONS DE CROISSANCE TUMORALE (LARRA F.)

Une tumeur peut être schématiquement représentée comme comportant 3 compartiments :

1. Un compartiment composé de cellules en division.
2. Un compartiment composé de cellules quiescentes.

3. Un compartiment composé de cellules incapables de se diviser donc destinées à mourir.

Trois paramètres permettent de définir la cinétique de croissance d'une tumeur :

1. Le coefficient de prolifération cellulaire : c'est le pourcentage de cellules dans le cycle par rapport à l'ensemble des cellules tumorales.
2. Le coefficient de pertes cellulaires : il représente les cellules perdues par la tumeur, qui se desquament, qui meurent ou qui se disséminent.
3. La durée du cycle cellulaire : ce paramètre a moins d'importance que les deux premiers.

Plus le coefficient de prolifération est important, plus le pourcentage de perte est faible, plus le temps de doublement est court.

## I.8 MODES DE PROPAGATION DES TUMEURS

L'extension locale, régionale et métastatique est une des caractéristiques de la tumeur maligne.

### I.8.1 Extension locale

Les cellules possèdent une mobilité accrue, une perte de l'inhibition de contact, une moindre cohésion et ont tendance à infiltrer les tissus adjacents. La sécrétion de substances diverses favorise cette progression comme :

- les facteurs d'angiogénèse (facteur sécrété par les cellules cancéreuses : TAF ou tumor angiogenic factor),
- les facteurs toxiques induisant une nécrose cellulaire,
- les facteurs protéolytiques entraînant la destruction de l'élastine du collagène, l'activation de la coagulation ou de la lyse locale.

### I.8.2 Extension régionale

Elle est favorisée par des facteurs mécaniques (pression de la tumeur sur les organes de voisinage), des modifications de la vascularisation régionale, la nature du tissu d'origine (importance du stroma péri-tumoral, de la réaction inflammatoire).

L'infiltration va se faire le long des gaines des nerfs, des vaisseaux, des aponévroses en les envahissant.

Les structures les plus résistantes à l'infiltration tumorale sont le cartilage, la sclérotique, les parois vasculaires, les structures tendineuses et aponévrotiques.

### I.8.3 Extension métastatique

La métastase est la conséquence de l'implantation dans un tissu ou un organe, à distance de la tumeur primitive, de cellules tumorales viables.

Il existe différentes voies de dissémination :

- dissémination lymphatique

C'est la plus fréquente car les tissus lymphatiques par leur structure discontinue, opposent peu de résistance à l'envahissement.

- dissémination hématogène

Elle caractérise les sarcomes mais peut se voir aussi dans les carcinomes.

- autres voies de dissémination

Les cellules tumorales peuvent également migrer dans les séreuses, c'est le cas dans le cancer de l'ovaire, du colon avec carcinose péritonéale.

Ainsi sont définis brièvement le cancer, ses différentes formes, les caractères de la cellule cancéreuse, la physiopathologie, les mécanismes moléculaires de l'oncogenèse et les propriétés des oncogènes.

## II. LES MECANISMES DE LA CANCEROGENESE (VANIO H., MAGEE P.N)

Le cancer est une maladie multifactorielle en raison des nombreux facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux qui peuvent concourir à son déclenchement et multiphasique puisque le développement de la maladie est un phénomène prolongé dans le temps pouvant comporter plusieurs étapes.

## II.1. LA PHASE D'INITIATION

On attribue au cancer une origine clonale, à partir d'une cellule somatique dont les mécanismes régulateurs de la croissance, de la différenciation, de la prolifération cellulaire vont être gravement perturbés ; de plus, les caractères nouveaux acquis par cette cellule devront être transmis à la descendance. Cette théorie implique que l'événement initiateur ait lieu au niveau du génome de la cellule.

Plusieurs mécanismes interviennent dans l'initiation des cellules, c'est à dire dans la formation d'altérations génétiques stables et transmissibles aux cellules filles, ce qui confère un caractère d'irréversibilité à cette première phase du processus cancérogène.

Les altérations génétiques sont de différents types selon qu'il s'agisse de mutations géniques, d'aberrations et remaniements chromosomiques ou de dommages primaires de l'ADN.

Rappelons qu'il existe chez l'homme, un bruit de fond mutagène (mutations spontanées) dû à certains mécanismes endogènes tels que la production de radicaux libres, les erreurs de la réplication de l'ADN ainsi que l'exposition naturelle à l'environnement.

Par contre l'exposition à des agents cancérogènes spécifiques entraîne des mutations induites dont celles qui touchent les oncogènes (les gènes *apc* et *cdc* dans le cancer du côlon et les gènes *brca 1* dans le cancer du sein) et les gènes suppresseurs des tumeurs (exemple : le gène *p53*). Dans les 2 cas, la probabilité néoplasique est augmentée.

Les cancérogènes chimiques peuvent aussi provoquer des altérations primaires de l'ADN telles que la formation de bases alkylées (agents alkylants), des coupures de brins d'ADN, des partages intra et inter-brins. Les radicaux libres oxygénés participent largement à la production d'altérations de l'ADN.

Cependant la formation de lésions génotoxiques dans une cellule est conditionnée par deux mécanismes cellulaires très importants : les capacités de métabolisation des agents chimiques et l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN.

Selon la nature chimique, une molécule peut soit réagir directement avec l'ADN comme dans le cas d'agents physiques (nitroso-urés, agents alkylants), soit être métabolisée en dérivés actifs pour exercer un effet génotoxique.



Les métabolisations de toutes les substances xénobiotiques sont assurées par des enzymes hépatiques telles que les monooxygénases à cytochrome P450, les glutathion 5-transférases, ou encore les UDP-glucuronyl transférase.

C'est donc bien l'équilibre des systèmes enzymatiques impliqués dans l'activation métabolique et la détoxification des cancérogènes chimiques qui est évidemment crucial puisqu'il détermine le pouvoir cancérogène réel de la molécule, une fois celle-ci absorbée par l'organisme.

Les mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN endommagé constituent un système efficace de protection contre l'initiation des cellules, plus de 85 % des lésions de l'ADN sont ainsi éliminées par un mécanisme de réparation fidèle dit d'excision-resynthèse.

Ce sont également des systèmes enzymatiques qui éliminent les lésions et restaurent l'intégrité fonctionnelle et structurale de l'ADN.

## II.2. LA PHASE DE PROMOTION

Les cellules initiées peuvent persister dans l'organisme à l'état latent pendant une longue période, sans exprimer leurs potentialités oncogènes. Le passage des cellules initiées, d'un état quiescent à un état prolifératif nécessite l'intervention d'autres facteurs et d'autres mécanismes.

Dans le schéma actuel de développement de la cancérogénèse, l'expression clonale des cellules initiées qui aboutit à la formation de lésions précancéreuses se produit au cours de l'étape de promotion tumorale.

La phase de promotion tumorale se distingue de la phase d'initiation par plusieurs caractères :

- Elle requiert une séquence ne pouvant être efficace qu'après l'initiation ;
- Elle peut être réversible, ce qui permet d'envisager à ce niveau d'éventuelles actions de prévention du développement tumoral ;
- Elle est spécifique de certains organes comme le TPA (tétradécanoyl phorbol acétate) qui est un promoteur des tumeurs de la peau, le phénobarbital, promoteur tumoral du foie et la saccharine (à forte dose), promoteur tumoral de la vessie.
- Elle n'est efficace qu'au-delà d'un certain seuil, alors que l'initiation ne requiert théoriquement qu'une seule molécule active ou un seul événement génotoxique ;
- Elle recouvre l'ensemble des mécanismes non génétiques (ou épigénétiques) qui permettent l'expression des lésions génomiques.

Bien que les mécanismes déterminants du phénomène de promotion tumorale ne soient pas connus avec certitude, on admet qu'ils participent à la régulation de la prolifération, à la différenciation cellulaire et à l'expression des gènes.

De nombreuses hypothèses ont été envisagées comme :

- Les perturbations des mécanismes de signalisation cellulaire, ainsi que la présence dans une cellule d'oncogènes actifs qui entraînent l'activation des mécanismes de signalisation.  
Les cellules reçoivent alors en permanence des signaux de croissance.
- L'inhibition des capacités de communication intercellulaire.  
Elle conduit à l'isolement de clones de cellules initiées qui échappent alors aux mécanismes de régulation de cellules normales et peuvent ainsi proliférer sans contrainte.
- La production de radicaux libres oxygénés provenant du métabolisme cellulaire.  
Elle a été mise en cause dans les mécanismes de promotion tumorale ainsi que dans la peroxydation des lipides par des facteurs exogènes.

En fait la promotion peut être définie comme une altération tardive dont l'effet carcinogène ne se fera sentir que sur une cellule dont l'ADN a déjà subi un ou plusieurs effets mutagènes antérieurs dits « initiateurs ».

Les effets mutagènes pourraient agir non pas par une mutation mais par l'induction de l'expression d'un gène préalablement muté sous l'effet d'un initiateur mais resté silencieux jusque là dans la cellule.

### II.3. PHASE DE PROGRESSION ET D'INVASION

L'acquisition définitive de la malignité s'effectue au cours d'une phase de progression, moins bien connue que les précédentes, qui aboutit à l'émergence clinique de la tumeur.

Cette étape met en jeu, à nouveau, des mécanismes génétiques qui vont contribuer à fixer de manière irréversible les lésions génomiques, orientant définitivement la machinerie cellulaire vers l'état tumoral.

Cette phase se caractérise par une grande instabilité génomique faisant appel à des remaniements de gènes et/ou de chromosomes, à des translocations, des recombinaisons, des amplifications de gènes.

Des mutations de protooncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs sont également impliquées.

En effet, de nombreux protooncogènes, tels que les gènes *apc* et *ddc* dans le cancer du côlon, *brca 1* dans le cancer du sein, activés par différents types de mutations ou sur-exprimés acquièrent des potentialités oncogéniques en favorisant la prolifération cellulaire.

L'inactivation ou la perte de gènes suppresseurs de tumeurs, (le plus connu est le gène de la protéine p53), empêche le contrôle négatif de la croissance des cellules tumorales tel qu'il se produit dans un organisme sain. Dans les 2 cas, la probabilité de transformation néoplasique est augmentée.

La dernière phase est celle de l'invasion et de la dissémination des cellules tumorales s'échappant de leur organe d'origine pour migrer vers d'autres tissus et former des métastases.

Ce modèle initiation-promotion-progression ne rend certes pas compte de toute la complexité des mécanismes conduisant à la formation d'une tumeur maligne mais, il représente, à l'heure actuelle, un schéma généralement admis conciliant les données issues de la cancérogenèse expérimentale et celles de la cancérologie humaine.

#### II.4. INTERACTIONS DES FACTEURS ALIMENTAIRES AVEC LES MECANISMES DE LA CANCEROGENESE

Avec une meilleure connaissance des divers mécanismes mentionnés ci-dessus, il serait possible de mieux comprendre quel est le rôle et l'impact des facteurs alimentaires sur les différentes étapes du processus tumoral.

Quelques-unes des hypothèses actuelles de recherche concernant le mode d'action des facteurs alimentaires se rattachent à la modulation de l'activité de systèmes enzymatiques de métabolisation des cancérogènes.

En effet, certains minéraux et certaines vitamines peuvent d'une part inhiber les enzymes à cytochrome P450 responsables de l'activation métabolique, et d'autre part induire les enzymes de conjugaison qui assurent la détoxification de substances xénobiotiques.

Différents points sont étudiés et concernent :

- la protection de la molécule d'ADN en agissant contre l'action pro-oxydante des radicaux libres par des agents anti-oxydants,

- la lutte contre les effets délétères des radicaux libres par les vitamines et les minéraux,
- la perturbation de la transmission de signaux entre l'environnement et la cellule ou de cellule à cellule,
- l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs,
- la régulation des mécanismes de prolifération et de différenciation cellulaire.

### III. EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS

D'après l'INSERM, 250 000 nouveaux cas de cancer environ étaient diagnostiqués en 2000 en France.

60 % surviennent avant l'âge de 70 ans et 150 000 décès environ par an sont dus à cette maladie.

Les thérapeutiques médicales, radiothérapeutiques, chirurgicales proposées aux malades ont une efficacité d'autant plus importante qu'elles sont appliquées précocement.

Il est donc normal que l'une des grandes voies d'approche des cancers soit le souci du diagnostic précoce d'une part et d'autre part la prévention primaire comme par exemple la lutte contre l'alcoolisme ou le tabagisme et une meilleure connaissance des relations possibles entre l'alimentation et le cancer.

#### III.1. EVOLUTION DE LA MORTALITE PAR CANCER EN FRANCE AU COURS DES QUARANTE DERNIERES ANNEES

L'évolution de la mortalité par cancer en France, de 1950 à 1990 est retracée par la figure suivante. On note une différence importante selon le sexe.

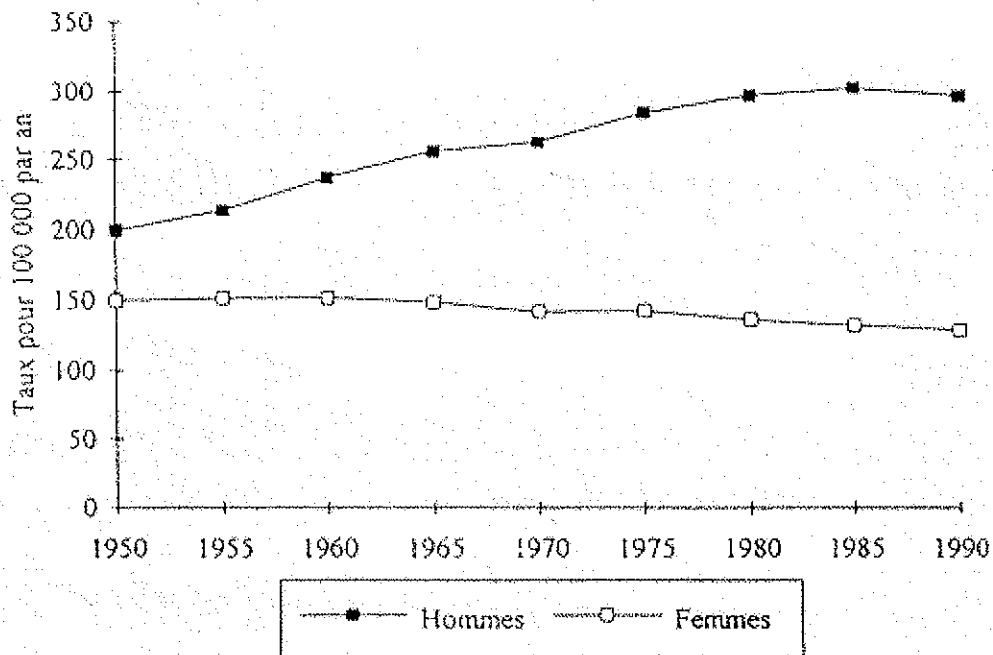


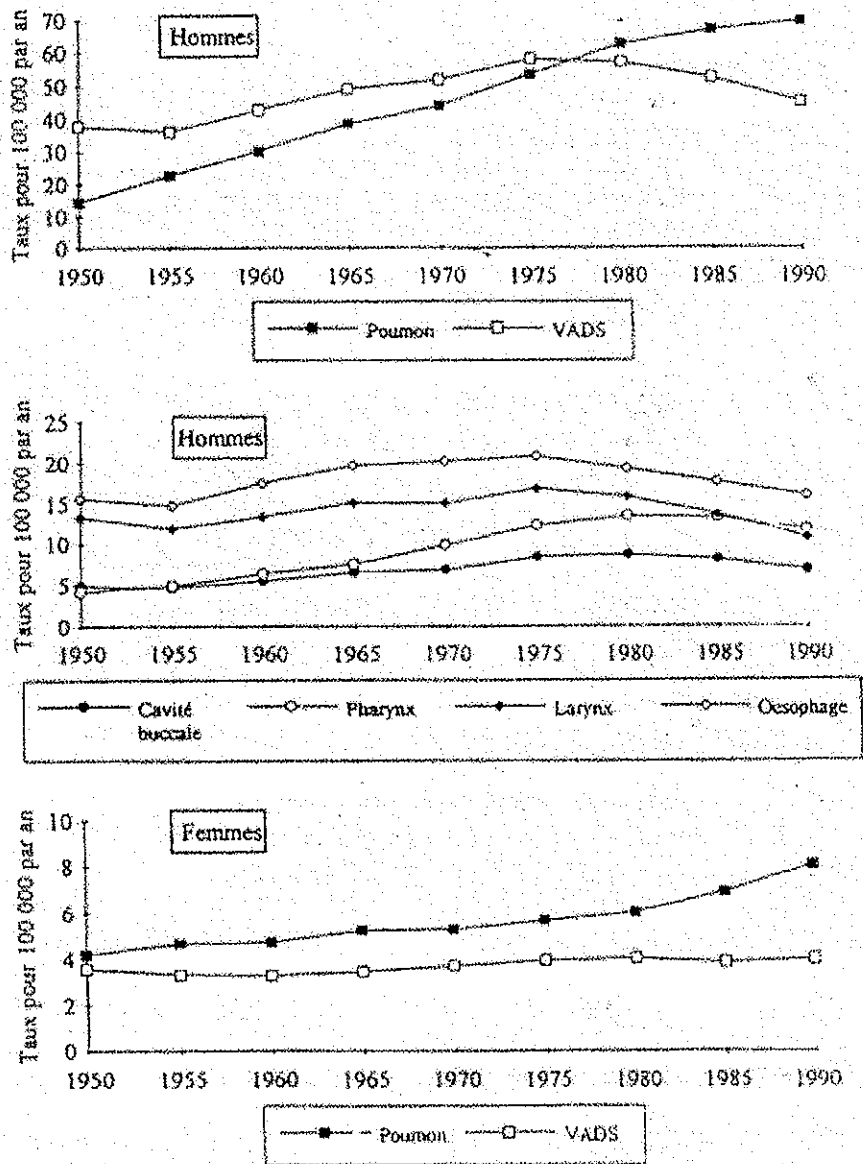
Figure 1 : Evolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à 1990 (HILL C.)

Pour la population masculine (tous âges confondus), l'augmentation de mortalité globale par cancer est constante de 1950 à 1985 (+ 49%) alors qu'elle a baissé de 14% chez les femmes depuis 1960.

Ces tendances globales recouvrent en réalité de grandes différences lorsque l'on considère l'évolution individuelle de chaque type de cancer. Il faut affiner ces résultats avec les données relatives à chaque organe.

Jusqu'à maintenant, la progression du cancer des voies respiratoires touche particulièrement la population masculine, en relation avec l'usage du tabac et de l'alcool.

L'accroissement de la mortalité par cancer du poumon est spectaculaire (cf fig.2).



Les données sont exprimées en taux standardisé par âge sur la population standard européenne.

Figure 2 : Evolution de la mortalité par cancer du poumon et des voies aéro-digestives supérieures en France de 1950 à 1990 (HILL C.)

Outre le cancer du poumon, deux cancers sont particulièrement importants en France, ce sont les cancers de l'œsophage et du larynx.

De 1950 à 1975, on note une augmentation de la mortalité et de 1975 à 1990, on observe une décroissance, ce qui fait que le taux de mortalité en 1990 se rapproche de celui observé en 1950.

En 1990, le taux de mortalité par cancer du pharynx a rejoint celui du larynx.

La mortalité due à ces types de cancer est particulièrement faible dans la population féminine.

Cependant, on note chez les femmes, une augmentation continue et sensible du cancer du poumon dont le taux est multiplié par 2 depuis 1950, en raison du développement du tabagisme.

En ce qui concerne les cancers digestifs, (fig.3) on observe une diminution très importante du cancer de l'estomac qui était, en 1950, responsable d'un taux de mortalité très élevé chez l'homme et moindre chez la femme. Ces taux diminuent dans les 2 cas de 75% en 1990.

Cette diminution sensible est due, entre autre, à l'utilisation des réfrigérateurs qui ont permis de stocker les aliments en évitant le développement de bactéries (*Helicobacter Pylori*) responsable de l'apparition de cancer de l'estomac.

On note également une certaine baisse de la mortalité par cancer de l'intestin (colon et rectum) surtout sensible chez la femme.

Chez l'homme, une augmentation continue a eu lieu jusqu'en 1980, atteignant son maximum, et depuis cette date, on assiste à une légère réduction du taux de mortalité jusqu'en 1990.

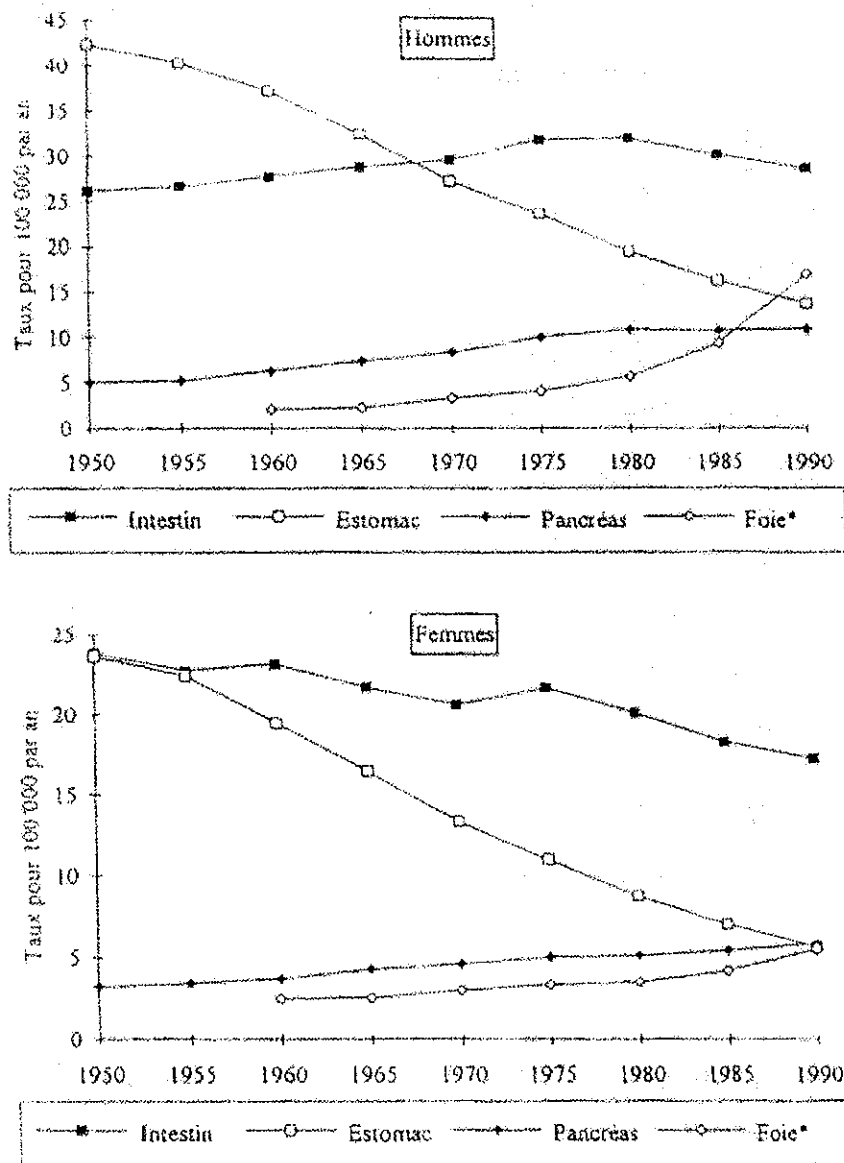
En dépit de cette tendance à la baisse, le cancer de l'intestin reste néanmoins un des cancers les plus meurtriers.

Le cancer du pancréas est responsable d'un taux de mortalité relativement faible mais en progression constante de 1950 à 1990, aussi bien chez les hommes (+ 114%) que chez les femmes (+ 80%).

Les cancers du foie et des voies biliaires sont également en forte augmentation chez l'homme surtout depuis 1980 (+ 143% de 1980 à 1990).

Parmi les cancers du système reproducteur, l'augmentation la plus importante et la plus préoccupante est celle du cancer du sein et de la prostate (fig.4).

La progression des cancers de l'ovaire est également importante.

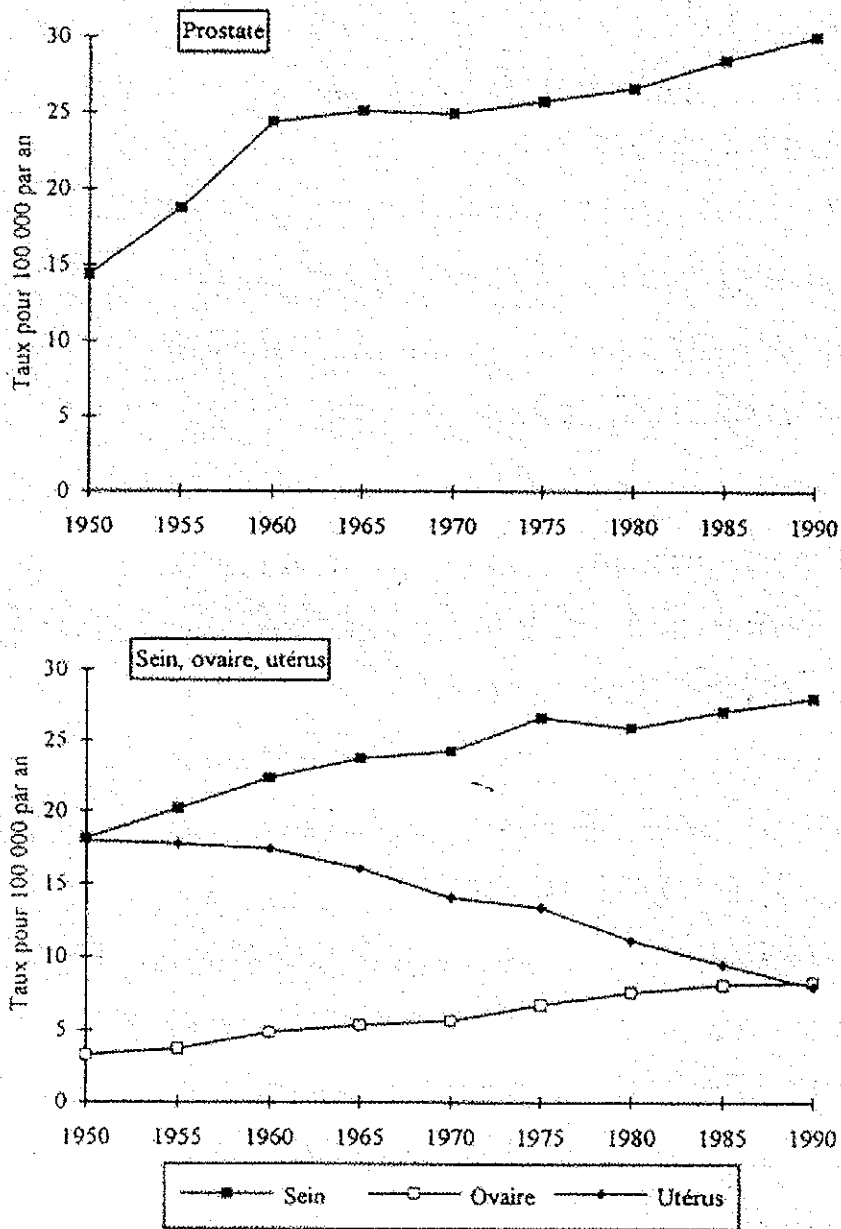


\* Foie : foie + voies biliaires intra et extra-hépatiques.

Les données sont exprimées en taux standardisé par âge sur la population standard européenne.

Figure 3 : Evolution de la mortalité par cancers digestifs en France de 1950 à 1990 (HILL C.)





Les données sont exprimées en taux standardisé par âge sur la population standard européenne

*Figure 4 : Evolution de la mortalité par cancer des organes du système reproducteur en France de 1950 à 1990 (HILL C.)*

Les taux de mortalité en 1980 ont plus que doublé par rapport à ceux enregistrés en 1950.

Toutefois, une très légère diminution de la mortalité par cancer de l'ovaire est notée depuis 1988.

Seul le cancer du col de l'utérus a vu sa mortalité diminuer grâce notamment au dépistage précoce mis en place.

### III.2. SITUATION DE LA FRANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES PAYS OCCIDENTAUX

Pour évaluer l'importance des taux d'incidence de certains cancers, il est utile de comparer entre eux des pays présentant les mêmes caractéristiques.

Il a été ainsi établi que des différences existent entre le Nord et le Sud de l'Europe, quant aux types de cancer les plus représentés.

La mortalité générale par cancer toutes localisations confondues est plus faible dans les pays du Sud de l'Europe.

Des différences dans les habitudes de consommation alimentaire ont été relevées, donnant lieu au concept d'alimentation méditerranéenne pour les pays du Sud mais il n'est pas possible de généraliser à tous les types de cancer cette opposition Nord/Sud.

D'une manière globale, le taux d'incidence des cancers (toutes localisations) chez les hommes est plus élevé en France (310/100000) que dans la plupart des autres pays européens et il est du même ordre que celui enregistré aux Etats Unis ; par contre chez les femmes, ce taux (208/100000) correspond à celui de la moyenne des pays européens et il est très inférieur à celui des Etats-Unis.

Certaines localisations cancéreuses sont prédominantes en France comme on peut le voir sur les figures qui suivent (DECLOITRE F.).

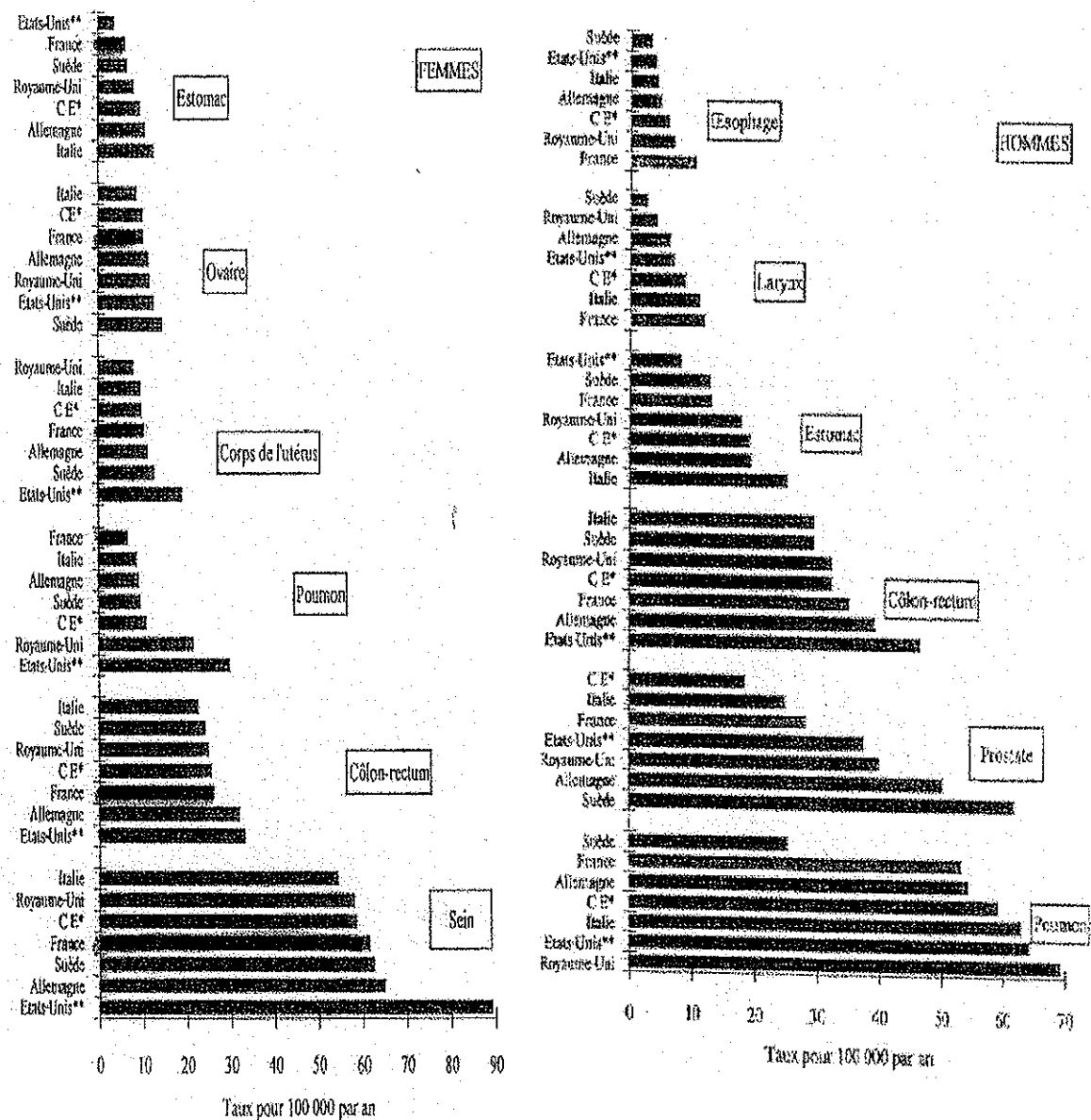


Figure 5 : Taux d'incidence de certains cancers chez les femmes (schéma de gauche) et les hommes (schéma de droite) dans quelques pays occidentaux (DECLOITRE F.)

**Légende :** \*\* Données du programme SEER du National Cancer Institute pour la population blanche  
 \* Communauté européenne des douze (avant 1992)

Les données sont exprimées en taux standardisé par âge sur la population standard mondiale.

Pour les États-Unis (période 1983-1987), et pour les autres pays, estimation pour l'année 1990.

### III.3. LE CANCER AUJOURD'HUI

#### III.3.a. Situation actuelle en France

La première place dans la mortalité par maladie en France fut pendant une quarantaine d'années détenue par les maladies cardio-vasculaires.

Cependant depuis 1988, le cancer arrive désormais en tête des causes de mortalité par maladie dans la population masculine tous âges confondus, alors que dans la population féminine, il conserve la deuxième place.

Ce résultat global doit pourtant prendre en compte l'âge des populations car si ces deux pathologies sont considérées comme liées au vieillissement, la mortalité par cancer touche une population sensiblement plus jeune.

Pour les moins de 75 ans, chez les hommes, on enregistre presque deux fois plus de décès par cancer que par maladies cardio-vasculaires comme le montre le tableau suivant.

Au-delà de 75 ans, chez les hommes et les femmes, la mortalité par maladies cardio-vasculaires dépasse celle par cancer.

	0-14 ans	15-34 ans	35-54 ans	55-74 ans	>75 ans	Tous âges
<b>HOMMES</b>						
<i>Cancer</i>	235	754	9775	<b>41313</b>	<b>32125</b>	84202
<i>MCV</i>	96	434	2652	<b>13895</b>	<b>35556</b>	52633
<i>Infarctus</i>	3	115	2149	<b>10522</b>	<b>13935</b>	26724
<i>SIDA</i>	22	882	1179	265	27	2375
<i>Accidents</i>	840	7802	7153	6395	6849	29039
<i>Toutes causes</i>	4769	12415	30315	94267	130898	272664
<b>FEMMES</b>						
<i>Cancer</i>	168	607	5333	<b>19200</b>	<b>28438</b>	53746
<i>MCV</i>	75	255	1055	<b>7797</b>	<b>63441</b>	72623
<i>Infarctus</i>	0	22	271	<b>3604</b>	<b>18667</b>	22564
<i>SIDA</i>	16	205	106	62	21	410
<i>Accidents</i>	511	2003	2330	3142	11229	19215
<i>Toutes causes</i>	3346	4170	12361	45190	188470	253537

*Tableau 1 : Données en nombre absolu de décès (Statistiques de l'INSERM, 1990)*

Légende : MCV=maladies cardio-vasculaires (hors infarctus et cardiopathies ischémiques).

**III.3.b. Données concernant la mortalité par cancer en France**  
(HILL C.)

Les cancers constituent la première cause de mortalité chez les hommes qui meurent 2,3 fois plus de cancer que les femmes comme le montre le tableau 2.

Le taux de mortalité par cancer pour 100 000 habitants de tout âge standardisé sur la population standard européenne, calculé en 1990 est de 298,2 pour 100 000 chez les hommes et de 129 pour 100 000 chez les femmes.

<b>LOCALISATION DES CANCERS</b>	<b>HOMMES</b>	<b>FEMMES</b>
<b>Tous cancers</b>	<b>298,2</b>	<b>129</b>
Poumons (et trachée, bronches, plèvre)	70	8,1
Larynx	10,8	0,5
Œsophage	16	1,7
Autres VADS (Cavité buccale et pharynx)	18,5	1,9
<b>Cancers des voies respiratoires et des VADS</b>	<b>115,3</b>	<b>12,2</b>
Estomac	13,7	5,6
Intestin (côlon, rectum et intestin grêle)	28,7	17,2
Pancréas	10,9	5,8
Foie et voies biliaires intra et extrahépatiques	16,9	5,5
<b>Cancers des organes du système digestif</b>	<b>70,2</b>	<b>34,1</b>
Prostate	30	-
Sein	0,5	28,1
Ovaire	-	8,3
Utérus (col, corps et choriocarcinome)	-	8,1
<b>Cancers des organes du système reproducteur</b>	<b>30,5</b>	<b>44,5</b>
Cancers des voies urinaires (vessie et rein)	17,9	4,8
Cancers lymphoïdes et hématopoïétiques	18,2	11,1
Autres cancers	46,1	22,3

*Tableau 2 : Taux de mortalité tous cancers selon le sexe en France en 1990*  
(HILL C., Données INSERM, 1993)

D'après ce tableau, chez les hommes, le taux de mortalité par cancer du poumon et des voies aérodigestives supérieures (VADS) est particulièrement élevé (39% de la mortalité générale par cancer).

Dans cette catégorie, le cancer du poumon arrive largement en tête, responsable à lui seul de 23,5% des décès dus au cancer.

Parmi l'ensemble des cancers digestifs, le cancer de l'intestin (côlon et rectum) est le plus meurtrier (9,6% de la mortalité générale par cancer).

Les autres cancers digestifs, foie et voies biliaires, estomac et pancréas interviennent pour 5,7 ; 4,6 ; 3,7% respectivement.

Enfin le cancer de la prostate constitue la seconde cause importante de mortalité par cancer chez l'homme (10,1%) après le cancer du poumon.

Chez les femmes, l'importance relative des divers types de cancers est complètement différente.

Ce sont les cancers du système reproducteur et particulièrement le cancer du sein qui sont au premier rang des causes de mortalité par cancer (34,5 et 21,8% de l'ensemble des cancers).

Les cancers de l'ovaire et de l'utérus (col et corps) représentent 6,4 et 6,3% de la mortalité par cancer et se situent au 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> rang.

Au 2<sup>ème</sup> rang se trouve le cancer de l'intestin (côlon et rectum) représentant 13,3% de la mortalité par cancer.

Les autres cancers digestifs (estomac, pancréas, foie et voies biliaires) contribuent pour 4 à 5 %.

Le cancer du poumon qui est au 3<sup>ème</sup> rang chez les femmes est en très forte augmentation.

Les cancers du larynx et de l'œsophage ne concernent que 1,7% de la mortalité.

Les oncologues français, lors du congrès d'Eurocancer 2001 viennent d'insister sur les progrès tangibles.

Tous cancers confondus, la mortalité diminue de 0,8 % chaque année.

En 10 ans, la mortalité par cancer du sein a baissé de plus de 20%, ce qui donne un rythme annuel de 2%.

Une réduction de mortalité est également communiquée pour la prostate, le côlon et le col utérin. Un succès dû au progrès du dépistage et des traitements classiques, chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie.

Des avancées encore plus nettes sont attendues dans la prochaine décennie, avec la carte d'identité tumorale, les données du polymorphisme génique et les traitements ciblés non cytotoxiques. Ainsi on attend une guérison de 80% des cancers, au lieu de 50% actuellement (CHARENT I.).

## IV. LE RESVERATROL

### IV.1. INTRODUCTION

La faible incidence de maladies cardiovasculaires en France par rapport aux autres pays développés a fait naître le terme de « french paradox » dans les années 70 (SAINT-LEGER A.S. et als). Ce bénéfice sur la santé, a incité les scientifiques à rechercher les molécules responsables de « cette protection cardiovasculaire ».

Beaucoup de substances naturelles ont été mises en évidence parmi lesquelles le resvératrol.

Cette molécule est présente dans de nombreuses plantes et elle est avant tout synthétisée par la plante pour se défendre lors d'une attaque fongique. C'est la présence de cette molécule dans le vin à des concentrations non négligeables qui a conduit de nombreux chercheurs à l'étudier.

Ainsi dans ce travail, l'accent a été plus particulièrement mis sur le vin et les bienfaits qu'il pourrait avoir sur la santé de par la présence de resvératrol.

Les recherches portant sur les maladies cardiovasculaires ont apporté des certitudes sur le rôle d'une consommation modérée d'alcool et de vin dans la prévention de ces maladies conduisant même dans certains pays à une évolution des recommandations gouvernementales en matière de consommation.

Les études concernant les effets du resvératrol dans le cancer n'ont apporté, pour le moment, que des hypothèses. La complexité de cette maladie et les mécanismes provoquant les différentes formes de cancer, ne simplifient pas les recherches.

Cependant, il semblerait, d'après les premières études expérimentales et épidémiologiques, qu'une consommation modérée de vin pourrait jouer un rôle dans la diminution du risque de certains cancers.

De l'avis d'un certain nombre de chercheurs, davantage d'études seront nécessaires pour adopter une position plus tranchée sur le lien entre le vin et le cancer, d'autant que l'on sait qu'une consommation excessive d'alcool augmente les risques. D'ores et déjà, les propriétés anti-oxydantes du vin sont citées comme étant l'une des hypothèses pouvant expliquer ce lien.

L'équipe du professeur Pezzuto, a montré que le resvératrol bloque les principales étapes de la cancérogenèse tant au niveau de l'initiation, du développement que de la progression des tumeurs (JANG M et als, 1997).

Même si aucune étude clinique n'a encore vérifié chez l'homme le potentiel de ce composé phénolique, on peut imaginer d'ores et déjà, que le resvératrol joue un rôle dans la prévention des cancers.

#### IV.2. DECOUVERTE DE LA MOLECULE DE RESVERATROL

Le resvératrol, d'abord appelé 3,5, 4'-trihydroxystilbène semble avoir été pour la première fois isolé par Takaoka en 1940 d'espèces de Lys (Liliacées) et il était alors nommé par sa formule chimique ou tout simplement « takaoka' compound » (Hatway D.E, Seakins J.W.T).

En 1963, la présence de resvératrol, a été signalée comme principe actif d'un ancien remède chinois et japonais appelé « Kojo kon » ou « Koji jon » ou encore « Ko-jo-kon ». Il s'agit de la poudre de rhizome de *Polygonum cuspidatum*.

Originaire de Chine, où on la nomme « HU ZHANG (HZ) » ou encore « HU CHANG », c'est une plante appartenant à la famille des Polygonacées. Elle a ensuite migré vers le Japon où elle est connue sous le nom de « Kojo Kon ».

*Polygonum cuspidatum* se rencontre aussi dans le Nord de l'Amérique. La variété qui pousse aux Etats Unis est référencée sous le nom de *mexican bamboo*, *japanese bamboo* ou *japanese knotweed* (VASTANO B.C et als).

Dans la médecine traditionnelle chinoise, elle a pour effet (YAN X et als) de supprimer l'état fébrile, les substances toxiques du corps et faciliter la circulation sanguine. Elle sera indiquée dans les douleurs osseuses et tendineuses dues à l'humidité, dans la jaunisse, les écoulements vaginaux, les douleurs menstruelles, les écoulements et les collections de pus, dans les engourdissements, les paralysies, dans les coups et les chutes, les brûlures, dans les maladies inflammatoires et allergiques, l'athérosclérose, l'hyperlipidémie et le lichen.

Trois autres plantes chinoises contiennent du resvératrol (YAN X et als), il s'agit de :

- *Ampelopsis brevipedunculata* ou SHE PU TAO  
(Vitacées)
- *Veratrum nigrum* L. var- *ussurrense* Nakai ou WU SU LI LI LU  
(Liliacées)
- *Gnetum parvifolium* (warb.) C.Y. Cheng ou XIAO YE MAIMA TENG  
(Gnetacées)

De même, l'analyse d'une préparation indienne à base de plantes appelée « darakchasava » connue chez les hindoues pratiquant l'Ayurveda ou « science



de la vie », la médecine traditionnelle en Inde, révèle dans sa composition la présence de polyphénols dont le resvératrol et le pterostilbène (PAUL B, MASIH I).

Cette potion composée en grande partie à partir de baies de raisin séchées sert pour le traitement de plusieurs maux comme les maladies cardiaques, l'anémie, les tumeurs, la tuberculose, la perte d'appétit, l'épistaxis. C'est aussi un diurétique, un antipyrétique, un stimulant.

Langcake et Pryce (LANGCAKE et als) détectèrent pour la première fois le resvératrol dans la vigne (*Vitis vinifera*) en 1976 ; ils trouvèrent que le composé était synthétisé par les tissus des feuilles en réponse à une infection fongique, (principalement *Botrytis cinerea*) ou à une exposition aux ultraviolets.

La découverte du resvératrol dans le vin date de 1992, par les américains Siemann et Creasy et c'est en 1997 qu'on lui associera pour la première fois des propriétés anti-cancéreuses.

Son glycoside, le picéide a été découvert dans le vin en 1994. Depuis cette mise en évidence capitale dans le vin, les études concernant le resvératrol ont pris énormément d'ampleur.

Une revue publiée en 1972 (INGHAM JL) a recensé sa présence et sa distribution dans de nombreuses espèces végétales. Le resvératrol se retrouve seulement parmi les Spermatophytes (plantes à fleurs et à graines), espèces herbacées ou ligneuses.

Dans le sous-embranchement des Gymnospermes (plantes dont la graine est nue), le resvératrol a été signalé dans :

- Les Pinaceae : les épicéas, *Pinus sp* comme *Picea abies* (racine) et *Picea excelsa*

Dans le sous embranchement des Angiospermes (plantes dont la graine est protégée), on trouve parmi la classe des Monocotylédones :

- Les Liliaceae : la salsepareille, *Smilax glabra*  
le Yucca (racine) *Yucca shildigera*  
les lys, comme *Veratrum formosanum* et *Veratrum grandiflorum*
- Les Poaceae : *Festuca versuta* (graines), *Lolium sp.*, *Hordeum sp.*, *Stipa robusta*, *Poa alsodes*

Enfin, dans la classe des Dicotylédones, le resvératrol se retrouve dans :

- Les Moraceae : la mûre, *Morus nigra*

- Les Fabaceae : la cacahuète, *Arachis hypogaea* L.
- Les Caesalpinaceae : *Erythopleum lasiantum*, *Cassia quinquangulata*, *Cassia garrettiana*
- Les Polygonaceae : *Reynoutria japonica* (*Polygonum cuspidatum*)
- Les Monimiaceae : *Ficus barteri* (fruits)
- Les Myrtaceae : les eucalyptus (tissu ligneux) *Eucalyptus wandoo* et *Eucalyptus sideroxylon* (feuilles)

Le resvératrol a été également mis en évidence dans un arbre tropical à feuilles caduques, nommé *Bauhinia racemosa* lamk. (Fabaceae) (SOLEAS G.J et als).

D'autres plantes contiennent de l'oxyresveratrol, le piceatannol, ce sont :

- *Morus alba*, Moraceae
- *Scirpus maritimus*, Cyperaceae

Certaines plantes peuvent aussi contenir des oligomères de resvératrol, comme les gnetins (*Gnetum sp*).

Enfin dans le sophora, *Sophora leachiana*, Fabaceae, on trouve des trimères du resvératrol.

Les plus grandes concentrations sont retrouvées dans *Polygonum cuspidatum* (2,96 à 3,77 mg/g dans la racine séchée (VASTANO B.C. et als)), le raisin (5 à 100µg/g dans la peau des baies), le vin (1,5 à 3mg/L), les mûres (JANG M et als, 1997) et la cacahuète (0,02 à 1,79µg/g dans la graine (SOBOLEV V.S., COLE R.J.)).

## IV.2. LE RESVERATROL DANS LE VIN

### IV.2.a. Dosage du resvératrol dans le vin

\*Par chromatographie liquide haute performance (HPLC), (SOLEAS G.J et als)

L'analyse du resvératrol nécessite une extraction par un solvant organique suivie de plusieurs étapes chromatographiques.

Pour cette raison, il est nécessaire de partir d'une grande quantité car des pertes variables ont été enregistrées, pertes dues à une extraction incomplète ou à l'oxydation du produit.

L'analyse du resvératrol par HPLC a pu être simplifiée quand les conditions de résolution ont été améliorées (extraction par le bon solvant, filtration, prévention de l'isomérisation photochimique du *trans*-resvératrol, meilleure sensibilité dans la détection), le travail préliminaire sur l'échantillon est devenu ainsi non nécessaire et un faible volume a pu être injecté directement dans la colonne chromatographique.

#### \*Autres méthodes

D'autres méthodes analytiques ont également été employées comme la chromatographie en phase gazeuse suivie de la spectrométrie de masse (SOLEAS G.J, 1995) ou des méthodes immunologiques (HAIN R. et als).

#### **IV.2.b. Concentration en resvératrol et en picéide dans le vin**

Les premières études réalisées par Siemann et Creasy (SIEMANN E.H, CREASY L.L, 1992), (SIEMANN E.H, CREASY L.L, 1993) dosaient le resvératrol total, aucune distinction n'était faite entre les formes *cis* et *trans* (cf tableau 3).

Dans l'étude (SIEMANN E.H, CREASY L.L, 1992), le resvératrol est obtenu et purifié à partir de la rafle du raisin et du vin et sa présence est confirmée par spectroscopie.

Les vins utilisés ont été achetés dans le commerce et l'extraction est réalisée à température ambiante 3 fois avec de l'acétate d'éthyle suivi d'un lavage à l'eau distillée 2 fois. L'extrait d'acétate d'éthyle est concentré puis l'eau résiduelle a été éliminée par filtration des cristaux de glace à 0°C. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu est repris par du méthanol.

La solution méthanolique est injectée dans une colonne HPLC contenant du gel de silice et éluée avec une phase mobile formée d'un mélange de 3% de méthanol et 97% de chlorure de méthylène. La fraction contenant du resvératrol est collectée puis exposée pendant 45 min aux radiations UV à une longueur d'onde de 312 nm.

Le *trans*-resvératrol est converti quantitativement en *cis*-resvératrol pour permettre une meilleure résolution de pic dans le second système décrit plus bas et pour être plus facilement détecté par le détecteur UV à 280 nm.

Les extractions réalisées avec de l'eau distillée et 15% d'éthanol à partir du vin contenant une quantité connue de resvératrol ajouté indiquent que le resvératrol peut être extrait complètement par ce système.

Dans le groupe des vins blancs les concentrations sont en moyenne de 0,139  $\mu\text{mol/L}$  et vont jusqu'à 0,438  $\mu\text{mol/L}$  et pour les vins rouges, les concentrations vont de moins de 0,01  $\mu\text{mol/L}$  à 2,861  $\mu\text{mol/L}$ . Une micromole par litre correspond à 171  $\mu\text{g}$  pour 750 mL d'une bouteille.

Ainsi Siemann et Creasy décrivent de faibles concentrations dans les vins blancs (environ 0,03 mg/L de resvératrol total) bien que certains Chardonnays new-yorkais atteignent 0,1 mg/L (0,438  $\mu\text{mol/L}$ ) (tableau 3).

CONCENTRATION EN RESVERATROL TOTAL DES VINS SELECTIONNES				
Variété	Origine	Année du cru	N	$\mu\text{mole/L}$
Chardonnay	NY-1	1988	4	<b>0,438</b>
Chardonnay	NY-2	1988	4	0,255
Chardonnay	NY-3	1988	4	0,220
Chardonnay	NY-4	1988	5	0,159
Chardonnay	NY-5	1988	4	0,129
Chardonnay	NY-6	1988	4	0,081
Chardonnay	CA-1	1988	4	0,064
Chardonnay	CA-2	1987	4	0,058
Chardonnay	CA-3	1989	8	0,054
Chardonnay	CA-4	1989	4	0,049
Chardonnay	CA-5	1989	8	0,028
Zinfandel rouge	CA	1988	6	0,361
Zinfandel blanc	CA	1989	1	0,021
Bordeaux rouge	FR-R1	1987	2	1,367
Bordeaux blanc	FR-W1	1988	2	0,011
Bordeaux rouge	FR-R2	1988	2	<b>2,861</b>
Bordeaux blanc	FR-W2	1989	2	0,018
Muscadet	FR	1988	2	0,034
Cabernet sauvignon	CA	1982	1	<b>0,010</b>

*Tableau 3: Concentrations en resvératrol en  $\mu\text{mol/L}$  dans divers vins sélectionnés(extraits) (Siemann E.H, Creasy L.L, 1992)*

Légende: N : nombre d'unités dosées, NY : vins new-yorkais, CA : vins californiens, FR : vins français, W : White (blanc), R : Red (rouge)

Pour les vins rouges américains la concentration en resvératrol total est basse (0,01  $\mu\text{mol/L}$ ) tandis que les vins rouges bordelais atteignent des concentrations de 2.861  $\mu\text{mol/L}$  soit 0.65 mg/L.

Dans le cas des vins de Bordeaux, les vins blancs contiennent moins de resvératrol que les vins rouges mais ceci n'est pas toujours vrai pour les vins d'autres provenances.

Les techniques se sont ensuite améliorées et on a pu reporter les concentrations en *trans*, *cis*-resvératrol et celles de leurs glucosides.

Dans une autre étude, l'équipe du Professeur Goldberg (GOLDBERG D.M et als), a mesuré la concentration en resvératrol total dans plus de 300 vins et les a classés en pays et régions d'origine.

Sur 100 vins blancs testés, un très faible nombre avait une concentration en *trans*-resvératrol supérieure à 0,1 mg/L ; il s'agit d'un Sauternes (0,27 mg/L) et de vins d'appellation Riesling (0,75 à 1,22 mg/L).

En ce qui concerne les vins rouges, le cépage Pinot noir surtout de Bourgogne, Californie et Orégon a la plus forte concentration en *trans*-resvératrol (6,5 à 12,1 mg/L).

Les concentrations du *trans* et *cis*-resvératrol ainsi que des *trans* et *cis*-picéide dans les vins blancs et rosés espagnols ont été reportées dans l'étude de Perez et Gomez (PEREZ R., GOMEZ I. et als) et mesurées dans 36 jus de raisin par HPLC avec analyse des spectres des pics élués (cf. tableaux 4 et 5).

Le *trans*-picéide est en moyenne, le composé présent au plus haut niveau (0,166 mg/L) dans les vins blancs (tableau 4), mais sa concentration est <sup>très</sup> supérieure dans les vins rosés. Par contre, le *cis*-resvératrol est le moins présent (0,056 mg/L). Dans tous les vins, les formes *trans* ont une concentration plus élevée que les isomères *cis*.

Dans les vins rosés Espagnols (tableau 5), le niveau moyen de *cis*-picéide (0,88 mg/L) est supérieur à ceux de *trans*-picéide (0,45 mg/L) et de *cis*-resvératrol (0,36 mg/L). Pour le *trans*-resvératrol, le niveau moyen est de 0,44 mg/L).

Parmi tous les vins analysés, le rosé Pinot noir est le seul pour qui le ratio *trans/cis* est inférieur à 1.

En moyenne, les niveaux en resvératrol total les plus élevés sont trouvés dans les variétés de Pinot noir (2,93 mg/L) suivies par Grenache (2,14 mg/L), et la plus faible quantité dans Cabernet Sauvignon (1,38 mg/L).

Il s'avère en fait difficile d'estimer les concentrations en resvératrol et picéides de manière fiable dans les vins, car elles varient de façon importante selon la région de production, le cépage, le type de vinification.

*Tableau 4: Concentrations en mg/L des isomères du resvératrol et du picéide dans des vins blancs espagnols*

Variété de vin (blanc)	Année du cru	Concentrations en mg/L				Quantité totale
		Trans-picéide	Cis-picéide	Trans-resveratrol	Cis-resveratrol	
Albarino	1993	0,080	0,071	0,080	0,021	0,252
Albarino	1993	0,119	0,161	0,233	0,121	0,634
Albarino	1993	0,063	0,100	0,082	0,044	0,289
Albarino	1993	0,212	0,025	0,396	0,021	0,654
Chardonnay	1992	0,036	0,035	0,047	0,020	0,138
Chardonnay	1993	0,030	0,033	0,031	0,021	0,115
Chardonnay	1993	0,008	0,010	0,016	0,022	0,051
Macabeo	1991	0,252	0,042	0,095	0,005	0,394
Macabeo	1992	0,106	0,145	0,011	0,015	0,280
Macabeo	1993	0,300	0,073	0,130	0,013	0,516
Macabeo	1993	0,121	0,041	0,053	0,002	0,215
Macabeo	1993	0,168	0,204	0,168	0,066	0,606
Parellada	1992	0,425	0,196	0,174	0,030	0,805
Parellada	1992	0,329	0,115	0,222	0,035	0,701
Parellada	1993	0,305	0,146	0,183	0,022	0,656
Parellada	1993	0,178	0,255	0,055	0,027	0,515
Riesling	1993	0,143	0,100	0,041	0,013	0,297
Riesling	1993	0,173	0,079	0,061	0,013	0,326
Riesling	1993	0,086	0,036	0,059	0,006	0,187
Sauvignon blanc	1993	0,040	0,027	0,081	0,029	0,177
Sauvignon blanc	1993	0,166	0,145	0,284	0,084	0,679
Sauvignon blanc	1993	0,064	0,092	0,051	0,063	0,270
Verdejo	1993	0,209	0,224	0,080	0,059	0,572
Verdejo	1993	0,074	0,040	0,034	0,020	0,168
Verdejo	1993	0,053	0,057	0,052	0,019	0,181
Xarello	1992	0,422	0,217	0,353	0,062	1,054
Xarello	1992	0,158	0,393	0,547	0,708	1,801
Xarello	1993	0,380	0,447	0,168	0,076	1,069
Xarello	1993	0,448	0,225	0,342	0,040	1,055

Variété de vin (blanc)	Année du cru	Trans-picéide	Cis-picéide	Trans-resveratrol	Cis-resveratrol	Quantité totale
Albarino : moyenne		0,118	0,089	0,198	0,052	0,457
Chardonnay : moyenne		0,023	0,026	0,031	0,021	0,101
Macabeo : moyenne		0,189	0,101	0,091	0,021	0,101
Parellada : moyenne		0,309	0,178	0,158	0,028	0,673
Riesling : moyenne		0,134	0,072	0,054	0,011	0,271
Sauvignon bl moyenne		0,090	0,088	0,139	0,059	0,376
Verdejo : moyenne		0,112	0,107	0,055	0,033	0,307
Xarello : moyenne		0,351	0,320	0,352	0,221	1,244
Moyenne totale		0,166	0,123	0,135	0,056	0,480

*Tableau 5 : Concentrations en mg/L des isomères du resvératrol et du picéide dans les vins rosés espagnols*

Variété de vin (rosé)	Année du cru	Concentrations en mg/L				Quantité totale
		Trans-picéide	Cis-picéide	Trans-resveratrol	Cis-resveratrol	
Cabernet-sauvignon	1992	0,81	0,85	0,90	0,32	2,85
Cabernet-sauvignon	1993	0,14	0,25	0,29	0,16	0,84
Cabernet-sauvignon	1993	0,12	0,008	0,25	0,08	0,43
Grenache	1993	0,66	0,120	0,23	0,20	2,29
Grenache	1993	0,41	0,56	0,17	0,15	1,29
Grenache	1993	0,71	0,56	0,07	0,02	1,36
Grenache	1993	0,91	0,85	1,06	0,35	3,17
Grenache	1993	0,69	0,55	0,93	0,43	2,60
Pinot noir	1992	0,37	1,89	0,29	0,97	3,52
Pinot noir	1993	0,24	1,14	0,28	0,72	2,38

Variété de vin (rosé)	Année du cru	Trans-picéide	Cis-picéide	Trans-resveratrol	Cis-resveratrol	Quantité totale
Cabernet sauvignon : moyenne		0,36	0,39	0,46	0,17	1,38
Grenache moyenne		0,65	0,74	0,49	0,23	2,14
Pinot noir moyenne		0,3	1,51	0,28	0,84	2,93
Moyenne totale		0,45	0,88	0,44	0,36	2,15

**IV.2.c. Facteurs affectant la concentration en resvératrol dans le vin** (SOLEAS G.J et als),(CATHIARD-THOMAS M. et als), (SIEMANN E.H. et als, 1992)

Selon les cépages, la région de production, et les techniques de vinification, on a vu qu'il y avait de grandes différences de concentration en resvératrol dans le vin.

- le cépage du vin

Certaines espèces de Vitacées comme le Pinot noir semble avoir une forte capacité intrinsèque à synthétiser le resvératrol, indépendamment d'autres facteurs. Ce raisin a en effet une peau très fine qui le rend très sensible au *Botrytis cinerea*, aux rayons UV et aux blessures.

Le potentiel de synthèse du resvératrol est maximal juste avant la complète maturité des fruits, c'est à dire avant la veraison et minimal dans les fruits mûrs. Il diminue dans toutes les cultures à partir de la fin du mois d'Août. Le Pinot noir étant très susceptible de flétrir, il est récolté en premier juste avant la veraison, la concentration de resvératrol est donc très élevée.

Le choix de la variété du vin est de première importance puisque les raisins n'ont pas un potentiel égal de synthèse du resvératrol.

- la région semble être un facteur déterminant pour la quantité en resvératrol du vin

Il y a de façon significative plus de resvératrol dans les Chardonnay new-yorkais que dans les Chardonnay californiens.

Le resvératrol étant une phytoalexine, on devrait trouver de forts taux en resvératrol dans les vins issus de régions subissant une plus forte attaque fongique.



Puisque la ville de New-York a un climat plus humide et subit une plus forte attaque fongique, on se doutait que le Chardonnay new-yorkais aurait plus de resvératrol que celui de Californie de la même variété.

L'autre preuve d'une variable géographique est le fort contenu en resvératrol des vins rouges bordelais comparé au Cabernet Sauvignon californien. Mais il est certain que d'autres facteurs interviennent dans la concentration du vin en resvératrol.

La composition du sol constitue aussi un facteur de différenciation entre les vins ainsi que les conditions climatiques pendant la saison de croissance.

Les différences géographiques peuvent être dues à des différences dans les techniques d'élevage et les techniques de vinification plus que des différences de l'environnement.

- les techniques de vinification ont probablement une contribution importante dans le contenu du vin en resvératrol

Un exemple important est celui du Zinfandels californien. Le Zinfandels californien rouge a un contenu en resvératrol plus élevé que le Zinfandels californien blanc. On trouve le resvératrol dans la peau mais pas dans la pulpe.

Ainsi, le vin blanc qui est pressé doucement et qui ne macère pas avec la peau possède un contenu en resvératrol plus faible que le vin rouge qui est macéré avec la peau.

D'autre part, le resvératrol ne se dissout que dans l'alcool. Pour l'extraire, il faut donc que les pellicules de peau macèrent dans le jus au cours de la fermentation alcoolique.

C'est le cas des vins rouges qui nécessitent au moins 14 jours de macération durant lesquels le degré alcoolique augmente et les matières colorantes, les polyphénols et le resvératrol passent dans le jus.

Les vins blancs au contraire, sont pressés tout de suite et les pellicules jetées avant la fermentation car elles donneraient un vin lourd, moins aromatique.

- les effets des pratiques œnologiques ont une influence sur le contenu en resvératrol du vin (JEANDET P., BREUIL A.C., 1995)

Dans cette étude, quatre lots de différents Pinot noir et Chardonnay blanc (affectés à moins de 10 % par le botrytis) ont été préparés et vinifiés séparément. Le premier lot de Pinot noir et le premier lot de Chardonnay ont été fermentés avec la peau et maintenus à 25°C pendant 7 jours.

Le second lot de Pinot noir et le second lot de Chardonnay ont été pressés doucement et n'ont pas macéré avec la peau.

Comme on s'y attendait, la macération augmente l'extraction du resvératrol. Quand la macération se produit, le contenu des vins blancs en resvératrol (1,11 +/- 0,18 mg/L) augmente de 10 fois par rapport aux valeurs trouvées dans les vins qui sont juste pressés doucement et ne passent pas de temps avec la peau (0,12 +/- 0,04 mg/L).

Au contraire, le contenu en resvératrol de vins rouges non macérés (0,23 +/- 0,07 mg/L) est bien plus bas (jusqu'à 13 fois moins) que ceux obtenu par macération (3,04 +/- 0,53 mg/L) comme le montre le tableau suivant (tableau 6).

Resvératrol (mg/L) +/- derivation standard				
	Vins macérés		Vins non macérés	
	Vins rouges	Vins blancs	Vins rouges	Vins blancs
<i>Trans</i> isomère	1,84 +/- 0,35	0,81 +/- 0,13	0,17 +/- 0,05	0,09 +/- 0,03
<i>Cis</i> isomère	1,20 +/- 0,18	0,30 +/- 0,05	0,06 +/- 0,02	0,03 +/- 0,01
Resvératrol total	3,04 +/- 0,53	1,11 +/- 0,18	0,23 +/- 0,07	0,12 +/- 0,04

Tableau 6 : Concentrations en resvératrol (mg/L) dans les vins macérés et non macérés

- l'influence fongique (la « pression fongique ») dans la variation de la concentration en resvératrol

Les vins qui contiennent le plus de resvératrol sont des vins d'altitude ou des vins issus de régions septentrionales, plutôt humides et froides, où les champignons peuvent se développer aisément.

Une certitude est que le Pinot noir, cépage des vins de Bourgogne, et surtout des vins Suisses, développe de grandes quantités de resvératrol.

Le resvératrol est en réalité, une caractéristique de millésime, car la vigne le synthétise au gré des conditions climatiques, qui sont plus ou moins favorables aux champignons.

- le niveau d'infection de la vigne par le *Botrytis cinerea* peut avoir une influence sur le contenu du vin en resvératrol

L'effet produit sur la teneur en utilisant du raisin infecté par a été étudié. Quatre lots de grappes de Pinot noir en pleine santé et des lots de grappes infectés successivement à 10, 40 et 80 % par le botrytis ont été préparés. Ils ont été vinifiés de la même manière que le Pinot noir macéré.

Comme le resvératrol est une phytoalexine produite par la vigne en réponse à une infection fongique, on pourrait s'attendre à trouver plus de resvératrol sur les grappes hautement atteintes que sur celles en pleine santé ou modérément infectées.

Les résultats montrent que contrairement à ce que l'on pourrait s'attendre, les vins rouges atteints à 40 ou 80 % par le botrytis ont les taux de resvératrol les plus bas (respectivement 2,02 +/- 0,5 et 1,01 +/- 0,15 mg/L) tandis que les vins sains ou affectés à 10 % par le botrytis ont un taux de resvératrol plus haut (2,71 +/- 0,24 et 3,88 +/- 0,10 mg/L respectivement).

	Resvératrol ( mg/L) +/- déviation standard			
	Grappes saines	Grappes affectées à 10% par le <i>botrytis</i>	Grappes affectées à 40% par le <i>botrytis</i>	Grappes affectées à 80% par le <i>botrytis</i>
<i>Trans</i> isomère	1,86 +/- 0,20	2,62 +/- 0,08	1,45 +/- 0,35	0,74 +/- 0,10
<i>Cis</i> isomère	0,85 +/- 0,04	1,26 +/- 0,02	0,57 +/- 0,15	0,27 +/- 0,05
Resvératrol total	2,71 +/- 0,24	3,88 +/- 0,10	2,02 +/- 0,50	1,01 +/- 0,15

Tableau 7 : Concentrations en resvératrol en mg/L dans les grappes en fonction du taux de contamination par le botrytis

Ce résultat peut être expliqué en supposant que des grappes très atteintes ont peut-être subi une dégradation par les enzymes extracellulaires de ce champignon.

Le taux de resvératrol le plus fort est observé malgré tout dans le lot infecté à 10%, et le taux le plus bas dans les grappes infectées à 80% ; ceci montre que l'attaque moyenne de la pourriture grise, qui n'a pas de conséquences sur la qualité du vin conduit à un vin possédant un haut taux de resvératrol.

- Remarque concernant l'isomérisation *cis/trans* (JEANDET P., BREUIL A.C., 1995)

Le *cis*-resvératrol n'a pas été détecté dans les extraits de grappes de raisin mais sa présence est démontrée dans le vin.

L'isomère *cis* est présent en grandes quantités (41 % du resvératrol total) dans les vins vinifiés dans l'obscurité, tandis qu'il représente 46 % du total dans les vins exposés à la lumière. Ces observations suggèrent que la présence de l'isomère *cis* n'est pas influencée par une exposition à la lumière. On peut penser que sa présence pourrait être due à la fermentation par une levure ou à une isomérase du grain de raisin qui convertirait partiellement le *trans*-resvératrol en *cis*-resvératrol.

#### IV.2.d. Relations entre vin et cancer

On sait depuis longtemps que la consommation excessive de boissons alcooliques surtout en combinaison avec le tabac est associée à l'augmentation du risque de cancer du système digestif (bouche, larynx, œsophage).

Concernant la consommation modérée d'alcool, il y a très peu de données sur ses effets indésirables à propos du risque de développer un cancer. D'autres facteurs, comme des facteurs nutritionnels ou le type de boissons alcooliques interviennent aussi.

En 1988, Blot (BLOT W.J. et als) montre que la consommation modérée de vin peut diminuer le risque de cancer de l'œsophage alors que la bière et les spiritueux favorisent ce type de cancer.

En 1990, Bouchardy (BOUCHARDY C. et als) confirment et montrent que le vin ne protège pas du cancer du sein mais ne favorise pas non plus son développement par rapport à d'autres boissons.

En 1996, Clifford et Teissedre réalisent des expériences sur des souris programmées pour développer spontanément des tumeurs cancéreuses (espérance de vie d'environ 78 jours) (Clifford A.J.).

80 % des animaux dont l'alimentation avait été additionnée d'un extrait solide de vin dont on avait éliminé l'alcool (1L de Zinfandel/ Kg de nourriture) ont survécu au-delà de 80 jours. Il a été même noté que leur longévité a augmenté de 40%. Le contenu de la poudre renferme des acides phénoliques, du resvératrol ? (non recherché à l'époque), des tanins et des catéchines.

En 1998, l'équipe de chercheurs danois dirigée par Gronbaek a étudié un ensemble de maladies afin d'examiner l'association entre celles-ci et la consommation de trois types de boissons alcoolisées. Parmi ces maladies figurent celles qui sont le plus souvent associées avec l'alcool, à savoir les cancers de la bouche et du tube digestif supérieur. Les résultats ont confirmé que le risque de cancer augmentait de façon considérable lorsqu'il s'agissait de la consommation globale d'alcool, mais non dans le cas du vin (BAVARESCO L. et als).

Dans un schéma comprenant les trois types de boissons alcoolisées, la consommation de vin avait tendance à réduire le risque de cancer du tube digestif supérieur, alors que la consommation de bière et de spiritueux augmentait le risque de manière significative.

Par rapport aux abstinents dont le risque relatif était de 1,0, ceux qui consommaient entre 7-21 verres par semaine de bière ou de spiritueux, mais pas de vin, présentaient un risque relatif de 3,0. En revanche, ceux dont la consommation d'alcool comportait au moins 30 % de vin présentaient un risque relatif de 0,5.

Les conclusions sur la relation entre le vin et le cancer du tube digestif supérieur sont fortement corroborées par des études expérimentales qui montrent que le resvératrol, inhibe la genèse, la promotion et la progression des tumeurs.

En 1998, sont publiés les résultats de la première étude prospective française sur les effets bénéfiques pour la santé d'une consommation modérée de vin. Cette étude a été menée dans l'Est de la France par S. Renaud, sur une population de 34 000 hommes âgés de 40 à 60 ans de 1978 à 1983 dans le cadre d'un bilan médical de la sécurité sociale (RENAUD S.).

Dans cette population, 77% étaient des consommateurs de vin et la consommation de vin représentait 82% de la consommation totale d'alcool. L'équipe de S. Renaud a suivi cette population pendant 10 à 15 ans, ajustant les données recueillies en fonction de variables telles que l'éducation, l'activité physique, le tabagisme, la consommation de boissons, dont les boissons alcooliques, et des facteurs médicaux comme la tension artérielle ou le taux de cholestérol sanguin.

Pour le cancer, comme d'ailleurs pour toute autre cause de mortalité, une courbe en forme de J a été établie (figure 6).

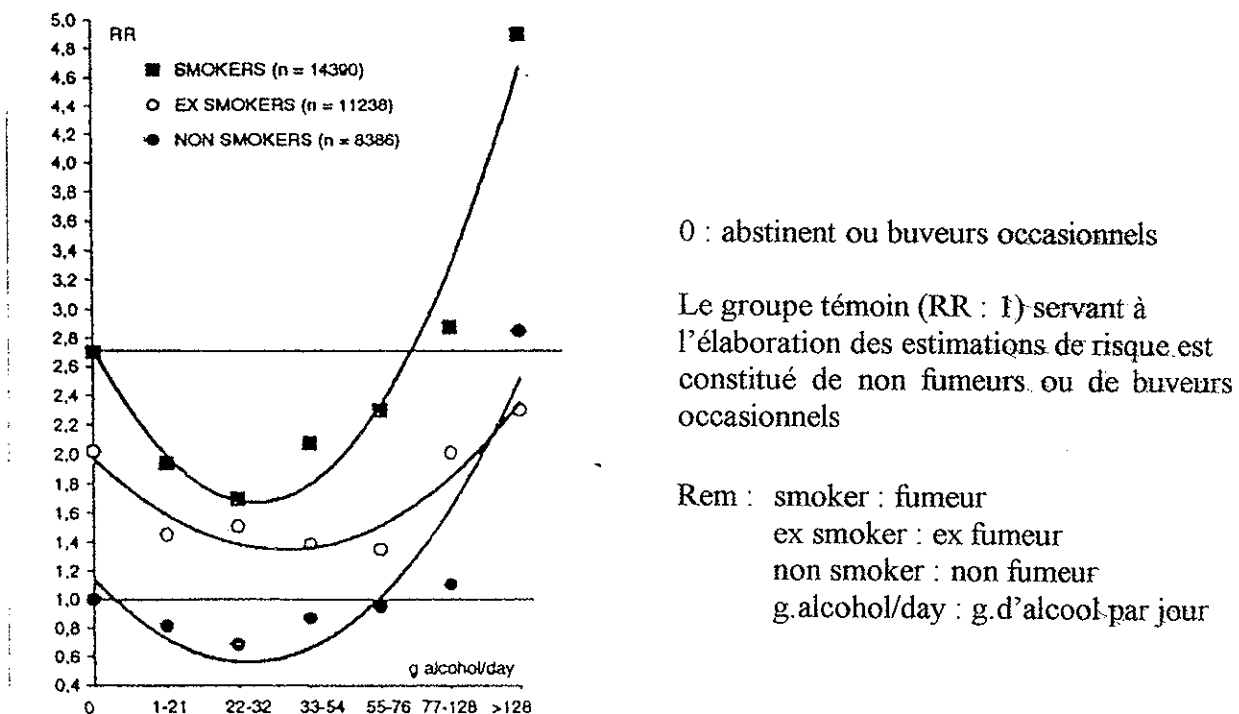


Figure 6 : Risque relatif de mortalité toutes causes confondues pour les non fumeurs, les anciens fumeurs, et les fumeurs en fonction de la consommation d'alcool (RENAUD S.).

L'étude a montré qu'une consommation modérée de vin peut protéger contre le cancer.

Jusqu'à 2 verres de vin par jour soit environ 22g d'alcool, le bénéfice en terme de diminution du risque relatif de mortalité par rapport aux non consommateurs ou aux consommateurs occasionnels, atteint son maximum (22%).

Entre 2 et 3 verres, la réduction du risque est de 19%. Jusqu'à environ 7 verres de vin par jour, (76g d'alcool), on observe toujours une diminution du risque relatif, qui va bien évidemment en s'amenuisant au fur et à mesure que la consommation augmente.

En revanche, au-delà du seuil de 76g, le risque relatif s'accroît, de façon très significative, avec une augmentation de plus de 60% pour des consommations supérieures à 128g d'alcool par jour.

En conclusion, une consommation modérée de vin (environ 2 verres par jour), diminue le risque de cancer, mais le resvératrol est-il le seul responsable de ces effets ?

### IV.3. NATURE CHIMIQUE DU RESVERATROL (BAVARESCO et als, 1999)

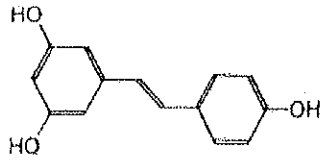
#### IV.3.a. Structure

C'est un composé naturel appartenant au groupe des stilbènes que l'on retrouve dans de nombreuses familles de plantes et notamment dans la famille des Vitacées à laquelle appartient *Vitis vinifera* L., l'une des plus importantes espèces.

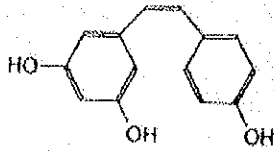
Les stilbènes sont des composés phénoliques de bas poids moléculaire qui agissent comme des composés antifongiques permettant à la plante de surmonter les attaques de pathogènes.

La structure de base du resvératrol est formée par un pont éthylène reliant deux radicaux, un de type résorcinol (noyau A), et un de type phénol (noyau B). Pour ce type de structure, il y a possibilité d'une isomérisation *cis* et *trans*.

- *cis* et *trans* resvératrol (3, 4', 5-trihydroxystilbène)



Trans-resvératrol



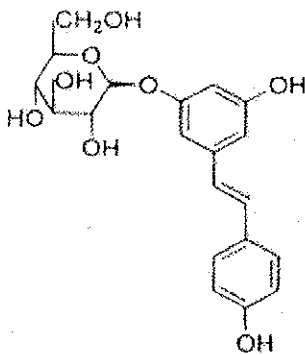
Cis-resvératrol

De plus, les stilbènes du raisin incluent de nombreux composés.

#### IV.4.b. Le resvératrol et ses dérivés

Ses groupements hydroxyles peuvent être étherifiés et donner naissance aux dérivés glycosylés (JEANDET P., BESSIS R., et al 1994).

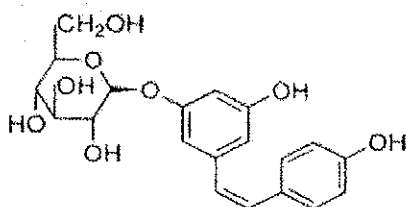
- dérivés hétérosidiques (picéide ou polydatine)



*trans*-Piceid

Ces dérivés ont été découverts en 1994 dans le vin et le raisin, et leur concentration est variable selon les vins.

On a observé dans quelques vins une relation entre la concentration en polydatine et en resvératrol, et on a déduit que le resvératrol dérivait de la polydatine par hydrolyse lors de la fermentation.

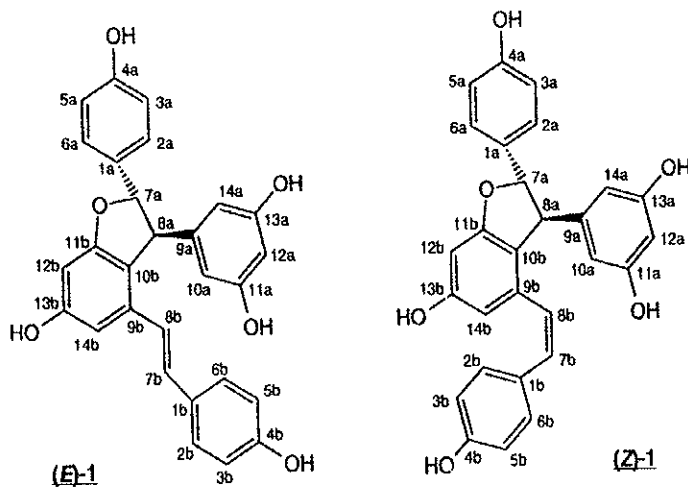


*cis*-Piceid

- ptérostilbène (*trans*-3,5-diméthoxy-4'-hydroxystilbène) dérivé méthylé du resvératrol, ayant également une puissante action antifongique.
- picéatannol (astringinine) ou 3,5,3',4'-tétrahydroxystilbène
- picéatannol glucoside (astringine) ou 3,3',4'trihydroxystibène-5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside
- oligomères du resvératrol ou viniférines comme les  $\alpha$  et  $\epsilon$  viniférines.

L'  $\epsilon$  viniférine est un dimère du resvératrol et l'  $\alpha$  viniférine est un trimère du resvératrol, ce sont les plus importantes. Elles sont synthétisées par condensation de monomères de resvératrol .

- structure des viniférines



Les oligomères du resvératrol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  viniférines) sont aussi présents dans d'autres familles végétales comme les Fabacées et les Césalpiniacées.

#### IV.3.c Relation structure/activité (FORTI L., CARAFOLI F. et als)

On a cherché à savoir le rôle que les trois groupements -OH pouvaient conférer à la molécule de resvératrol en ce qui concerne l'activité anti-oxydante et les propriétés antiprolifératives.

Des dérivés de ce composé possédant des groupements -OH protégés sélectivement par un groupement méthyle, benzyle ou myristyle ont été synthétisés.

L'activité anti-oxydante de ces composés a été évaluée par l'inhibition de l'oxydation du citronellal. La preuve expérimentale suggère que l'activité anti-



oxydante du resvératrol dépend largement de son groupement -OH en position 4' et que le squelette stilbénique lui-même pourrait contribuer à la propriété anti-oxydante.

#### IV.3.d Stilbènes en tant que phytoalexines

Le terme de « phytoalexines » provient du grec « *alexein* » qui signifie défendre (MAROUF A.).

Ce sont des substances antibiotiques de faible poids moléculaire, de nature chimique diverse, produite par les cellules végétales en réponse à l'infection bactérienne ou, généralement fongique, limitant ainsi la diffusion de l'agent pathogène. Chaque famille botanique possède ses phytoalexines caractéristiques.

Exemples :

- \*la brassilexine des *Brassica*
- \*la capsidiol des piments (*Capsicum*)
- \*la glycéoline du soja (*Glycine max*)
- \*la pisatine du pois (*Pisum sativum*, pois chiche)
- \*la dianthalexine de l'œillet (*Dianthus caryophyllus*)
- \*le resvératrol de la vigne, de la mûre, de l'arachide

On en connaît à l'heure actuelle, plus de 200, isolées d'une vingtaine de familles végétales.

Les phytoalexines sont produites durant l'infection et donc indécélables avant. Elles sont synthétisées très rapidement dans l'espace de 24 à 48 heures suivant l'attaque de l'agent pathogène et leur formation est localisée à la région autour du site d'infection.

Selon le cépage, le pic de concentration en resvératrol varie de 50 à 400 mg/kg de poids frais et 80 mg/kg de ce composé suffisent à inhiber la germination des spores et à tuer les cellules fongiques (BLACHE D.).

Pour que le resvératrol se retrouve dans le vin, il faut que la vigne ait été stressée par un champignon mais ni trop, ni trop peu, car lorsque l'agression est massive, le micro-organisme produit une enzyme qui détruit le resvératrol.

La vigne synthétise des stilbènes et donc le resvératrol pour se défendre contre l'un de ses plus graves parasites : le champignon de la pourriture grise « *Botrytis cinerea* ».

C'est une attaque qui se fait par des conidies (spores exogènes de champignon formées par reproduction asexuée) sur les baies du raisin lésées par les vers de la grappe ou par des blessures dues par exemple à une chute de grêle ; ces plaies permettent la pénétration des conidies qui germent et développent un mycélium.

Le resvératrol est ensuite transformé dans la plante en plusieurs agents antifongiques plus puissants. On a montré que le resvératrol s'accumulait rapidement dans les tissus sains entourant immédiatement le site infecté par le botrytis, probablement pour ralentir ou stoppé la diffusion de l'infection.

Bien que des niveaux élevés de resvératrol diminuent ou ralentissent la diffusion de l'infection, certaines souches de *Botrytis cinerea* hautement pathogènes peuvent circonvenir à ce mécanisme de défense en détoxifiant le resvératrol par un processus oxydatif (JEANDET P., BESSIS M., 1998).

Cela conduit à la production de cinq dimères oxydés du resvératrol, d'identification récente (restrytisols A-C) et trois moins connus (resvératrol *trans*-dehydrodimères, leachinol F, et pallidol) (CICHEWICZ R.H et als).

Le resvératrol est aussi synthétisé lors d'autres attaques fongiques notamment lors de l'attaque par *Plasmopara viticola*, agent du mildiou et *Uncinula necator*, agent de l'oïdium de la vigne.

La vigne synthétise les phytoalexines d'autant plus qu'elle est attaquée par le champignon. Les stilbènes détectables lors de l'attaque fongique sont le *trans* resvératrol, l' $\epsilon$  viniférine, l' $\alpha$  viniférine et le ptérostilbène, lesquels sont produits par les feuilles et la peau des baies. Les feuilles et baies saines ne synthétisent pas de stilbènes.

En plus de l'attaque par les champignons, la production de phytoalexines est également stimulée par l'irradiation UV (LANGCAKE P, PRYCE R.J), par le chlorure d'aluminium (ADRIAN M. et als), l'ozone, par un stress ou une blessure (SOLEAS G.J. et als).

Une expérience a été réalisée par l'équipe de Bavaresco (BAVARESCO M. et als, 1997), pour évaluer l'accumulation de phytoalexines (resvératrol,  $\epsilon$ -viniférine et ptérostilbène) au cours du temps dans les baies de deux génotypes différents de vigne infectés par *Botrytis cinerea*.

Les baies, à différents stades de maturité, ont été collectées et infectées par deux souches différentes de *Botrytis cinerea*. Le niveau de phytoalexines diminue pendant le développement de la grappe et il est très faible à la maturation des fruits.

Le stilbène en quantité la plus importante est l' $\epsilon$ -viniférine suivie par le resvératrol tandis que le ptérostilbène est présent à un niveau très faible. Les variétés de vigne réagissent différemment aux souches de *Botrytis cinerea* en regard de la concentration de stilbènes obtenues dans la baie de raisin.

Les blessures mécaniques de la peau de la baie provoquent la synthèse de phytoalexines en faibles quantités.

Dans les échantillons de baies, à la veraison, des niveaux acceptables de resvératrol et d' $\epsilon$ -viniférine sont détectés même 16 jours après l'infection.

Cette découverte permet de supporter l'hypothèse selon laquelle les stilbènes détectés dans les baies de raisin mûres sont produits à cause d'une attaque fongique antérieure.

#### **IV.3.e. Stilbènes en tant que composés constitutifs de la plante**

Les stilbènes sont présents dans les organes lignifiés comme le tronc, la tige, les pépins, les racines, dans la rafle de raisin mûr et sont probablement impliqués dans les mécanismes de résistance du bois à la pourriture.

Les stilbènes détectés dans les différents organes sont :

- le *trans*-resvératrol et l'  $\epsilon$  viniférine dans le tronc et les tiges
- le *trans* et *cis*-resvératrol dans les pépins
- le *trans*-resvératrol, le picéide, l'  $\epsilon$  viniférine, l'ampelopsine, l'hoephénol, la gnetine H, l' $\alpha$  viniférine, l'  $\alpha$  2-viniférine dans les racines
- le *trans* et *cis* resvératrol, l'  $\epsilon$  viniférine et autres oligostilbènes dans les pédoncules ou queues des grappes de raisin.

#### **IV.4. PLANTES CONTENANT DU RESVERATROL**

Parmi les nombreuses plantes contenant du resvératrol, deux plantes en sont particulièrement riches en et représentent pour de nombreux chercheurs un domaine intéressant d'investigation. Ceci justifie le choix d'étudier plus particulièrement ces deux plantes ici.

##### **IV.4.a. Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc.(REMALEY P.)**

- Description

On le nomme également *Japanese knotweed*, *Crimson beauty*, *Mexican bamboo*, *Japanese fleece flower* ou *Reynoutria japonica* ou encore *Pleuropteris zuccarinii*.

Il est originaire de l'Est de l'Asie et est arrivé aux Etats Unis comme plante ornementale par l'intermédiaire de l'Angleterre il y a 100 ans environ.

C'est une plante herbacée, dressée, vivace qui peut faire jusqu'à 3 m de hauteur. Comme tous les membres de la famille des Polygonacées, la base de sa tige, au-dessus de chaque nœud, est entourée d'une enveloppe membraneuse. Les tiges sont grosses, lisses et renflées à chaque nœud au niveau où la feuille rencontre la tige.

La taille de la feuille est variable, normalement elle fait 7,5 à 10 cm de large, elle est ovale à triangulaire et pointue au bout.

Les minuscules fleurs blanc verdâtre se répartissent sur la tige en été et sont suivies tout de suite après par de petits fruits en forme d'aile. Les graines sont triangulaires, brillantes et très petites, environ 0,2 mm.

- Habitat

Cette plante peut tolérer une grande variété de conditions difficiles incluant de hautes températures, un haut degré de salinité du sol, et l'obscurité. On la trouve près des sources d'eau, comme les torrents et les rivières, sur les terres en friche, sur les chemins de terre, près de vieilles maisons.

Elle peut très vite devenir une plante envahissante dans certains endroits après s'être échappée des jardins cultivés. Aux Etats-Unis, on la trouve surtout dans le nord-est mais également dans le sud du Canada.

- Nuisances écologiques

Cette plante se reproduit presque exclusivement par ses rhizomes qui peuvent se régénérer même à partir de très petits fragments. Ces fragments sont transportés vers de nouveaux sites par l'eau ou par les mouvements de terre réalisés par l'homme.

Ses racines profondes lui permettent de rentrer en compétition avec d'autres plantes pour l'eau et les nutriments. Une fois installée, cette plante est très difficile à éradiquer. Dans certains états des Etats Unis, elle est devenue une vraie nuisance.

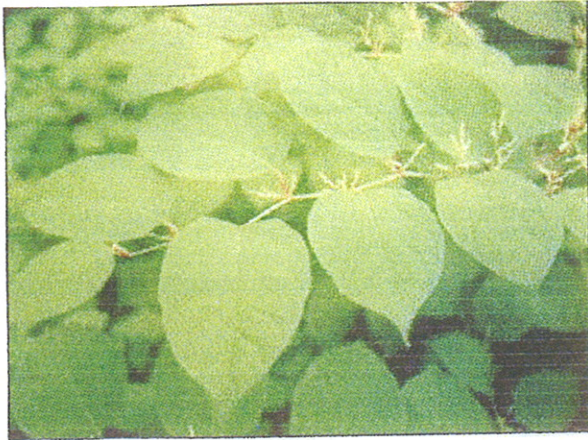
- Attributs médicaux (SPAINHOUR J.)

Historiquement, *P. cuspidatum* était utilisé en médecine populaire comme laxatif et comme aliment. Cependant, les tanins qu'il contient sont connus pour être cancérigène.

De grandes quantités de tanins condensés isolés de différentes espèces, incluant *P. cuspidatum* inhibent la trypsine, l' $\alpha$  amylase et la lipase, qui sont des enzymes digestives, aussi bien *in vitro* que dans le tractus digestif des rats.

*P. cuspidatum* est utilisé en thérapeutique de différentes façons.

Des extraits de *P. cuspidatum* possèdent une activité antipyrétique et analgésique par des études chez des souris et des rats sains.



*Figures 7, 8 : feuilles et fleurs de Polygonum cuspidatum (Spainhour J.)*



*Figure 9 : Racines de Polygonum cuspidatum (Spainhour J.)*

Les extraits de cette plante confèrent également une protection de la membrane gastrique contre les ulcères de stress, diminue l'inhibition de la sécrétion gastrique et n'a pas d'effets sur la pression artérielle. Cependant elle entraîne chez la souris une dépression du système nerveux central.

En plus du resvératrol, les racines de *P. cuspidatum* contiennent :

- de la polydatine, resvératrol glycosylé ayant une action protectrice des cellules myocardiques lésées par une privation d'oxygène et de glucose. Ce produit inhibe aussi l'agrégation plaquettaire après un traitement par la clonidine, un médicament antihypertenseur.

- de l'émodyne, (3-méthyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone). Elle inhibe l'activité des schistosomes (ANANTAPHRUTI M. et als), possède une activité antinéoplasique, antimutagénique et elle inhibe la tyrosine kinase (KUMAR A. et als).

- Commercialisation

L'extrait de *P.cuspidatum* se trouve en vente sur Internet sur des sites spécialisés dans les extraits de plantes chinoises.

#### IV.4.b. La vigne rouge *Vitis vinifera* L. (BOMBARDELLI E. et als)

- Description de la famille des Vitacées

Les plantes de cette famille sont des arbrisseaux grimpants (sarmenteux), à feuilles non opposées et possédant de petites stipules écailleuses. Ils se fixent grâce à des vrilles sur d'autres arbrisseaux, sur les branches des arbres ou autres supports.

Les fleurs sont petites, régulières, bisexuées ou unisexuées, la plante étant généralement monoïque, elles se présentent sous forme de cymes, les inflorescences étant opposées aux feuilles. Elles possèdent 4 ou 5 sépales soudés presque entièrement entre eux ou formant 4 ou 5 petites dents et 4 ou 5 pétales accolés qui ne se recouvrent pas les uns les autres dans le bouton.

Les étamines sont aussi nombreuses que les pétales et sont opposées à ceux-ci, elles sont insérées sur un disque annulaire ou lobé, les anthères étant libres ou soudées.

L'ovaire est supère et généralement formé de 2 carpelles soudés avec 2 à 6 loges, renfermant chacune 2 ovules. Le style est court, terminé par un stigmate discoïde.

Le fruit charnu et juteux est une baie, renfermant 2 à 6 graines dures, les pépins. Les graines renferment un embryon droit entouré d'un abondant albumen oléagineux.

- Description du genre *Vitis*

Les fleurs sont verdâtres ou jaunâtres de par la couleur des étamines, les inflorescences ou les rameaux transformés en vrilles sont opposés aux feuilles. Les 5 pétales de la fleur restent soudés entre eux par le sommet lorsque la fleur s'ouvre, le calice, court, porte 5 dents peu marquées qui correspondent aux 5 sépales.

Les 5 étamines sont opposées aux pétales et l'ovaire est formé d'une ou 2 loges renfermant chacune 1 ou 2 graines ; le fruit mûr, charnu ne renferme qu'une ou 2 graines et ne présente plus de traces des loges.

- Description de l'espèce *Vitis vinifera* L.

La vigne est une plante grimpante qui se fixe grâce à des vrilles sur d'autres arbrisseaux, sur les branches des arbres ou sur des autres supports. Les feuilles sont longuement pétiolées et leur limbe, le plus souvent à 5 lobes principaux a des nervures disposées en éventail.

Les fleurs apparaissent en juin, elles sont verdâtres, petites, odorantes et disposées en une sorte de grappe formée de ramifications assez complexes. Les fruits arrivent à maturité à la fin de l'été ou en automne, ils sont alors charnus, recouverts d'une fine poussière et leur couleur est variable.

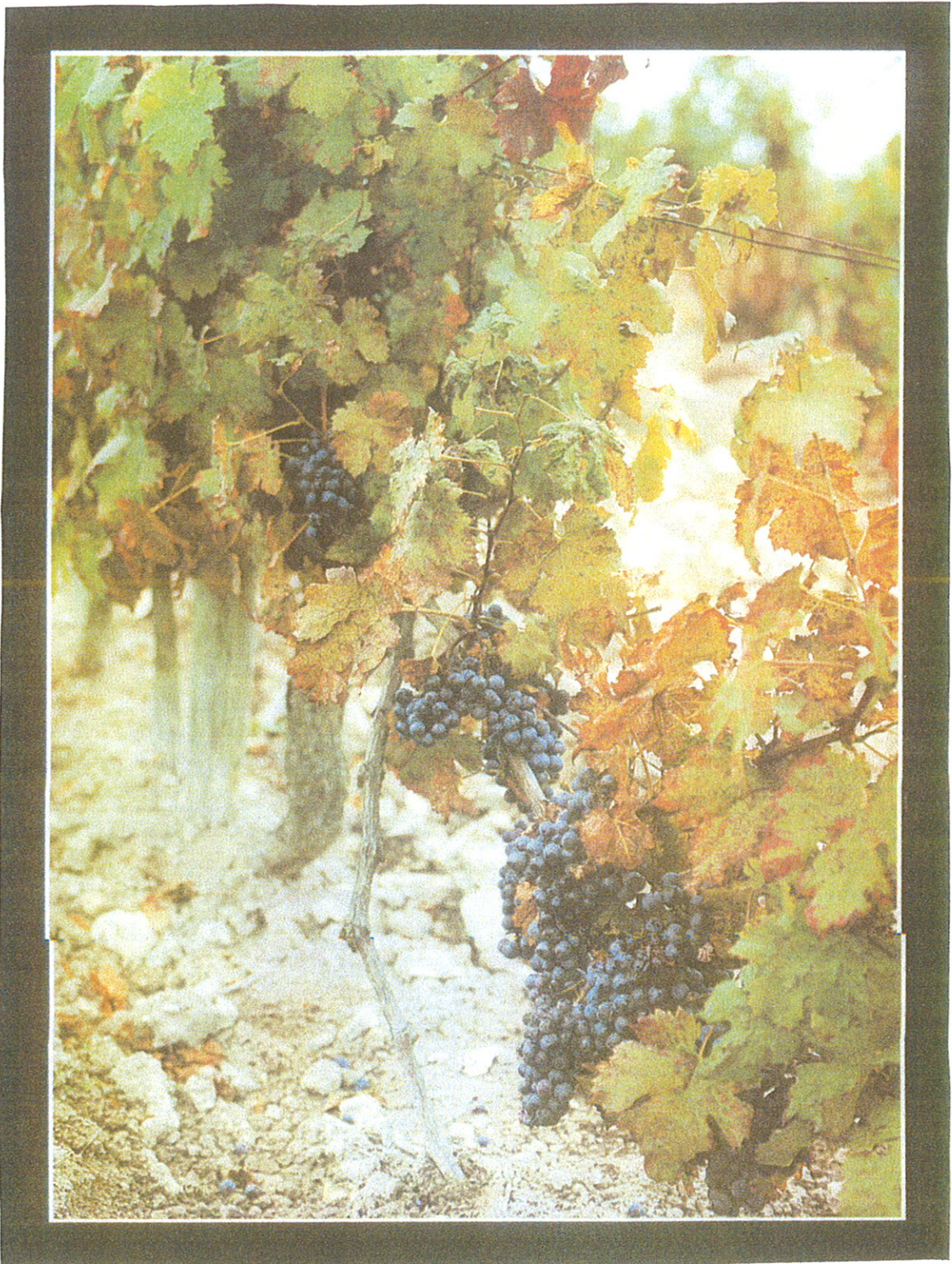
Le développement de la tige est complexe, elle est constituée de portions successives de rameaux placés bout à bout. Chaque entre-nœud produit une feuille et le bourgeon terminal forme soit une grappe de fleurs, soit une vrille et devient latéral.

C'est le rameau né à l'aisselle de la feuille qui prédomine et qui semble continuer l'entre-nœud précédent.

L'écorce est grise et se détache irrégulièrement par de larges filaments plus ou moins déchiquetés.

- Les espèces vinifiées (COLLOMBET J. et als)

Toutes les espèces de vigne ne sont pas utilisées pour la vinification. En fait, parmi la quarantaine d'espèces du genre *Vitis*, divisé en 2 sous-genres, *Euvitis* et *Muscadinia*, seul un nombre infime porte des grappes suffisantes pour être vinifiées.



*Figure 10 : Vitis vinifera L.*



#### IV.4.c. Les différents produits dérivés du raisin (COLLOMBET J. et als)

##### 1. Les cépages

Un cépage est une variété de vigne soigneusement et longuement sélectionnée par l'homme pour atteindre des objectifs particuliers d'adaptation à un microclimat, à un sol ou encore le rendement.

Tous les vins de qualité sont produits à partir de vignes dérivées de « *Vitis vinifera* », ancêtre européen commun de tous les cépages nobles.

Il existe environ 1500 cépages, dont les plus grands sont les suivants :

- Les cépages rouges

##### -Barbera

C'est l'un des cépages les plus cultivés dans le monde. Il est surtout présent en Italie et en Californie.

##### -Cabernet sauvignon

Il s'agit du cépage rouge du Bordelais par excellence, il s'est imposé dans les régions du Médoc et des Graves, mais il s'est très bien adapté également dans d'autres régions froides du monde comme la Nouvelle-Zélande ou chaudes comme le Liban.

Les baies de Cabernet sauvignon sont petites, bleu noir, poussiéreuses et elles présentent un rapport pépins/pulpes élevé.

La forte concentration des pépins et des rafles, partie ligneuse qui supporte les baies, dans ce cépage, explique sa teneur remarquable en polyphénols et notamment en tanins.

Les pellicules sont épaisses et bleues et elles permettent au Cabernet sauvignon de lutter contre la pourriture.

##### -Merlot noir

Ce cépage rouge du Bordelais est associé aux grands vins de Saint Emilion et de Pomerol. Il est souvent comparé au Cabernet, ses baies noir-bleuté sont moins poussiéreuses, à peau moins épaisse et sont moins tanniques que celles du Cabernet. La finesse de la peau des baies les rend sensibles à la pourriture.

##### -Pinot noir

Ce cépage rouge est originaire de la Bourgogne. Ses baies, d'un noir légèrement bleuté, sont petites et serrées, elles donnent un jus incolore et sucré.

Il est très sensible aux maladies comme la pourriture grise, le mildiou et l'oïdium à cause de la finesse de la peau de ses baies et ses teneurs en tanins et en pigments sont plus faibles que celles des autres grands cépages rouges.

- Les cépages blancs

#### -Chardonnay

Ce cépage blanc, originaire de la Bourgogne s'accommode de tous les climats et il est présent dans le monde entier. Non seulement il produit les plus grands champagnes mais on lui doit également les plus grands Bourgogne blancs.

Ses baies sont petites et dorées et la pellicule fine des baies favorise le développement de la pourriture.

#### -Riesling

C'est l'un des cépages blancs les plus prestigieux, il est originaire d'Allemagne mais il est également cultivé en France, en Europe de l'Est et en Californie.

## 2. Le vin (COLLOMBET J. et als)

La vinification est le processus qui va transformer le raisin en vin. Il existe 4 principaux processus de vinification, selon le vin que l'on produit : vin rouge, vin blanc, vin liquoreux ou vin rosé.

### a. La vinification en rouge

Plusieurs étapes sont nécessaires pour l'obtention du vin rouge.

- éraflage et foulage

Cela consiste à séparer la rafle des grains, grains que l'on foule ensuite en évitant d'écraser les pépins, ce qui donne le moût, un mélange de peau, de pulpe et de pépins.

- Cuvaïson et macération

Les moûts sont placés dans des cuves de fermentation. Ils vont macérer en moyenne 9 à 20 jours dans le Bordelais et 5 à 15 jours en Bourgogne. Grâce aux levures et à une bonne aération, les moûts, en quelques jours, commencent à chauffer et à bouillonner, permettant l'extraction des matières colorantes, des tanins et des arômes particuliers du cépage. Pendant ce temps les sucres se transforment en alcool à raison d'un degré d'alcool pour 15 à 18 g de sucres.

A ce stade le contrôle de la température est indispensable, car au-dessus de 32°C on risque l'arrêt de la fermentation ; pour les vins primeurs, la température idéale est 20 à 25°C, les vins de garde riche en tanins et alcool, supportent 30°C.

Le gaz carbonique qui se dégage de la fermentation va concentrer en haut de la cuve tous les éléments solides du moût et forme le marc qui peut atteindre un mètre d'épaisseur.

Tout l'art consiste ensuite à faire remonter par un système de pompe, le jus sur le dessus du marc pour dissoudre sans cesse tanins, pigments, acides et sels.

- L'écoulage et le pressurage

Après la période de macération, le jus est séparé des éléments solides par soutirage ou simple écoulage, on obtient alors le vin de goutte. Le vin de presse ( 15 % de la récolte ) de qualité inférieure mais plus riche en tanins provient du pressurage ou de l'écoulage du marc.

Mélangés ou en cuves séparées, ils incubent quelques semaines encore à une température de 18 à 20°C.

- La fermentation malolactique

C'est la transformation de l'acide malique en acide lactique grâce aux bactéries lactiques du vin. Il faut 3 conditions : une température de 20°C, un peu d'aération, un pH pas trop acide ; le vin va perdre de son acidité, de sa verdeur et gagne en rondeur.

La phase de vinification est terminée, tout l'art du maître de chai consiste maintenant à réunir ces assemblages entre 2 ou 3 cépages, en rajoutant un peu de vin de presse au vin de goutte, fabriquant ce que l'on appelle un millésime.

## b. La vinification en blanc

Le vin blanc résulte de la fermentation du seul jus de raisin. Il faut donc éliminer rafle, peau, pulpe et pépins.

On emploie deux techniques : l'une consiste à pressurer le raisin non foulé pour obtenir du jus blanc à partir par exemple d'un cépage blanc à peau noire (le Pinot en champagne) ; l'autre technique part d'abord du foulage pour faire éclater les baies.

Il faut aussi éviter à tout prix le contact avec l'air, en effet, moût blanc, jus de raisin blanc et vin blanc jeune craignent l'oxydation qui fonce la couleur et détruit les arômes.

La fermentation alcoolique dure une quinzaine de jours et doit se faire en cuve à une température de 18°C à l'exception des vins de garde qui respectent l'usage de la fermentation alcoolique à 25°C en barrique de chêne.

Pour les vins destinés à être bus jeunes et frais, il faut écarter le risque de toute fermentation malolactique car cette fermentation tend à atténuer les arômes du cépage. Elle est par contre indispensable pour les vins de garde, leur apportant les qualités dont ils ont besoin pour bien vieillir.

### c. La vinification en rosé

Les vins rosés ne sont pas, comme on pourrait le croire, un mélange de vins rouges et de vins blancs.

La législation française ne connaît que deux techniques pour les obtenir. La première consiste à traiter le raisin noir comme s'il s'agissait de blanc, mais en faisant précéder le pressage d'un foulage vigoureux, de manière à libérer dans le jus le pigment contenu dans la pellicule du raisin. La deuxième s'apparente à la manière de vinification en rouge, mais en limitant la macération entre douze et vingt-quatre heures seulement, jusqu'à ce que l'on ait atteint la couleur désirée.

### d. La vinification en vins liquoreux

Elle nécessite des raisins très riches en sucres (deux fois plus que les raisins ordinaires).

Une telle concentration de sucres est obtenue à partir de raisins atteints de « la pourriture noble » (*Botrytis cinerea*).

Le sucre comme l'alcool étant toxique pour les levures, lorsqu'ils sont arrivés à un certain niveau, ces deux éléments stoppent la fermentation ; il reste alors une plus ou moins grande quantité de sucres non transformés.

Les vins liquoreux contiennent de 40 à 200g de sucres par litre, ce qui leur donne un goût « doucereux ».

## **V. EXTRACTION, PURIFICATION ET SYNTHÈSE DU RESVERATROL**

### **V.1. EXTRACTION ET PURIFICATION (IZARD J.C et als)**

Le resvératrol se trouve à des teneurs très faibles, de l'ordre de quelques mg/L dans les vins rouges.

Le resvératrol présent dans la peau et dans les pépins de raisins est extrait par le vin rouge lors de la vinification.

Les extraits de la vigne provenant de la peau et des pépins de raisin sont peu concentrés en resvératrol.

La concentration maximale est de l'ordre de 500 ppm et n'est pas compatible avec certaines applications industrielles.

La concentration en resvératrol dans les autres végétaux, ne permet pas d'envisager la production d'extraits plus concentrés.

Seuls les extraits provenant des racines de *P. Cuspidatum* peuvent avoir des teneurs supérieures à 20 %. Cependant ces extraits ont l'inconvénient de contenir aussi de l'émodyne dont la présence ne permet pas l'utilisation dans certaines applications industrielles.

Il a été découvert que la macération de sarments, de pédoncules et de feuilles de vigne dans un solvant possédant un radical carbonyle, comme par exemple les esters ou les cétones, ou dans un alcool, conduisait à un extrait contenant des teneurs élevées en resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine.

Le procédé comprend une étape d'extraction et 2 étapes de purification.

La matière végétale, constituée par des sarments, des pédoncules et des feuilles de vigne est au préalable broyée pour faciliter le contact avec le solvant. Cette matière broyée est mise en contact avec un alcool ou un solvant ayant un radical carbonyle ; parmi les alcools et les solvants utilisables, on peut citer sans que cette liste soit exhaustive : l'éthanol, le méthanol, le butanol, l'isopropanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone, la méthyléthylcétone ou la diéthylcétone.

Le taux massique de solvant doit être suffisant pour imprégner la totalité du solide et permettre une agitation du mélange. Ce taux est généralement compris entre 5 et 15%.

Le contact est effectué à une température comprise entre la température ambiante et la température d'ébullition du solvant. Le temps de contact entre la matière végétale et le solvant d'extraction est compris entre quelques heures et 24 heures.

Le solvant et la matière végétale sont ensuite séparés par filtration et le solvant est éliminé par évaporation.

L'extrait brut obtenu a une teneur en resvératrol comprise entre 1 et 5 % et a la texture d'une gomme verdâtre.

#### \*Purification primaire

On réalise une purification pour obtenir un produit moins coloré, se présentant sous la forme d'une poudre.

La purification primaire est faite par dissolution de l'extrait brut dans un solvant qui est un mélange hydro-alcoolique dont la teneur en alcool est comprise entre 10 et 80% et la dissolution est faite à une température comprise entre 20 et 40°C. Les impuretés insolubles dans ce solvant sont séparées du surnageant par centrifugation.

Le solide obtenu après élimination du solvant du surnageant par évaporation est une poudre de couleur marron clair, ayant une teneur en resvératrol comprise entre 7 et 20 %.

Le rapport teneur en resvératrol/teneur en  $\epsilon$  viniférine dans l'extrait purifié est de l'ordre de 1.

#### \*Purification secondaire

Le premier extrait purifié est dissous dans un solvant de purification secondaire. On utilise de l'eau ou un mélange hydro-alcoolique ayant une teneur en alcool plus faible que le solvant de purification primaire.

La dissolution est faite à une température comprise entre 20 et 40°C. Le surnageant est séparé de la partie insoluble par centrifugation.

Le solide obtenu après élimination du solvant du surnageant par évaporation est une poudre marron clair, ayant une teneur en resvératrol entre 1 et 3%. Le rapport teneur en resvératrol/teneur en  $\epsilon$  viniférine est compris entre 1 et 4.

L'extrait purifié obtenu après séchage de la partie insoluble a une couleur marron clair et se présente sous la forme d'une poudre. Sa teneur en resvératrol est comprise entre 25 et 50 %, et le rapport teneur en resvératrol/teneur en  $\epsilon$  viniférine est compris entre 0.25 et 0.75.

Cette technique permet l'obtention d'extraits de vigne 20 à 1000 fois plus concentrés en resvératrol.

## V.2. SYNTHÈSE DU RESVERATROL

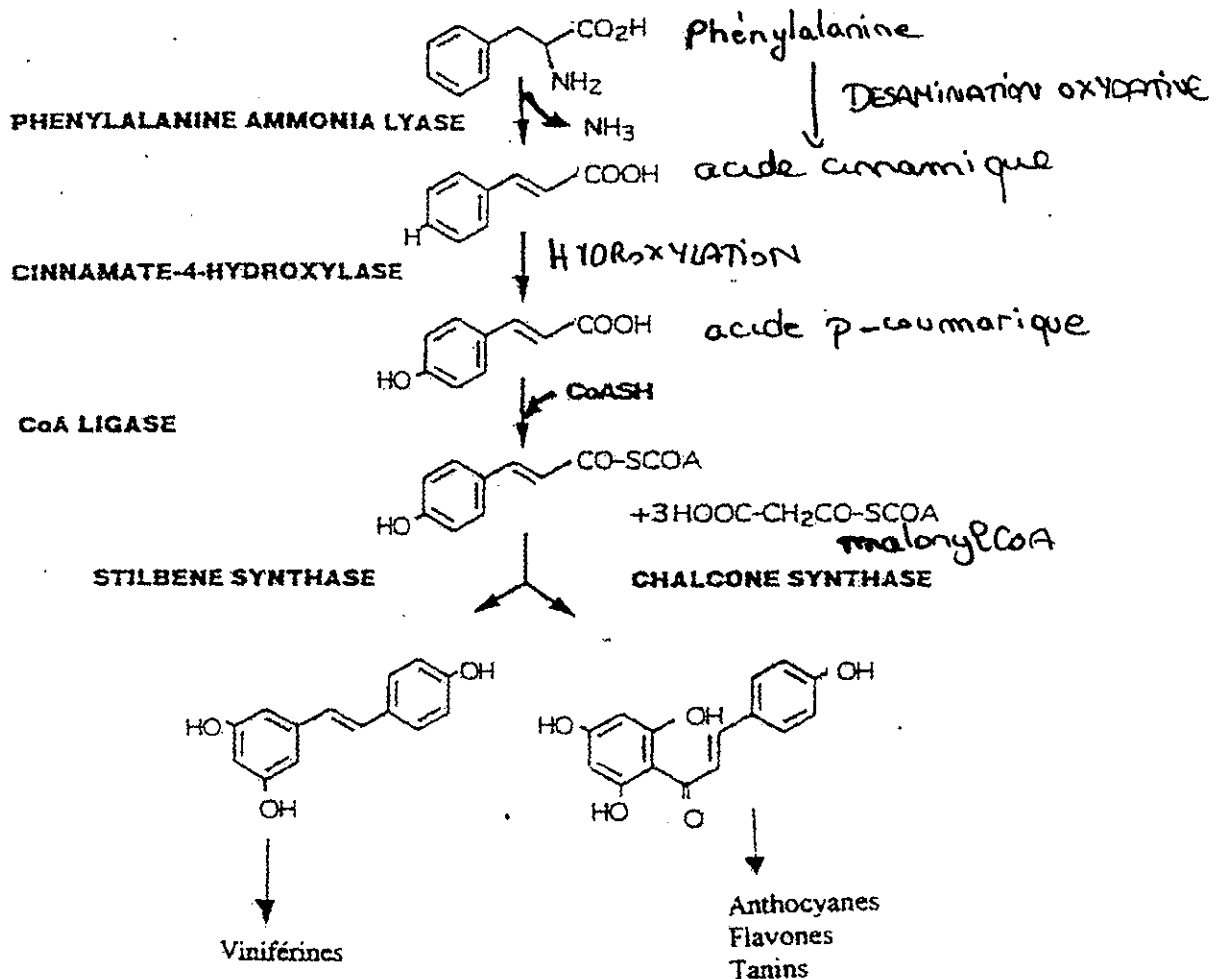
### V.2.1 Synthèse naturelle (JEANDET P., SPAGHI M., *Vitis*, 1995)

Le resvératrol est une phytoalexine et en l'absence d'agression les plantes n'en contiennent pas. L'enzyme responsable de sa synthèse, la stilbène oxydase est détectée rapidement après l'agression.

Cette rapidité s'explique par le fait que la vigne ne met pas en marche une voie particulière, il suffit juste d'un détournement d'une voie métabolique déjà active qui est la voie de biosynthèse des flavonoïdes. La stilbène oxydase entre en compétition avec la chalcone synthase conduisant à une déviation du flux de biosynthèse des flavonoïdes.

La stilbène synthase réalise le couplage de trois molécules de malonylCoA avec le p-coumarylCoA et permet la synthèse du resvératrol.

La réaction générale peut être représentée sous la forme du schéma ci-dessous.



*Figure 11 : Voie de biosynthèse des phytoalexines chez la vigne (JEANDET P., SPAGHI M., Vitis, 1995)*

Il existe une différence fondamentale entre ces deux enzymes. La stilbène synthase qui est normalement inexprimée est inductible seulement par une variété de stimuli que sont les infections, les UV, les blessures tandis que la chalcone synthase est exprimée constitutivement et ses produits s'accumulent proportionnellement à la quantité de sucres précurseurs générés pendant la maturation des grains en présence de rayons UV.

#### IV.2.3 Synthèse en laboratoire (MERITT A., MEREDITH E.)

Comme le resvératrol est présent dans le raisin et d'autres sources naturelles seulement sous forme de traces, on a cherché à le synthétiser en laboratoire.

Quelques méthodes de synthèse chimique du resvératrol ont été décrites, bien que ces méthodes nécessitent des matériaux de départ assez onéreux, ce qui augmente le coût de production du resvératrol. Ces méthodes de synthèse produisent également de grandes quantités de produits secondaires. Ces produits doivent être éliminés pour éviter les interférences et la contamination du produit final.

Généralement, la purification des produits de réaction est faite par chromatographie sur gel de silice, étape qui augmente la durée totale nécessaire pour la synthèse et peut significativement s'ajouter au coût.

Du fait de l'obtention de nombreux produits secondaires et du resvératrol perdu au cours de l'étape de purification, le rendement final en resvératrol se trouve réduit. De ce fait, une synthèse qui utiliserait des matériaux de départ peu onéreux, qui permettrait l'obtention d'un bon rendement en resvératrol et peu de produits secondaires, et qui ne nécessiterait pas de chromatographie sur gel de silice s'avérerait intéressante, c'est le cas de la méthode suivante.

##### \*Première méthode de synthèse : réaction de couplage d'Horner-Emmons

Cette méthode de synthèse utilise comme réaction centrale, le couplage d'un phosphonate benzylique à un aldéhyde protégé.

C'est une méthode de synthèse peu onéreuse, utilisant des matériaux de départ et des réactifs fiables.

Le point de départ de la synthèse est l'acide résorcylique possédant des groupements hydroxyles en 3 et 5 protégés par un groupe méthyle, benzyle ou alkyle.

Le groupement carboxylique est ensuite réduit, puis halogéné. Le composé obtenu réagit avec un alkyle phosphonate et la dernière étape est le couplage de Horner-Emmons conduisant au resvératrol.

En résumé, voici les différentes étapes :

- l'acide résorcylique réagit avec le benzyl brome dans l'acétone en milieu basique pour donner un benzyl ester protégé.
- un traitement par la potasse permet le retrait du benzoate de potassium du produit secondaire qui est l'alcool benzylique.
- le mélange réactionnel est acidifié, suivi d'une réduction par le LAH (tetrahydruure de lithium et d'aluminium) pour donner un benzyl alcool avec un grand rendement.



Cette procédure élimine le recours à la séparation chromatographique du benzyl alcool et tous les intermédiaires de la séquence sont isolés par recristallisation.

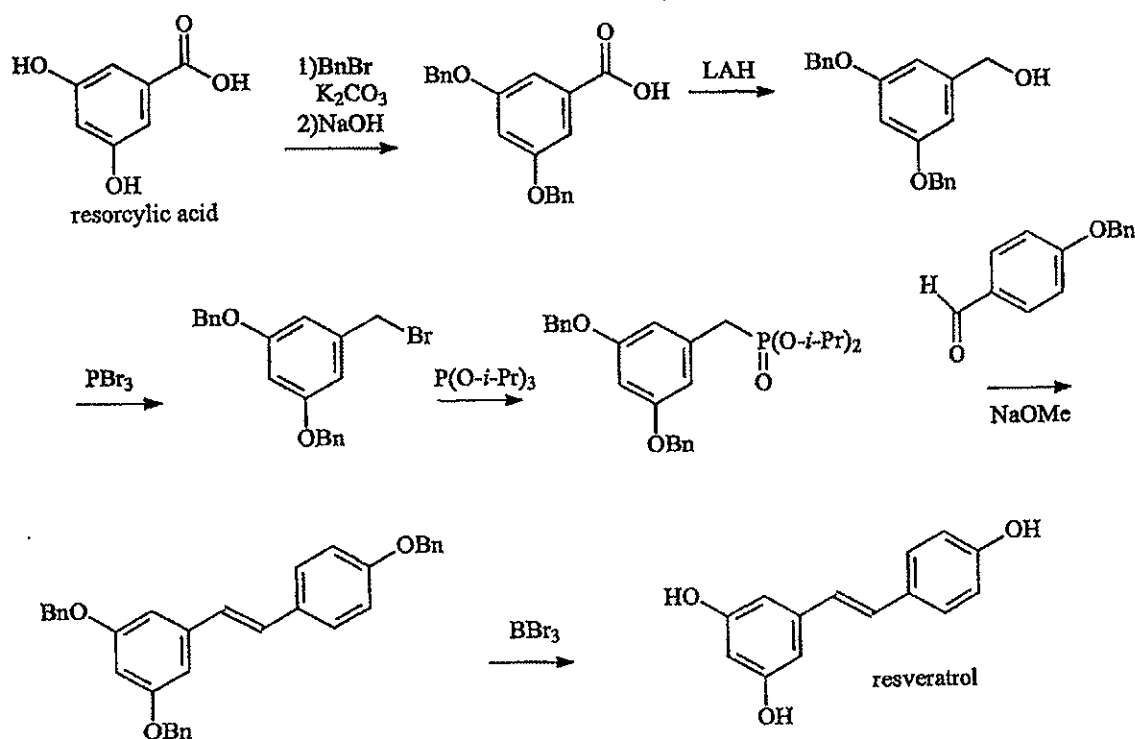
- le groupement hydroxyle du benzyl alcool est ensuite halogéné par un brome provenant du tribromure de phosphate.
- on réalise ensuite la réaction d'Arbuzov en utilisant l'isopropyl phosphate pour donner le phosphonate correspondant avec un bon rendement.

En le couplant avec le 4-benzyloxybenzaldéhyde en présence de méthoxyde de sodium avec une stoechiométrie 1 : 1, on obtient l'isomère *trans* ( E ) comme seul isomère et avec un bon rendement.

La grandeur stérique de l'isopropyl phosphonate favorise la formation complète en composé *trans*. Le retrait des 3 benzyl ethers est réalisé par le bore tribromé conduisant au *trans*-resvératrol.

Les auteurs précisent que ces étapes ne nécessitent pas l'utilisation d'une purification par chromatographie sur gel de silice.

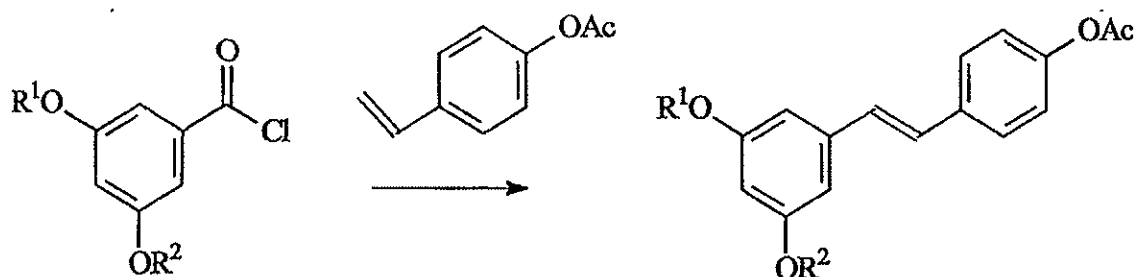
Le schéma qui suit résume les différentes réactions :



\*Autre méthode de synthèse du resvératrol par la voie de décarboxylation par le palladium

Cette méthode utilise une nouvelle voie non classique impliquant une catalyse par le palladium.

La réaction de couplage est illustrée par l'équation suivante :

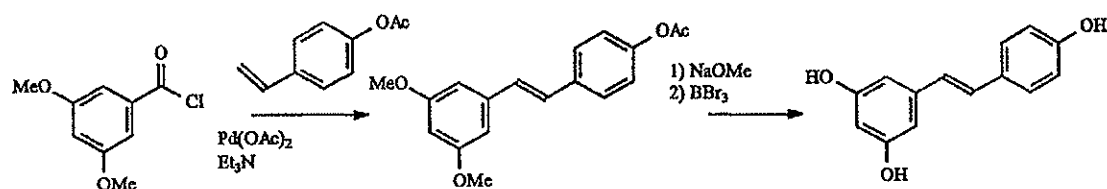


R1 et R2 sont des groupements protégés de type méthyle, alkyle, ou benzyle.

Le chlorure d'acide 3,5-diméthoxybenzoyl réagit avec un 4-acétoxystyrène en utilisant l'acétate de palladium et la trialkylamine comme catalyseurs pour former le (E)-4-acétoxy-3',5'-diméthoxystilbène.

Une réaction de Heck utilisant comme catalyseur le Palladium est utilisée comme réaction de couplage.

Une base est ajoutée à l'(E)-4-acétoxy-3',5'-diméthoxystilbène pour retirer le groupement 4-acéto et former l'(E)-3,5-diméthoxy-4'-hydroxystilbène. L'addition de BBr<sub>3</sub> permet enfin le retrait des groupements méthyle pour obtenir le resvératrol.



## VI. PHARMACOCINÉTIQUE DU RESVÉRATROL DANS L'ORGANISME

La pharmacocinétique du resvératrol est encore mal élucidée. Le resvératrol présente une bonne absorption au niveau intestinal (FREMONT L.).

De Santi et ses collaborateurs ont étudié la glucuronidation du resvératrol dans le foie humain.(DE SANTI C. et als). L'étude a montré que le resvératrol est glucuronidé dans le foie.

Cette glucuronidation pourrait réduire sa biodisponibilité, cependant, les flavonoïdes comme la myrcétine, la catéchine, le kaempférol, l'apigénine aux doses de 20µM chacune, inhibent la glucuronidation du resvératrol et le pourcentage d'inhibition est 46% pour la catéchine jusqu'à 72% pour l'apigénine. Ceci pourrait ainsi augmenter la biodisponibilité du resvératrol.

Juan et son équipe ont mesuré la présence de resvératrol dans le plasma par HPLC (JUAN M.E et als).

Le *trans*-resvératrol contenu dans le plasma a été extrait et purifié. Avec cette expérience, l'auteur montre que du *trans*-resvératrol administré oralement à des rats a été détecté dans le plasma.

Cette méthode d'analyse rapide et simple par HPLC avec détection UV pourra permettre de mieux connaître la biodisponibilité du resvératrol et de connaître son absorption, sa distribution et son métabolisme.

## VII. PROPRIETES BIOLOGIQUES DU RESVERATROL

On s'intéressera surtout à l'activité anticancéreuse et à ses mécanismes moléculaires, puisque le resvératrol apparaît comme un des agents chimiopréventifs et chimiothérapeutiques les plus prometteurs.

Etant donné le nombre important de travaux et de parutions sur les propriétés du resvératrol, nous avons axé plus particulièrement la recherche bibliographique sur les six dernières années (1996-2001) et toutes les références ne sont pas citées. Seules les plus représentatives ont été mentionnées.

Les études cliniques n'en sont qu'à leurs balbutiements, mais beaucoup de chercheurs pensent que le resvératrol pourrait être un principe actif prometteur.

## VII.1. ACTIVITE CHIMIOPREVENTIVE DU RESVERATROL

Le cancer est la plus grande cause de mortalité chez l'homme et la femme, emportant plus de six millions de vie chaque année dans le monde.

La chimioprévention, c'est à dire la prévention du cancer en ingérant des agents qui réduisent le risque de carcinogenèse est une des voies les plus directes pour réduire la morbidité et la mortalité. Elle apparaît comme l'une des voies riche d'espérance dans la lutte contre le cancer à condition que l'on sache identifier les sujets à risque et mener à bien les vastes essais qui seront indispensables pour expertiser les nouveaux produits.

On a identifié un grand nombre d'agents chimiopréventifs potentiels à partir d'études épidémiologiques, d'observations pré-cliniques et cliniques. Les marqueurs biochimiques du processus de carcinogenèse sont particulièrement utiles pour sélectionner ces agents et pour connaître leurs mécanismes d'action. Le resvératrol intervient dans le cadre de son activité chimiopréventive à différents niveaux (SOVAK M.), (SAVOURET J.F.), du fait de :

- ses propriétés anti-oxydantes
- son action sur les trois étapes de la cancérogenèse
- son action sur le monoxyde d'azote (NO)

### VII.1.1. PROPRIETES ANTI-OXYDANTES DU RESVERATROL

#### VII.1.1.1. DEFINITION DES RADICAUX LIBRES

Les radicaux libres sont des espèces chimiques ayant un électron célibataire. Cela leur confère une instabilité énergétique et cinétique.

Du fait de leur instabilité énergétique, ils ont tendance à revenir à un état stable en donnant un électron ou en le prenant à une autre molécule.

Les formes réactives de l'oxygène : anion superoxyde ( $O_2^-$ ), radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ), radicaux dérivés des acides gras (peroxydes et alcoxydes) sont les espèces radicalaires les plus courantes (PASQUIER.C).

#### VII.1.1.2. PRINCIPALES SOURCES DE RADICAUX LIBRES

Les radicaux libres sont produits par de nombreuses sources intracellulaires (mitochondries, phagocytes) ou membranaires en général par l'intermédiaire d'oxydases, enzymes intervenant dans le métabolisme oxydatif cellulaire.

Cependant, ils sont aussi produits par des sources exogènes, soit sous l'effet de radiations ionisantes, soit au cours du métabolisme de certains

antitumoraux (adriamycine, daunorubicine) ou de certains pesticides (PASQUIER C.).

### VII.1.1.3. REACTIONS DES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE AVEC LES MOLECULES BIOLOGIQUES

Toutes les membranes biologiques ont des structures communes : ce sont des assemblages de molécules protéiques et lipidiques dont la partie externe est couplée à des chaînes glucidiques formant des glycolipides et des glycoprotéines.

La membrane jouant un rôle primordial dans les fonctions cellulaires, une modification d'un de ces constituants peut être à l'origine d'un dysfonctionnement irréversible ou de messages erronés de l'environnement vers l'intérieur de la cellule (PASQUIER C.). Ces modifications sont les suivantes :

#### - Peroxydation lipidique

Le radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$ , est capable de réagir sur tous les composés membranaires, lipides, protéines et glucides. La partie interne de la membrane contient des chaînes d'acides gras saturés et insaturés. Ces derniers, qui assurent sa fluidité, paraissent particulièrement sensibles à l'attaque des radicaux libres.

La formation d'un premier radical dans la membrane déclenche la propagation en chaîne de réactions au sein des doubles liaisons lipidiques, ce qui désorganise finalement la structure membranaire par accumulation de molécules déformées.

La phase de propagation peut être arrêtée par des piègeurs de radicaux peroxydes tels que les composés phénoliques et donc le resvératrol.

#### - Oxydation des protéines

Les protéines sont aussi sensibles à l'action du radical  $\text{OH}\cdot$ . Celui-ci peut en effet réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines.

Les plus sensibles à son action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical  $\text{OH}\cdot$  s'additionne, modifiant la conformation de la protéine. Le radical  $\text{OH}\cdot$  est aussi capable de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques.

Toutes ces modifications aboutissent comme pour les lipides à une désorganisation membranaire à l'origine d'un dysfonctionnement voire d'une lyse cellulaire.

Par ailleurs, le radical  $\text{OH}\cdot$  attaque aussi les structures lipidiques et protéiques dans le milieu extracellulaire, ce qui entraîne la formation et le

dépôt de complexes d'immunoglobulines ou de lipoprotéines oxydées, à l'origine de la constitution des plaques d'athérome dans les vaisseaux sanguins.

#### - Oxydation de l'ADN

L'ADN, constituant l'essentiel du génome est aussi sensible à l'attaque du radical OH·. Celui-ci s'additionne en effet sur les doubles liaisons des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN et coupe les sucres qui y sont associés, provoquant la mutagenèse, la carcinogenèse et la mort cellulaire.

#### **VII.1.1.4. DEFENSE ANTI-OXYDANTE (PASQUIER C., 1994, seconde partie)**

Les principaux anti-oxydants physiologiques, présents dans toutes les cellules, permettent une protection totale du milieu cellulaire (cytoplasme et membrane lipidique) au cours des réactions d'oxydoréduction.

#### **1. Système enzymatique de défense cellulaire**

##### - la superoxyde dismutase (SOD)

L'enzyme anti-oxydante intervenant en première ligne dans l'élimination des radicaux libres de l'oxygène est la SOD. Son action aboutit à la production de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  par la dismutation de l'anion super oxyde.

La SOD catalysant la réaction de production d' $H_2O_2$ , son activité serait particulièrement toxique si d'autres enzymes permettant d'éliminer cette molécule n'étaient pas présentes.

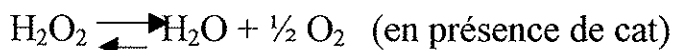
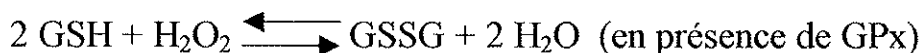
##### - la catalase et la glutathion-peroxydase

Ces deux enzymes semblent faire double emploi. En réalité, la catalase (cat), présente dans les peroxysomes de nombreux tissus élimine de grandes quantités d' $H_2O_2$ , sans utiliser d'autres substrats que  $H_2O_2$  lui-même.

La glutathion-peroxydase (GPx) est une métalloprotéine qui élimine de faibles concentrations de  $H_2O_2$ , de même que les peroxydes, en utilisant le glutathion comme substrat. Le taux de  $H_2O_2$  dans la cellule est régulé par un rapport constant entre SOD et GPx.

Le glutathion réduit (GSH) est le substrat de la GPx, et la réaction (cf ci-dessous) conduit à l'obtention de glutathion oxydé (GSSG). Celui-ci doit être réduit rapidement pour l'équilibre cellulaire; pour cela, la glutathion réductase utilise comme donneur d'hydrogène le NADPH.

Dans la cellule, la quantité de GSH représente 95 % du glutathion total (5% sous forme de glutathion oxydé).



Ces enzymes coopèrent entre elles. L'action de la SOD doit être couplée à celle des cat/ peroxydase pour éviter l'accumulation du peroxyde d'hydrogène.

En plus de ces systèmes intracellulaires, il existe des défenses anti-oxydantes extracellulaires comme la transferrine, la ceruloplasmine par exemple.

## **2. Défenses anti-oxydantes non enzymatiques, non spécifiques, à la fois intra et extracellulaires**

Il y a un équilibre constant entre tous les anti-oxydants, dont l'activité est synchronisée. Dès qu'un maillon de cette chaîne est défaillant, le système perd de son efficacité et un apport extérieur doit palier à cette anomalie.

Parmi les anti-oxydants nécessaires à la régulation red/ox de la cellule, mais que celle-ci ne sait pas synthétiser, se trouve la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et la vitamine C (ascorbate). Des apports exogènes sont donc obligatoires pour le bon fonctionnement cellulaire.

Les micronutriments minéraux (sélénium, zinc, cuivre, manganèse, fer) sont des composants des enzymes anti-oxydantes. Parmi eux, le sélénium, un composant essentiel de la glutathion-peroxydase, a montré une action de prévention des cancers dans des études expérimentales et humaines.

## **3. Les anti-oxydants exogènes**

Des observations cohérentes montrant que le risque de cancer est réduit par un régime riche en fruits, légumes et céréales ont encouragé la recherche d'autres composés végétaux dotés d'un effet anti-oxydant et susceptibles de protéger l'ADN. Une activité anti-oxydante et un potentiel de prévention des cancers ont ainsi été observés en laboratoire dans une foule de substances chimiques d'origine végétale ou de produits phytochimiques.

C'est le cas du raisin et ses dérivés contenant des quantités importantes de catéchines et des anthocyanines, pigments des raisins noirs.

Ces composés ont un potentiel anti-oxydant qui s'ajoute à celui du resvératrol, molécule qui, en culture cellulaire et chez l'animal a démontré une activité anti-oxydante qui peut être associée à la prévention des cancers.

Beaucoup des produits étudiés bloquent les voies de la carcinogenèse par d'autres mécanismes que leur effet anti-oxydant.

Les effets des oxydants et des anti-oxydants sont montrés expérimentalement par les cultures cellulaires et les essais chez l'animal.

Les cultures cellulaires fournissent des systèmes précis pour étudier en fonction des doses et du temps les liens plausibles entre les mutations induites par les oxydants, les transformations néoplasiques et la protection apportée par les anti-oxydants.

Les essais chez l'animal sont plus complexes ; ils fournissent des renseignements sur les effets d'un apport abondant d'anti-oxydants sur la durée de vie de l'animal.

Les études chez l'homme comportent une pléthore de complexes variables génétiques et extérieures. Ainsi, dans les études épidémiologiques, les bénéfices apportés par un régime riche en anti-oxydants, de même que la corrélation établie entre des taux faibles d'anti-oxydants et un risque accru de certains cancers, peuvent être en parties reliés à d'autres différences de modes de vie, comme le niveau d'activité physique, les risques professionnels ou le tabagisme, dont ces études n'ont pas tenu compte.

L'implication des radicaux libres dans la cancérogenèse apparaît aussi évidente que dans le vieillissement, dans la mesure où toutes les cellules sont en permanence soumises à l'action des formes réactives de l'oxygène qui attaquent et modifient tous les composants moléculaires.

La différence entre les deux processus réside dans les cellules cibles. Des cellules différenciées (sang, cerveau) sont plutôt sensibles au vieillissement, alors que les cellules souches semblent être de meilleures cibles pour la carcinogenèse.

Le contenu en anti-oxydants des cellules âgées diminue avec l'âge. Le taux de glutathion baisse et le rapport des taux de SOD et de GPx, dont dépend l'élimination des formes réactives de l'oxygène, est augmenté.

Un apport constant en anti-oxydants pourrait permettre de pallier la diminution des défenses naturelles et de protéger les tissus contre une dégénérescence précoce.

L'activité hypothétique du resvératrol contre l'oxydation a intéressé plusieurs scientifiques cherchant à découvrir le ou les modes d'action de ce composé naturel.

Deux axes d'action se profilent : l'inhibition de la production de radicaux libres par différents mécanismes et la protection de l'ADN contre l'oxydation.



### VII.1.1.5. LE STRESS OXYDATIF (BOREK C.)

#### a. Définition

Les défenses anti-oxydantes n'étant pas complètement efficaces, une formation élevée de radicaux libres dans le corps est susceptible d'induire des dommages.

Le stress oxydatif est un déséquilibre de la balance oxydants/anti-oxydants en faveur des premiers ce qui provoque les oxydations de biomolécules (acides nucléiques, lipides et protéines).

#### b. Implications du stress oxydatif dans les maladies humaines

Le rôle des radicaux libres est important dans les maladies neurodégénératives, les maladies inflammatoires chroniques, les maladies cardio-vasculaires, et le cancer qui est le fléau majeur dans les pays industrialisés.

### VII.1.1.6. RÔLES ANTI-OXYDANTS DU RESVÉRATROL

#### a) Le resvératrol module le stress oxydatif induit par le TPA

\*On a étudié le potentiel du resvératrol à moduler le stress oxydatif induit par le TPA (promoteur tumoral) en évaluant la production d' $H_2O_2$ , l'activité de la myéloperoxydase (MPO) et l'activité des enzymes anti-oxydantes (GPx, SOD) (JANG M, PEZZUTO J.M, 1998).

Une simple application de 10 mmol de TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) sur la peau de souris conduit à la modulation de plusieurs paramètres du stress oxydatif, comparé aux animaux témoins recevant de l'acétone.

En effet, une élévation marquée de la production d' $H_2O_2$  (fig.12A) et une augmentation considérable de l'activité de la MPO (fig.12B) ont été observées respectivement à 4 et 6h après traitement de la peau de souris.

De plus, le TPA induit une augmentation de l'activité de la GSSG réductase 1 à 6h après traitement (fig.12C).

D'un autre côté, une diminution rapide des systèmes de protection anti-oxydants est induite au niveau de la peau de souris après traitement par le TPA, comme cela est illustré par un déclin des niveaux de GSH (fig.12D) et une décroissance de l'activité de la SOD (fig.12E) observé après 1h de traitement.

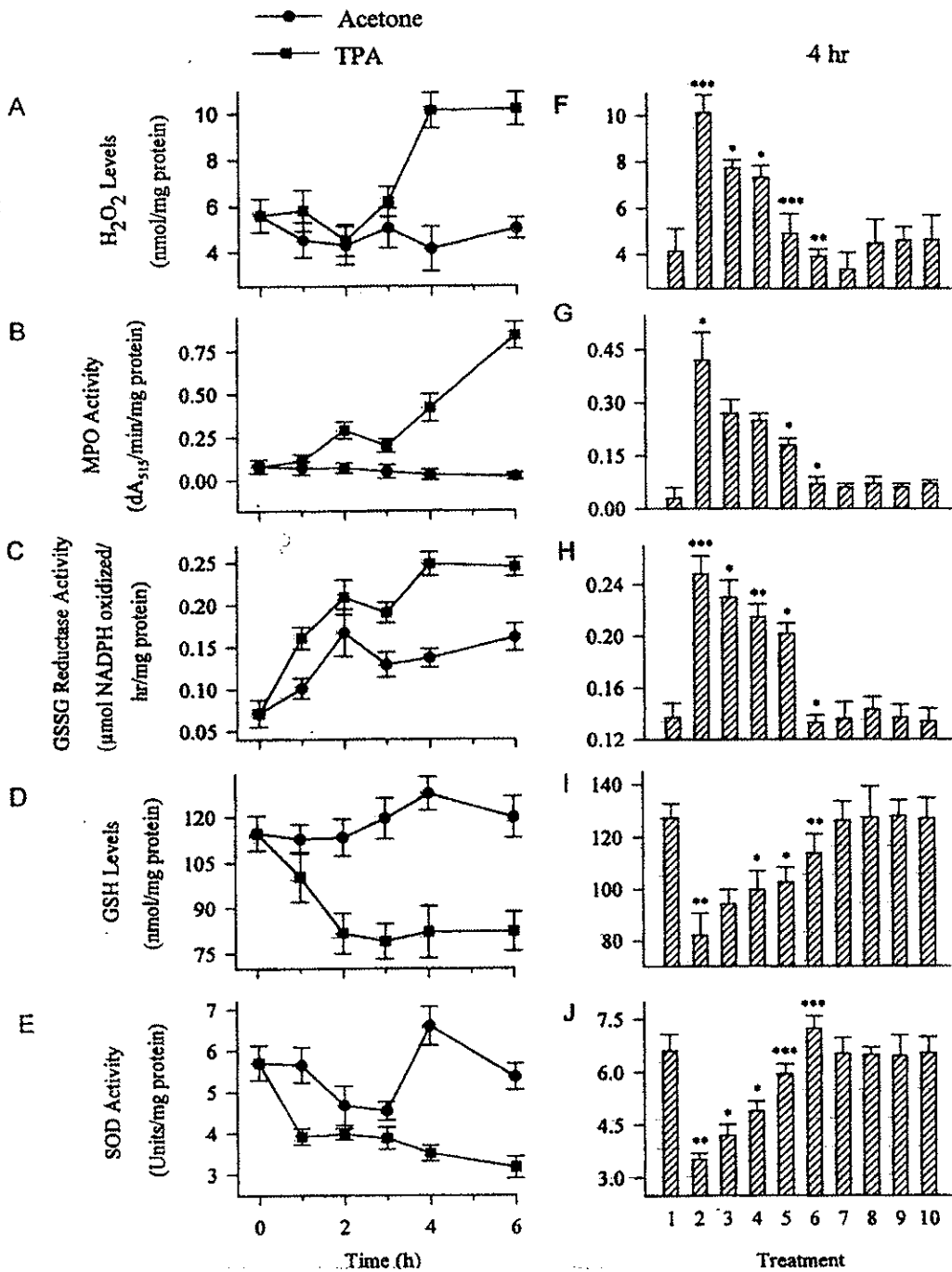


Figure 12. : Evènements oxydatifs entraînés par le TPA au cours du temps (A à E) et effets respectifs du resvératrol sur ces réponses au niveau de la peau de souris

En conclusion, le traitement de la peau de souris par le TPA, promoteur de tumeur, a produit une surproduction d'oxydants cellulaires et la modulation du système de défense anti-oxydant.

Le traitement préalable des animaux par le resvératrol pallie à chacun des événements oxydatifs de manière dose dépendante.

Comme cela est montré sur la fig.12F,G respectivement, le resvératrol supprime de façon significative la production d' $H_2O_2$  induite par le TPA et la MPO.

De façon similaire, le resvératrol fait diminuer progressivement l'activité de la GSSG réductase (fig.12H).

De plus ce composé prévient la diminution des niveaux de GSH et de l'activité de la SOD induites par le TPA (fig.12I et,J).

Dans chaque cas, par rapport aux animaux <sup>fermoürü</sup> traités par l'acétone, les différents paramètres ne sont pas affectés par le traitement avec le resvératrol seul.

Le resvératrol est donc capable de moduler le stress oxydatif induit par le TPA en supprimant la production d' $H_2O_2$ , en inhibant l'activité de la MPO et en diminuant progressivement les activités de la GSSG.

Il favorise l'activité des systèmes de défense anti-oxydants des cellules par la SOD.

#### **b) Le resvératrol protège les cellules mononuclées du sang périphérique de dommages oxydatifs**

On a examiné l'activité anti-oxydante sur des cellules mononuclées isolées du sang périphérique de donneurs sains (PBMNC) (GRABER R. et als). Le statut oxydant a été étudié en enregistrant le métabolisme intracellulaire du GSH impliquant les enzymes et la peroxydation lipidique.

Les cellules PBMNC ont tout d'abord été cultivées en présence de resvératrol seul pendant 24 heures et successivement, sans retrait du resvératrol, exposé pendant 48 h à 10 mM de desoxyribose, un sucre très oxydant.

Ces recherches ont révélé que les dommages oxydatifs provoqués par le desoxyribose sont contrecarrés par le resvératrol de façon dose dépendante même lorsque le resvératrol est additionné à la concentration minimale de 5 $\mu$ M.

#### **c) Le resvératrol a montré de multiples activités sur le système vasculaire et notamment dans le phénomène pathologique plurifactoriel qu'est l'athérosclérose.**

Le resvératrol exerce un effet protecteur sur le système cardiovasculaire en grande partie de part son potentiel anti-oxydant.

Les niveaux élevés de LDL contribuent à la pathogenèse de l'athérosclérose, plus particulièrement, il semble que l'oxydation des LDL dans l'espace sous-endothéliale soit le facteur déterminant de son athérogénicité.

Les LDL oxydés plutôt que les LDL intacts sont reconnus par les récepteurs piègeurs des macrophages et cela permettra la formation de cellules spumeuses.

L'atteinte endothéliale est suivie par une perméabilité accrue et une libération de facteurs chimiotactiques par les LDL oxydés qui attirent les monocytes, lesquels vont ensuite se développer en macrophages dans la paroi vasculaire.

Les LDL oxydées inhibent la motilité des monocytes/macrophages et ainsi préviennent leur retour à la circulation. Il y a sécrétion de radicaux superoxydes, d' $H_2O_2$ , et d'enzymes hydrolytiques, ce qui endommage les cellules endothéliales avoisinantes.

D'autres facteurs libérés par les macrophages stimulent la prolifération des cellules des muscles lisses, qui peuvent pénétrer la lame élastique pour former une masse cellulaire qui donnera la plaque athéroscléreuse.

Les plaques athéromateuses sont remplies de macrophages qui ont digéré de grandes quantités de cholestérol des LDL. Ceux-ci accumulent tellement de cholestérol et d'esters de cholestérol qu'ils deviennent des cellules spumeuses chargées de lipides. Les processus oxydatifs jouent donc un rôle majeur dans l'athérogenèse.

Le resvératrol, par son pouvoir anti-oxydant, inhibe l'oxydation des LDL et module la synthèse des lipides et des apolipoprotéines plasmatiques (MERILLON et als), (FRANKEL E.N et als).

#### **d) Neuroprotection**

Le peu d'information concernant l'action du resvératrol sur les cellules neuronales a amené à chercher les effets de ce composé sur la lignée cellulaire SH-SY5Y du neuroblastome humain (TREDECI G. et als).

Cette lignée cellulaire a les aspects morphologiques, biochimiques et fonctionnels de neuroblastes immatures. Quand elle est activée par les neurotrophines (ou autres facteurs de croissance), ou simplement par l'acide rétinolique, elle peut être amenée à se différencier en prenant l'apparence typique de neurones matures.

Cela représente un modèle simple d'étude de cellules neuronales humaines.

Pour connaître les effets du resvératrol sur les cellules SH-SY5Y, on détermine si ce composé est capable d'induire la phosphorylation de la MAP kinase (mitogen activated protéin kinase).

Les MAP kinases sont une famille de kinases qui sont impliquées dans de nombreuses voies de transduction de signaux intracellulaires et qui peuvent être activées par différents stimuli conduisant à différents effets.

L'intérêt se porte sur deux MAP kinases du sous-groupe des kinases extracellulaires (ERK ou extracellular regulated kinases), nommées ERK1 et ERK2, dont l'activation est indiquée par leur état phosphorylé et dont on a prouvé beaucoup d'effets potentiellement utiles sur les cellules neuronales in vitro et également sur toutes les fonctions cérébrales.

Elles ont un rôle dans la différenciation morphologique et la survie neuronale, dans la régulation des protéines des vésicules synaptiques et des éléments du cytosquelette. Enfin elles interviennent dans la régulation de la plasticité synaptique des neurones matures.

Dans les neurones de l'hippocampe de rat, la phosphorylation des MAP kinases induit des modifications dans la plasticité synaptique des neurones pré et postsynaptiques à travers les changements transcriptionnels des molécules d'adhésion cellulaire.

Le resvératrol induit la phosphorylation de l'ERK1 et de l'ERK2 à la fois dans les cellules différenciées et indifférenciées SH-SY5Y, et la phosphorylation de l'ERK1 et de l'ERK2 est beaucoup plus marquée dans les cellules SH-SY5Y matures.

La phosphorylation se réalise avec de très faibles concentrations de resvératrol (1pM) et augmente quand on augmente la concentration de resvératrol jusqu'à 1µM, mais décroît avec de plus fortes concentrations.

Le resvératrol, en induisant la phosphorylation des MAP kinases exerce donc un rôle de protection au niveau neuronal.

Dans une autre étude, Nicolini et ses collaborateurs (NICOLINI G. et als), ont montré que le resvératrol réduit l'apoptose induite par le Paclitaxel dans une lignée cellulaire SH-SY5Y d'un neuroblastome humain, en inhibant presque complètement l'activation des caspases, un événement central dans les processus moléculaires qui conduisent les cellules à la mort par apoptose (cf partie concernant l'apoptose).

### **VII.1.2. ACTION DU RESVÉRATROL SUR LES 3 ÉTAPES DU MÉCANISME DE CANCÉROGENÈSE**

Le resvératrol inhibe les événements cellulaires associés à l'initiation de la tumeur, sa promotion et sa progression (JANG et als, 1997).

Il agit comme un agent anti-oxydant et antimutagène et induit des enzymes métaboliques de phase II de la substance cancéreuse (activité anti-initiation).

C'est aussi un médiateur des effets anti-inflammatoires et il inhibe les fonctions de la cyclooxygénase (activité anti-promotion); il induit la différenciation des cellules leucémiques promyélocytaires humaines (activité anti-progression).

Il inhibe enfin le développement de lésions préneoplasiques de la culture cellulaire de glande mammaire de souris traitée pour carcinogenèse et inhibe la genèse de tumeur chez un modèle de souris ayant un cancer de la peau.

#### VII.1.2.1 Activité anti-initiation du resvératrol

- Par son pouvoir anti-oxydant, il a un rôle dans l'initiation de la tumeur.

Ses effets ont été observés dans différents types cellulaires comme on l'a vu dans le paragraphe précédent.

C'est aussi, un composé anti-mutagène. Ceci est illustré par exemple par l'inhibition dose-dépendante de la réponse mutagénique induite par le traitement de souche TM 677 de *Salmonella typhimurium* avec le 7,12-diméthylbenz(a) anthracène (DMBA), qui est un initiateur (SHANON L.A et als).

Le resvératrol induit aussi l'activité de la quinone réductase dans des cellules d'hépatome de souris (HEPA-1c1c7), (HEO YH et als). Or les enzymes de phase II, comme la quinone réductase, sont des enzymes responsables de la détoxification métabolique des carcinogènes.

Un profil de réponse identique est observé dans des cellules cultivées d'un hépatome BPrC1 (un dérivé de cellules HEPA-1c1c7 incapable d'induire l'enzyme de phase I) indiquant que le resvératrol est un inducteur mono fonctionnel.

- Par ces effets sur les cytochromes P450 (CHUN J.Y).

La P450-1A1 est une arylhydrocarbène hydroxylase qui s'exprime à de très faibles taux dans le foie humain et est principalement exprimée dans les poumons humains, le placenta et les lymphocytes, par rapport à la P450-1A2 qui s'exprime principalement dans le foie.

La P450-1A1 active de nombreux toxiques (notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques) et procarcinogènes en des carcinogènes définitifs. Elle est souvent considérée comme l'une des plus importantes enzymes impliquée dans l'initiation tumorale.

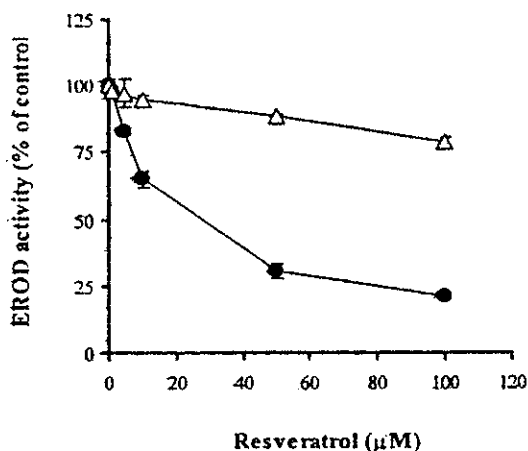
Les effets du resvératrol sur l'activité P450 ont été déterminés sur les microsomes humains du Foie (HL-97 et HL-111), et sur les membranes d'*Escherichia Coli* coexprimant les cytochromes P450-1A1 ou P450-1A2 et la NADPH P450 réductase humaine.

L'activité catalytique spécifique des cytochromes P450 est déterminée par l'O-dé-éthylation de l'éthoxyrésorufin (EROD).

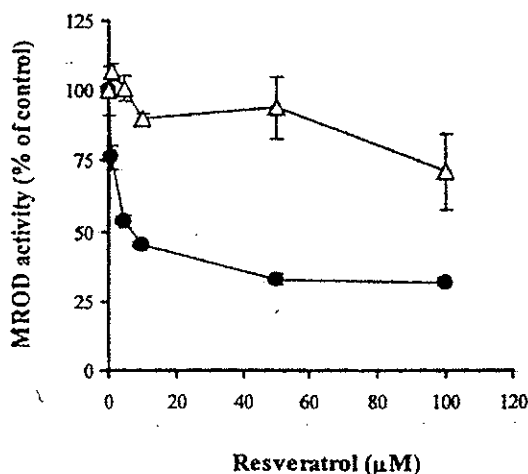
De façon intéressante, le resvératrol montre une forte inhibition de la P450-1A1 dépendant de l'activité EROD et MROD, (fig.13) avec une IC50 de 23 $\mu$ M et 11 $\mu$ M respectivement. L'inhibition des activités dépendant de la P450-1A2 est plus faible (IC50=1,2 mM pour EROD et 580 $\mu$ M pour MROD).

Ainsi, le resvératrol montre 50 fois plus d'inhibition pour la P450-1A1 comparée à la P450-1A2.

### (A) EROD



### (B) MROD



Légende : -rond plein = coexpression de la P450-1A1/NADPH P450 reductase  
 -triangle = coexpression de la P450-1A2/NADPH P450 reductase

*Figure 13. Effets du resvératrol sur l'activité EROD et MROD dépendante de la P450-1A*

La NADPH P450 réductase transfère les électrons du NADPH vers la P450, et dans certains cas, l'inhibition de la P450 par des agents chimiques est

médiée par le blocage du transfert d'électrons par l'inhibition de la NADPH P450 réductase.

Le resvératrol ne produit pas de changements significatifs de l'activité NADPH P450 réductase jusqu'à 100  $\mu\text{M}$  et on peut conclure que le resvératrol n'a pas d'effets sur la P450 réductase.

Pour étudier le mécanisme d'inhibition du resvératrol, les études d'inhibition cinétique ont été réalisées avec la P450-1A1 et la NADPH reductase humaine coexprimée par la membrane d'*Escherichia Coli*.

Le resvératrol inhibe l'activité de la P450-1A1 d'une façon mixte compétitive/non compétitive avec un  $K_i$  de 9,1  $\pm$  1,9  $\mu\text{M}$  (pour l'inhibition compétitive) et un  $K_i$  de 89  $\pm$  6  $\mu\text{M}$  (pour l'inhibition non compétitive). Cela montre que le resvératrol est un inhibiteur sélectif de la P450-1A1.

De plus, l'inhibition de la P450-1A1 n'est pas augmentée après une pré incubation de 10 min avec un milieu contenant de la NADPH.

En conclusion, le resvératrol est l'un des inhibiteurs naturels le plus sélectif des cytochromes P450-1A1.

C'est une inhibition de type mixte (compétitive-non compétitive). L'inhibition de la P450-1A1 n'est pas augmentée après une pré incubation de 10 min avec un milieu contenant de la NADPH. Le resvératrol inhibe donc l'expression du P450-1A1 dans le cancer du foie humain.

Le resvératrol semble également jouer un rôle dans la prévention du cancer du poumon.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs) et les composés nitrés sont d'importants carcinogènes de la fumée de tabac. Ils sont formés par la combustion incomplète du tabac lorsque l'on fume et sont considérés comme des agents causals du cancer du poumon. Ils se lient aux récepteurs aux aryls hydrocarbures (AhR) et induisent la transcription de gènes comme celui de la P450-1A1, impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques et de composés endogènes (MOLLERUP S).

Le fait d'inhiber la P450-1A1 pourrait donc prévenir la survenue de ce type de cancer.

La phase I de biotransformation (phase oxydative) des PAHs donnent des diépoxydes hautement réactifs qui peuvent former des liaisons covalentes avec l'ADN. Récemment on a montré que le niveau de liaisons covalentes ADN-PAH est relié au niveau d'expression de la P450-1A1.

Comme celui du cytochrome P450-1A1, le gène de la P450-1B1 est contrôlé de façon transcriptionnelle par le récepteur aux arylhydrocarbures (AhR).

Dans le poumon, la P450-1B1 s'exprime de façon plus importante sous sa forme constitutive que la P450-1A1 qui s'exprime de façon plus importante sous



sa forme induite. On a surtout attribué à la P450-1B1 un rôle dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes dans les tissus reproducteurs. Cependant cette enzyme P450 métabolise également de façon efficace les PAHs. Du fait que cette enzyme possède une expression 5 fois supérieure dans le poumon humain par rapport à la P450-1A1, un rôle significatif de cette enzyme dans le cancer du poumon induit par la fumée de cigarette ne peut être exclu.

La lignée cellulaire BEP2D de cellules épithéliales bronchiques humaines a été utilisée pour étudier les effets du resvératrol sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des PAHs en relation avec le cancer du poumon. On a trouvé que le resvératrol inhibe de façon dose-dépendante la transcription des gènes P450-1A1 et P450-1B1 activés par le récepteur aux arylhydrocarbures (AhR) en phase I de métabolisme.

L'exposition au benzo(a)pyrène ou au TCDD produit une augmentation du niveau d'expression des 2 gènes mais un traitement concomittant par le resvératrol supprime cette induction.

La TCDD (2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine) a été très largement utilisée comme modèle pour l'induction de la transduction du signal transmis par l'AhR car elle n'est pas métabolisée.

Le benzo(a)pyrène (B(a)P) est aussi un important procarcinogène de la fumée de tabac mais l'inhibition de la P450-1A1 ou de la P450-1B1 est plus importante quand on utilise comme inducteur le TCDD à la place du benzopyrène.

En fait, les courbes d'inhibition pour 1 nM de TCDD suivent des schémas similaires à ceux observés pour l'inhibition de l'expression non induite de la P450-1A1 et de la P450-1B1.

Ces découvertes suggèrent une interaction entre les inducteurs et le resvératrol pour la liaison aux récepteurs des arylhydrocarbures.

Les métabolites des PAH activés peuvent être détoxiqués par des enzymes de phase II comme les glutathion-S transférases (GSTs). La GST P1 qui est active envers plusieurs époxydes de PAHs s'exprime à un fort niveau dans le cancer du poumon humain.

L'époxide hydrolase microsomiale (mEH) joue également un rôle significatif dans le métabolisme des PAHs. En général, la mEH a une activité de détoxification, mais ici la présence de mEH conjointement avec la P450-1A1 donnent des métabolites encore plus carcinogènes sans que l'on puisse encore expliquer pourquoi.

Le resvératrol exerce un effet inducteur mineur sur l'expression de la mEH. Par contre que ce soit seul ou en combinaison avec le B(a)P ou le TCDD le resvératrol n'a aucun effet sur le niveau d'expression de la GST P1.

En comparaison avec la situation obtenue avec les enzymes de phase I, une augmentation de l'activité des enzymes de phase II (ou phase de détoxification) pourrait être protectrice contre les substances carcinogènes.

On a vu que le resvératrol induisait l'activité de la quinone réductase dans les cellules murines en culture d'un hépatome.

Le resvératrol a un effet inducteur mineur sur la transcription du gène de la mEH et n'a pas d'effet apparent sur la GST P1.

On peut dire que l'effet chimiopréventif du resvératrol sur la carcinogénèse induite par les PAH a lieu principalement au niveau de l'inhibition de l'activation des procarcinogènes plus qu'au niveau de la détoxification des métabolites réactifs.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier l'effet du resvératrol sur l'activité des enzymes de phase II et sur la liaison des métabolites du B(a)P à l'ADN.

### **VII.1.2.2 Activité anti-promotion et effets anti-inflammatoires**

Dans un contexte de recherche de nouveaux agents chimiopréventifs, de nombreuses plantes ont été testées pour leur potentiel à inhiber la cyclooxygénase (COX).

Cette enzyme existe sous une forme constitutive (COX-1) impliquée dans les phénomènes physiologiques et sous une forme induite (COX-2) qui s'exprime sous l'influence de facteurs divers et qui entraînent des effets pathologiques, cancéreux notamment.

Ces formes conduisent à la production de substances proinflammatoires, les prostaglandines, obtenues par le métabolisme de l'acide arachidonique.

L'acide arachidonique se trouve fixé sur les phospholipides membranaires et sous l'effet de la phospholipase A2, il est libéré. Il sera ensuite oxydé suivant deux voies : la voie de la cyclo-oxygénase qui aboutit à la synthèse de prostaglandines et la voie de la lipoxygénase qui aboutit à la synthèse des leucotriènes. Seul la première voie nous intéresse ici.

La synthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique fait intervenir un système multienzymatique nommé prostaglandine synthétase ou cyclooxygénase (COX) qui possède deux activités enzymatiques : une activité dioxygénase qui permet l'oxydation de l'acide arachidonique en prostaglandine G2 (PGG2) et une activité peroxydasique qui réduit la PGG2 en prostaglandine H2 (PGH2) qui conduira ensuite à l'obtention d'autres prostaglandines proinflammatoires (cf. figure 14 page suivante).

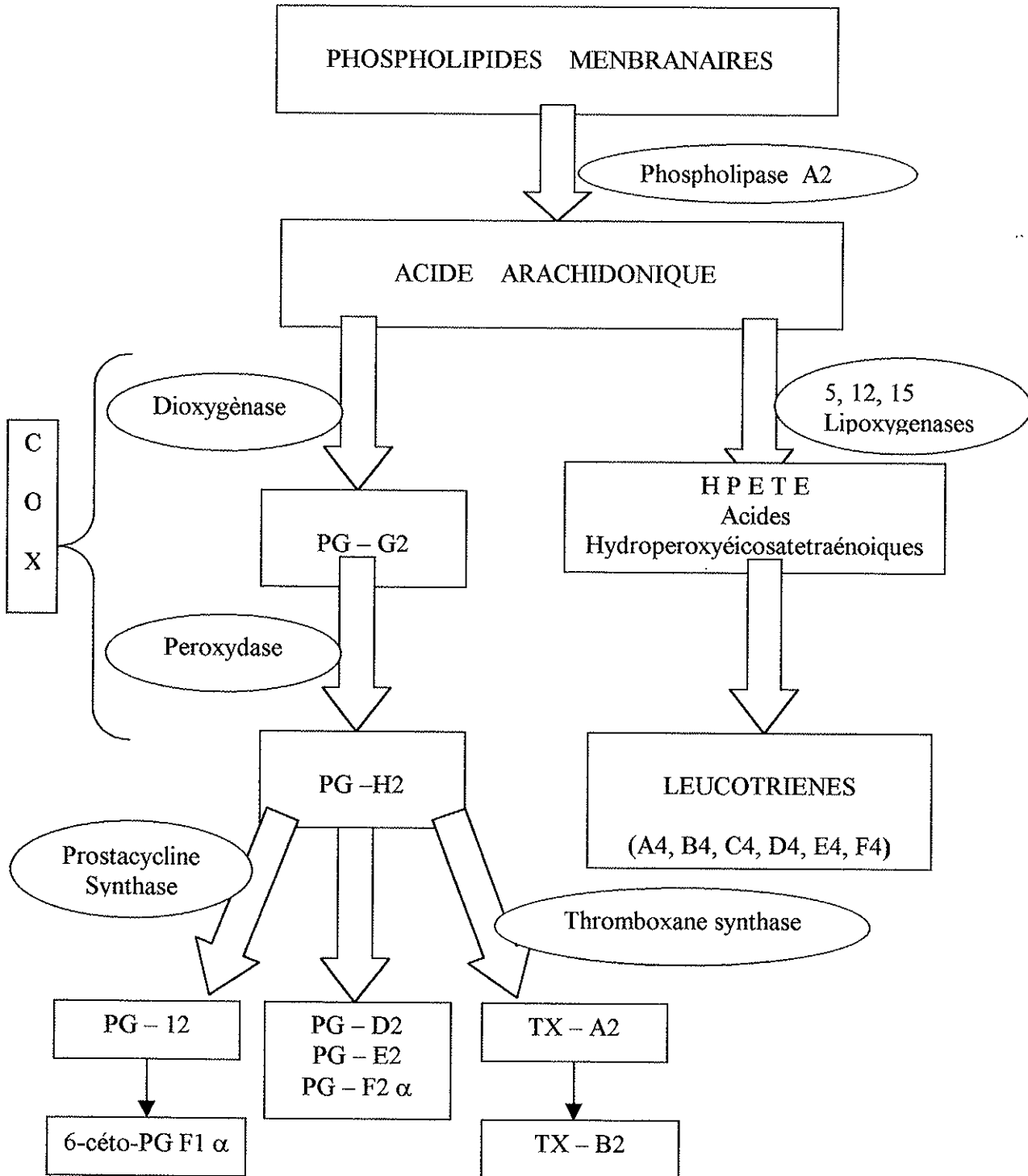


Figure 14 : SCHEMA DE BIOSYNTHESE DES EICOSANOIDES

Le resvératrol inhibe l'activité d'oxygénase de la COX-1 de façon compétitive dans les vésicules séminales de mouton et cet effet est en corrélation avec une activité anti-promotion (NAM-HO S. et als).

Sur un extrait de *Cassia quinquangulata* (Légumineuses), ramassé au Pérou et considéré comme un potentiel inhibiteur de la COX, a été identifié par analyse la présence de resvératrol (JANG et als, 1997).

Les auteurs ont étudié la capacité du resvératrol à inhiber l'activité de la COX-1 (dose moyenne effective ED50 = 15  $\mu$ M), cette activité étant corrélée à la promotion anti-tumorale.

Bien que cette activité anti-tumorale soit moindre par rapport à certains AINS comme l'indométacine (ED50 = 2,3 $\mu$ M), elle était mieux que celle obtenue avec des composants comme l'aspirine (ED50 = 880  $\mu$ M).

Ainsi, à la différence de l'indométacine et la plupart des AINS, le resvératrol inhibe l'activité peroxydase de la COX-1 (ED50 = 3,7  $\mu$ M) et l'inhibition obtenue avec le resvératrol semble plus spécifique pour l'activité peroxydase de la COX-1, parce que l'inhibition de l'activité peroxydase de la COX-2 (ED50=85 $\mu$ M) a été très réduite comparé à celle observée avec la COX-1.

Sur la base de ces résultats, l'activité anti-inflammatoire du resvératrol a été recherchée. Dans le modèle d'induction de l'inflammation par le carraghénane, le resvératrol réduit significativement la phase d'œdème aussi bien dans la phase aiguë (3 à 7 heures) que dans la phase chronique (24 à 144 heures).

L'expression des gènes induits par le TPA a ensuite été évaluée. Une application topique de 10nmol de TPA sur la peau de souris provoque une stimulation rapide de la COX-1, de la COX-2, du c-myc, c-fos, c-jun, et l'expression de la TGF $\beta$ 1 et TNF- $\alpha$ .

Dans les animaux témoins traités par l'acétone, des niveaux modérément haut de l'expression de COX-1, c-myc, et c-jun sont observés et une expression faible ou absente de la COX-2, du c-fos, du TGF $\beta$ 1 ou de l'ARNm du TNF- $\alpha$  est observée.

L'effet du resvératrol sur l'expression de chaque gène étudié a été mesuré 4h après traitement par le TPA. Les résultats sont comparés avec les groupes témoins de souris traitées par l'acétone, le TPA seul ou le resvératrol seul.

L'induction de la COX-1, de la COX-2, du c-myc, c-jun, et l'ARNm du TNF- $\alpha$  n'est pas affecté par le traitement par le resvératrol à toutes les doses testées.

Cependant le resvératrol inhibe significativement l'expression du c-fos et du TGF $\beta$ 1 de façon dose dépendante.

Comparé aux animaux traités par l'acétone, le resvératrol lui-même n'altère l'expression d'aucun des gènes étudiés. Le resvératrol réduit donc l'expression de proto oncogènes comme le c-fos et le TGF $\beta$ 1 ce qui empêche la transmission de signaux de promotion tumorale vers toute la machinerie de transcription nucléaire.

En conclusion, le resvératrol inhibe la promotion tumorale induite par le TPA au niveau de la peau de souris.

De façon contradictoire, d'autres chercheurs ont montré que le resvératrol a une action sur la COX-2 et semble augmenter l'activité dioxygénase de la COX-2 mais inhibe son activité peroxydase.

Ceci implique que dans la COX-2, la suppression de l'activité peroxydase ne gêne pas le fonctionnement de la dioxygénase (JOHNSON J.L et als).

En stimulant la dioxygénase tout en inhibant la peroxydase, le resvératrol peut entraîner une accumulation de la PGG2 qui est un endoperoxyde cyclisé pouvant être hautement toxique

L'activité peroxydase de la COX-2 est responsable de l'activation de mutagènes. En inhibant l'activité peroxydase, le resvératrol peut empêcher la transformation de procarcinogènes en carcinogènes.

Une étude de Subbaramaiah (SUBBARAMAIAH K et als), stipule que le resvératrol supprime la synthèse de PGE2 induite par les esters de phorbol de façon dose-dépendante dans les cellules humaines épithéliales de sein via l'inhibition de l'expression du gène de la COX-2 et non de la COX-1.

Mais cette étude ne différencie pas les activités peroxydases et dioxygénases de ces enzymes.

### VII.1.2.3 Activité anti-progression

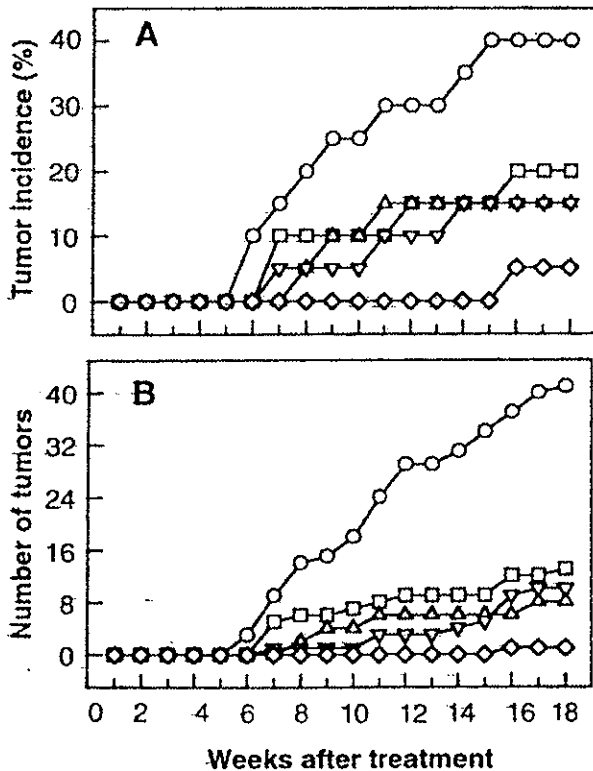
- le resvératrol réduit le développement tumoral dans un modèle cancéreux de la peau de souris (JANG et als, 1997).

Une étape importante et caractéristique des métastases cancéreuses est l'invasion. Le blocage de cet événement biologique par des médicaments ou par des facteurs nutritionnels prolonge la durée de vie de l'hôte affecté.

On a recherché les effets du resvératrol sur la réduction du développement de tumeur dans les 2 phases d'un modèle cancéreux de la peau de souris dans lequel le DMBA était utilisé comme initiateur et le TPA comme promoteur.

Pendant une étude de 18 semaines, les souris traitées avec le DMBA et le TPA ont développé une moyenne de 2 tumeurs par souris avec une incidence de 40 % de tumeur (fig.15A).

Une application de 1,5, 10 ou 25  $\mu\text{M}$  de resvératrol associé au TPA 2 fois par semaine pendant 18 semaines ont réduit le nombre de tumeur de la peau des souris à 68, 81, 76 ou 98 % respectivement, et le pourcentage de souris avec des tumeurs a été diminué de 50, 63, 63 ou 88 % respectivement (fig.15B).



Légende :

- rond : traitement des souris avec 5  $\mu\text{mol}$  de TPA dans 0,2 mL d'acétone
- carré : TPA + 1  $\mu\text{mol}$  de resvératrol
- triangle : TPA + 5  $\mu\text{mol}$  de resvératrol
- triangle renversé : TPA + 10  $\mu\text{mol}$  de resvératrol
- losange : TPA + 25  $\mu\text{mol}$  de resvératrol

*Figure 15 : Effets du resvératrol sur la genèse de tumeur sur un modèle de peau de souris*

Aucun signe supplémentaire de toxicité induite par le resvératrol n'ont été observé, à en juger par l'inspection de la peau, à l'examen morphologique grossier de la majorité des fonctions organiques ou de changement dans le poids du corps, en comparaison avec les témoins.

Le resvératrol inhibe donc le développement de tumeur au niveau d'un modèle cancéreux de peau d'une souris.

- l'activité anti-invasive est liée à une action anti-oxydante

Dans une première étude, on étudie l'effet du resvératrol sur l'invasion des cellules AH-109A, une lignée cellulaire cancéreuse d'une ascite hépatique de rat, par un système de co-culture de cellules d'un hépatome avec des cellules mésothéliales (M-cells), cellules endothéliales des tuniques séreuses par un procédé de dérivation mésentérique (KOZUKI Y. et als).

Ce procédé représente un modèle pour mesurer l'invasion d'une tumeur.

Dans une deuxième étude, en utilisant des cellules AH-109A, prétraitées par l'hypoxanthine et la xanthine oxydase, on tente de démontrer l'importance de l'activité anti-oxydante du resvératrol dans l'inhibition de l'invasion des cellules tumorales.

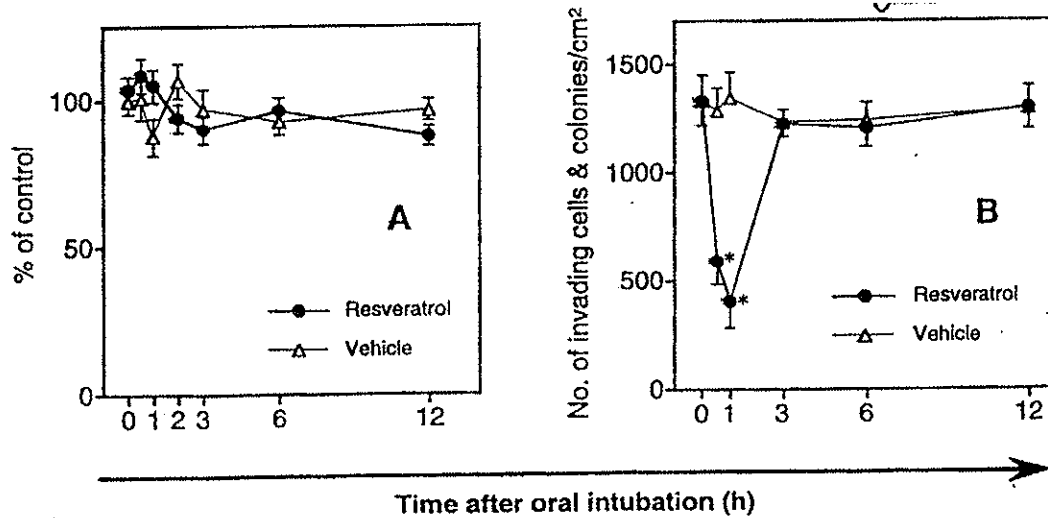
Tout d'abord, l'effet temps-dépendant du resvératrol sur la prolifération et l'invasion des cellules AH-109A est évalué.

Pour cela on utilise le sérum d'un rat. La suspension de resvératrol (5mg pour 100g de poids) est intubée au rat, puis on collecte le sang des rats ayant reçu du resvératrol à des intervalles réguliers et le sang des rats témoins.

On réalise une centrifugation du sang pour obtenir le sérum et on l'introduit dans le milieu de culture à la concentration de 10 %.

On mesure ensuite l'activité de prolifération et d'invasion des cellules AH-109A en présence de ces sérums.

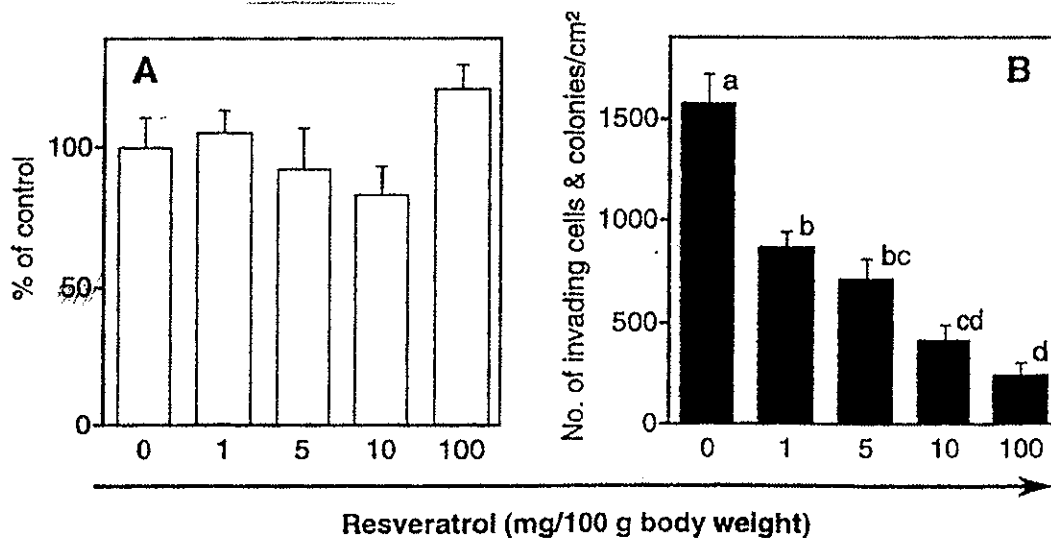
Comme cela est montré sur la figure 16B, les sérums de rat suppriment significativement l'invasion de l'hépatome 0.5 et 1h après l'intubation orale en comparaison avec la valeur à  $t=0$  h des rats ayant reçu du resvératrol et avec les groupes témoins correspondant (fig.5B) tandis qu'ils n'influencent pas de façon appréciable la prolifération de l'hépatome sous les mêmes conditions (fig. 16A). Cet effet anti-invasif disparaît 3h après l'intubation orale.



*Figure 16 : Effets temps dépendant du resvératrol sur la prolifération (A) et l'invasion (B) des cellules AH-109A.*

Ensuite, l'étude sur l'effet dose-dépendant du resvératrol sur la prolifération et l'invasion des cellules AH-109A a été réalisée.

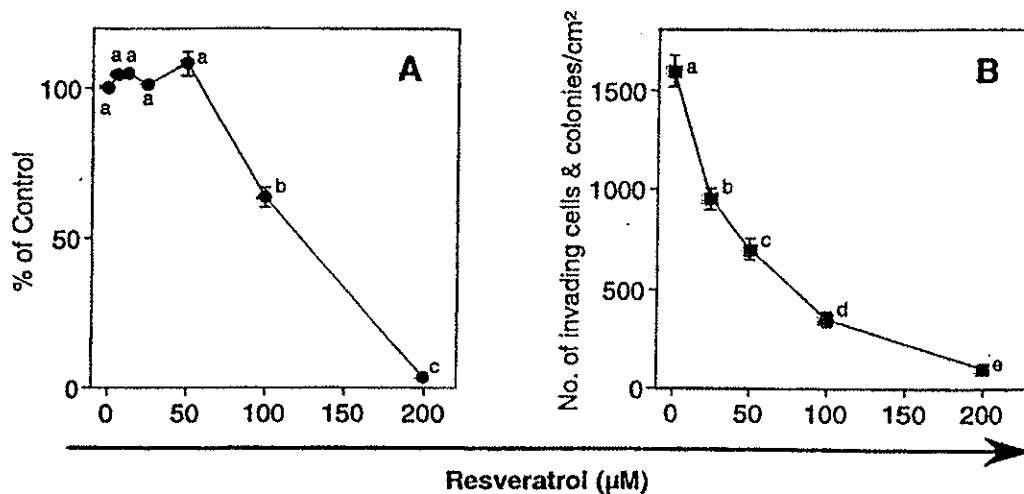
Les sérums de rat ayant reçu du resvératrol inhibent l'invasion des cellules tumorales de façon dose-dépendante (fig. 17B), tandis qu'ils n'ont pas d'effets significatifs sur la prolifération des cellules AH-109A (fig. 17A).



*Figure 17 : Effets dose dépendants du resvératrol sur la prolifération (A) et l'invasion (B) des cellules AH-109A.*

Pour résumer, le resvératrol inhibe à la fois la prolifération et l'invasion des cellules de l'hépatome à des concentrations élevées de 100 et 200  $\mu$ M (fig. 18).





*Figure 18 : Effets du resvératrol sur la prolifération (A) et l'invasion (B) des cellules AH-109A par un test in vitro*

Cependant, le composé supprime l'invasion à des concentrations de 25 et 50 µM tandis qu'il n'exerce aucune influence sur la prolifération. Le sérum de rat contenant du resvératrol maîtrise seulement l'invasion (fig.16 et 17).

Ces résultats suggèrent que l'effet anti-invasif du resvératrol est indépendant de son effet anti-prolifératif.

On peut penser que la propriété anti-oxydante du resvératrol soit impliquée dans cette action anti-invasive dans notre système de test.

Notre étude montre que le resvératrol et le sérum de rat contenant du resvératrol suppriment la capacité invasive potentialisée par les formes réactives de l'oxygène (ROS).

La capacité anti-oxydante du resvératrol ou de ses métabolites pourrait donc être impliquée dans leur action anti-invasive.

Les sérums de rat contenant du resvératrol ne montrent pas d'activité anti-proliférative bien qu'ils suppriment l'invasion des cellules AH-109A. La raison de ce phénomène n'est pas claire à présent.

Cependant, les concentrations de resvératrol et/ou de ses métabolites dans le sang semble être suffisantes pour l'activité anti-invasive.

Il semble que la plus grande part de resvératrol pourrait avoir été métabolisée en des composés qui conservent leur activité anti-oxydante mais perdent leur activité anti-proliférative.

Cette conversion pourrait résulter d'une diminution dans le sérum de la concentration de resvératrol.

Ainsi, il est intéressant de réaliser des analyses quantitatives et qualitatives de sérum contenant du resvératrol et ses métabolites pour clarifier le phénomène mentionné ci-dessus.

En conclusion, le resvératrol inhibe à la fois la prolifération et l'invasion des cellules AH-109A à de fortes concentrations mais supprime seulement l'invasion à des concentrations plus faibles ; et le sérum de rat contenant du resvératrol maîtrise uniquement l'invasion.

L'activité anti-invasive du resvératrol est indépendante de son activité anti-proliférative.

Le resvératrol et le sérum de rat contenant du resvératrol supprime également l'activité invasive potentialisée par les formes réactives de l'oxygène des cellules d'un hépatome, ce qui suggère l'implication de la propriété anti-oxydante du resvératrol.

- effet anti-progression par induction de la différenciation cellulaire (DELLA RAGIONE F. et als)

On a testé la capacité du resvératrol à inhiber le troisième stade du processus de la carcinogenèse en utilisant des cellules HL-60, qui, sous des conditions de cultures normales ont des capacités de prolifération illimitées. Dans ces expériences, on a utilisé la vitamine D3 comme contrôle positif de l'induction de la différenciation.

L'addition de resvératrol dans le milieu de culture produit une augmentation significative de la réduction du nitrobleu tétrazolium qui est un marqueur connu de la différenciation des cellules HL-60 vers la lignée myélo monocyttaire.

De façon intéressante un résultat similaire est obtenu avec un traitement par la vitamine D3 (contrôle positif de l'induction de la différenciation).

De plus, une augmentation de cellules montrant une activité acide estérase non spécifique (autre marqueur de la différenciation) est observée par analyse microscopique

Afin de savoir si l'activité inhibitrice du resvératrol est reliée à l'induction de l'apoptose, on a analysé des cellules HL-60 traitées par le resvératrol par cytométrie de flux (technique de comptage et d'identification de cellules).

Les résultats indiquent qu'au-dessus d'une concentration de 30 $\mu$ M, un très faible % de cellules apoptotiques sont détectées (environ 4%), ce qui est superposable aux valeurs obtenues pour les cellules non traitées.

A des concentrations plus fortes, une augmentation de l'apoptose peut être observée.

De façon intéressante, l'analyse en cytométrie de flux indique l'absence complète de pic G2/M et l'accumulation de cellules en phases G 1/S.

En conclusion, le resvératrol, à des concentrations comparables à celles que l'on retrouve dans le vin et le raisin produit un arrêt complet de la prolifération des cellules HL-60. Cet arrêt est réversible, non dû à l'induction de l'apoptose et associé à une différenciation vers un phénotype myélo-monocytaire.

Après addition de 30µM de resvératrol, une augmentation significative des cyclines A et E (preuve d'un blocage entre les phases S et G2) ainsi que de la forme inactive de la cdc2 ou cdk1 (preuve d'un arrêt du cycle cellulaire empêchant l'entrée en phase G2) est observée.

Ces données démontrent clairement qu'un traitement par le resvératrol cause l'arrêt du cycle de division cellulaire au niveau du point contrôle en phase S.

Pour résumer, la cytométrie de flux et les analyses biochimiques détaillées, montre que le resvératrol bloque la prolifération cellulaire au point de contrôle des phases S/G2.

Ceci cause un allongement de la phase S et l'activation du programme de différenciation cellulaire ou probablement à de fortes concentrations de resvératrol, l'activation du processus d'apoptose.

## VII.1.3 ACTION SUR LE NO

### VII.1.3.1 Le monoxyde d'azote (NO)

#### a. Origine du monoxyde d'azote

C'est un gaz potentiellement toxique, d'une demie-vie de quelques secondes, ayant un électron célibataire, ce qui lui confère une forte réactivité. Il est synthétisé de façon enzymatique à partir de la L-arginine par la NO synthase (NOS) en présence d'oxygène et de NADPH.

Il existe deux types de NOS, une forme constitutive et une forme inductible.

Les isoformes NOS constitutives exigent la présence de Ca<sup>2+</sup> et de calmoduline pour leur activité et synthétisent une quantité de NO de l'ordre du pmol/L qui est bénéfique. Elles ont été isolées à partir des neurones (nNOS) et des cellules endothéliales (eNOS).

Par contre les isoformes inductibles (iNOS) sont généralement calcium indépendant et produisent de fortes quantités de NO de l'ordre du nmol/L qui est cytotoxique.

Cette isoforme est présente dans de nombreux types cellulaires (macrophages, monocytes, neutrophiles, lymphocytes, cellules du muscle lisse vasculaire) et s'exprime presque exclusivement après une exposition à des cytokines et des lipopolysaccharides bactériens (LPS).

Le NO agit comme une molécule messager sur diverses fonctions physiologiques et peut intervenir à tous les niveaux de la régulation cellulaire.

### **b Effet du NO sur la signalisation cellulaire via le GMPc**

La guanylate cyclase (GC) est une hémoprotéine qui, en présence de NO, perd un atome de Fer et devient active.

Il y a formation du second messager GMPc ; l'activation de protéines kinases dépendantes de GMPc entraîne une relaxation de la cellule musculaire lisse responsable d'une vasodilatation.

Au niveau du système nerveux central, NO agit comme un neuromédiateur, intervenant dans le système de transmission du glutamate qui est un acide aminé excitateur participant au processus de mémorisation. Quand le glutamate devient toxique, NO inactive son récepteur post-synaptique NMDA (N-méthyl-D-aspartate).

## **VII.1.3.2.NO et NFkB**

### **a.Définition de NFkB (RUSSO-MARIE F. et als)**

Le NFkB est un élément régulateur de la région promotrice de plusieurs cytokines proinflammatoires, c'est un facteur de transcription impliqué entre autres dans la prolifération des cellules tumorales.

Le NFkB est constitué de deux sous unités p50 et p65. Dans les macrophages activés, le NFkB, en synergie avec d'autres activateurs transcriptionnels, joue un rôle central en coordonnant l'expression de gènes codant pour le TNF- $\alpha$ , les interleukines IL-1, IL-6 et l'iNOS.

Le NFkB est lié dans le cytoplasme à une sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B qui, en réponse à une variété de stimuli parmi lesquels le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, les radicaux oxygénés, les virus, le LPS ou les rayons UV, est phosphorylée par un complexe IKK et dégradée. Libéré d'I $\kappa$ B, NFkB peut migrer dans le noyau et est capable de reconnaître et de se fixer sur une séquence particulière appelée « kB enhancer ».

Les gènes contenant cette séquence, en particulier ceux contrôlant la production de médiateurs inflammatoires cités, peuvent donc être activés par le NFkB.

Selon les chercheurs américains, le *trans*-resvératrol pourrait, en inhibant l'IKK, bloquer l'activation du NFkB, donc l'expression des gènes dépendant du NFkB.

#### **b.Effet du NO sur NFkB**

Le NO entraîne l'inactivation du NFkB par stabilisation d'IkB qui est plus difficile à dégrader, en induisant l'expression du gène IkB et en diminuant la liaison du NFkB à l'ADN.

### **VII.1.3.3 Action du resvératrol sur le monoxyde d'azote et son rôle dans la carcinogénèse**

#### **a.Inhibition de l'expression d'iNOS**

De fortes quantités de NO et de ses dérivés jouent un rôle important dans l'inflammation et le processus de carcinogénèse.

On a étudié les effets du resvératrol sur la protéine iNOS dans les macrophages Raw264.7 activés par le LPS (TSAI SH. et als). Cette étude montre que l'inhibition de la protéine iNOS par le resvératrol est dose-dépendante avec une IC50 de 5µM.

Elle révèle également qu'une co-incubation de macrophages avec le LPS et le resvératrol provoque presque complètement la suppression de l'ARNm d'iNOS en bloquant la transcription de son gène ; il peut donc agir comme un protecteur contre les effets des agents stimulant l'induction d'iNOS.

Cependant, contrairement à l'étude précédente, Kawada et ses collaborateurs (KAWADA N. et als), estiment que le resvératrol diminue les quantités d'iNOS en présence du LPS sans affecter les niveaux d'ARNm mais que l'inhibition de la production de NO par le resvératrol peut s'opérer au niveau post-transcriptionnel. Ceci a été montré dans les cellules de Küpfer de rats stimulées par le LPS.

En conclusion, on peut dire que le resvératrol inhibe la synthèse de NO. Cependant il existe des différences dans le mode d'action, ceci peut provenir des protocoles d'étude différents utilisant des concentrations de resvératrol variables.

#### **b.Effets régulateurs de croissance du resvératrol sur les cellules endothéliales et induction d'eNOS (HSIEH T.C et als)**

Les cellules endothéliales jouent un rôle fondamental en maintenant l'intégrité et le fonctionnement de l'endothélium vasculaire.

L'homéostasie de l'endothélium vasculaire, aussi bien en termes d'activités métaboliques que physiologiques, est sujet à de fins réglages par des aliments simples ou leurs dérivés.

A la suite d'un dommage vasculaire dû à un traumatisme, une inflammation aiguë, l'endothélium peut devenir vulnérable et perdre ses propriétés de barrière. Cet endommagement est considéré comme jouant un rôle pivot en initiant l'athérosclérose.

Suite à l'étude des effets du resvératrol sur la croissance des cellules BPAE cultivées, on a découvert que ce produit réduisait la prolifération des cellules endothéliales, prolifération qui joue un rôle clef dans la pathogenèse de l'athérosclérose.

Le resvératrol pourrait exercer un effet cardiovasculaire protecteur en produisant des changements sur des gènes spécifiques dans les cellules endothéliales, incluant ceux impliqués intégralement dans la biogenèse de NO. Parce que le NO est un gaz à durée de vie courte et impossible à visualiser directement, on a testé les effets du resvératrol en faisant des essais sur l'eNOS, une isoforme de NOS spécifiquement et constitutivement exprimée dans les cellules endothéliales.

Un traitement de cellules BPAE avec 50 à 100µM de resvératrol entraîne une augmentation triplée dans l'expression de l'eNOS, tandis que 10µM de resvératrol n'ont aucun effet.

Le resvératrol induit donc l'eNOS, mais il perturbe également la progression du cycle cellulaire, en particulier en fin de phase S et en phase G2. Cette perturbation est accompagnée d'une accumulation du gène suppresseur de tumeur p53 de façon concomitante avec l'inhibiteur de cdk p21<sup>waf/cip1</sup>.

Pour minimiser le développement du stress oxydatif, les cellules endothéliales possèdent de nombreux mécanismes de défense à l'intérieur du milieu cellulaire, incluant le NO, qui sert à protéger les sites intracellulaires des risques du stress oxydatif.

L'eNOS, qui s'exprime dans les cellules endothéliales, inhibe le tonus contractile et la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire en produisant du NO.

Aux concentrations présentes dans le vin et le raisin, le resvératrol peut fournir une petite augmentation de la production de NO par l'eNOS et les concentrations en NO atteintes peuvent être suffisantes pour faire pencher la balance entre les états prooxydants et antioxydants, en favorisant le dernier. Le resvératrol pourrait ainsi diminuer l'incidence de l'athérosclérose.

En conclusion, la croissance des cellules BPAE en présence de resvératrol conduit à plusieurs changements cellulaires, notamment l'induction de l'eNOS, de la p53, de la p21 et la suppression de la prolifération cellulaire.

L'inhibition de la prolifération cellulaire, qui se manifeste par une accumulation de cellules en phases S et G2 est étroitement parallèle aux niveaux élevés de p53 et p21 observée pour des concentrations en resvératrol de 50 et 100µM. La sur régulation de la p53 est responsable de l'induction de la transcription de la p21.

Pris ensemble, ces résultats montrent que le resvératrol, par la surexpression de l'eNOS et de la p53, peut réduire les dommages de l'endothélium vasculaire et le développement de maladies comme l'athérosclérose et la thrombose.

### **c. Inhibition de la production de NO par le resvératrol**

- Par l'intermédiaire du facteur NFκB

Le resvératrol produit une diminution de l'expression d'iNOS et ceci a pour conséquence une baisse de la production de NO de manière dose dépendante dans les macrophages Raw264.7 (TSAI SH. et als) et dans les cellules de Küpfer de rats stimulées par le LPS (MC NARY H. et als).

L'activation du facteur NFκB est nécessaire pour induire l'iNOS dans les macrophages exposés au LPS.

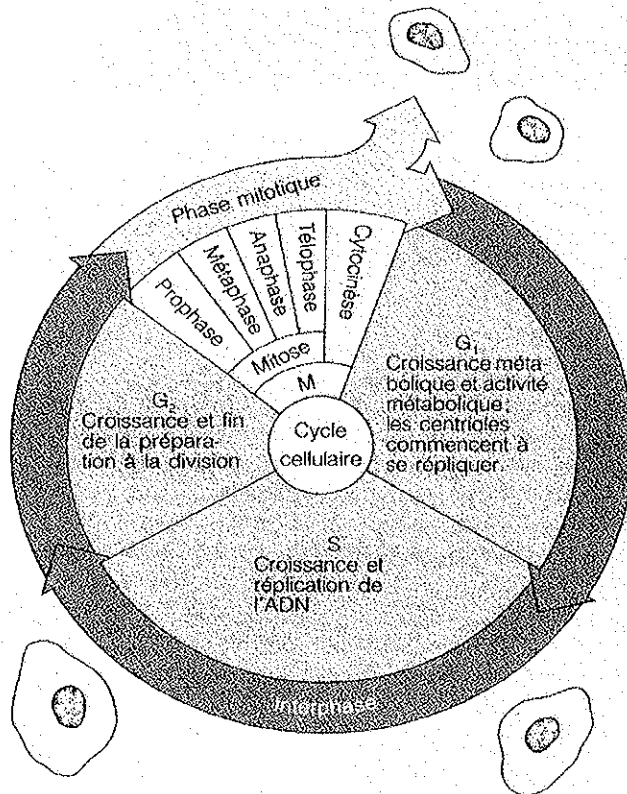
Le resvératrol bloque l'IKK, complexe qui phosphoryle la sous-unité IκB. En bloquant la phosphorylation ainsi que la dégradation de la protéine IκB, le resvératrol empêche la translocation du facteur NFκB et finalement supprime son activation dans le noyau, ce qui bloque l'induction de l'iNOS et la production de NO qui est cytotoxique.

## **VII.2 EFFETS CHIMIOTHERAPEUTIQUES DU RESVERATROL : ACTION SUR LE CYCLE CELLULAIRE, LA PROLIFERATION CELLULAIRE ET L'APOPTOSE**

### **VII.2.1. LE CYCLE CELLULAIRE**

Dans le cycle cellulaire, on distingue 4 phases : G1-S-G2-M avec G pour « gap » ou intervalle de repos et S pour « synthesis » ou synthèse d'ADN.

L'espace de temps entre 2 mitoses ou interphase correspond donc à G1+S+G2. L'accumulation de matériaux nécessaires à la division cellulaire se produit pendant les phases G1 et S.



*Figure 19 : Schéma du cycle cellulaire (MARIEB E.N.)*

Les protéines impliquées dans le cycle cellulaire sont les cdk (cyclin dependent kinase).

Les cyclines sont des protéines synthétisées continuellement pendant l'interphase puis sont brusquement dégradées par des enzymes protéolytiques à la fin de chaque mitose, d'où leur nom.

Dans le cycle cellulaire, il existe deux points cruciaux de contrôle ou « check point » :

- le passage G1 à S

Il existe en phase G1 un point de non retour ou point R pour « restriction ». Une fois ce point franchi, la cellule s'engage de façon irréversible vers la phase S de synthèse d'ADN. En fait, il y aura encore deux possibilités : division ou suicide (apoptose).

Les cdk2 et cdk4 sont impliquées dans le contrôle des événements de la phase G1.



• le passage G2 à M

C'est au niveau de la phase G2 que l'on trouve le point T pour « transition ». La cdk1 et la cycline B s'associent et jouent un rôle essentiel pour déclencher l'entrée en mitose.

Les différentes enzymes seront activées ou désactivées par phosphorylation ou déphosphorylation. La cdk1 doit être phosphorylée pour être inactivée. Elle sera activée quand la tyr15 et la thr14 seront déphosphorylées par une phosphatase appelée cdc 25. La déphosphorylation déclenche le passage G2 à M, c'est à dire l'entrée en mitose.

## VII.2.2 ACTION SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

### VII.2.1.1. Inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse

Actuellement, les mécanismes responsables de l'effet anti-prolifératif du resvératrol restent très obscurs et les résultats obtenus par les chercheurs sont parfois contradictoires (ROEMER K.), (WOLTER F.).

Son fort pouvoir antiprolifératif semble s'expliquer de par son action sur des enzymes intervenant de façon directe ou indirecte dans la synthèse de l'ADN (ribonucléotide réductase et ADN polymérase) mais également par son action sur des enzymes ayant un rôle clef dans la prolifération cellulaire (ornithine décarboxylase, tyrosine kinase).

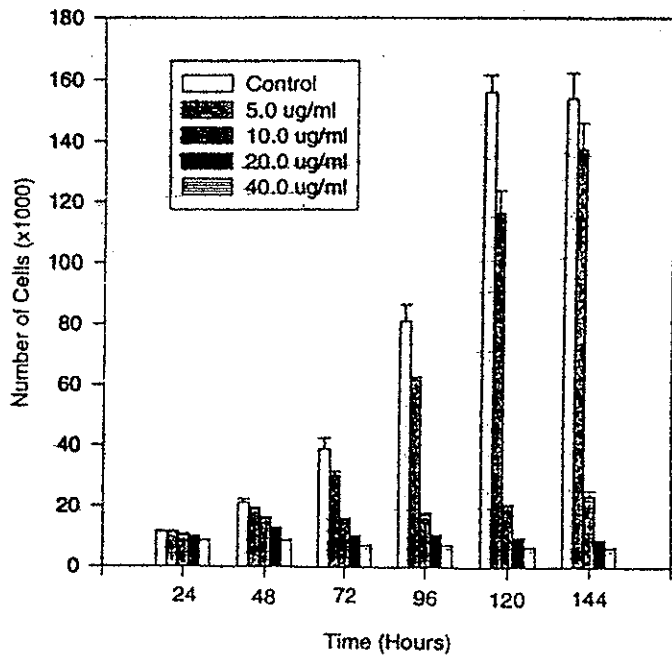
L'inhibition considérable de la viabilité cellulaire montrée dans les expérimentations suggère également que l'effet inhibiteur pourrait être relié à sa capacité à induire la mort cellulaire par apoptose, un phénomène associé aux effets de plusieurs substances anticancéreuses.

#### **a) Effet du resvératrol sur la capacité proliférative de cellules épithéliales mammaires humaines cancéreuses en culture (MGONYEBI O.P et als)**

Cette étude est réalisée sur 3 lignées cellulaires humaines cancéreuses. La lignée MCF-7 possédant des récepteurs estrogéniques et les lignées MCF-10F et MDAMB-231, ne possédant pas de récepteurs estrogéniques. Ces cellules ont été traitées avec 5, 10, 20 ou 40 µg/mL de resvératrol et leurs activités prolifératives ont été déterminées avec le WST1 (test colorimétrique utilisé pour les cellules en prolifération), avec des temps de traitement allant de 24 à 144 h.

L'exposition des cellules MCF-7, MCF-10F et MDAMB-231 à des concentrations de resvératrol allant de 5 à 40 µg/mL conduit à une décroissance exponentielle du taux de croissance des cellules en culture.

L'effet du resvératrol sur la viabilité des cellules MCF-7 est illustré par la figure 20.



*Figure 20 : Effets du resvératrol sur la viabilité des cellules MCF-7*

Les données démontrent clairement que cette substance a un effet inhibiteur sur la viabilité des cellules MCF-7 et cela est très marqué lorsque des doses de 10, 20 et 40  $\mu\text{g/mL}$  sont utilisées.

L'inhibition observée après 24 h de traitement est maintenue durant 144 h.

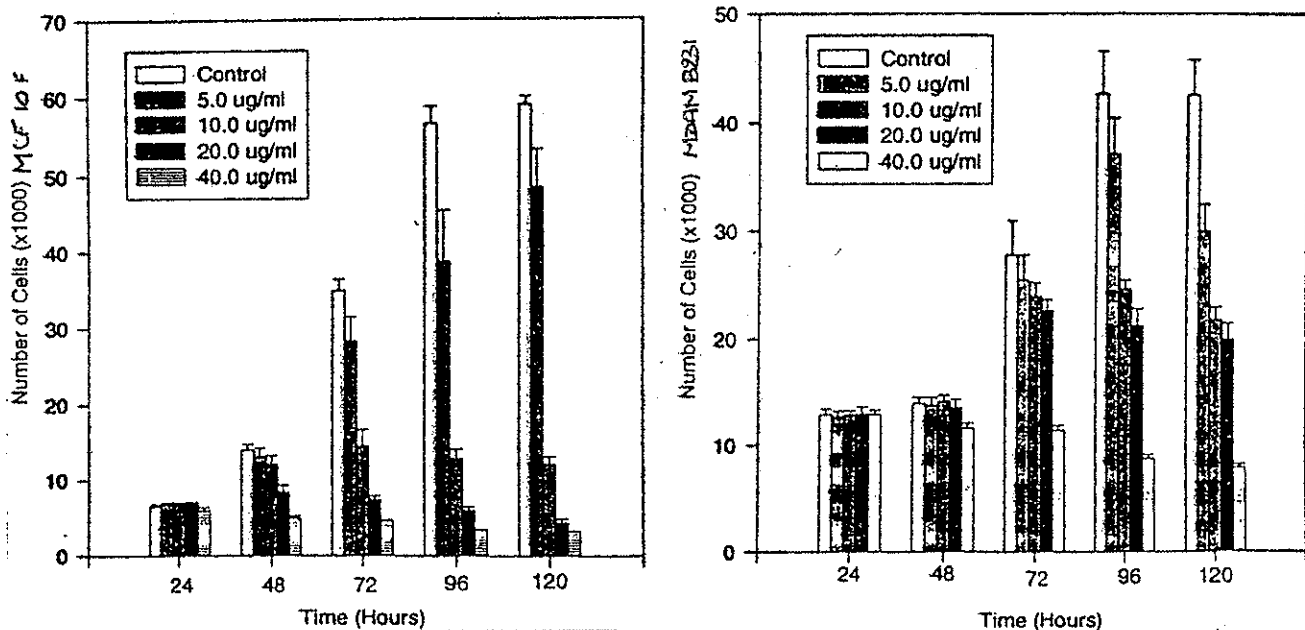
Comme cela est montré sur la figure 20, le resvératrol n'affecte pas la viabilité des cellules MCF-10F pendant les premières 24 h de traitement avec aucune des doses testées.

Un effet dose et temps dépendant devient clairement évident après 48 h de traitement et est maintenu jusqu'à 120 h.

La figure 21, démontre que 24 h d'exposition de ces cellules avec 5, 10, 20 ou 40  $\mu\text{g/mL}$  de resvératrol n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules.

Cependant, les traitements avec 10, 20 et 40 diminuent de façon marquée les cellules viables après 72 h en culture.

En comparaison avec des témoins, 5  $\mu\text{g/mL}$  de resvératrol réduisent le nombre de cellules viables seulement après 120 h de traitement.



*Figure 21 : Effets du resvératrol sur la viabilité des cellules MCF-10F et figure 22 : Effets du resvératrol sur la viabilité des cellules MDAMB-231*

Les résultats ont montré que cette substance inhibe la prolifération de cellules mammaires épithéliales humaines de façon dose et temps dépendant. Le traitement de ces cellules par le resvératrol, réduit le nombre de cellules viables et prévient la croissance exponentielle des 3 lignées cellulaires examinées.

Ces observations indiquent que le resvératrol a un effet anti-prolifératif direct sur les cellules épithéliales mammaires humaines indépendamment du nombre de récepteurs estrogéniques des cellules.

Ainsi ce composant de l'alimentation est un agent chimiopréventif potentiel pour à la fois les cancers hormonaux et non-hormonaux.

#### **b) Effet anti-prolifératif par action sur des enzymes**

- inhibition de la ribonucléotide réductase (FONTECAVE et als)

La ribonucléotide réductase est une enzyme complexe qui catalyse la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides.

Elle permet la prolifération cellulaire avec les désoxyribonucléotides nécessaires pour la synthèse d'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire.

L'effet inhibiteur du resvératrol sur la ribonucléotide réductase explique ainsi ses propriétés anti-prolifératives.

Les cellules mammaires, comme d'autres cellules eucaryotes, ont une enzyme formée de deux sous unités homodimériques non identiques R1 et R2. Chaque protéine représente une cible importante pour de nouveaux médicaments anti-prolifératifs.

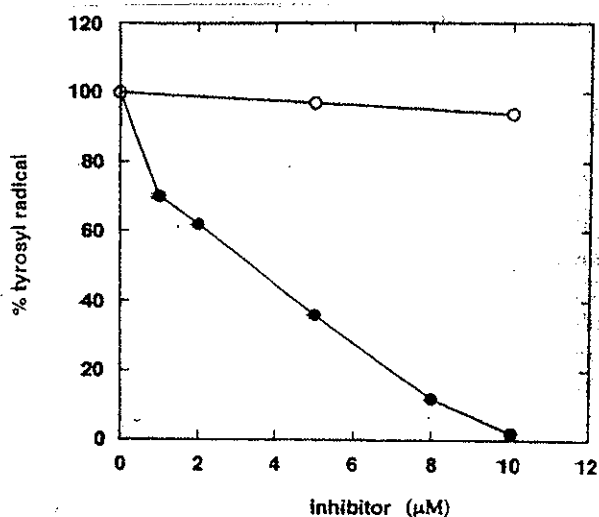
La protéine R1 contient le substrat se liant aux sites et peut être irréversiblement inactivée par certains analogues de nucléotides.

Une autre stratégie d'inhibition se base sur le fait que l'activité enzymatique dépend de la présence d'un radical tyrosyl sur un résidu spécifique de la petite protéine R2.

L'activité scavenger de l'hydroxyurée (agent anti-cancéreux) sur le radical tyrosyle provoque une inactivation enzymatique et une inhibition de la synthèse d'ADN.

Ainsi l'association d'AZT (médicament anti-VIH analogue de nucléotide) avec l'hydroxyurée dans la recherche de nouveaux médicaments contre le SIDA a produit des effets antiviraux synergiques.

On a trouvé que le radical tyrosyle est totalement détruit de façon essentiellement catalytique, en présence d'une quantité stoechiométrique de resvératrol (10 $\mu$ M) après 5 min d'incubation à 37°C (fig.23).

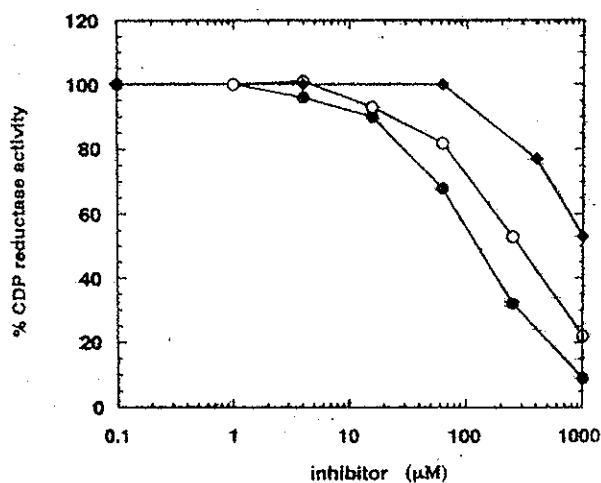


*Figure 23 : Inactivation de la protéine R2 de la ribonucléotide réductase murine par le resvératrol et l'hydroxyurée*

Le resvératrol est ainsi beaucoup plus actif que l'hydroxyurée puisque 10  $\mu$ M d'hydroxyurée n'ont pas d'effets détectables sur le radical tyrosyle après 5 min de réaction.

Les capacités du resvératrol à détruire le radical tyrosyle sont corrélées avec les effets inhibiteurs fortement dose-dépendant sur l'activité enzymatique de la ribonucléotide réductase, comme on peut le voir sur les extraits solubles de cellules leucémiques murines contenant une expression de la protéine R2 importante. La valeur IC50 (100 $\mu$ M) est beaucoup plus petite que celle de l'hydroxyurée (1mM).

On l'a également comparé avec celle du p-propoxyphénol, un des plus puissant phénol inhibiteur de la ribonucléotide réductase, qui s'est montré moins actif avec une valeur IC<sub>50</sub> de 300µM, sous des conditions comparables (fig. 24). On a obtenu une valeur IC<sub>50</sub> beaucoup plus basse que 100µM dans nos tests où la protéine R2 est plus limitante dans les cellules normales.



*Figure. 24 : Inhibition de l'activité de la ribonucléotide réductase murine par le resvératrol (cercle plein), l'hydroxyurée (losange) et le p-propoxyphénol (cercle vide)*

Les propriétés anti-prolifératives du resvératrol et ses effets inhibiteurs sur la synthèse d'ADN ont été évalués à partir de l'incorporation de thymidine tritiée dans un test ADN.

Pour ces expériences, ont été utilisées à la fois des cellules P815 mastocytaires murines et des cellules K562 leucémiques myélogènes humaines et l'effet du resvératrol et de l'hydroxyurée ont été comparés. Les deux lignées cellulaires donnent des résultats comparables avec le resvératrol qui est un bien meilleur inhibiteur de la synthèse d'ADN avec une valeur IC<sub>50</sub> de 8-10µM comparée avec la valeur IC<sub>50</sub> de 250µM pour l'hydroxyurée (fig.25).

Les valeurs IC<sub>50</sub> sont significativement plus basses que celles obtenues dans le test avec la CDP réductase décrit au-dessus. Cela reflète que les cellules utilisées ici ne surexpriment pas la protéine R2.

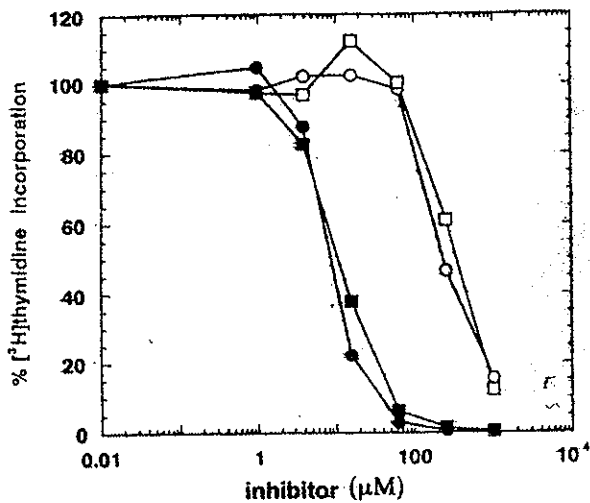


Figure 25 : Inhibition de la synthèse d'ADN par le resvératrol et l'hydroxyurée

Les cellules tumorales K562 (cercles) et P815 (carrés) sont incubées avec le resvératrol (figures pleines) ou l'hydroxyurée (figures creuses) et avec la thymidine tritiée à 37°C pendant 24h

Le resvératrol se montre être un remarquable inhibiteur de la ribonucléotide réductase et il est plus efficace que l'hydroxyurée, l'hydroxyanisole, les seules molécules attaquant le radical tyrosyle de la ribonucléotide réductase utilisées en médecine.

On confirme ici les propriétés fortement anti-prolifératives du resvératrol, propriétés qui semblent être dues à sa capacité à détruire efficacement le radical tyrosyle essentiel de la petite protéine de la ribonucléotide réductase et, en conséquent, d'inhiber la synthèse de desoxyribonucléotides.

- action sur la ribonucléotide réductase du virus HSV1 et HSV2 (DOCHERTY J et als)

La ribonucléotide réductase a une activité protéine kinase et c'est cette activité qui est nécessaire pour une expression efficace de l'ICP-4 (protéine régulatrice virale précoce).

Puisque le resvératrol est capable d'inhiber de façon efficace l'activité de la ribonucléotide réductase cellulaire, comme on vient de le voir, il peut aussi affecter défavorablement la ribonucléotide réductase virale et l'activité kinase, réduisant l'expression optimale de l'ICP-4.

Cela pourrait en retour empêcher la synthèse de protéines virales précoces essentielles pour la réplication ou la réactivation des formes latentes de l'HSV.

Puisque ni la ribonucléotide réductase cellulaire ou virale ne sont capables de générer les déoxyribonucléotides pour la synthèse d'ADN, les cellules s'arrêtent en phase S/G2 et la réplication de l'HSV cesse.

La ribonucléotide réductase représente une cible potentielle pour le resvératrol, mais il est aussi possible que le resvératrol diminue directement la production d'ICP-4.

Il peut également agir indirectement sur la réplication virale en affectant les kinases cellulaires en phase G1/S du cycle nécessaire pour la réplication efficace de l'HSV.

Pour finir, on a prouvé que le resvératrol inhibait également l'activité de l'ADN polymérase et peut donc agir sur cette enzyme virale en limitant la synthèse d'ADN viral, et donc la production de nouveaux virions.

Pour savoir si d'autres stilbènes peuvent affecter la réplication de l'HSV, on teste le picéatannol qui diffère du resvératrol que par un groupement hydroxyle. Il n'a aucun effet sur la réplication de l'HSV.

Ces données suggèrent que l'inhibition de la réplication de l'HSV par les composés stilbéniques nécessite un haut degré de spécificité, l'exigence structurale est importante.

Le resvératrol pourrait à l'avenir être utilisé comme médicament anti-herpétique.

- action sur l'ADN polymérase

Un extrait éthanolique de *Psoralea Corylifolia* a causé une forte inhibition de l'ADN polymérase dans un essai biologique cellulaire spécifique pour les inhibiteurs des enzymes de réplication de l'ADN, (SUN NJ et als).

L'analyse des composés actifs a conduit à l'identification d'un nouveau composé, la coryfiline.

Le resvératrol dont la structure est proche de ce composé isolé a été testé et il s'est avéré qu'il inhibait l'ADN polymérase.

On a également étudié les effets du resvératrol sur la prolifération des cellules fibroblastiques normales humaines et sur les cellules d'un fibrosarcome. Le resvératrol affecte la progression du cycle cellulaire en inhibant la réplication de l'ADN au niveau de l'ADN polymérase L (FORTI L. et als).

La progression du cycle cellulaire a été mesurée par une analyse en cytométrie de flux du contenu en ADN. La réplication d'ADN a été évaluée par incorporation de bromodesoxyuridine (BrdU) et immunostimulation.

Les résultats montrent que le resvératrol induit une accumulation de cellules du début de la phase S après 24 heures de traitement et de la phase de transition S-G2/ M après 48 heures de traitement.

Cet effet est réversible puisque le % de cellules en phase S retourne à la valeur de contrôle 24 heures après le retrait de ce composant.

Un traitement par les dérivés du resvératrol n'a pas d'effet sur la progression du cycle cellulaire. Le retard de la phase S induit par le resvératrol a lieu de façon concomitante avec une réduction de l'incorporation de BrdU.

L'antigène de noyau cellulaire proliférant (PCNA) et la protéine de réplication (RP-A) sont assemblées dans le foyer de réplication dans la phase cellulaire S d'arrêt, suggérant que la réplication de l'ADN est affectée par l'inhibition de l'ADN polymérase.

Ces résultats indiquent que le resvératrol affecte la progression du cycle cellulaire en inhibant la réplication de l'ADN au niveau de l'ADN polymérase  $\delta$ .

- action sur l'ornithine décarboxylase (ODC) dans les cellules cancéreuses du colon (SCHNEIDER Y. et als)

L'ODC ou ornithine décarboxylase est une enzyme clef dans la biosynthèse des polyamines dans les cellules CaCo2 (cellules cancéreuses du côlon) ; de plus, une haute expression de l'ODC est caractéristique des cellules cancéreuses.

L'ODC est exprimée la plupart du temps dans les cellules CaCo-2 en prolifération, son activité est plus faible quand les cellules se différencient.

On sait également que l'expression de l'ODC varie considérablement pendant la progression des cellules à travers le cycle cellulaire, avec des pics au début de la phase S et en phase G2/M.

Le resvératrol, à la concentration de 25 $\mu$ M/L produit une décroissance de l'activité de l'ODC dans les cellules CaCo-2 et manifeste un important effet anti-prolifératif.

L'effet anti-prolifératif semble relié à la capacité du resvératrol à provoquer une inhibition de la croissance à la phase de transition S/G2 du cycle cellulaire. Ses effets sont réversibles, puisque les cellules reprennent leur croissance après 40h. Ceci est montré par la grande quantité de cellules engagées à la phase de transition G2/M.

La réversibilité de l'effet du resvératrol pourrait être expliquée par sa transformation métabolique, et/ou par son instabilité dans le milieu de culture, car si on additionne du resvératrol au moment où les cellules reprennent leur croissance, on obtient à nouveau une inhibition de croissance.

Plusieurs études ont été faites dans le but d'établir des relations entre l'expression de l'ODC et de la PKC (protéine kinase C), (SLATER SJ et als).

Les protéines kinases sont les produits de l'expression d'oncogènes, capables de phosphoryler des protéines sur leur résidu tyrosine, sérine ou thréonine. Elles jouent un rôle fondamental dans la transduction du signal et régulent ainsi le métabolisme cellulaire, la croissance cellulaire et les processus de différenciation et d'apoptose.



Un certain nombre de protéines kinases sont impliquées dans la physiopathogénie de certains cancers comme la PKC qui est un médiateur clef de la promotion et de la progression tumorale.

On a montré que la staurosporine, un inhibiteur puissant de la PKC, inhibe à la fois l'induction de l'ODC et la promotion de la tumorigénèse dans la peau de souris. De même, le phorbol ester, un activateur puissant de la PKC, induit l'expression de l'ODC dans l'épiderme de souris et dans les cellules épithéliales. Des données récentes montrent que le resvératrol inhibe l'activité de la PKC.

Sur la base de ces données, on peut faire l'hypothèse que l'inhibition de l'ODC par le resvératrol dans les cellules CaCo-2 est réalisée à travers l'inactivation de la PKC.

Un effet direct du resvératrol sur l'ODC est peu probable, puisque des variations de concentrations du resvératrol (de 5 à 25  $\mu\text{M}$ ) n'affectent pas l'ODC dans des homogénats cellulaires de cellules CaCo-2.

En conclusion, ces résultats sont les premiers à décrire un effet anti-prolifératif puissant du resvératrol sur les cellules cancéreuses du côlon humaines.

Des analyses par cytométrie de flux et l'absence de fragmentation de l'ADN montre que le resvératrol n'induit pas l'apoptose des cellules CaCo-2. Des résultats contradictoires ont été rapportés sur l'induction de l'apoptose par le resvératrol, cependant, dans cette étude, l'effet anti-prolifératif du resvératrol n'est pas relié à ses propriétés pro-apoptotiques.

Le resvératrol n'a pas d'effet cytotoxique, il est la plupart du temps cytotatique, et conduit à l'accumulation de cellules CaCo-2 à la phase de transition S/G2.

L'inhibition de l'expression de l'ODC peut être une des plusieurs cibles impliquées dans l'effet anti-prolifératif du resvératrol.

La faible toxicité du resvératrol est attractive pour les études *in vivo* de prévention et de traitement du cancer du côlon.

### **c) Etude des effets du resvératrol *in vivo* sur la croissance tumorale chez le rat (CARBO N. et als)**

La plupart des études concernant les effets du resvératrol ont été réalisées *in vitro*, il est pour cela intéressant de savoir si les mêmes effets peuvent se reproduire *in vivo*.

Il a ainsi été testé le potentiel chimiothérapeutique de ce composé quand il est administré à des rats ayant une ascite hépatique yoshida AH-130, une tumeur à croissance rapide qui cause la mort de l'animal environ 10 jours après l'inoculation.

Quatre groupes de rats pesant aux alentours de 100g. ont pour cela été formés :

- premier lot = rats témoins
- second lot = rats traités par le resvératrol
- troisième lot = rats transplantés AH-130
- quatrième lot = rats transplantés AH-130 traités par le resvératrol

Un libre accès à la nourriture leur est permis et on mesure leur consommation tous les jours. Les rats traités reçoivent une injection intrapéritonéale de resvératrol à la dose de 1mg par kg de poids.

Les rats transplantés sont pesés 7 jours après et on les anesthésie pour mesurer le volume de la tumeur. Cette tumeur produit une réduction de la prise alimentaire et du poids de l'animal (tableau 8).

La croissance tumorale progresse rapidement et massivement au sein des tissus, et on a un amaigrissement dû à l'accélération du catabolisme des protéines associée à des perturbations du statut hormonal.

Le traitement des rats témoins par le resvératrol n'exerce pas d'effets importants à la fois sur la prise de nourriture ou sur le poids du corps (tableau 8), montrant que même si la dose utilisée est plutôt élevée, elle est bien tolérée par les animaux.

*Tableau 8 : Effets du traitement par le resvératrol sur le poids des animaux et la prise de nourriture*

	Poids de l'animal (g)	Prise de nourriture (g)
Rats témoins	144 +/- 2	115 +/- 10
Rats traités	145 +/- 5	112 +/- 13
Rats porteurs de AH-130	101 +/- 2	90 +/- 7
Rats AH-130 traités	82 +/- 1	65 +/- 6

Lorsque le resvératrol est administré à des animaux ayant la tumeur, on observe un ralentissement de la croissance tumorale (tableau 9).

*Tableau 9 : Effets du resvératrol sur le nombre de cellules tumorales et sur la distribution des cellules dans le cycle des cellules AH-130 yoshida*

Paramètres	TRAITEMENT	
	Sans resvératrol (n=7)	Avec resvératrol (n=7)
<i>Tumeur</i>		
Volume de la tumeur (ml)	42.3 +/- 1.9	43.90 +/- 1.4
Nombre total de cellules(*10 <sup>6</sup> )	4524 +/- 132	3380 +/- 139
<i>Distribution des cellules dans le cycle</i>		
% de cellules en G1/G0	66.4 +/- 1.1	62.6 +/- 2.5
% de cellules en S	25.4 +/- 1.2	22.6 +/- 1.5
% de cellules en G2/M	8.1 +/- 0.4	14.8 +/- 1.7

La distribution des cellules dans le cycle cellulaire analysée par cytométrie de flux montre que le resvératrol induit une légère accumulation des cellules en phase G2/M.

De plus, le traitement produit l'apparition d'un pic hypodiploïde probablement dû à la présence de cellules apoptotiques et/ou de corps apoptotiques contenant de l'ADN < à 2n.

Cependant l'effet cytotoxique obtenu *in vivo* n'est pas parallèle aux résultats obtenus *in vitro*.

En fait, après 24h de culture en présence de resvératrol, le nombre de cellules AH-130 est comparable au lot témoin et la présence de cellules apoptotiques n'est pas détectable ni morphologiquement, ni par cytométrie de flux (tableau 10).

*Tableau 10 : Effets après 24h d'exposition au resvératrol sur le nombre de cellules tumorales et sur la distribution du cycle cellulaire des cellules AH-130 in vitro*

	Nombre de cellules	G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Contrôles	1 280 000	70,5	18	11,4
Resvératrol (15µM)	1 280 000	67,5	19,5	13,1
Resvératrol (30µM)	1 310 000	64,6	18,3	17,5

La faible toxicité observée sur les cellules AH-130 cultivées peut être reliée au faible taux de prolifération montré par ces cellules *in vitro*. Une autre possibilité est que les observations *in vivo* sont dues à une voie indirecte qui peut impliquer des molécules produites par l'hôte.

La mort des cellules par apoptose est fréquemment associée à une diminution de l'activation du facteur de transcription de NFkB. On a montré que les éicosanoïdes et en particulier la prostaglandine PGE<sub>2</sub>, sont des activateurs puissants de ce facteur NFkB.

Puisque le resvératrol est un inhibiteur des cyclooxygénases, on peut spéculer qu'en réduisant la production d'éicosanoïdes chez l'hôte, on pourrait causer une diminution de l'activation du facteur NFkB, ce qui augmente l'apoptose.

D'un autre côté, l'administration de resvératrol à des rats ayant une tumeur produit une augmentation des niveaux de CD95L, qui représente une des voies de déclenchement de la mort cellulaire par apoptose.

Ces données suggèrent que le resvératrol peut être efficace non seulement dans la chimioprévention du développement de la tumeur mais aussi comme agent chimiothérapeutique.

Cependant il faut introduire quelques réserves puisque l'administration *in vivo* de la drogue produit des altérations observées chez les porteurs de tumeur AH-130 comme un amaigrissement de certains tissus (foie, cœur) et une anorexie. C'est surprenant puisque le traitement du lot de rats témoins n'a pas d'effet sur la prise de nourriture et le poids de l'animal et la masse tissulaire.

Ces observations suggèrent que le resvératrol peut interagir avec les facteurs produits par l'hôte à cause de la croissance tumorale.

Une autre possibilité est que les altérations métaboliques causées par l'hépatome AH-130 qui sont plus fortes que celles observées pendant le développement de tumeurs à développement lent comme celles chimiquement induites, pourrait favoriser l'apparition d'effets indésirables malgré une nette efficacité sur la croissance tumorale.

### **VII.2.1.2 Effets anti-prolifératifs du resvératrol par perturbation du cycle cellulaire**

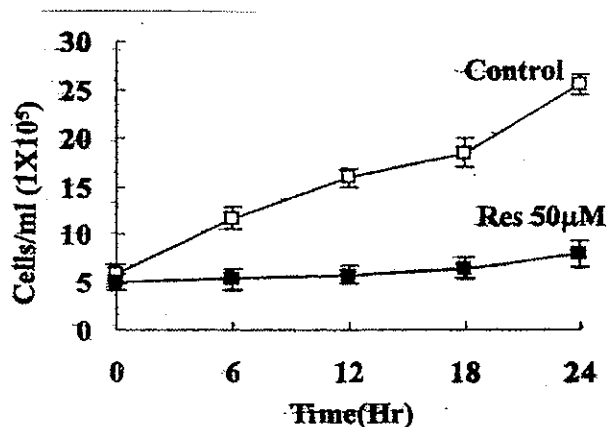
#### **a) Arrêt de croissance des cellules CaCo-2, une lignée cellulaire cancéreuse du côlon à la phase de transition S/G2**

Le resvératrol à la dose de 25µM/L produit une décroissance de l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC) dans les cellules cancéreuses du côlon CaCo-2. Il manifeste un important effet anti-prolifératif qui semble lié à sa capacité à provoquer une inhibition de la croissance à la phase de transition

S/G2 du cycle cellulaire (cf chapitre action du resvératrol sur l'ODC (SCHNEIDER Y et als).

**b) Arrêt en phase S des cellules U937 par le resvératrol (PARK J.W et als)**

La croissance des cellules U937 traitées par le resvératrol est inhibée de façon significative, tandis que les cellules non traitées par le resvératrol ont une croissance 5 fois supérieure (fig.26).



*Figure 26 : Effet du resvératrol sur la croissance des cellules U937*

Pour déterminer, de quelle manière le resvératrol exerce son effet cytotoxique, la sortie de lactate deshydrogénase est mesurée dans le milieu. Aucun changement n'est observé en présence de 50µM de resvératrol, indiquant que l'inhibition de la croissance n'est pas due à un effet cytotoxique.

Afin de rechercher de plus près la nature d'inhibition de la croissance par le resvératrol, des cellules U937 poussant de façon exponentielle sont traitées avec des concentrations variables de resvératrol et sont ensuite soumises à une analyse par cytométrie de flux après coloration de leur ADN.

Les cellules non traitées suivent le schéma attendu de croissance cellulaire tandis que celles traitées avec des concentrations croissantes (30 à 120µM) s'accumulent progressivement en phase S du cycle de division cellulaire.

Les cellules traitées avec 30 ou 60µM de resvératrol se trouvent respectivement après 24h, à un pourcentage de 71 ou 78 % en phase S.

Cependant 90 ou 120µM de resvératrol n'induisent pas d'accumulation de cellules en phase S.

Pour étudier les mécanismes impliqués dans l'arrêt de la phase S induite par le resvératrol, des études cinétiques des effets de l'arrêt en phase S du resvératrol sur des cellules U937 sont menées.

Ces cellules sont traitées avec 50 $\mu$ M de resvératrol et soumises à des analyses du cycle cellulaire à 6, 12, 18 et 24h par FACS (fluorescent activated cell sorting).

L'incidence de phase S chez des cellules non traitées est de 22%, tandis que les cellules traitées avec 50 $\mu$ M montrent une augmentation progressive de la proportion de phase S.

La culture de cellules avec 50 $\mu$ M de resvératrol augmente la population en phase S de manière temps dépendant, tandis qu'il diminue la population de cellules en phase G1.

Pour savoir si l'effet de l'arrêt de la phase S par le resvératrol est réversible, les cellules U937 sont traitées avec 50 $\mu$ M de resvératrol pendant 24h. Le resvératrol est ensuite retiré et les cellules sont incubées dans un milieu sans resvératrol pendant 12h.

Quand les cellules arrêtées en phase S sont libérées de l'inhibition par le resvératrol, une progression synchrone vers la phase G2/M est observée pendant 6 à 9h après le retrait du blocage et un modèle de cycle cellulaire asynchrone est détecté à 12h.

En conclusion, il est montré ici que le resvératrol arrête la progression du cycle cellulaire en phase S dans les cellules U937 histiocytaires d'un lymphome humain et que l'arrêt en phase S est réversible.

Des concentrations de resvératrol de 30 à 60  $\mu$ M bloquent la progression du cycle cellulaire à la phase S/G2. Cependant, le resvératrol n'arrête pas les cellules en phase S à des concentrations plus élevées (90 à 120 $\mu$ M).

Ces résultats démontrent que les effets du resvératrol sur le cycle cellulaire sont concentrations dépendantes.

De fortes concentrations de resvératrol induisent l'arrêt en différents points à l'intérieur du cycle cellulaire.

Par ailleurs, Pervaiz et als ont démontré que de fortes concentrations de resvératrol inhibaient la croissance de cellules HL-60 en induisant l'apoptose (PERVAIZ S. et als).

De plus des études récentes ont montré que la progression vers la phase de transition G1/S est régulée par la cycline E. Ceci s'exprime à la fin de G1, précédant l'expression de la cycline A avec une expression maximale à la liaison G1/S.

L'accumulation de cyclines E et A chez les cellules U937 traitées par le resvératrol est due à un arrêt du cycle de division cellulaire au niveau de la phase S.

Certains auteurs ont montré que l'arrêt en phase S par le resvératrol est accompagné d'une surrégulation de p53 et p21 dans les cellules endothéliales d'une artère pulmonaire bovine (HSIEH T.C et als).

Cependant, cet arrêt en phase S ne peut être expliqué par une surrégulation de p53 et p21, car les précédentes données montrent que les cellules U937 n'ont pas la protéine p53.

Ce désaccord suggère qu'il y ait peut-être des mécanismes additionnels pour l'arrêt en phase S par les resvératrol chez les cellules U937.

### **VII.2.3. RESVERATROL ET APOPTOSE**

#### **VII.2.3.1 Définition de l'apoptose (COHEN N.)**

La mort cellulaire par apoptose est un phénomène actif d'auto-destruction ayant une fonction homéostatique chez les organismes pluricellulaires et c'est un processus génétiquement contrôlé.

Elle joue un rôle essentiel comme mécanisme protecteur contre le développement de tumeurs dans l'organisme en éliminant les cellules endommagées génétiquement ou des cellules en excès qui ont été improprement induites à se diviser par un stimulus mitotique.

Les différentes voies apoptotiques sont sous la dépendance d'effecteurs cellulaires. Ces effecteurs cellulaires sont par exemple :

- les récepteurs cellulaires qui transduisent un signal apoptotique ; ce sont les récepteurs de mort comme par exemple, l'antigène Fas (ou CD 95), le récepteur au TNF- $\alpha$  (TNFR).  
Ces protéines transmembranaires exposent un domaine cytosolique et vont s'associer au contact du ligand.
- la protéine p53 qui joue un rôle central dans le maintien de la stabilité et de l'intégrité du génome cellulaire
- la protéine kinase ARN-dépendante (PKR) qui peut arrêter la traduction cellulaire et initier l'apoptose
- le réticulum endoplasmique (RE).

#### **VII.2.3.2.Mécanismes de l'apoptose et modifications morphologiques des cellules (HOMBERG J.C et als)**

L'apoptose des cellules humaines peut être déclenchée par plusieurs voies qui convergent vers les caspases (cystéine protéase aspartate spécifique) qui induisent la mort cellulaire (fig. 27).

### \*Voie passant par le récepteur Fas

Cette voie dépend de la protéine Fas (CD 95) exprimée à la surface cellulaire de façon constitutionnelle.

Le phénomène d'apoptose nécessite une interaction avec la protéine Fas-L d'une autre cellule.

On a identifié une protéine adaptatrice (FADD ou *fas associated death domain*) qui se lie à la région cytoplasmique de Fas et qui possède dans sa partie terminale un domaine effecteur de mort cellulaire qui attire à son tour la procaspase 8, forme zymogène d'une protéase à cystéine appelée caspase 8. Après cette interaction, il y a intervention des caspases cytoplasmiques. Ensuite les mécanismes propres de l'apoptose s'activent, en particulier les endonucléases nucléaires qui fragmentent l'ADN.

### \*Voie passant par le récepteur au TNF- $\alpha$ (TNF R1)

Les récepteurs de Fas/Apo-1 et TNF R1 possèdent en commun un domaine cytoplasmique homologue qui est responsable de la transduction du signal.

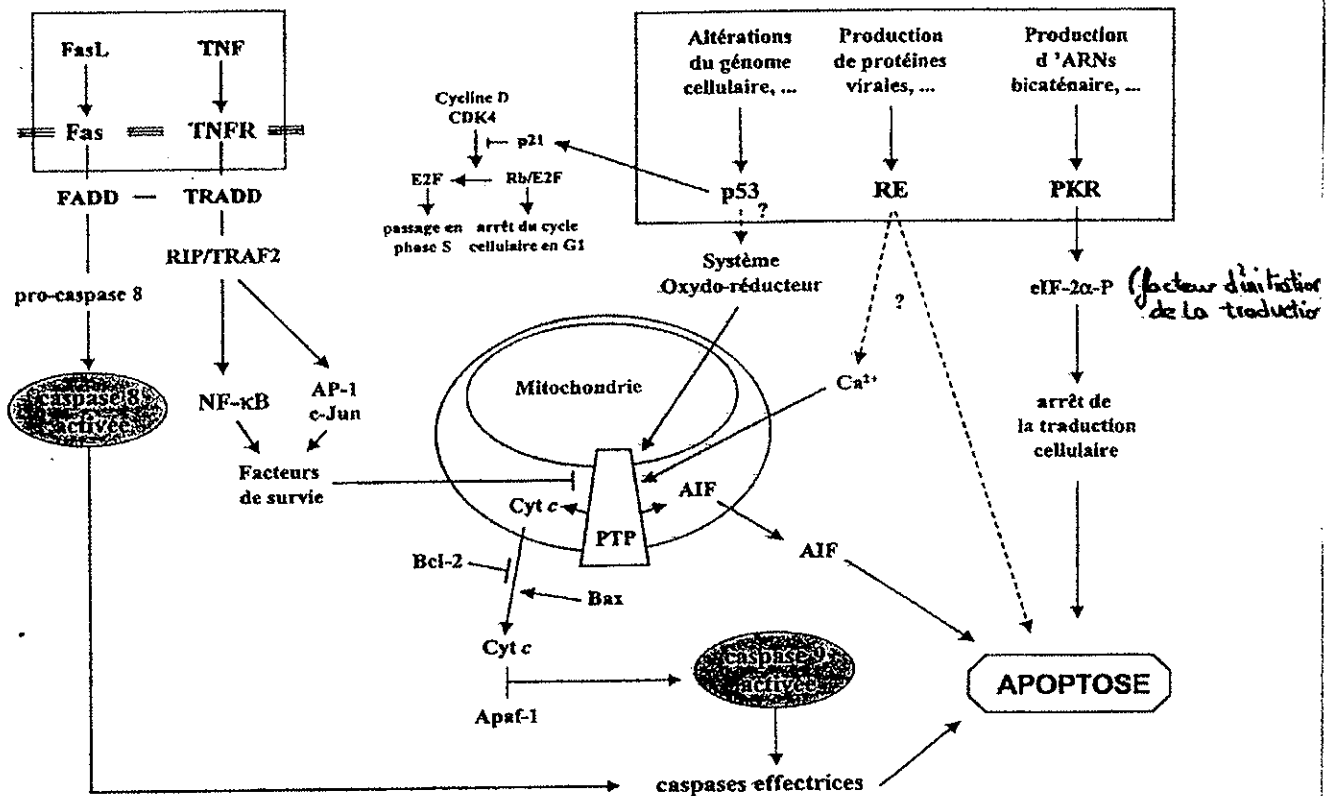
Ce domaine a été dénommé domaine DD (*Death domain*), c'est un domaine intracellulaire essentiel pour l'exécution du programme apoptotique. Après fixation du ligand, le récepteur se trimérise. Cette trimérisation entraîne une modification de conformation du domaine DD qui peut alors s'associer aux domaines DD équivalents d'autres molécules de signalisation. Il y a ensuite association avec la procaspase-8 et activation des caspases effectrices qui aboutit à l'apoptose.

### \*Voie mitochondriale

La cascade d'activation des caspases n'est pas toujours directe et peut dépendre de protéines relarguées par les mitochondries.

En effet il est maintenant admis qu'au cours d'un signal apoptotique, la diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial entraîne l'ouverture des pores de la mitochondrie et la libération dans le cytosol de protéines mitochondriales telles le cytochrome c qui peut déclencher l'activation des caspases ou l'AIF (*apoptosis inducing factor*).





Légende : AIF : facteur inducteur de l'apoptose, eIF : facteur d'initiation de la traduction, NFκB : facteur nucléaire kB, PKR : protéine kinase ARN dépendante, PTP : pore perméable de transition, RE : réticulum endoplasmique

*Figure 27 : Représentation schématique des différentes voies impliquées dans le processus apoptotique (COHEN N.)*

L'apoptose proprement dite est caractérisée par un certain nombre de caractéristiques :

\*la fragmentation de l'ADN nucléaire entre les nucléosomes en segments de 200 à 300 paires de base, grâce à deux endonucléases. La chromatine se condense et se marginalise au niveau de la membrane nucléaire, qui s'altère.

\*le cytoplasme se rétracte avec une diminution globale du volume de la cellule, qui perd son adhérence aux cellules voisines. Des invaginations membranaires isolent les futurs corps apoptotiques contenant des organites intracytoplasmiques encore fonctionnels entourés de membrane plasmique.

\*la membrane plasmique subit des modifications minimales, comme l'exposition vers l'extérieur des phosphatidylsérines. La perméabilité membranaire est peu modifiée et les colorants vitaux ne pénètrent pas.

L'apoptose n'est pas suivie de phénomènes inflammatoires, de fibrose et de cicatrices comme dans le cas d'une mort par nécrose cellulaire.

En effet, les corps apoptotiques sont phagocytés par de nombreuses cellules comme les fibroblastes et les macrophages, sans intervention du complément.

La survie des cellules dépend d'un apport constant de signaux de survie fournis par les cellules voisines et la matrice extracellulaire. Sans ces apports exogènes, les cellules subissent l'apoptose.

L'absence du phénomène d'apoptose dans les cellules peut être impliquée dans la pathogénicité de différentes maladies humaines comme les cancers, les maladies auto-immunes et les infections virales.

### **VII.2.3.3. Implication de l'apoptose dans les cancers (COHEN N.)**

#### **a. Mécanisme d'action**

L'apoptose peut être inhibée ou perturbée dans les tumeurs où le taux de prolifération cellulaire excède le taux de perte cellulaire.

Les cellules malignes subissent l'apoptose de façon moins importante par rapport aux cellules saines en réponse à des stimuli physiologiques.

La plupart des cellules normales dépendent de facteurs spécifiques environnementaux pour maintenir leur viabilité. Cette dépendance peut servir à empêcher les cellules normales de survivre dans des sites différents de ceux d'origine. Les cellules tumorales métastatiques ont circonvenu à ce mécanisme homéostatique et peuvent survivre à des sites distincts des tissus d'où elles proviennent. Des recherches sur ce mécanisme ont défini plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose.

L'apoptose est un mécanisme qui protège l'organisme des cellules ayant acquis des altérations génétiques qui les prédisposent à la prolifération cellulaire.

#### **b. Rôles des gènes bcl-2 et p53 dans l'apoptose**

- le gène bcl-2

Il protège de l'apoptose en inhibant l'activation des caspases effectrices et en protégeant du stress oxydatif via le maintien de la production du GSH.

bcl-2 est un membre d'une famille de gènes qui peuvent contrôler le seuil apoptotique d'une cellule.

- la protéine p53 (BONNET L. et als)

La protéine p53 a un rôle de médiateur intracellulaire et exerce son action au niveau nucléaire où elle interagit avec certains promoteurs de transcription de gènes contrôlant la prolifération cellulaire (la p21 par exemple), elle possède donc une activité anti-oncogène indirecte.

La présence d'un seul allèle mutant est susceptible d'altérer l'activité de la p53 et de provoquer un cancer.

Dans une cellule normale, la p53 a une T1/2.(demie-vie) courte et son expression est finement régulée. Lors d'un développement tumoral, la p53 a tendance à s'accumuler dans le noyau cellulaire du fait de l'augmentation de sa T1/2.

L'apparition des anticorps p53 est corrélée à l'accumulation de p53 et à la présence de p53 mutée.

La p53 est donc nécessaire pour initier l'apoptose dans les cellules en réponse à des dommages génotoxiques. S'il y a un dommage sur l'ADN, elle bloque le cycle cellulaire en phase G1, empêche la transition en phase S ce qui permet une réparation éventuelle de l'ADN. Si l'ADN est fortement endommagé, elle oriente vers l'apoptose.

Les mécanismes qui régissent ce choix « arrêt du cycle/ mort par apoptose » ne sont pas encore élucidés.

### **c. Cycle cellulaire et cancer**

La p21 ou WAF-1 est un inhibiteur de cdk qui empêche le passage G1/S. Elle arrête le cycle cellulaire en G1 et empêche la réplication de l'ADN qui a normalement lieu en phase S.

Cette petite protéine s'associe aux complexes cycline et cdk de la phase G1, et inhibe la cdk-2.

On a vu que la p53, stimulée par la présence d'un ADN endommagé arrête momentanément le cycle cellulaire et permet la réparation des lésions. En fait, la p53 induit la synthèse de la p21, qui inhibe cdk-2 et ainsi le passage G1/S. S'il y a trop de mutations et que les réparations sont insuffisantes, p53 oriente vers l'apoptose.

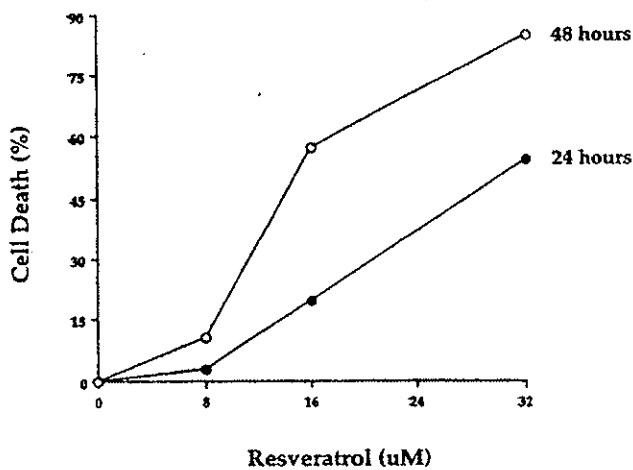
Lorsque la p53 a subi une mutation, elle n'a plus cette action de blocage du cycle cellulaire et d'orientation vers l'apoptose. Ainsi, la cellule continue à répliquer son ADN endommagé d'où la genèse de tumeur.

### VII.2.3.4 Le resvératrol induit l'apoptose par la voie Fas dépendante (PERVAIZ et als)

En 1998, on a reporté que le resvératrol induisait la mort cellulaire par apoptose dans les cellules leucémiques humaines (HL-60) par une voie dépendante de l'antigène Fas (ou CD 95).

Ces cellules avaient été exposées à des concentrations croissantes (4 à 32 $\mu$ M) de *trans*-resvératrol synthétique pendant 24 à 48 heures.

Les résultats ont montré une augmentation de la mortalité des cellules tumorales de façon dose-dépendante avec un maximum de 80% de mort cellulaire en 48 heures (fig.28).



*Figure 28 : Sensibilité des cellules HL60 au resvératrol*

Les trois caractéristiques de la mort par apoptose que sont la fragmentation de l'ADN, des changements dans la perméabilité de la membrane, l'activation de caspases intracellulaires ont été étudiées.

Les résultats obtenus ont montré que les cellules HL-60 traitées par le resvératrol possèdent des changements morphologiques et biochimiques qui sont des marqueurs de l'apoptose, ce qui prouve que le resvératrol induit l'apoptose.

Young J.S et als ont également observé dans une étude les changements morphologiques de cellules HL-60 traitées avec 100 $\mu$ M de resvératrol pendant 8h.

Les cellules exposées au resvératrol montrent un profil morphologique de cellules apoptotique comme on vient de le décrire. Elles présentent des formations de corps apoptotiques et des rétrécissements cellulaires par examen au microscope à contraste de phases.

Au microscope à fluorescence, des changements de la morphologie nucléaire sont aussi typiques de l'apoptose : la coloration des cellules traitées par le resvératrol avec le fluorochrome spécifique de l'ADN « DAPI » permet de visualiser le noyau partagé en fragments de différentes tailles contenant de la chromatine.

La mort des cellules par apoptose est plus tard confirmée par microscope électronique à transmission, qui révèle les formes des ultrastructures caractéristiques de l'apoptose.

Ainsi, tandis que les cellules contrôle HL-60 montrent des organites cytoplasmiques intacts, des membranes nucléaires bien préservées et une chromatine régulièrement répartie, les cellules traitées par le resvératrol montrent une condensation de la chromatine à la périphérie du noyau.

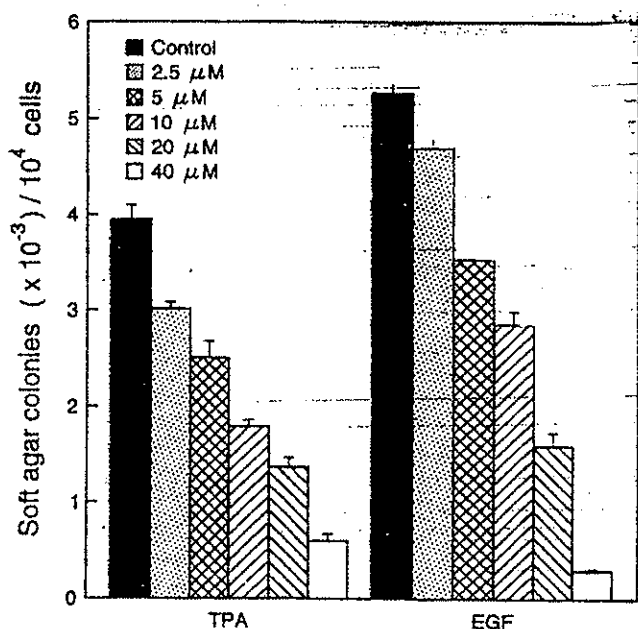
Le gonflement modéré à sévère des organites intracellulaires est également évident.

### VII.2.3.5 Induction de l'apoptose par action sur la p53 (HUANG C. et als)

Le resvératrol semble avoir un effet antipromoteur et pourrait aussi induire l'apoptose en agissant sur la p53.

Pour étudier cet effet antipromoteur, un modèle de culture cellulaire épidermique de souris (JB6 C1 41) a été employé.

Comme cela est montré sur la figure 1, le resvératrol inhibe la promotion tumorale induite par le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) ou l'EGF (epidermal growth factor) dans les cellules JB6 C1 41 de façon dose dépendante à des concentrations comprises entre 2,5 et 40  $\mu\text{M}$  (fig.29).



*Figure 29 : Inhibition de la transformation cellulaire des cellules JB6 C1 41 induite par le TPA et l'EGF par le resvératrol*

Les cellules JB6 C1 41 ont été ensuite mises en présence de concentrations différentes de resvératrol.

Le résultat des essais de fragmentation de l'ADN montre que le traitement de cellules par le resvératrol induit l'apoptose des cellules JB6 C1 41 dans la

même tranche de doses qui inhibe la promotion tumorale. Ces résultats confortent l'idée que les effets préventifs du resvératrol contre le cancer pourraient apparaître par induction de l'apoptose.

Pour étudier le rôle possible de la p53 dans l'induction de l'apoptose par le resvératrol, on a analysé l'influence du resvératrol la transcription et sur l'expression de la protéine p53 dans les cellules JB6 transfectantes PG13-luciférase.

Il a été montré que le resvératrol activait de façon marquée la transcription de la p53 de façon dose-dépendante. Elle atteint une induction maximale 24h après que les cellules aient été exposées au resvératrol.

L'augmentation de l'expression et de la transcription de la p53 pourrait être associée à l'induction de l'apoptose par le resvératrol.

Pour confirmer l'implication de la p53 dans l'apoptose induite par le resvératrol, deux lignées de cellules fibroblastiques, p53<sup>+/+</sup> et p53<sup>-/-</sup> qui sont dérivées d'embryons de souris contenant soit le type sauvage (p53<sup>+/+</sup>) soit déficiente en p53 (p53<sup>-/-</sup>) ont été employées. Dans la lignée cellulaire déficiente en p53, on n'obtient pas d'apoptose.

En résumé, on peut dire que le resvératrol induit l'apoptose dans la même fourchette de concentrations que celle qui inhibe la transformation cellulaire et l'apoptose induite par le resvératrol se réalise par une voie dépendante de la p53.

Dans des cellules BPAE (cellules endothéliales bovines de l'artère pulmonaire) ayant une croissance exponentielle, en présence de resvératrol, on observe des changements, notamment l'induction de la p53, de la p21 et l'inhibition de la prolifération cellulaire (HSIEH T.C et als).

L'inhibition de la prolifération cellulaire est fréquemment associée avec la surrégulation observée de la p53 et l'induction de la p21.

Des études utilisant les analyses par cytométrie de flux et Western Blot, démontrent que le ralentissement de la prolifération cellulaire à travers le cycle, qui se manifeste par l'accumulation des cellules en phases S et G2 en présence de concentrations de resvératrol de 50 et 100  $\mu$ M est parallèle aux niveaux élevés de p53 et p21.

La surrégulation de p53 est responsable de l'induction de la transcription de la p21. Cette dernière est un inhibiteur clef de la progression du cycle cellulaire arrêtant les cellules en des points de contrôle ou « check point » pour permettre la réparation des dommages sur l'ADN.

Cette surrégulation dans les cellules BPAE par le resvératrol, comme on le voit dans cette étude, est en toute probabilité directement responsable de l'inhibition des complexes de kinases cycline dépendants cdk2 et cdc2 (cdk1), et par là même de la suppression de la transition cellulaire à travers les phases S et G2.

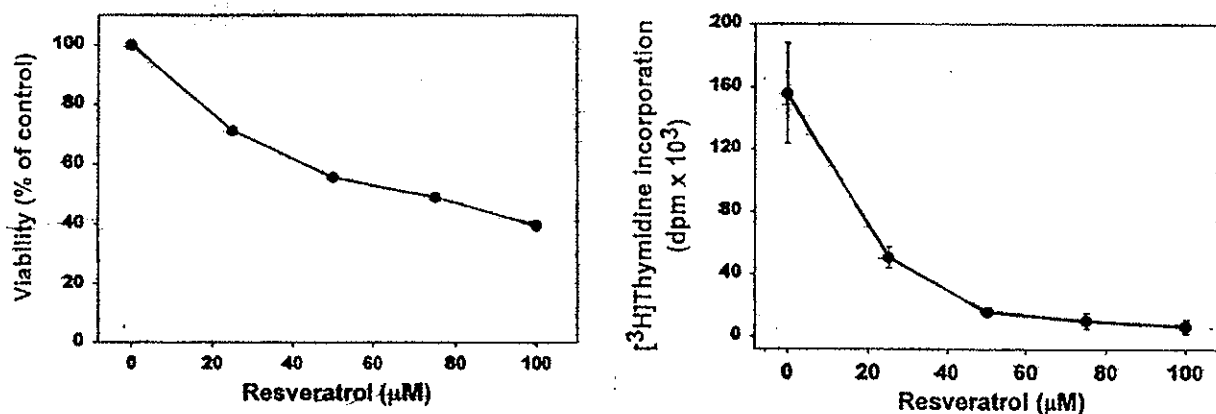
Les effets observés sur les cellules BPAE comme l'induction de la p53 et de la p21, la suppression de la prolifération cellulaire, l'accumulation des cellules en phases S et G2/M et l'induction de l'apoptose sont compatibles avec l'activité chimiopréventive et/ou antitumorale imputée au resvératrol.

Si l'inhibition de la prolifération cellulaire par le resvératrol observée dans ces cultures apparaît *in vivo*, cela pourrait avoir plusieurs conséquences. Il est probable en effet, que de façon similaire aux cellules BPAE, la prolifération des cellules vasculaires du muscle lisse soit inhibée par le resvératrol, or on sait que cela joue un rôle clef dans la pathogenèse de l'athérosclérose.

Si en effet le resvératrol contenu dans le vin rouge est responsable de la baisse de l'incidence de l'athérosclérose, cela pourrait être un des possibles mécanismes d'action.

### VII.2.3.6 Induction de l'apoptose par activation des caspases

- Le traitement des cellules HL-60 en culture par le resvératrol s'accompagne d'une inhibition marquée de la croissance cellulaire de façon concentration dépendante (fig. 30), (YOUNG-JOON S. et al.).



*Figure 30 : Effet du resvératrol sur la viabilité et la prolifération des cellules HL-60 en culture*

L'addition de resvératrol (50µM) pendant 8h cause environ 45% de réduction dans la viabilité de la cellule.

Les effets du resvératrol sur la prolifération cellulaire sont calculés par la mesure de la synthèse d'ADN en utilisant un précurseur radiomarqué (thymidine tritiée). Il s'avère que le resvératrol produit une diminution de la croissance cellulaire.

La mort cellulaire observée dans la culture et provoquée par le resvératrol, s'accompagne de changements morphologiques et ultrastructuraux, changements caractéristiques survenant lors de l'apoptose.

Le resvératrol semble donc induire l'apoptose dans ces cellules et cette mort cellulaire est liée étroitement à la perturbation d'une phase spécifique du cycle.

L'analyse temps-dépendant de ces cellules HL-60 traitées par le resvératrol par cytométrie de flux (procédé qui permet une estimation simultanée des paramètres du cycle cellulaire et de l'apoptose) démontre une distribution réduite dans le cycle des cellules vivantes résiduelles, particulièrement celles en phase G0/G1 avec une augmentation progressive de cellules avec un ADN inférieur à 2N (possédant les caractéristiques de cellules apoptotiques).

La réduction dans la proportion de cellules saines en phase G0/G1 et l'apparition concomitante de cellules apoptotiques après traitement par le resvératrol suggère que les cellules arrêtées en phase G0/G1 subissent préférentiellement l'apoptose dans ces cultures.

En conclusion, le resvératrol induit l'apoptose dans les cellules HL-60 en culture, et ceci semble expliquer ses propriétés anti-prolifératives.

L'apoptose est un procédé bien régulé, qui implique des changements dans l'expression de gènes distincts. Un des gènes majeurs impliqué dans la régulation de l'apoptose est le protooncogène bcl-2 qui code pour une protéine associée à la mitochondrie. Le produit du gène bcl-2 prolonge la survie de la cellule en bloquant l'apoptose induite par une large variété de stimuli dont l'activation des caspases.

Les résultats de cette étude indiquent une décroissance de l'expression de bcl-2 dans les cellules HL-60 avec un traitement par le resvératrol supérieur à 48 h..

Cette décroissance dans l'expression de bcl-2 produit l'activation des caspases et donc l'apoptose. Le resvératrol induit ainsi l'apoptose par activation des caspases.

- L'addition de resvératrol dans une culture de cellules SH-SY5Y exposées au paclitaxel réduit significativement la mort cellulaire par apoptose (NICOLINI G. et als)

Très peu d'études ont été menées concernant les effets du resvératrol sur le système nerveux ou sur les cellules neuronales.

Le resvératrol avec d'autres anti-oxydants réduisent l'apoptose induite par un stress oxydatif sur la lignée cellulaire SH-SY5Y de neuroblastome humain (TREDECI G. et als).

Le paclitaxel est un principe actif médicamenteux anticancéreux, obtenu par hémisynthèse et agissant comme stabilisant du fuseau. Il bloque la réplication cellulaire en inhibant la dépolymérisation de la tubuline et augmente



sa polymérisation, ce qui permet de contourner la résistance de certains cancers aux autres anticancéreux.

Le paclitaxel est neurotoxique, induisant *in vivo* une neuropathie périphérique. Dans la culture de cellules SH-SY5Y, il induit l'apoptose.

Puisque ces cellules peuvent être considérées comme des neuroblastes à cause de leurs caractères morphologiques, biochimiques et fonctionnels, ce modèle permet l'étude de l'apoptose et de sa prévention dans les cellules semblables aux cellules neuronales.

L'apoptose joue un rôle spécifique dans le développement du système nerveux pendant la croissance, tandis que dans la vie adulte, ce phénomène est essentiel à l'homéostasie du tissu nerveux. Une régulation anormale de l'apoptose a été reportée dans les maladies dégénératives et acquises du système nerveux central.

Les cellules SH-SY5Y ont été exposées pendant 24 h soit à 1 $\mu$ M de paclitaxel seul, soit à 1 $\mu$ M à paclitaxel en combinaison avec 1, 10, 50 et 100 $\mu$ M de resvératrol. La concentration la plus efficace pour réduire la mort cellulaire est de 50 $\mu$ M et cette concentration a été utilisée dans toutes les études qui suivent.

Un examen morphologique des cultures exposées au paclitaxel démontre que la mort cellulaire est due à l'apoptose. Cette hypothèse est confirmée par l'échelle typique de l'ADN à l'électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,2 %.

Afin de déterminer le mécanisme par lequel le resvératrol prévient l'apoptose induite par le paclitaxel dans les cellules SH-SY5Y, on a déterminé par Western blot, en utilisant un anticorps spécifique contre la  $\beta$ -tubuline, la quantité de tubuline polymérisée dans les cellules exposées au paclitaxel seul ou en combinaison avec le resvératrol.

La polymérisation de la  $\beta$ -tubuline, induite par exposition au paclitaxel était déjà évidente après 2 min. d'exposition et a duré pendant toute la période d'exposition, à la fois dans les cultures traitées avec le paclitaxel seul et dans les cultures exposées au paclitaxel en combinaison avec le resvératrol. Le resvératrol n'interfère pas avec la capacité du paclitaxel à polymériser la tubuline et l'effet neuroprotecteur du resvératrol peut apparaître à travers d'autres modes d'action.

De plus, dans ce modèle, l'action neuroprotectrice du resvératrol ne semble pas être dépendante de sa capacité anti-oxydante.

En fait, l'addition de paclitaxel à différents anti-oxydants comme l' $\alpha$ -tocophérol, la N-acétylcystéine, l'acide ascorbique, utilisés à des concentrations connues pour être efficaces dans la prévention de l'apoptose des cellules SH-SY5Y exposées à un stress oxydatif, ne réduit pas la mort cellulaire.

Pour avoir un aperçu de la façon par laquelle le resvératrol est neuroprotecteur, on a étudié ses effets sur l'activation des caspases, qui jouent un rôle central dans l'exécution du processus de l'apoptose. Leur activation produit le clivage de plusieurs protéines structurales et enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, comme la poly-(ADP-ribose)-polymérase (PARP), engageant les cellules à mourir.

L'addition de 50µM de resvératrol inhibe significativement l'activation de la pro-caspase 7 induite par le paclitaxel et le clivage conséquent de la PARP.

En conclusion, le resvératrol, à certaines concentrations, réduit significativement l'apoptose induite par le paclitaxel.

L'activité neuroprotectrice du resvératrol est due, ni à son action anti-oxydante, comme cela est montré par le modèle utilisé jusqu'à présent dans lequel l'apoptose a été induite par un stress oxydatif, ni à une possible interférence avec l'assemblage de la tubuline, le mécanisme d'action principal de l'action du paclitaxel.

Le resvératrol agit en inhibant presque complètement l'activation des caspases, un événement central dans les processus moléculaires qui conduisent les cellules à la mort par apoptose.

#### **VII.2.3.7 Induction de l'apoptose par diminution de l'expression de la p21 dans les cellules cancéreuses LNCaP de la prostate (MITCHELL et als)**

Les androgènes sont des hormones régulatrices importantes de la prostate et jouent un rôle, par l'intermédiaire de leur récepteur (AR), dans le développement du cancer de la prostate, cancer hormono-dépendant.

Le gène de la p21 est un des gènes régulés par les androgènes. Cette protéine, on l'a vu, est un puissant inhibiteur de la prolifération cellulaire et il a été montré aussi que le fait de réduire les niveaux de cette protéine pouvait augmenter l'apoptose.

Certains auteurs (LU S. et als) ont suggéré que l'augmentation de la p21 par les androgènes pouvait faciliter la prolifération des cellules LNCaP (cellules obtenues à partir de cellules métastatiques d'un cancer de la prostate chez un patient).

Pour cela, un western blot pour la protéine p21 des cellules LNCaP traitées par 0, 100 ou 200µM de resvératrol a été réalisé. Le resvératrol diminue la p21 de façon dose-dépendante. L'étude semble suggérer que la réduction de la p21 par le resvératrol pourrait être dûe en partie à la répression du récepteur aux androgènes.

De plus, les effets sur l'inhibition de la croissance des cellules LNCaP par le resvératrol ont ensuite été examinés après 24h de traitement.

100 $\mu$ M de resvératrol produisent une inhibition de croissance cellulaire en présence d'androgènes avec une petite détection d'apoptose, tandis que 200 $\mu$ M de resvératrol induisent une mort cellulaire par apoptose massive. De plus jusqu'à une concentration de 100 $\mu$ M de resvératrol, les effets inhibiteurs sur la croissance sont réversibles.

En conclusion, d'après l'étude, on est tenté de penser que la réduction de la p21 par le resvératrol peut être reliée aux effets négatifs de celui-ci sur la croissance et que l'existence, soit d'un effet inhibiteur sur la croissance, soit de l'apoptose dépend du degré de répression de la p21.

De nouvelles études pour savoir de quelle manière la réduction de la p21 par le resvératrol peut diminuer la croissance des cellules cancéreuses de la prostate sont nécessaires pour clarifier ces points.

Une importante question reste sans réponse pour l'instant, c'est celle de savoir si le resvératrol est capable de s'accumuler dans les tissus comme celui de la prostate à des concentrations aussi fortes que 100 et 200 $\mu$ M.

#### **VII.2.3.8 Induction de l'apoptose par inhibition de l'activation du facteur NF $\kappa$ B (MC NARY H. et als)**

On a cherché à savoir si les effets chimiopréventifs du resvératrol ont lieu à travers l'inhibition de l'activation du facteur NF $\kappa$ B et si oui, à travers quel mécanisme.

Ce facteur de transcription joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et ainsi dans l'oncogenèse en provoquant la mort des cellules tumorales.

Pour cela, deux lignées cellulaires sont utilisées, la lignée THP-1 (monocyte humain) et U937 (macrophage), les 2 étant caractérisées par leur capacité à activer le facteur NF $\kappa$ B.

Les cellules sont exposées ou non au TNF (facteur de nécrose tumoral), un inducteur potentiel de NF $\kappa$ B dans de nombreux types cellulaires, qui induit fortement la liaison de NF $\kappa$ B à l'ADN.

Aussi bien dans les cellules THP-1 que dans les cellules U937, le resvératrol bloque l'activation de NF $\kappa$ B. La capacité du resvératrol à bloquer l'activation de NF $\kappa$ B n'est donc pas spécifique d'un type de cellule.

De façon compatible avec ces résultats, il a été montré récemment que le resvératrol pouvait inhiber également l'activation de NF $\kappa$ B dans des macrophages RAW 264.7 (TSAI SH. et als).

On a ensuite déterminé de quelle manière l'expression endogène des gènes dépendant de NF $\kappa$ B pourrait être réprimée par le resvératrol.

Les niveaux d'ARNm de 2 gènes régulés par NFκB , IκB-α et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) ont été analysés par RT-PCR (reverse transcription PCR) après une stimulation par le TNF en présence ou en absence de resvératrol.

Les résultats indiquent que le resvératrol inhibe l'expression des gènes dépendant de NFκB à travers l'inhibition de l'induction de la liaison de NFκB à l'ADN.

La majorité des inducteurs de NFκB comme le TNF, stimulent une voie de transduction de signal qui conduit à l'activation d'un complexe IKK qui va phosphoryler IκB-α sur les sérines 32 et 36. L'IκB-α est ensuite dégradée par les protéasomes, libérant NFκB et permettant la translocation dans le noyau.

Pour déterminer à quel niveau le resvératrol bloque l'activité de NFκB, on a analysé les niveaux relatifs de IκB- α après exposition des cellules au TNF.

La stimulation par le TNF conduit à une forte réponse de dégradation de IκB- α chez les cellules THP-1 après 15 min., suivie d'une réapparition de IκB- α à 30 min..

La phosphorylation de l'IκB- α induite par le TNF est démontrée par l'utilisation d'un anticorps phosphospécifique dirigé vers la sérine 32, suggérant que le resvératrol inhibe un signal en amont.

On a pour cela analysé le niveau d'activité de IKK après traitement des cellules THP-1 par le TNF en absence ou en présence de resvératrol.

On a trouvé que le resvératrol était un inhibiteur potentiel de l'activité de IKK, inductible en réponse à l'exposition au TNF, et il empêche ainsi la libération de NFκB et sa translocation dans le noyau.

Le resvératrol n'est pas apparemment un inhibiteur intrinsèque de IKK parce que le resvératrol ne bloque pas l'activité de IKK quand il est additionné directement dans la réaction avec la kinase *in vitro*.

En conclusion, les effets du resvératrol passent par l'inhibition de l'IKK, le complexe régulateur clé nécessaire pour l'activation du gène de transcription de NFκB. La cible moléculaire déterminant l'action du resvératrol est encore inconnue parce que le resvératrol ne semble pas bloquer directement l'activité de l'IKK.

Il est présumé que le resvératrol inhibe un composé en amont qui conduit à l'inactivation de l'IKK. Il pourrait alors bloquer l'expression des gènes dépendant de NFκB qui ont un rôle dans l'inflammation, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

Pour résumer, l'apoptose et les effets du resvératrol à ce niveau, on peut dire que : l'apoptose joue un rôle essentiel dans la protection de l'organisme contre le développement de tumeurs. Les cellules malignes répondent moins bien à l'apoptose déclenchée par les stimuli physiologiques.

En agissant sur l'apoptose, le resvératrol exerce ses effets protecteurs et agit de différentes façons :

- dans les cellules HL-60, il induit l'apoptose par une voie dépendant de Fas (CD 95), et dans ces mêmes cellules, il produit une décroissance dans l'expression de bcl-2, décroissance qui produit l'activation des caspases et donc l'apoptose
- dans les cellules JB6 C1 41, il exerce un effet anti-promoteur et induit l'apoptose par un processus dépendant de la p53
- dans les cellules LNCaP d'un cancer de la prostate, il diminue l'expression de la p21, par une action sur le récepteur aux androgènes, et produit une augmentation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses
- dans les cellules neuronales SH-SY5Y, il exerce au contraire un effet neuroprotecteur en protégeant de l'apoptose induite par le paclitaxel par inhibition de l'activation des caspases
- enfin, en inhibant l'activation du facteur NFkB, il induit l'apoptose dans les cellules THP-1 et U937.

## **VII.3 ACTIVITE HORMONALE DU RESVERATROL**

### **VII.3.1 ACTION SUR LES CELLULES DEPENDANT DES ESTROGENES**

#### **VII.3.1.1. Généralités sur les estrogènes**

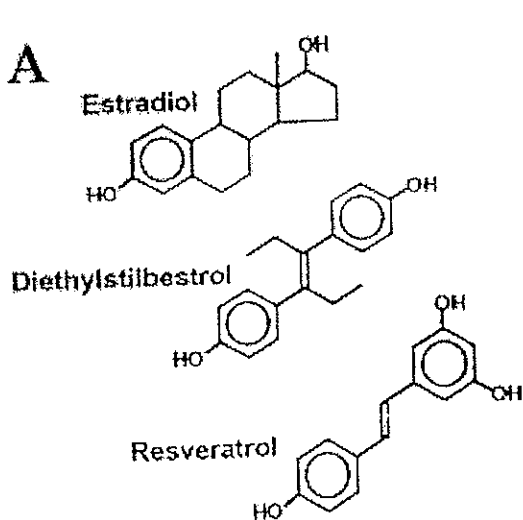
Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes qui provoquent la maturation des organes génitaux, ils sont responsables de l'apparition des caractères sexuels secondaires féminins à la puberté.

Ils se lient sur des récepteurs spécifiques (récepteurs aux estrogènes ou RE) dans les tissus cibles. Il existe 2 sous-types de récepteurs estrogéniques : les récepteurs de type I (RE- $\alpha$ ) et les récepteurs de type II (RE- $\beta$ ). Ces deux récepteurs sont identiques à 96% pour le domaine correspondant à la liaison à l'ADN, à 60% pour le domaine correspondant à la liaison à l'hormone mais n'ont aucune similitude pour le domaine correspondant à la partie amino terminale. Cette dernière partie joue un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle.

## VII.3.1.2. Resvératrol et phytoestrogènes

### VII.3.1.2.1. Similitudes

La similitude dans la structure du *trans*-resvératrol et de l'estrogène synthétique : le diéthylstilbestrol (4,4'-dihydroxy-*trans*- $\alpha$ - $\beta$ -diéthylstilbène) suggère que le resvératrol pourrait être un phytoestrogène (fig.31).



*Figure 31 : structure de l'estradiol, du trans-resvératrol, du diéthylstilbestrol*

Les phytoestrogènes (lignanes et isoflavones) sont des nutriments présents dans plus de 300 espèces de plantes comme le soja, le thé, les céréales, les légumes, les fruits.

Ils ont structurellement et fonctionnellement une homologie avec le 17- $\beta$  estradiol et ont une activité estrogénique non négligeable sur certains récepteurs mais aussi non estrogénique sur d'autres.

Ils se fixent avec la même affinité que celle du 17- $\beta$  estradiol sur les récepteurs de type II (RE- $\beta$ ) de façon compétitive mais réversible, et ils pourraient ainsi inhiber la liaison du 17- $\beta$  estradiol avec son récepteur.

Ils ont de plus une activité anticarcinogénique en inhibant l'angiogenèse, l'aromatase, et en stimulant la synthèse de l'hormone sexuelle binding globuline.

Les estrogènes sont capables d'influencer le système lipidique et sont donc impliqués dans les mécanismes d'athérosclérose (ARNAL J.F et als).

Ils inhibent en outre la synthèse des LDL oxydées, par une moindre production d'espèces réactives oxydantes telles que l'anion superoxyde.

Ils influencent également la perméabilité de l'endothélium de la paroi artérielle par leur capacité d'induire la prolifération cellulaire de celui-ci. Ceci joue un rôle important car la lésion est un facteur capital de la pénétration des lipoprotéines dans la média et de l'appel d'agrégation cellulaire.

Le *trans*-resvératrol, comme les phytoestrogènes possède aussi des effets estrogéniques chez les femmes post-ménopausées, réduisant les bouffées de chaleur et les autres symptômes de la ménopause.

Il prévient également la perte osseuse en inhibant la fonction des ostéoclastes.

Des femmes post-ménopausées ont reçu 100 µg de *trans*-resvératrol par jour (correspondant à environ 4 verres de vin rouge) pendant 6 mois et une augmentation de la densité osseuse a été constatée (CALABRESE G.).

En se basant sur la similitude de structure du *trans*-resvératrol et du diéthylstilbestrol (DES), une étude sur l'activité estrogénique/antiestrogénique de ce composé a été réalisée.

#### VII.3.1.2.2. Activité estrogénique/antiestrogénique

En utilisant des cellules cancéreuses du sein humaines MCF-7 possédant des récepteurs aux estrogènes, on a démontré dans une première étude que l'estradiol tritié se liant aux récepteurs estrogéniques de type I dans ces cellules était complètement bloqué par 1 ng/mL de DES (WILLIAMS R.L et als).

Le *trans*-resvératrol montre une activité parallèle au DES dans les concentrations allant de 1ng/mL à 1000 ng/mL et bloque la liaison de l'estradiol tritié aux récepteurs estrogéniques de type I avec une haute affinité pour de faibles concentrations.

De plus les cellules MCF-7 qui ont été prétraitées par 1 ng/mL de DES pour saturer les récepteurs estrogéniques de type I et exposées ensuite au *trans*-resvératrol montrent une inhibition additionnelle de liaison de l'estradiol tritié. L'inhibition additionnelle observée dans ces études peut être attribuée à une interaction du *trans*-resvératrol avec les récepteurs estrogéniques de type II qui ont été identifiés dans les cellules MCF-7.

Le *trans*-resvératrol produit ainsi un effet inhibiteur sur la liaison de l'estradiol tritié qui est équivalent à l'élimination de tous les récepteurs spécifiques liant l'estradiol tritié.

Les résultats de cette étude suggèrent que le *trans*-resvératrol est un très puissant antagoniste de la liaison de l'estradiol aux deux types de récepteurs estrogéniques.

Toutes les recherches ont été menées sans précisions sur la forme chimique *cis* ou *trans* (BASLY J.P et als). Or les formes *cis* et *trans*-du resvératrol possèdent des différences marquées en ce qui concerne leurs activités

piégeurs de radicaux libres, estrogéniques ou anti-estrogéniques, de plus, ces deux isomères sont présents dans le vin rouge.

Afin d'évaluer l'action estrogénique du resvératrol, différents modèles cellulaires ont été utilisés et ont permis de mesurer directement l'activation des récepteurs estrogéniques par bioluminescence. Ces modèles sont transfectés dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain.

La lignée cellulaire MCF-7 (MVLN) estrogénodépendante a été transfectée en utilisant le gène de l'enzyme luciférase comme gène marqueur.

Ainsi l'activité estrogénique de l'hormone a été mesurée par induction de la luciférase intracellulaire (émission d'un photon lors de la liaison au récepteur estrogénique). L'activité intracellulaire de la luciférase des cellules MVLN a été mesurée après incubation en présence de *trans* et *cis*-resvératrol.

Les effets sont étudiés à des concentrations variables et mesurées.

Des concentrations moyennes de *trans*-resvératrol (10 et 25µM) et de *cis*-resvératrol (25µM) fonctionnent comme agonistes de l'estradiol.

De faibles concentrations de *trans* et *cis*-resvératrol (0,1 et 1µM) et une concentration moyenne de 10 µM de *cis*-resvératrol n'interfèrent pas avec le récepteur aux estrogènes. En effet, ces concentrations ne sont pas capables d'induire une activité luciférase induite par l'estradiol dans la lignée cellulaire des cellules MVLN.

Une explication possible serait que l'isomère *trans* puisse se lier au récepteur aux rétinoïdes, et l'activer à de faibles concentrations, ce qui diminuerait la capacité de l'estradiol à induire une réponse estrogénique.

Ce phénomène peut conduire à une inhibition de l'activité du récepteur aux estrogènes, en altérant par exemple la quantité de protéine liée au récepteur aux estrogènes ou en affectant l'efficacité transcriptionnelle de ce complexe.

### **VII.3.1.2.3. Prolifération cellulaire et cytotoxicité du *trans*-resvératrol**

En utilisant des cellules MCF-7 possédant des récepteurs aux estrogènes et des cellules MDA-231 ne possédant pas de récepteurs, on a étudié la cytotoxicité potentielle qui peut être associée au *trans*-resvératrol en tant que antagoniste des estrogènes (WILLIAMS R.L et als).

La cytotoxicité produite dans toutes les lignées cellulaires est mesurée en utilisant un test de microculture au tétrazolium (MTT). Ce test est basé sur la capacité sélective de cellules vivantes à réduire ce sel soluble jaune en un précipité bleu-violet insoluble de formazan.

Le pourcentage de survie est analysé avec la gamme de concentration de resvératrol.

La lignée des cellules MDA-231 est faiblement mais pas significativement plus sensible aux effets cytotoxiques du *trans*-resvératrol que la lignée des cellules MCF-7.



Les concentrations 50% inhibitrices du *trans*-resvératrol sont de 14,0 +/- 2,0 µg/mL pour les cellules MCF-7 et de 10,5 +/- 2,4 µg/mL pour les cellules MDA-231.

La seconde étude (BASLY J.P et als) concerne l'influence du *cis* et du *trans*-resvératrol sur la prolifération des cellules MCF-7 après 6 jours sans ou avec une coincubation avec le 17-β estradiol (E<sub>2</sub>) en utilisant un test au MTT. 10 et 25µM des isomères *trans* et *cis* augmentent la prolifération cellulaire de façon significative.

Ces isomères, à 50µM, produisent une plus faible prolifération cellulaire que celle obtenue avec 25µM. Cette concentration semble être cytotoxique. De plus, 25µM de l'isomère *cis* produit un effet moindre comparé à l'isomère *trans* à la même concentration.

En présence de 0,1 µM de 17-β estradiol (E<sub>2</sub>), le *cis*-resvératrol (50µM) et le *trans*-resvératrol (25 et 50µM) diminuent significativement la prolifération cellulaire estrogénodépendante.

25 µM de l'isomère *trans* seul est capable de réduire la prolifération induite par l'estradiol et 25 µM du *cis* isomère produit moins d'effet.

Quelle que soit la lignée cellulaire utilisée, le *cis*-resvératrol est moins efficace que le *trans*-resvératrol à la même concentration.

Le modèle moléculaire en 3D des deux isomères comparé à celui de l'estradiol montre que l'isomère *trans* possède une structure 3D plane correspondant à celle de l'estradiol à la différence de l'isomère *cis*.

Bien que l'on ne possède pas vraiment d'informations concernant les paramètres pharmacocinétiques *in vivo* du resvératrol, il semble que les niveaux de *trans*-resvératrol contenus dans le vin pourraient réduire la liaison aux estrogènes, ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques par exemple dans le cancer du sein.

Il est très intéressant d'observer l'interaction apparente du *trans*-resvératrol avec à la fois les récepteurs aux estrogènes de type I et de type II.

Les propriétés de faibles concentrations en resvératrol soulèvent la possibilité que les études structure-activité puissent conduire au développement d'agonistes ou antagonistes de récepteurs aux estrogènes plus sélectifs qui pourraient être utiles comme agents thérapeutiques à l'avenir.

## VII.3.2 ACTION SUR LES CELLULES DEPENDANT DES ANDROGENES

### VII.3.2.1 Généralités

Les androgènes jouent un rôle important dans la prolifération, la différenciation, le maintien et la fonction de la prostate. Ils sont impliqués dans le développement et la progression du cancer de la prostate qui est un cancer hormono-dépendant.

Le récepteur aux androgènes est le médiateur essentiel pour l'action des androgènes et un facteur transcriptionnel appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdiennes, ainsi le récepteur aux androgènes a un rôle critique dans le développement du cancer de la prostate.

On a découvert que la croissance de cellules cancéreuses de la prostate répondant aux androgènes pouvait être inhibée par le resvératrol, ce qui est attribué en partie à une diminution de l'expression et de la fonction du récepteur aux androgènes.

### VII.3.2.2 Effets sur la lignée cellulaire LNCaP (MITCHELL S. et als)

La lignée cellulaire LNCaP est une lignée cellulaire cancéreuse de la prostate répondant aux androgènes, obtenue à partir d'une métastase d'un nodule lymphoïde du cancer de la prostate chez un patient.

Les cellules LNCaP expriment un récepteur aux androgènes et un certain nombre de gènes induits par les androgènes (comme le *prostate-specific antigen* ou PSA et le *human kallikrein-2* ou hK2), et leur croissance est stimulée par les androgènes.

Les effets du resvératrol sont d'abord examinés aux doses de 8 à 32 $\mu$ M sur la croissance stimulée par les androgènes, et sur l'expression des gènes dans les cellules LNCaP.

Une diminution de croissance des cellules LNCaP traitées par le resvératrol a été observée.

Un milieu épuisé (issu du premier test), a été collecté pour des essais sur des protéines PSA et hK2 en présence d'androgènes et de resvératrol. Une grande diminution des 2 protéines induites par les androgènes a été constatée.

La transfection dans les cellules LNCaP est réalisée avec ou sans mibolérone, Mib, un androgène synthétique qui n'est pas métabolisé dans la culture cellulaire. On veut ainsi tester de quelle manière le resvératrol peut

directement affecter l'activité transcriptionnelle du gène du PSA conduite par les androgènes.

La transfection est le processus par lequel des acides nucléiques exogènes sont introduits dans des cellules en culture dont on désire étudier une voie métabolique par des moyens physiques ou biochimiques.

Une fois le vecteur intégré dans le cytoplasme des cellules, il va être possible de le détecter et de suivre l'expression du gène de la luciférase et ainsi déterminer les portions du gène couplé au gène de la luciférase qui sont responsables de la régulation transcriptionnelle.

La mesure des émissions lumineuses se fait grâce au luminomètre.

Les résultats obtenus suggèrent que le récepteur aux androgènes est impliqué dans l'inhibition des cellules LNCaP par le resvératrol.

Le resvératrol pourrait donc inhiber l'expression du récepteur aux androgènes et ses fonctions, incluant l'induction du gène et la prolifération cellulaire.

De plus amples études des effets *in vivo* du resvératrol sur l'expression du récepteur aux androgènes et en conséquence sur l'action des androgènes sont nécessaires. Néanmoins, le resvératrol se présente ici comme un potentiel inhibiteur de l'action des androgènes dans les cellules cancéreuses de la prostate.

L'inhibition de l'action des androgènes par le resvératrol est médiée par l'intermédiaire de la réduction de l'expression de plusieurs gènes importants comme celui du récepteur aux androgènes (AR), et de la p21.

## VII.4. RESVERATROL ET COSMETIQUE

### VII.4.1. LE RESVÉRATROL, UN NOUVEL ACTIF ANTI-ÂGE

Un laboratoire français, le laboratoire CAUDALIE, crée en 1993, s'intéresse de près aux propriétés des polyphénols du raisin (OPC ou oligomères procyanoliques) et au resvératrol en dermatologie.

Pour la première fois en cosmétologie, des polyphénols stabilisés sont utilisés et un brevet est déposé. Très fragiles, les polyphénols s'oxydent très rapidement à l'air et virent au rose s'ils ne sont pas stabilisés. Ils perdent alors toutes leurs vertus anti-oxydantes. Associés à un acide gras essentiel, les polyphénols agissent *in situ* pour protéger les cellules des radicaux libres.

Dès 1996, Caudalie signe une convention de recherche avec la Faculté de Bordeaux et sa propre équipe de recherche est en place.

D'après des tests *in vitro* (Publication Frankel The Lancet, 1993), la molécule d'OPC de pépins de raisin est 10 000 fois plus puissante que la vitamine E pour lutter contre les radicaux libres.

Pour autant, son extraction représente un travail considérable : il faut une tonne de pépins de raisin pour obtenir 1kg d'OPC.

D'une manière similaire, il faudra une tonne de sarments de vigne pour tirer 1 kilo de resvératrol, qui est à la base du sérum qui n'a vu le jour qu'après 4 ans de recherche et a mérité le dépôt d'un second brevet.

On revendique à ce sérum un effet raffermissant, anti-oxydant et stimulant du renouvellement cellulaire. C'est un nouvel actif « anti-âge ».

#### VII.4.2 ACTION SUR LES KERATINOCYTES (BOSKO C. et als)

Des préparations cosmétiques qui contiennent de  $2.10^{-5}$  à 10 % de resvératrol et sont utilisées pour hydrater, raffermir et prévenir ou réduire l'apparition des rides ont été testées. Ce sont des lotions, des gels ou des crèmes.

\*le resvératrol inhibe la prolifération des kératinocytes

Les kératinocytes sont les cellules majeures de l'épiderme, elles représentent 75 à 80% du nombre total de cellules épidermiques.

Les kératinocytes possèdent 4 stades majeurs de différenciation dans l'épiderme et la différenciation est importante pour permettre à la peau d'exercer sa fonction de barrière contre les agressions extérieures de l'environnement et prévenir la deshydratation.

Avec l'âge les processus de différenciation ralentissent et l'épaisseur du derme diminue, c'est ce qui cause les rides.

Des concentrations aussi faibles que  $1,56\mu\text{M}$  de resvératrol diminuent la synthèse d'ADN des kératinocytes de façon significative.  $1,56\mu\text{M}$  de resvératrol réduit la prolifération des kératinocytes de 50%.

Dans toutes les expériences,  $50\mu\text{M}$  de resvératrol inhibent complètement la synthèse d'ADN.

\*le resvératrol induit la différenciation des kératinocytes

Un test avec la transglutaminase, qui est une enzyme marqueur de la différenciation épidermique car elle permet la formation de la couche cornée terminale est utilisé.

La transglutaminase s'exprime dans les différentes couches de l'épiderme, particulièrement dans la couche granuleuse mais elle est absente dans la couche basale épidermique indifférenciée. Plus son niveau d'expression est élevé, plus on a un état de différenciation cellulaire.

A des concentrations supérieures à 10µM, on note une augmentation dans l'expression de la transglutaminase dans les kératinocytes, ce qui montre que le resvératrol augmente la différenciation des kératinocytes.

Le resvératrol est un phytoestrogène qui inhibe la prolifération des kératinocytes, et augmente leur différenciation.

Les agents qui augmentent l'épaisseur du derme et qui augmentent la différenciation des kératinocytes dans la couche épidermique sont des composants idéals pour permettre la création de produits dermatologiques avec un effet anti-âge bénéfique.

## VII.5. AUTRES PROPRIETES ATTRIBUEES AU RESVERATROL

En dehors des propriétés citées précédemment, de très nombreuses publications sont parues concernant le rôle bénéfique du resvératrol dans la protection contre les maladies cardiovasculaires.

Ces propriétés sont liées de près au phénomène qu'est le « French paradox ».

Le resvératrol semble avoir des effets bénéfiques certains dans la protection de maladies coronariennes. Les mécanismes de cette protection sont :

- la prévention de l'oxydation de l'apoprotéine B associé aux LDL (diminution de la formation de plaques athéromateuses) (FRANKEL E.N et als), (MERILLON J.M et als),
- la diminution de la sécrétion d'esters de cholestérol et de triglycérides (LIN J.K et als),
- l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (PACE-ASCIAK et als) et,
- l'inhibition de la squalène monooxygénase qui permet d'inhiber la synthèse endogène du cholestérol (LADEN B.P et als).

## VII.6. LES DERNIERES DECOUVERTES

Comme il a été précisé à la page 75, au début de cet exposé des propriétés du resvératrol, le travail développé jusqu'ici concerne une période de 1996 à 2001.

Les dernières études concernant les propriétés du resvératrol pour l'année 2002 et début 2003 sont présentées dans le chapitre qui suit.

- le resvératrol inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans les cellules pancréatiques humaines (DING X.Z., ADRIAN T.E.)

Plusieurs études ont montré que le resvératrol avait un rôle dans les cancers cutanés, mammaire, du côlon, de la prostate ou du foie.

Une recherche récente concerne le rôle du resvératrol sur la prolifération de deux types de cellules cancéreuses du pancréas : PANC-1 et AsPC-1. Le resvératrol a inhibé la prolifération de ces deux types de cellules de façon concentration et temps dépendants.

Le nombre de cellules des deux lignées a été diminué de façon significative par un traitement de 48 et 72 h avec 100  $\mu\text{mol/L}$  de resvératrol et on a observé une perturbation dans le cycle cellulaire à la phase de transition S/G2.

L'effet anti-prolifératif du resvératrol a été accompagné de changements morphologiques de l'apoptose.

Le resvératrol a donc un effet anti-prolifératif sur les cellules du pancréas, il produit un arrêt dans le cycle cellulaire et l'apoptose des cellules. Cet effet antiprolifératif par perturbation du cycle cellulaire avait déjà été observé dans une étude sur une lignée de cellules cancéreuse du côlon chapitre VII.2.1.2.

- effets du resvératrol sur le foie et la thyroïde

On a vu précédemment que le resvératrol avait un effet sur les cellules d'hépatome de souris HEPA-1C17, sur les microsomes humains HL-97, HL-111, et sur les ascites hépatiques de rat AH-130 et AH-109A.

L'effet anti-tumoral du resvératrol seul et ses effets en association avec le 5-FU qui est un anti-cancéreux, sur la croissance *in vitro* de la lignée cellulaire H-22 d'un hépatome a été étudié (SUN ZJ et als).

Le resvératrol a inhibé la croissance des cellules H-22 de l'hépatome de manière dose et temps dépendants et l'association du resvératrol avec le 5-FU a provoqué un effet synergique.

L'observation sous microscope électronique montre que les cellules tumorales possèdent les caractéristiques de cellules apoptotiques.

Ainsi le resvératrol peut supprimer la croissance des cellules H-22 *in vitro*, et cette activité anti-tumorale se produit par induction de l'apoptose.

D'autres chercheurs ont montré que le resvératrol avait un effet antifibrotique dans les hépatites chroniques (STICKEL F et als). Certains médicaments peuvent lutter contre le déclenchement de la fibrogenèse dans les cellules hépatiques stellaires et les myofibroblastes, qui sont la principale matrice productrice de cellules.

Le resvératrol semble interférer avec le processus d'activation des cellules stellaires hépatiques.

Le resvératrol inhibe également la croissance cellulaire dans les cellules Hep-G2 p53 positive (KURO PL et als). Cette inhibition de croissance est due à l'induction de l'apoptose par le resvératrol par la voie de la p53. Les cellules sont arrêtées en phase G1 et on note une augmentation de l'expression de la p21 et du gène Bax.

Dans les cellules Hep-3B p53 négative traitées par le resvératrol, on n'observe pas d'effets antiprolifératifs.

Deux lignées de cellules cancéreuses papillaires (PTC) et deux lignées de cellules cancéreuses folliculaires (FTC) de la thyroïde ont été traitées avec 1 à 10  $\mu$ M de resvératrol (SHIH A. et als).

Les études montrent que le resvératrol induit l'apoptose à la fois dans les cellules papillaires et folliculaires de la thyroïde par une voie dépendante de la p53.

L'induction de l'apoptose par la voie de la p53 avait déjà été observée dans la lignée de cellules cancéreuses épidermiques de souris (JB6 C1 41), et dans la lignée de cellules BPAE au chapitre VII.2.3.5.

- effet du resvératrol dans le cancer de l'œsophage chez le rat (LI ZG et als)

Une étude a montré que le resvératrol inhibe la tumorigénèse de l'œsophage chez le rat induite par le NMBA.

Lors de cette étude, on a constaté que la plus haute expression de la COX-1 et celle de la COX-2, ainsi que l'augmentation de la synthèse de PGE2, ont été significativement diminuées par administration de resvératrol.

Le resvératrol semble donc supprimé le développement du cancer de l'œsophage chez le rat induit par le NMBA en ciblant les COXs et la PGE2, et pourrait devenir un agent prometteur dans la prévention et le traitement du cancer de l'œsophage humain.

- effets sur les cellules cancéreuses du sein

On a vu précédemment que le resvératrol inhibe la prolifération des cellules mammaires épithéliales humaines de façon dose et temps dépendant. Le traitement de ces cellules par le resvératrol réduit le nombre de cellules viables et prévient la croissance exponentielle des 3 lignées cellulaires examinées (MCF-7, MDAMB-231, MCF-10F).

Ces observations indiquent que le resvératrol a un effet antiprolifératif direct sur les cellules épithéliales mammaires humaines indépendamment du nombre de récepteurs estrogéniques des cellules (MGONYEBI O.P. et als).

Dans une étude récente (POZO-GUISADO E. et als) sur les lignées de cellules cancéreuses du sein MDAMB-231 et MCF-7 le mécanisme possible par lequel le resvératrol pourrait interférer avec le contrôle du cycle cellulaire et provoquer la mort par apoptose a été analysé.

Le resvératrol a inhibé la prolifération cellulaire et la viabilité dans les deux lignées cellulaires et l'apoptose a été induite en fonction de la concentration et du type cellulaire.

Dans les cellules MDAMB-231, le resvératrol jusqu'à 200µM a diminué l'expression et les activités des kinases des régulateurs positifs du cycle cellulaires en phase G1/S et G2/M et a inhibé l'activité de la ribonucléotide réductase de manière concentration dépendante, sans un effet significatif sur la faible expression des suppresseurs de tumeurs que sont la p21, p27 et la p53.

Ces cellules sont mortes par un processus non apoptotique et en l'absence de changements significatifs dans la distribution du cycle cellulaire.

Dans les cellules MCF-7, le resvératrol a produit une augmentation significative et transitoire dans l'expression et dans les activités des kinases des régulateurs positifs du cycle cellulaires en phase G1/S et G2/M.

De façon simultanée, l'expression de la p21 a été induite en présence de hauts niveaux de p27 et de p53.

Ces effets contraires sont dus au blocage du cycle cellulaire en phase S et à l'induction de l'apoptose dans les cellules MCF-7. Ainsi l'activité antiproliférative du resvératrol peut avoir lieu à travers une régulation différentielle du cycle cellulaire qui conduit soit à l'apoptose soit à la nécrose. Ceci peut être influencé par la concentration de cette molécule et par les caractéristiques de la cible cellulaire.

- Effets antifongiques et antimicrobiens

Le resvératrol possède des effets antimicrobiens sur les bactéries pathogènes de la peau et les dermatophytes (CHAN MM.).

La croissance des espèces de bactéries comme *Stapylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, et *Pseudomonas aeruginosa* a été inhibée par 171 à 372µg/mL de resvératrol dans un solvant diméthyl sulfoxyde.

L'activité du resvératrol contre des espèces de champignon comme *Trichophyton mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *Epidermophytes floccosum*, et *Microsporum gypseum* a également été testée.

La croissance des dermatophytes a été inhibée avec 25 à 50 µg/mL de resvératrol.

Cette étude indique une nouvelle application du resvératrol pour combattre les infections fongiques et les potentiels cliniques sont prometteurs.



- amélioration de la résistance des fruits après la récolte

L'utilisation de conditions de stockage contrôlées ou de pesticides synthétiques n'est pas sans poser de problèmes pour la santé de l'homme et pour l'environnement, d'où la recherche du développement de l'utilisation des propres molécules de défense des plantes.

A côté de son rôle antifongique, le resvératrol est connu pour posséder d'importantes propriétés anti-oxydantes pouvant avoir des effets bénéfiques sur la conservation des fruits pendant leur stockage. En conséquence, on a mené des expériences d'application de resvératrol sur différents fruits (GONZALEZ U. et als).

La qualité des fruits traités et non traités par le resvératrol a été étudiée par la mesure de leur composition biochimique et par des analyses sensorielles. L'application externe de resvératrol n'altère pas les propriétés sensorielles et biochimiques des fruits et celui-ci pourrait donc être utilisé pour améliorer la résistance des fruits après la récolte.

## DISCUSSION - CONCLUSION

En 1963, on étudie un remède traditionnel chinois, le « kojo kon » préparé à partir de racines de *Polygonum cuspidatum*. Ce remède chinois est utilisé depuis des siècles pour lutter contre l'athérosclérose et est riche en un composé : le resvératrol.

En 1976, la présence du resvératrol est détecté dans la vigne où il est synthétisé pour protéger la vigne des attaques fongiques. La découverte dans le vin date seulement de 1992 et c'est en 1997 qu'on lui attribue des vertus anti-cancéreuses.

A partir de ce moment là, de nombreuses recherches sont entreprises. Le resvératrol, pourrait-il devenir un nouveau principe actif ?

Si le resvératrol était un jour utilisé en thérapeutique, il conviendrait de l'extraire ou de le synthétiser.

Le resvératrol se trouvant à des teneurs faibles et très variables dans le vin rouge (de l'ordre du mg/L), les extraits provenant de racines de *Polygonum cuspidatum*, qui possèdent des teneurs supérieures à 20 % de resvératrol pourraient être utilisés pour extraire le resvératrol.

Il pourrait être intéressant de le synthétiser plutôt que de l'extraire mais des facteurs comme le rendement et le prix de revient rentrent aussi en jeu.

Certains laboratoires commencent déjà à le commercialiser en tant « qu'actif nutritionnel anti-oxydant et anti-âge ».

Les recherches sur les propriétés du resvératrol ont donné lieu à de nombreuses publications dans des domaines variés.

Il est certain cependant que si le resvératrol protège des dommages de l'athérosclérose et exerce une action chimiopréventive, c'est en grande partie de par son pouvoir anti-oxydant. Ce pourrait être une propriété exploitée en thérapeutique notamment dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou en préventif dans les maladies coronariennes.

En effet, un apport constant en anti-oxydant pourrait permettre de pallier la diminution des défenses naturelles (le contenu en anti-oxydants endogènes des cellules diminuant avec l'âge), et de protéger les tissus contre une dégénérescence précoce.

La santé est-elle au fond du verre ?

A l'occasion de la conférence « Sang et vin », au mois d'Avril 2002 à Bordeaux, le Professeur Joseph Vercauteren, de l'université Victor Segalen à Bordeaux, a déclaré, qu'au vue de leurs propriétés démontrées *in vitro*, il est probable que si elles passent dans l'organisme lorsque l'on boit du vin, certaines des molécules polyphénoliques notamment de la famille du resvératrol, puissent agir comme elles le montrent *in vitro*, sur des maladies comme le cancer et de façon même préventive.

Il y a des molécules contenues dans le vin qui se révèlent très prometteuses, en tant que principes actifs médicamenteux, mais est ce que ces molécules agissent encore lorsque l'on boit du vin ? Ceci mérite encore d'être démontré.

Dans une étude menée par le Professeur Vercauteren à Bordeaux, en implantant de la flore intestinale humaine chez le rat, les polyphénols catéchiques sont métabolisés en de petites molécules, et ceci pour des proportions très importantes.

Peut être est-ce les métabolites des polyphénols (et on ne sait pas encore lesquels) qui sont actifs ?

La métabolisation de ces composés catéchiques crée des molécules qui ressemblent de près ou de loin à de l'aspirine. Cela reste des phénols, donc capables d'apporter des propriétés anti-oxydantes ou piègeurs de radicaux libres, propriétés des phénols en général. Mais ces métabolites sont devenus très petits et sont certainement aussi bien résorbés que les petites molécules comme l'aspirine. Le resvératrol est en phase clinique actuellement.

Peut-on considérer le resvératrol comme une molécule anti-cancer ?

D'après le Professeur Vercauteren, si le resvératrol était la seule molécule active, les teneurs en sont insuffisantes dans le vin pour qu'il soit efficace.

En revanche, il existe des dérivés du resvératrol en quantités bien plus importantes qui, dans leur mécanisme d'action, pourraient éventuellement jouer le rôle de précurseurs en resvératrol, en libérant ultérieurement du resvératrol.

Le resvératrol ne peut être à lui seul, responsable de tous les bienfaits du vin. On ne connaît actuellement pas plus de 25% de la composition phénolique du vin, il faut mettre l'accent non pas sur la singularité d'une molécule, mais sur leur complémentarité.

Ce n'est pas parce que telle molécule agit *in vitro* contre une maladie, qu'il faut faire croire aux malades qu'il leur suffit de boire du vin, dont la composition en resvératrol varie énormément selon le type de vin.

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

### TABLEAUX

Tableau 1 : Données en nombre absolu de décès, p.36

Tableau 2 : Taux de mortalité tous cancers selon le sexe en France en 1990, p.37

Tableau 3 : Concentrations en resvératrol dans divers vins sélectionnés(extraits) (Siemann E.H, Creasy L.L, 1992), p.44

Tableau 4 : Concentration des isomères du resvératrol et du picéide dans des vins blancs espagnols, p.46-47

Tableau 5 : Concentration des isomères du resvératrol et du picéide dans les vins rosés espagnols, p.47-48

Tableau 6 : Concentrations en resvératrol (mg/L) dans les vins macérés et non macérés, p.50

Tableau 7 : Concentrations en resvératrol dans les grappes en fonction du taux de contamination par le botrytis, p.51

Tableau 8 : Effets du traitement par le resvératrol sur le poids des animaux et la prise de nourriture, p.114

Tableau 9 : Effets du resveratrol sur le nombre de cellules tumorales et sur la distribution des cellules dans le cycle des cellules AH-130 yoshida, p.115

Tableau 10 : Effets après 24h d'exposition au resvératrol sur le nombre de cellules tumorales et sur la distribution du cycle cellulaire des cellules AH-130 in vitro, p.115

### FIGURES :

Figure 1 : Evolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à 1990, p.29

Figure 2 : Evolution de la mortalité par cancer du poumon et des voies aéro-digestives supérieures en France de 1950 à 1990, p.30

Figure 3 : Evolution de la mortalité par cancers digestifs en France de 1950 à 1990, p.32

Figure 4 : Evolution de la mortalité par cancer des organes du système reproducteur en France de 1950 à 1990, p.33

Figure 5 : Taux d'incidence de certains cancers chez les femmes (schéma de gauche) et les hommes (schéma de droite) dans quelques pays occidentaux, p.35

Figure 6 : Risque relatif de mortalité toutes causes confondues pour les non-fumeurs, les anciens fumeurs, et les fumeurs en fonction de la consommation d'alcool, p.53

Figure 7 : Feuilles de *Polygonum cuspidatum*, p.61

Figure 8 : Fleurs de *Polygonum Cuspidatum*, p.61

Figure 9 : Racines de *Polygonum cuspidatum*, p.61

Figure 10 : *Vitis vinifera* L., p.64

Figure 11 : Voie de biosynthèse des phytoalexines chez la vigne, p.71

Figure 12 : Evènements oxydatifs entraînés par le TPA au cours du temps (A à E) et effets respectifs du resvératrol sur ces réponses au niveau de la peau de souris, p.82

Figure 13 : Effets du resvératrol sur l'activité EROD et MROD dépendante de la P450-1A, p.87

Figure 14 : Schéma de biosynthèse des eicosanoïdes, p.91

Figure 15 : Effets du resvératrol sur la genèse de tumeur sur un modèle de peau de souris, p.94

Figure 16 : Effets temps dépendant du resvératrol sur la prolifération (A) et l'invasion (B) des cellules AH-109A, p.96

Figure 17 : Effets dose-dépendants du resvératrol sur la prolifération (A) et l'invasion (B) des cellules AH-109A, p.96

Figure 18 : Effets du resvératrol sur la prolifération (A) et l'invasion (B) des cellules AH-109A par un test *in vitro*, p.97

- Figure 19 : Schéma du cycle cellulaire, p.104
- Figure 20 : Effets du resvératrol sur la viabilité des cellules MCF-7, p.106
- Figure 21 : Effets du resvératrol sur la viabilité des cellules MCF-10F, p.107
- Figure 22 : Effets du resvératrol sur la viabilité des cellules MDAMB-231, p.107
- Figure 23 : Inactivation de la protéine R2 de la ribonucléotide réductase murine par le resvératrol et l'hydroxyurée, p.108
- Figure. 24 : Inhibition de l'activité de la ribonucléotide réductase murine par le resvératrol, p.109
- Figure 25 : Inhibition de la synthèse d'ADN par le resvératrol et l'hydroxyurée, p.110
- Figure 26 : Effet du resvératrol sur la croissance des cellules U937, p.117
- Figure 27 : Représentation schématique des différentes voies impliquées dans le processus apoptotique, p.121
- Figure 28 : Sensibilité des cellules HL-60 au resvératrol, p.124
- Figure 29 : Inhibition de la transformation cellulaire des cellules JB6 C1 41 induite par le TPA et l'EGF par le resvératrol, p.125
- Figure 30 : Effet du resvératrol sur la viabilité et la prolifération des cellules HL60 en culture, p.127
- Figure 31 : Structure de l'estradiol, du trans-resvératrol, du diéthylstilbestrol p.134

## BIBLIOGRAPHIE

1. ADRIAN M., JEANDET P., BESSIS R., JOUBERT J.M.  
« Induction of phytoalexin synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride  $AlCl_3$  »  
*J. Agric. Food Chem.*, 1996, (44) : 1979-1980
2. ANANTAPHRUTI M., TERADA M., ISHII A.I., KINO H., SANO M., KUROYANAGI M., FUKUSHIMA S.  
« Chemotherapy of parasit helminths : in vitro effects of various drugs on the motor activity of adults schistosoma japonicum »  
*JPN J. Parasitol.*, 31(4) : 321-328
3. ARNAL J.F, ELHAGE R., MARET A., RAMI J., FAYE J.C., BAYARD F.  
« Estrogènes et athérosclérose : données récentes et perspectives »  
Edition Médecine/sciences, 1999, (15) : 212-218
4. BASLY J.P, MARRE-FOURNIER F., LE BAIL J.C, HABRIOUX G., CHULIA A.J  
« Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E) and (Z)-resvératrol »  
*Life science*, 2000, 9(66) : 769-777
5. BAVARESCO L.  
« Elicitation and accumulation of the phytoalexine resvératrol by grapes in response to *Botrytis cinerea* attack under natural condition »  
*Vitis*, 1997, (36) : 77-78
6. BAVARESCO L., FREGONI C., CANTU E., TREVISAN M.  
“Stilbène compounds : from the grapevine to wine”  
*Drugs under experim. and clinic. res.*, 1999, (25) : 57-63
7. BERTELLI L., GIOVANNINI R., STRADI A.  
« Tillement, Plasma, urine and tissue levels of *trans* and *cis* resveratrol after short term or prolonged administration of red wine to rats »  
*Int. J. Tissue React*, 1996, (18) : 67-71

8. BLACHE D.  
« Tous les vins ne contiennent pas du resvératrol »  
*Science et vie*, 1999, (208) : 70-71
  
9. BLOT WJ, McLAUGHLIN JK, WINN DM, AUSTIN DF,  
PRESTON-MARTIN S., BERNSTEIN L., SCHOENBERG JB,  
FRAUMENI JF Jr  
« Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer »  
*Cancer Research*, 1988, 48(11) : 3282-7
  
10. BOMBARDELLI E., MORAZZONI P.  
« *Vitis vinifera* L. »  
*Fitoterapia*, 1995, 4(LXVI) : 295-304
  
11. BOREK C.  
« Anti-oxydants et cancer »  
*Actualités, Innovations, Médecine*, 1998, (49) : 43-49
  
12. BOSKO C.A., CARLOMUSTO M.A., PALANKER L.R.  
“Cosmetic composition containing resveratrol”  
Brevet d’invention US n° 6270780, 07/08/01
  
13. BOUCHARDY C., LE MG, HILL C.  
“Risk factors for breast cancer according to age at diagnosis in a french case-control study”  
*J. Clin. Epidemiol.*, 1990, 43(3) : 267-75
  
14. CALABRESE G.  
“Nonalcoholic compounds of wine : the phytoestrogen resveratrol and moderate red wine consumption during menopause »  
*Drugs under experimental and clinical research*, 1999, (25) : 111-114
  
15. CARBO N., COSTELLI P., BACCINO F.M., LOPEZ-SORIANO F.J.,  
ARGILES J.M.  
“Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumor growth in a rat tumour model”  
*Biochemical and biophysical research communication*, 1999, (254) : 739-743
  
16. CATHIARD THOMAS M., PEZARD C.  
« La santé par le raisin et la vinothérapie »  
Librairie de Médecis, 1998



17. CHAN MM.  
« Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin »  
*Biochem. Pharmacol.*, 2002, 63(2) : 99-104
18. CHARENT I.  
« Vin et santé »  
*Impact medecin* 2001, (539) : 40-45
19. CHUN J.Y, YOUNG MIE K., GUENGERICH P.  
« Resvératrol is a selective human cytochrome P4501a1 inhibitor »  
*Biochemical and biophysical research communication*, 1999, (262) : 20-24
20. CICHEWICZ R.H, KOUZI S.A., HAMANN M.T.  
« Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea* »  
*J. Natural Product*, 2000, (63) : 29-33
21. CLIFFORD A.J.  
« Delayed tumor onset in transgenic mice fed an aminoacid-based diet supplemented with red wine solids »  
*Am.J.Clin. Nutr.*, 1996, (64) : 748-756
22. COHEN N.  
« L'apoptose en pathologie humaine »  
*Annales de l'Institut Pasteur*  
Edition Elsevier, 2000, 25-29, 37-51, 79-89
23. COLLOMBET J., PAIREAULT M.  
« Vins de France »  
Hatier, 1998, 40-42
24. DECLOITRE F.  
« Alimentation et cancer »  
Edition Lavoisier, 1996 : 36-37
25. DE SANTI C., PIETRABISSA A., MOSCA F., PACIFICI G.M.  
« Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver »  
*Xenobiotica*, 1047-1054, 2000

26. DELLA RAGIONE F.D., CUCCIOLLA V., BORRIELLO A., PIETRA V.D., RACIOPPI L., SOLDATI G., MANNA C., GALLETTI P., ZAPPIA V.  
« Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition »  
*Biochemical et biophysical research communications*, 1998, (250) : 53-58
  
27. DELMAS D., JANNIN B.  
« Inhibitory effect of resveratrol, on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines »  
SFRR europe winter meeting, Dinard, 1999, : 077
  
28. DERCKX A., CREASY L.L.  
« The significance of stilbene phytoalexins »  
*Physiological molecular plant pathology*, 1989, (34) : 289
  
29. DING X.Z., ADRIAN T.E.  
« Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cells »  
*Pancreas*, 2002, 25(4) : 71-76
  
30. DOCHERTY J.J., FU M.M., STIFFER B.S., LUMPEROZ R.J., POKABLA C.M., DE LUCIA A.L.  
« Resveratrol inhibits HSV replication »  
*Antiviral research*, 1999, (43) : 135-145
  
31. DRACZYNSKA-LUSIAK B., MOSCA F., PACIFICI G.M.  
« Oxidized lipoproteins activate NF kB binding activity and apoptosis in PC12 cells »  
*NeuroReport*, 1998, (9) : 527
  
32. ETIENNE J.  
Abrégé de Biochimie génétique et biologie moléculaire  
Edition Masson, 1998, 200-203 et 266-281
  
33. FONTECAVE M., LEPOIVRE M., ELLEINGAND E., GEREZ C., GUITTET O.  
« Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase »  
*FEBS letters*, 1998, (421) : 277-279

34. FORTI L., CARAFOLI F., STIVALA A., SAVIO M., PROSPERI E., BIANCHI L., MAGA G., PAGNONI V.M., VANNINI V.  
« Relations entre la structure moléculaire et l'activité biologique du resvératrol »  
Bioflavonoïdes et polyphénols : rôle pour la santé et dans les maladies, SFRR Europe Winter Meeting, Dinard, 1999, : 021
35. FRANKEL E.N., WATERHOUSE A.L., KINSELLA J.E.  
« Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol »  
*The Lancet*, 1993, (341) : 1103-1104
36. FREMONT L.  
« Biological effects of resveratrol »  
*Life science*, 2000, (66) : 663-673
37. GOLDBERG D.M, YAN J., DIAMANDIS E.P, KARUMANCHIRI A., SOLEAS G.J, WATERHOUSE A.L.  
« A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in commercial wines »  
*Am. J. Enol. Vitic.*, 1995, (46), : 158-165
38. GONZALEZ U., OREA J.M., MONTERO C., JIMENEZ J.B.  
« Improving postharvest Resistance in Fruits by external application of *trans*-resveratrol »  
*J. Agric. Food. Chem.*, 2003, 51(1) : 82-89
39. GRABER R., FARINE J.C., A.LOSA G.  
« Activité anti-oxydante et prévention de l'apoptose par le resvératrol chez des cellules humaines mononuclées immunocompétentes du sang périphérique »  
Bioflavonoïdes et polyphénols : rôle pour la santé et dans les maladies, SFRR Europe winter meeting, Dinard, 1999 : 042
40. GRONBAEK M.  
« Population based cohort study of the association between alcohol intake and the cancer of the upper digestive tract »  
*B.M.J*, 1998, (317) : 844-847
41. HAIN R., BIESELER B., KINDL H., SCHRODER G., STOCKER R.  
« Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol »  
*Plant Mol Biol.*, 1990, (15) : 325-35

42. HATWAY D.E, SEAKINS J.W.T.  
« Hydroxystilbens of *Eucalyptus wandoo* »  
*Biochemistry*, 1959, (72) : 369-373
43. HEO Y.H., KIM S., PARK J.E., JEONG L.S., LEE S.K.  
« Induction of quinone reductase activity by stilbene analogs in mouse Hepa 1c1c7 cells »  
*Arch.Pharm.Res*, 2001, 24(6) : 597-600
44. HILL C.  
« Evolution de la mortalité en France de 1950 à 1990 »  
Statistiques de santé, édition INSERM, Paris, 1993
45. HOMBERG J.C.  
Immunologie fondamentale  
Edition estem, 1999 : 145-146
46. HSIEH T.C., JUAN G., DARZYNKIEWICZ Z.  
« Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21, and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2 »  
*Cancer research*, 1999, (59) : 2596-2601
47. HUANG C., WOI-YA M., GORANSON A., ZIGANG D.  
« resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway »  
*Carcinogenesis*, 1999, (20) : 237-242
48. INGHAM J.L.  
« Plant disease resistance »  
*Botanic review*, 1972, (38) : 343-424
49. IZARD J.C., FOURNERON J. D.  
« Procédé de fabrication d'un extrait naturel de la vigne concentré en resvératrol et produits »  
Brevet d'invention no 99 10904 déposé le 30.08.99
50. JANG M., CAI L., UDEANI G.O., SLOWING K.V., THOMAS C.F., BEECHER C.W., FONG H.H., FARNSWORTH N.R., KINGHORN A.D., MEHTA R.G., MOON R.C., PEZZUTO J.M.  
« Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes »  
*Science*, 1997, (275) : 218

51. JANG M., PEZZUTO J.M.  
« Effects of resvératrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin »  
*Cancer Letters*, 1998, (134) : 81-89
  
52. JEANDET P., BESSIS R., SBAGHI M., MEUNIER P.  
« Occurrence of a resveratrol B D-glucoside in wine : preliminary studies »  
*Vitis*, 1994, (33) : 183
  
53. JEANDET P., BREUIL A.C., ADRIAN M., BESSIS R.  
« Effect of Enological Practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine »  
*J. Agric. Food Chem.*, 1995, (43) : 316-319
  
54. JEANDET P., BESSIS R., ADRIAN M., RAJAEI H., VENEAU J.  
« Resveratrol oxidation in *bothrytis cinerea* conidia »  
*Phytopathology*, 1998, 5(88) : 472-476
  
55. JEANDET P., SPAGHI M., BESSIS R., MEUNIER P.  
« The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins »  
*Vitis*, 1995, (34) : 91-94
  
56. JUAN M.E., LAMUELA-RAVENTOS R.M, DE LA TORE-BORONAT M.C.  
« Determination of *trans*-resveratrol in plasma by HPLC »  
*Anal.Chem.*, 1999 : 747-750
  
57. KAWADA N., SEKI S., INOUE M., KUROKI T.  
« Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acétylcystéine, on the functions of cultured rat hepatic stellates cells, and Kupffer cells »  
*Hepatology*, 1998, (27) : 1265-1274
  
58. KOZUKI Y., MIURA Y., YAGASAKI K.  
“Resveratrol suppresses hepatoma cell invasion independently of its anti proliferative action”  
*Cancer letters*, 2001, (167), 2001 : 151-156

59. KUBO M., KIMURA Y., SHIN H., HANEDA T., TANI T., NANBA K.  
 « Studies on the antifungal substance of crude drug (II)  
 On the roots of *Polygonatum cuspidatum* »  
*Shoyakugaku zashi*, 1981, (35) : 58-61
  
60. KUMAR A., DHAWAN S., AGGARWAL B.B.  
 « Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, Ikap degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells »  
*Oncogene*, 1998, 7(17) : 913-8
  
61. KUO P.L., CHIANG L.C., LIN C.C.  
 « Resveratrol induced-apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells »  
*Life Science*, 2002, 72(1) : 23-34
  
62. LADEN B.P., PORTER T.D.  
 « Resveratrol inhibits squalene monooxygenase »  
*Nutrition Research*, 2001, (21) : 747-753
  
63. LANGCAKE P., PRYCE R.J.  
 « The production of resvératrol by *Vitis vinifera* L. and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury »  
*Physiol. Plant Pathol.*, 1976, (9) : 77-86
  
64. LANGCAKE P., BRYCE R.J.  
 « Production of phytoalexins by grapesvines in response to UV irradiation »  
*Phytochemistry*, 1977, (16) : 1193
  
65. LARRA F.  
 « Notion de croissance tumorale »  
 Manuel de cancérologie, 1989, p.50-55
  
66. LEVY V., LEVY-SOUSSAN M.  
 « Cancérologie »  
 Collection Medline, 1996
  
67. LI Z.G., HONG T., SHIMADA Y., KOMOTO I., KAWABE A., DING Y.  
 « Suppression of NMBA-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol »  
*Carcinogenesis*, 2002, 23(9) : 1531-1536

68. LIN J.K., TSAI S.H.  
« Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol »  
*Proc. Natl. Sci. Counc.*, 1999, 3(23) : 99-106
69. MARIEB E.N.  
« Anatomie et physiologie humaine » 2<sup>ème</sup> édition  
De Boeck Université, 1993, p.88
70. MAROUF A.  
« Dictionnaire de botanique, les phanérogames »  
Edition Masson science, Dunod, 2000
71. Mc NARY H., BALDWIN S.  
« Chemopreventive properties of *trans*-resveratrol are associated with inhibition of activation of I $\kappa$ B kinase »  
*Cancer research*, 2000, (60) : 3477-3483
72. MERILLON J.M., FAUCONNEAU B., WAFFO P., BARRIER L., DECENDET A., HUGUET F.  
« Antioxidant activity of wine phenolic compounds in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins »  
*Polyphenols communications*, Bordeaux, 1996 : 435-436
73. MERRITT A., MEREDITH E.  
« Synthesis of resveratrol »  
Brevet d'invention n° WO 01/60774, 23.08.2001
74. MGBONYEBI O.P., RUSSO J., RUSSO I.H.  
« Antiproliférative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells »  
*International journal of oncology*, 1998, (12) : 865-869
75. MITCHELL S., ZHU W., YOUNG C.  
“Resveratrol inhibits the expression and functions of the androgen receptor in LNCAP prostate cancer cells”  
*Cancer research*, 1999, (59) : 5892-5895
76. MOLLERUP S., OVREBO S., HAUGEN A.  
“Lung carcinogenesis : resveratrol modulates the expression of genes involved in the metabolism of PAH in human bronchial epithelial cells”  
*Int .J. Cancer*, 2001, (92) : 18-25

77. NAM-HO S., SHI Y.R., HEESON L., KYUNG R.M., YOUNG K.  
 « Inhibitory effects of hydroxystilbens on COX sheep seminal vesicles »  
*Planta medica*, 1998, (64) : 283-284
78. NICOLINI G., RIGOLIO R., MILOSO M.,  
 « Anti-apoptotic effect of *trans*-resveratrol on paclitaxel-induced apoptosis in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line »  
*Neuroscience letters*, 2001, (302) : 41-44
79. NONOMURA S., KANAGAWA H., MAKIMOTO A.  
 « Chemical constituents of polygonaceous plants : studies on the components of Ko-jo-kon »  
*Yakugaku Zasshi*, 1963, (83) : 988-990
80. PACE-ASCIAC C.R., HAHN S., DIAMANDIS E.P., SOLEAS G., GOLDBERG D.M.  
 « The red wine phenolics *trans* resvératrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis : Implications for protection against coronary heart disease »  
*Clinica Chimica Acta*, 1995, (235) : 207-219
81. PALMIERI L., MAMELI M., RONCA G.  
 « Effets of resveratrol and some other natural compounds on tyrosine kinase activity and on cytolysis »  
*Drugs under experimental and clinical research* , 1999, 25(2/3) : 79-85
82. PARK J.W., CHOI Y.J., JANG M.A., LEE Y.S., JUN D.Y., SUH S.I., BAEK W.K., SUH M.H., JIN I.N., KUON T.K.  
 « Chemopreventive agent resvératrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells  
*Cancer letters*, 2001, (163) : 43-49
83. PASQUIER C.  
 « Le point sur les anti-oxydants » (1<sup>ère</sup> partie)  
*Actualités, Innovations, Médecine*, 1994, (7) : 39-44
84. PASQUIER C.  
 « Le point sur les anti-oxydants » (2<sup>ème</sup> partie)  
*Actualités, Innovations, Médecine*, 1994, (8) : 37-40



85. PAUL B., MASIH I., DEOPUJARI J., CHARPENTIER C.  
 « Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India »  
*Journal of Ethnopharmacology*, 1999, (68) : 71-76
86. PEREZ R., GOMEZ I.  
 « Piceid, the major resvératrol derivative in Grape juices »  
*J. Agric. Food Chem.*, 1999, (47) : 1533-1536
87. PERVAIZ S., CLEMENT M.V., HIRPARA J.L., CHAWDHURY S.H.  
 « Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells »  
*Blood*, 1998, (92) : 996-1002
88. PEZARD C.  
 « Tout savoir sur les vertus du vin »  
 Edition Favre, 2000, 130 p.
89. POZO-GUISADO E., ALVAREZ-BARRIENTOS A.  
 « The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB 231 human breast cancer cells : cells specific alteration of the cell cycle »  
*Biochem. Pharmacol.*, 2002, 64(9) : 1375-1386
90. REMALEY P.  
 « PCA Alien Plant working group-Japanese Knotweed »  
 disponible sur :  
[http : //www.nps.gov/plants/alien/fact/pocu1.htm](http://www.nps.gov/plants/alien/fact/pocu1.htm) (consulté le 3 mars 2002)
91. RENAUD S.  
 « Alcool et mortalité chez les hommes d'un certain âge de l'Est de la France. »  
*Epidemiology*, 1998 : 184-188
92. RIOU S.  
 « Bénéfices à envisager avec modération »  
*Impact médecin*, 2001, (532) : 40
93. ROEMER K., MAHYAR-ROEMER M.  
 « The basis of chemopreventive action of resveratrol »  
*Drugs today*, 2002, 8(38) : 571-580

94. RUSSO-MARIE F., PELTIER A., POLLA B.  
« L'inflammation »  
John Libbey Eurotext, 1998 : 133-136
95. SAINT-LEGER A.S., COCHRANE A.L., MOORE F.  
« Factor associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine »  
*The Lancet*, 1979, (i) : 1017-1020
96. SARIG P., ZAHAVI T., ZUTKHI Y., YANNAI S., LISKER N., BEN-ARIE R.  
« Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer* »  
*Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1996, (48) : 403
97. SAVOURET J.F., QUESNE M.  
« Resveratrol an cancer »  
*Biomed. Pharmacothér.*, 2002, 2(56) : 84-87
98. SCHNEIDER Y., VINCENT F., DURANTON B., BADOLO L.  
« Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells »  
*Cancer letters*, 2000, (158) : 85-91
99. SHAMON L.A., CHEN C., MEHTA R.G., STEELE U., MOON R.C., PEZZUTO J.M.  
« A correlative approach for the identification of antimutagens that demonstrate chemopreventive activity »  
*Anticancer research*, 1994, (14) : 1775-1778
100. SHIH A., DAVIS F.B., LIN H.Y., DAVIS P.J.  
« Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK and p53-dependent mechanism »  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87(3) : 1223-1232
101. SIEMANN E.H., CREASY L.  
« Concentration of the phytoalexine resvératrol in wine »  
*Am.J. Enol. Vitic*, 1992, (43) : 49-52
102. SIEMANN E.H., CREASY L.L.  
« Occurrence of resvératrol in selected california wines by a New HPLC Method »  
*J. Agric. Food Chem.*, 1993, 4(41) : 521-523

103. SLATER S.J., SEIZ J.L., COOK A.C., STAGLIANO B.A., BUZAS C.J.  
 « Inhibition of PKC by resveratrol »  
*Biochem. Biophys. Acta*, 2003, 1637(1) : 53-69
104. SOBOLEV V.S., COLE R.J.  
 « *Trans*-resveratrol content in commercial peanuts and peanuts products »  
*J. agric. Food Chem.*, 1999, (47) : 1435-1439
105. SOLEAS G.J., GOLDBERG D.M., DIAMANDIS E.P., KARUMANCHI A., YAN J., NG E.  
 « A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine »  
*Am. J. Enol. Vitic.*, 1995, (46) : 346-52
106. SOLEAS G.J., DIAMANDIS E.P., GOLDBERG D.M.  
 « Resveratrol : a molecule whose time has come ? and gone ? »  
*Clinical Biochemistry*, 1997, 2(30) : 91-113
107. SOVAK M.  
 « Grape extract resveratrol and its analogs : review »  
*J. med. Food*, 2001, 2(4) : 93-105
108. SPAINHOUR J.  
 « Medical attributes of *Polygonum cuspidatum* »  
 disponible sur :  
[http : //wilkes1.wilkes.edu/kklemow/Polygonum.html](http://wilkes1.wilkes.edu/kklemow/Polygonum.html) (consulté le 3 mars 2002)
109. STICKEL F., BRINKHAUS B., KRAHMER N., SEITZ H.K., HAHN E.G., SCHUPPAN D.  
 « Antifibrotic properties of botanicals in chronic liver disease »  
*Hepatogastroenterol.*, 2002, 49(46) : 1102-1108
110. SUBBARAMAIAH K., CHUNG WJ., MICHELUARD P., TELANG N., TANABE T., INOUE H., JANG M, PEZZUTO JM, DANNENBERG AJ.  
 « Resveratrol inhibits COX-2 transcription and activity in phorbol ester treated human mammary epithelial cells »  
*J. Biol. Chem.*, 1998, 273(34) : 21875-21882

111. SUN N.J., WOO S.H., CASSADY J.M., SNAPKA R.M.  
 « DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea coryfolia* »  
*J. Nat. Prod.*, 1998, (61) : 362-366
112. SUN Z.J., PAN C.E., LIU H.S., WANG G.J.  
 « Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro »  
*World J. Gastroenterol.*, 2002, 8(1) : 79-81
113. TESSITORE L., DAVIT A., SAROTTO I., CADERNI G.  
 « Resvératrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21 cip expression »  
*Carcinogenesis*, 2000, 8(21) : 1619-1622
114. TOSHIYUKI T. , TETSURO I.  
 « Vaticanol D, a novel hexamer isolated from *Vatica rassak* »  
*Tetrahedron letters*, 2000, (41) : 7929-7932
115. TREDICI G., MILOSO M., NICOLINI G., GALBIATI S.,  
 CAVALETTI G., BERTELLI A.  
 « Resveratrol, map kinases and neuronal cells : might wine be a neuroprotectant ? »  
*Drugs exptl. Clin.res.*, 1999, XXV (2/3) : 99-103
116. TSAI SH, LIN-SHIAU S., LIN J.K.  
 « Suppression of nitric oxide synthase and the down régulation of the activation of NFkB in macrophages by resveratrol »  
*British Journal of Pharmacology*, 1999, (126) : 673-680
117. TUBIANA M.  
 « Le cancer hier, aujourd'hui, demain »  
 Edition Odile Jacob, 1998, 55-56 et 131-136
118. UENOBE F., NAKAMURA S.I., MIYAZAWA M.  
 «antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1»  
*Mutation Research*, 1997, (373) : 197-200
119. VANIO H., MAGEE P.N.  
 « Mechanism of carcinogenesis and risk identification »  
 IARC scientific publication, 1992, 115-134

120. VASTANO B.C, CHEN Y., ZHU N.  
« Isolation and identification of stilbenes in 2 varieties of *Polygonum cuspidatum* »  
*J. Agric. Food Chem.*, 2000, (48), 253-256
121. WILLIAMS R.L.  
« The estrogenic activity of the polyphenolic resveratrol benefits of moderate consumption of red wine »  
*Polyphenols Communications*, Bordeaux, 1996, 15-18
122. YAN X., ZHOU J., XIE G.  
« Traditional chinese medicine »  
Ashgate, 1999 : 719
123. YOUNG J.S, YEON-JIN H., JEE-YOUNG K.  
“Resveratrol , an anti-oxydant of red wine induces apoptosis in HL60 cells »  
*Cancer letters* , (140), 1999, 1-10
124. WOLTER F., STEIN J.  
« Biological activities of resveratrol and its analogs »\*  
*Drugs future*, 2002, 10(27) : 949-959

## SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 322

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER  
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

## RESUME

Chaque année, 7 à 8 millions de nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués dans le monde. Le diagnostic précoce et la prévention primaire restent les grandes voies d'approche pour lutter efficacement contre la maladie. La chimioprévention est une des voies les plus directes pour réduire la morbidité et la mortalité.

Le resvératrol est connu depuis des siècles en Asie et fait partie d'un remède préparé à partir des racines de *Polygonum cuspidatum*, préconisé pour lutter contre l'athérosclérose. En 1992, on découvre sa présence dans le vin et en 1997, ses propriétés anticancéreuses sont mises en évidence.

Le resvératrol possède une activité chimiopréventive du fait de ses propriétés anti-oxydantes, son action sur les 3 étapes de la cancérogenèse et par son action sur le NO. Il exerce également une activité chimiothérapeutique grâce à son action sur le cycle cellulaire et l'apoptose.

De plus, par sa similitude de structure avec le diéthylstilbestrol, il agirait comme un phytoestrogène ; et inhiberait également l'expression du récepteur aux androgènes.

A l'heure actuelle, les études cliniques n'en sont qu'à leurs balbutiements mais le resvératrol pourrait s'avérer être un principe actif prometteur.

---

## THESE

Docteur en pharmacie

---

## TITRE EN ANGLAIS :

Resveratrol and cancers : is health at the bottom of a glass of wine ?

---

## MOTS-CLES :

Resvératrol, 3,4,5'-trihydroxystilbène, polyphénol, phytoalexine, synthèse, extraction, *Polygonum cuspidatum*, *Vitis vinifera*, vin, cancer.

---

FACULTE DE LIMOGES  
2 rue du docteur Marcland  
87025 Limoges Cedex