

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département d'Agronomie

Laboratoire de Produits Naturels « LAPRONA »

THESE

Présentée par

GHANEMI Fatima Zohra

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Agronomie

Option : Nutrition

Intitulé de la thèse

Activités apoptotique et chimio-préventive des polyphénols de
feuilles de caroube (*Ceratonia siliqua* L.) sur les cellules
cancéreuses du côlon

Soutenue le 04 Novembre 2017, devant le jury composé de :

Président	AMRANI Sidi Mohamed	Pr	Université de Tlemcen
Directrice de thèse	BELARBI Meriem	Pr	Université de Tlemcen
Co-directeur de thèse	HICHAMI Aziz	MCA	Université de Bourgogne
Examineur	KHAN Naïm Akhtar	Pr	Université de Bourgogne
Examineur	BENAMMAR Chahid El Hocine	MCA	Université de Tlemcen
Examineur	KHELIFI Douadi	Pr	Université de Constantine

Année universitaire : 2016-2017

Remerciements

En terminant ce travail, il m'est un agréable devoir : de dire *Elhamdulillah* et de remercier sincèrement tous ceux qui de près ou de loin, ont permis sa réalisation en apportant une contribution sous une forme ou une autre.

Ma première pensée va tout naturellement à **M^{me} BELARBI Meriem**, *Professeuse à l'UABT et vice doyen chargée de la graduation à la faculté de S.N.V et S.T.U*, qui a continué après l'expérience du magister à me prendre sous son aile en m'accordant sa confiance et son attention. Je la remercie vivement d'avoir accepté de me soutenir dans cette voie et aussi pour ses compétences scientifiques vu qu'elle nous a enseigné durant l'année théorique, mais aussi bien avant, lors de mon ingénieurat en tronc commun et en spécialité. Je tiens aussi à la remercier pour ses remarques pertinentes et éclectiques, son ambition et sa bonne volonté, et surtout son bon vivant.

Je tiens à remercier du fond du cœur **M. HICHAMI Aziz**, maître de conférences à l'université de Bourgogne (Dijon- France) qui a toujours cru que ce travail mènera à un bon article puisqu'il m'a toujours dit « ya tttéma ya tttéma, il faut toujours taper très haut », « on fait de la recherche donc on cherche » et l'adage que je n'ai jamais compris « il faut regarder le verre à moitié plein ou à moitié vide ? » qu'il me sortait à chaque fois, quand ça n'allait pas du tout. C'était dur de débarquer dans un laboratoire où on ne connaît personne mais j'en sors la tête pleine d'expériences scientifiques et le cœur rempli de bons souvenirs.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à **M. AMRANI Sidi Mohamed**, *Professeuse à l'UABT*, chef du département des sciences d'Agronomie qui nous a ouvert les portes du Magister en « Nutrition », je le remercie aussi pour sa gentillesse, sa compréhension et sa bonne humeur transmissible.

Je suis également très sensible à l'honneur que me fait **M. KHAN Naïm Akhtar** *Professeuse à l'université de Bourgogne (Dijon- France)* en acceptant de juger ce travail malgré son emploi du temps surbooké. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse considération car il a contribué dans une grande partie à l'aboutissement de ce travail en tant que Directeur du laboratoire INSERM U-1231 anciennement INSERM-U866.

Mes vifs remerciements vont également à **M. KHELIFI Daoudi**, professeur à l'université de Constantine, pour avoir accepté de participer à l'examen de ce travail.

Je remercie sincèrement **M. BENAMMAR Chahid**, *Maître de Conférences de Classe A à l'UABT*, membre de l'équipe « LAPRONA », pour son sourire, son enthousiasme, ses encouragements, son accueil chaleureux dans son grand bureau de chef de département de Biologie et surtout sa contribution à l'aboutissement de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Merci pour les remarques, suggestions et critiques que vous allez m'apporter, qui vont, sans doute, me permettre d'enrichir le contenu de ce travail.

J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce mémoire :

Je tiens, en premier lieu, à remercier ma chère cousine « **Karima** » ainsi que son mari qui ont toujours pris soin de moi à chaque stage en France, je ne saurais comment leur rendre toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant ces cinq années, je remercie chaleureusement M. **NANI Abdelhafid** qui a apporté toute son aide pour l'aboutissement de l'article. Mes adorables fées qui sont M^{lle} **BENAHMED Meryem**, M^{me} **ICHCHOU Imane** et M^{lle} **CHAIB Faiza** pour l'aide précieuse et incontournable, et surtout leur bonne foi. C'est un cadeau du ciel de vous avoir à mes côtés toutes les trois.

Mes remerciements s'adressent également à Mlle **FLUCKIGER Aurélie** qui m'a initié à la culture cellulaire, la cytométrie, Adélie, Charlotte et tous les co-auteurs de mon article surtout M. **Mickael Riolland**, M. **François Gheriguelli** et M. **Farid Lahfa**. Mlle **Djeziri Fatima Zohra**, M^{lle} **DIB Hanane** ainsi que M^{me} **BORSALI Naila** qui étaient de très bonnes camarades au laboratoire de LAPRONA ainsi qu'au laboratoire de Dijon, merci pour leur soutien et leur collaboration. Merci à tous mes camarades de LAPRONA ainsi que INSERM U-866, Nadhir, Abir, Amira, Sihem, Madjid, Souleymane, Charline, Thibaut, Naima, Faten, Julia, Léa, Inchirah, Adel, Danish et tous les autres.

Merci à tous les collègues qui m'ont remplacé durant mon absence quand j'étais en stage à Dijon, ou lorsqu'il y avait des surveillances et j'étais en pleine rédaction de ma thèse, « neredhalkoum fel khir inchallah », y'a tellement de collègues, j'espère n'avoir oublié personne : Amel Didi, Amel Medjdoub, Nassima Boudilmi, Tefiani, Manaa, Youcefi, Nehar, Esma Sib, Benyoub et la liste est encore longue.

Je tiens à remercier mes amis (es) : **Souad, Halima, Khadidja, Imane, Nawel, Yasmina (Bichette) et Amina**. Sans oublier **Ikram (kiki), Ikram, Rafika Dahmani, Rachida, Rafika, Fatima Zohra, Zakia, Djamila, Touriya, Mohamed, Mohamed, Amine Khemis, Imane (belle-sœur) et tous mes camarades de l'équipe LAPRONA**.

Merci à ma mère et à Imane Ichchou pour la relecture et la chasse aux fautes. Je remercie bien évidemment ma famille et mes amis d'être là chaque jour. Une pensée à toutes nos personnes disparues et surtout celles que nous avons perdu à cause du cancer et particulièrement à notre défunte étudiante « Hafidha », Allah yerhamhoum

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier mes parents de tout mon cœur et plus particulièrement ma douce mère, mon père qui m'a toujours accompagné partout, ma chère sœur Imane et mes deux frères Mustapha et Abdellah : cette thèse est la vôtre.

Fatima Zohra

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Communications :

1 - 9e Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique, P2T Poitiers 2014

(Présentation orale)

Titre: Antiproliferative Effect of Carob Polyphenolic Extract (Pulp and Leaves) in HCT116 and HT29 Colon Cancer Cell Lines

Auteurs: F.Z Ghanemi, A. Fluckiger, N.A. Khan, M. Rialland, F. Ghiringhelli, M. Belarbi, A. Hichami

2- 3ème congrès international sur les molécules bioactives, aliments fonctionnels et maladies associées au stress oxydant Hammamet 2014

Titre: In vivo antiproliferative activity induced by aqueous and phenolic extract of Carob leaves.

Auteurs: Ghanemi FZ, Dib H, Djeziri FZ, Nani A, Khan AN, Hichami A, Belarbi M.

3- 1er congrès de physiologie et biologie intégrative CPBI - Strasbourg 2015

Polyphenolic extracts from Carob leaves exert apoptotic effects on colon cancer cells

Ghanemi FZ, Belarbi M, Fluckiger A, Benammar C, Khan AN, Apetoh L, Rialland M, Ghiringhelli F, Hichami A

4- 1st International congress of Nutrition and Food Science, Tlemcen 2015 (prix de la meilleure présentation orale)

Titre: Apoptotic pathway induction by phenolic extract of carob leaves in colon cancer cell lines

Auteurs: F.Z. Ghanemi, M. Belarbi, A. Fluckiger, F. Lahfa, N. A. Khan, M. Rialland, F. Ghiringhelli, A. Hichami

5- 1st International congress of Nutrition and Food Science, Tlemcen 2015

Titre: Apoptotic effect via the mitochondrial pathway of phenolic extract of oleaster (*Olea europea* L.) on cancer cells

Auteurs: W.Zeriouh, A. Fluckiger, C. Thomas, N. Taghzoute, F. Z. Ghanemi, F. Z. Djeziri, A. Hichami, M. Belarbi

6- FEPS 2016 congress, Université des Cordeliers, Paris France (prix de la meilleure présentation de poster)

Titre: Carob Leaves Polyphenols Trigger Intrinsic Apoptosis Pathway and Induce Cell Cycle Arrest in Colon Cancer Cells

Auteurs: F.Z. Ghanemi, M. Belarbi, A. Fluckiger, A. Nani, A. Dumont, C. De Rosny, I. Aboura, C. Benammar, B.F. Lahfa, D. Delmas, C. Rébé, L. Apetoh, N.A. Khan, M. Rialland, F. Ghiringhelli, A. Hichami

Publications:

Functional Foods 2017

Titre: Carob Leaf Polyphenols Trigger Intrinsic Apoptotic Pathway and Induce Cell Cycle Arrest in Colon Cancer Cells

Auteurs: F.Z. Ghanemi, M. Belarbi, A. Fluckiger, A. Nani, A. Dumont, C. De Rosny, I. Aboura, A. Sayed-Khan, B. Murtaza, C. Benammar, B.F. Lahfa, D. Patoli, D. Delmas, C. Rébé, L. Apétoh, N.A. Khan, F. Ghiringhelli, M. Rialland, A. Hichami.

PLOS ONE 2017

Titre: Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway

Auteurs: W. Zeriouh, A. Nani, M. Belarbi, A. Dumont, C. de Rosny, I. Aboura, F.Z. Ghanemi, B. Murtaza, D. Patoli, C. Thomas, L. Apetoh, C. Rébé, Dominique Delmas, N. A. Khan, F. Ghiringhelli, M. Rialland, Aziz Hichami

الملخص

Ceratonia siliqua المعروفة بالخروب، من فصيلة البقوليات، جد منتشرة في بلدان البحر الأبيض المتوسط.

من خلال هذا العمل قمنا بدراسة المستخلص البوليفينولي لأوراق شجرة الخروب النامية في منطقة تلمسان (الجزائر) حيث عمدنا الى تحديد، أولا: التركيب الكيميائي للنبته، ثانيا: نشاط مضادات الأكسدة، ثالثا: الآثار المضادة للسرطان باستعمال خلايا القولون (HCT 116, HT 29, SW 480 et CT 26) عن طريق قياس بقاء الخلايا حية داخل غرفة عداد خلايا الدم و كذلك تقييم موت الخلايا المبرمج بتقييم نشاط انزيم (3 et 9) caspase بطريقة western blot و scytométrie en flux أيضا توزيع دورة الخلايا بواسطة cytométrie en flux . تأثير مقاومة الأورام تم اختباره على فئران Balb/c المحقونة بخلايا CT26 و ذلك بتقييم نقيع أوراق الخروب بدلا عن الماء مقارنة بالمجموعة الشاهدة.

أظهرت نتائج تحليل مستخلصات البوليفينول لأوراق الخروب مستوى عالي من حمض القاليك و حمض الكوماريك، بالمقابل لاحظنا أن لهذه المستخلصات، تأثير سام على الخلايا يعتمد على الجرعة لإحداث الموت المبرمج للخلايا السرطانية للقولون، ما يقارب 20 ميكروغرام/ملل جرعة كافية لقتل 50 % من المجموعة.

قامت المستخلصات البوليفينولية بإحداث طريق داخلي للموت المبرمج و ذلك بتنشيط انزيم Caspase 9 و حل PARP داخل خلايا HCT-116 و CT-26. اضافة الى ذلك قامت هذه المستخلصات بتوقيف الدورة الخلوية في المرحلة G1 و ذلك بتنشيط p53 و تغيير ترجمة البروتينات الداخلة في تعديل الدورة الخلوي (p27, CDK, cycline E et A) . تبين أيضا من خلال النتائج أن حمض القاليك و حمض الكوماريك بوليفينولات تظاهي بعملها عمل المستخلصات البوليفينولية مما يوحي بعمل تآزري بين البوليفينولات. فيما يخص نقيع أوراق الخروب فقد قلص و بطريقة فعالة نمو ورم CT-26 لدى الفئران.

نخلص أخيرا من خلال نتائج هذه الدراسة أنه يمكننا استعمال مستخلصات البوليفينول لأوراق الخروب للوقاية من سرطان مستقيم القولون.

الكلمات المفتاحية: الخروب *Ceratonia siliqua L*، الأوراق، البوليفينولات، سرطان مستقيم القولون، مضادات الأورام، الموت المبرمج، دورة الخلية.

Résumé

Ceratonia siliqua L. (Fabaceae), communément appelé « elkhroub » est un arbre très répandu dans les pays méditerranéens. Dans la présente étude, l'extrait polyphénolique des feuilles de *Ceratonia siliqua* est étudié: (i) screening phytochimique, (ii) activité antioxydante (iii) effets anticancéreux en utilisant des lignées de cellules du colon HCT-116, HT-29, SW-480 et CT-26, par la mesure de la viabilité des cellules par une chambre d'hémocytomètre ainsi que l'évaluation de la mort cellulaire par apoptose (activité de caspase -3 et -9 par western blot et cytométrie en flux) et la distribution de leur cycle cellulaire en utilisant un cytomètre en flux. L'effet anti-tumoral a été testé sur des souris Balb/c transplantées avec des cellules CT-26 en utilisant l'infusion des feuilles de caroube à la place de l'eau contrairement au lot témoin. L'analyse du profil phénolique par HPLC des extraits phénolique de feuilles de caroube a montré une teneur élevée d'acide gallique et d'acide *m*-coumarique.

Nous avons observé que CLP exerçait un effet cytotoxique dépendant de la dose par induction de l'apoptose sur les lignées cellulaires du CRC, avec un IC50 d'environ 20 µg/mL. CLP a induit une voie apoptotique intrinsèque à travers l'activation caspase-9 et le clivage PARP dans les cellules HCT-116 et CT-26. En outre, le CLP a induit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1 par l'activation de la p53 et en modulant l'expression des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (P27, CDK, cycline E et cycline A). L'acide gallique et *m*-coumarique semblent être les polyphénols actifs de CLP puisqu'ils miment légèrement l'activité de CLP induisant ainsi l'activité synergique entre les polyphénols. L'infusion de feuilles de caroube a réduit de façon intéressante la croissance de la tumeur CT-26 chez les souris Balb/c. Cette étude suggère CLP pourrait être utilisé dans la prévention du CRC.

Mots-clés: Caroube (*Ceratonia siliqua* L.), feuilles, polyphénols, cancer colorectal, anti-tumoral, apoptose, cycle cellulaire.

Abstract

Ceratonia siliqua L. (Fabaceae), commonly called "elkharoub" is a tree very common in Mediterranean countries. In this study, the polyphenolic extract *Ceratonia siliqua* leaves is studied for (i) phytochemical screening, (ii) antioxidant activity (iii) anti-cancer effects of colon cells HCT-116, HT-29, SW-480 and CT-26 by measuring cell viability by a hemocytometer chamber as well as evaluating cell death by apoptosis and the distribution of their cell cycle using a flow cytometer. The anti-tumor effect was tested on the Balb / c mice transplanted with the CT-26 cells using the infusion of carob leaves instead of the water on the contrary to the control group. HPLC analysis of the phenolic content of CLP showed a high amount of gallic acid and *m*-coumaric acid.

We observed that CLP had a dose-dependent cytotoxic effect by inducing apoptosis on CRC cell lines with an IC₅₀ of about 20µg/mL. CLP induced an intrinsic apoptotic pathway through caspase-9 activation and PARP cleavage in HCT-116 and CT-26 cells. Moreover, CLP induced cell cycle arrest in the G1 phase through p53 activation and modulating the expression of the proteins involved in the regulation of the cell cycle (P27, CDK, cyclin E and cyclin A). Individual compounds, gallic acid and *m*-coumaric acid, seem to be the active polyphenols of CLP since they slightly mimic the activity of CLP, signifying the existence of synergistic effect between polyphenols in CLP activity. Interestingly, the carob leaf infusion reduced CT-26 tumor growth in BALB/c mice. This study suggests CLP can be used in the prevention of CRC.

Keywords: Carob (*Ceratonia siliqua* L.), leaves, polyphenols, colorectal cancer, caspases, apoptosis, cell cycle.

Liste des abréviations

Apaf-1: Apoptotic Proteases Activating Factor 1.

CA: coumaric acid

CDK: Cyclin-dependant kinase.

CKI: Cyclin dependent Kinase Inhibitor.

CLP: carob leaf polyphenols (les polyphénols des feuilles de caroube)

CRC: colorectal cancer

CT-26: The murine colon tumor cell line

DMEM: Dulbecco modified eagle medium.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

DO: densité optique

DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl.

GA : gallic acid

HCT-116: The human colon carcinoma cell line

HT-29: human colon adenocarcinoma cell lines

IC50: concentration inhibitrice à 50%

PARP: Poly-ADP-ribose-polymérase.

PBS: Phosphate buffered saline.

SVF: Sérum de veau fœtal.

SW-480: Human colorectal carcinoma cell line

Liste des figures

Figure n°1 : Estimation du nombre globale des nouveaux cas des pays les plus développés (a) et les moins développés (b), en proportion pour les deux sexes confondus en 2012.....	7
Figure n°2 : Comparaison de la consommation alimentaire régionale dans le monde et la propagation mondiale du cancer colorectal, en fonction des données de Globocan 2008	8
Figure n°3 : Comparaison des caractéristiques morphologiques des cellules en apoptose et en nécrose.....	17
Figure n°4 : Les voies d'activation de l'apoptose.....	19
Figure n°5 : Schéma des points de régulation du cycle cellulaire	26
Figure n°6 : Classification des polyphénols (en haut) et structures des composés phénoliques non flavonoïques (en bas).....	37
Figure n°7: Arbre du caroubier, feuilles du caroubier.....	43
Figure n°8 : Principe de réduction du radical DPPH.....	52
Figure n°9 : Pics représentatifs des différents composants de l'extrait de polyphénols (a) et de l'infusion (b) de feuilles de caroube.....	63
Figure n°10 : (à gauche) courbe d'inhibition par le radical de piégeage de radicaux libre DPPH des polyphénols CLP, (à droite) photo montrant une gamme de couleurs du mauve foncé au jaune clair selon les concentrations des extraits de CLP et leur capacité à piéger le radical libre de DPPH.....	64
Figure n°11 : (à gauche) pouvoir réducteur des polyphénols totaux, flavonoïdes (Bu-OH) et (AcEt) DPPH des polyphénols CLP, (à droite) photo montrant une gamme de ce couleur du bleu-vert foncé au jaune clair selon les concentrations des extraits de CLP et leur capacité à piéger le radical libre de fer.....	65
Figure n°12 : Effets de CLP à différentes concentrations sur la viabilité cellulaire des cellules HCT-116, CT-26, HT-29 et SW-480.....	66
Figure n°13 : Observation au microscope de l'effet de CLP sur la viabilité cellulaire	67
Figure n°14 : Effet de CLP sur l'induction de l'apoptose des cellules HCT-116, CT-26, HT-29 et SW-480 (a) et (b). Test d'inhibiteurs de l'apoptose Z-vad sur les cellules HCT-116 et HT-29 (c).....	68-69

Figure n°15A : Analyse par western-blot : (en haut) des protéines p38 et p 53 dans les cellules HCT-116 et CT-26 traitées pendant 24h avec CLP 10 et 20 µg/mL ; (en bas) des caspases -9 clivées et PARP dans les cellules HCT-116 et CT-26 traitées pendant 24h avec CLP 10 et 20 µg/mL, ou GA (460 µM) pendant 24h.....	70
Figure n°15B : Activation des caspases 3/7 exprimée en pourcentage de FLICA caspase-3/7AAD positives dans les cellules HCT-116 et CT-26 traitées avec CLP à 10 ou 20 µg/mL	70
Figure n°16 : Effet de CLP sur l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire des cellules HCT-116 et CT-26 cells. (A) profil représentatif du cycle cellulaire des cellules HCT-116 et CT-26 traitées avec CLP 20 µg/mL pendant 24h. (B) analyses des phases G1, S and G2/M phases cycle cellulaires des cellules traitées CLP, 5FU, GA ou CA. (C) Analyses par Western blot des protéines p27, CDK2, cycline E et cycline A exprimées dans les cellules HCT-116 et CT-26 traitées avec CLP.....	72
Figure n°17 : (à gauche) Courbe de croissance des tumeurs transplantés aux souris Balb/c recevant ou non l'infusion comme traitement ; (à droite) photo de souris du lot contrôle (en haut) photos de souris traitées avec l'infusion de CLP (en bas).....	73

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Principaux facteurs affectant la biodisponibilité des polyphénols alimentaires chez l'homme.....	41
Tableau n°2 : Composition des gels de migration.....	58
Tableau n°3 : Composition phyto-chimique des feuilles de caroube.....	62
Tableau n°4 : Composition en acides phénoliques des feuilles de caroube.....	63

Table des Matières

Introduction.....	1
Synthèse Bibliographique	
Chapitre 1 : Cancer colorectal	4
1.1. Incidence du cancer colorectal.....	4
1.2. Cancer colorectal et environnement.....	5
1.3. Altérations génétiques et épigénétiques.....	11
1.4. L'obésité et le mode de vie.....	14
Chapitre 2 : Mort cellulaire : induction de l'apoptose, arrêt du cycle cellulaire	16
2.1. L'apoptose.....	16
2.2. Rôle physiologique de l'apoptose.....	16
2.3. Caractérisation morphologique et biochimique de l'apoptose.....	17
2.4. Les différentes voies de l'apoptose.....	18
2.4.1. La voie extrinsèque de l'apoptose.....	18
2.4.2. La voie intrinsèque de l'apoptose.....	19
2.5. Les différents acteurs de l'apoptose.....	20
2.5.1. Les récepteurs de mort.....	20
2.5.2. Les caspases.....	21
2.5.3. La famille de Bcl-2.....	22
2.6. Cycle cellulaire	23
2.6.1. Cycline-CDK et cancer	24
2.6.2. CKI.....	25
2.6.3. Thérapies ciblées par cycle cellulaire.....	25
2.6.4. La protéine p53	26
Chapitre 3 : Aliments, nutriments et cancer	23
3.1. Aliments pro-oncogènes	27
3.1.1. Viande rouge	27
3.1.2. Lipides et graisses saturées	28
3.1.3 L'Alcool	29
3.2. Aliments ou nutriments protecteurs contre le cancer colorectal	29
3.2.1. Polyphénols	29

3.2.2. Curcumine.....	30
3.2.3. Flavonoïdes	30
3.2.4. Autres composés phytochimiques.....	30
3.2.5. Le thé vert	31
3.2.6. Le café	31
3.2.7. Fibres alimentaires, fruits et légumes	31
3.2.8. Oméga 3 (n-3)	32
3.2.9. Acide folique / acide folique (vitamine B9).....	33
3.2.10. Calcium et vitamine D.....	33
3.2.11. Zinc.....	34
3.2.12. Sélénium.....	34
3.2.13. Microbiote intestinal.....	34
3.2.14. Mode de vie.....	35
Chapitre 4 : Polyphénols et activités biologiques	36
4.1. Les acides phénoliques	36
4.2. Les stilbènes	38
4.3. Les lignanes	38
4.4. Les flavonoïdes	39
4.5. Biodisponibilité des polyphénols	40
Problématique	42
Matériels et Méthodes	
1. Préparation du Matériel végétal.....	43
2. Analyses Physicochimiques.....	43
2.1. Détermination du pourcentage d'humidité.....	43
2.2. Détermination quantitative des métabolites primaires.....	44
2.2.1. Dosage des sucres totaux	44
2.2.2. Détermination de la teneur en lipides.....	45
2.2.4. Détermination de la teneur en fibres brutes	46
2.2.5. Détermination de la teneur en cendres.....	48
3. Dosage des métabolites secondaires et évaluation du pouvoir antioxydant.....	49
3.1. Extraction des composés phénoliques.....	49
3.2. Dosage colorimétrique des polyphénols totaux	49

3.3. Dosage colorimétrique des flavonoïdes	50
3.4. Extraction des tanins condensés.....	51
3.5. Evaluation du pouvoir antioxydant par le DPPH.....	52
3.6. Réduction du Fer : FRAP	53
4. Effet anti-cancéreux de l'extrait polyphénolique des feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i>	54
4.1. Culture cellulaire et traitements.....	54
4.2. Traitements CLP, GA, p-CA et 5-FU.....	54
4.3. Traitements avec les inhibiteurs.....	55
4.4. Mesure de la prolifération cellulaire et viabilité.....	55
4.5. Evaluation de l'apoptose par marquage Annexin V et 7AAD.....	55
4.6. Mesure de l'activité caspase-3/7.....	56
4.7. Western Blotting.....	56
4.7.1. Extraction des protéines.....	56
4.7.2. Migration et transfert.....	57
4.7.3. Immunoblotting et révélation.....	59
4.7.4. Stripping des membranes	59
4.8. Analyse du cycle cellulaire par Cytométrie en flux.....	60
4.9. Expérimentation animale.....	60
4.10. Analyse statistique.....	61
Résultats et Discussion	
Résultats	62
1. Métabolites primaires et secondaires.....	62
2 Teneur en Polyphénols et pouvoir antioxydant.....	62
3. Viabilité cellulaire.....	65
4. Test d'apoptose.....	65
5. Détection des protéines liées à l'apoptose.....	69
6. Détection de l'activité de caspase-3 et caspase-7	70
7. Cycle cellulaire.....	71
8. Croissance tumorale.....	73
Discussion	74
Conclusion	87

INTRODUCTION

Le cancer colorectal (CRC) se hisse parmi les trois principaux cancers les plus couramment diagnostiqués au monde, ce qui représente 8% de tous les décès liés au cancer annuellement. La maladie est traditionnellement un problème de santé majeur dans les pays industriels, mais les taux de CRC augmentent aussi dans les pays en développement qui connaissent une croissance économique (Bishehsari *et al.*, 2014).

Le développement du CRC est associé à plusieurs facteurs, y compris le mode de vie (consommation élevée d'alcool, viandes rouges, alimentation riche en graisses et pauvre en fibres, tabagisme, manque d'exercice physique), vieillissement, obésité, diabète, maladies intestinales inflammatoires, antécédents familiaux et certains syndromes génétiques (Afrin *et al.*, 2016). Des études épidémiologiques ont démontré que le développement sporadique du cancer du côlon est étroitement lié aux habitudes alimentaires et aux changements de mode de vie représentant environ 85% de tous les cas de CRC (Vasen *et al.*, 2015).

Cependant, l'incidence du CRC peut être considérablement réduite par une alimentation saine (Jia *et al.*, 2013; Vainio & Weiderpass, 2006) riche en fruits, légumes, grains et céréales contenant de nombreux composants, y compris les fibres alimentaires, les vitamines et les produits phyto-chimiques bioactifs qui affectent le développement du cancer (Derry *et al.*, 2013). À cet égard, l'identification de composés bioactifs naturels qui suppriment la prolifération cellulaire et / ou induit l'apoptose pourrait être une stratégie complémentaire et utile pour contrôler le développement et la progression du cancer du côlon (Martín *et al.*, 2016).

Actuellement, en plus des médicaments anti-tumoraux utilisés dans les schémas de chimiothérapie, il existe un intérêt croissant pour les composés bioactifs dérivés des plantes qui pourraient jouer un rôle dans la gestion ou la prévention du cancer ou l'amélioration de la sensibilité à la chimiothérapie (Stoner & Mukhtar, 1995). Le rôle crucial de la sélectivité dans la chimiothérapie du cancer peut être trouvé dans le ciblage pharmacologique des molécules naturelles en évitant la cytotoxicité contre les cellules normales (Martin *et al.*, 2013).

En effet, les preuves provenant d'études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la consommation alimentaire riche en polyphénols est associée à un risque moindre pour les maladies cardiovasculaires et les cancers ([Blumberg et al., 2013](#); [Pappas & Schaich, 2009](#)).

Parmi les plantes médicinales riches en molécules ayant un potentiel thérapeutique prometteur s'impose *Ceratonia siliqua* L. C'est une plante des pays méditerranéens, très utilisées en agro-alimentaire et en médecine traditionnelle.

Les activités anti-tumorales et anti-prolifératives de l'extrait de pulpe de caroube ont été largement étudiées ([Klenow et al., 2008](#)) et ([Klenow & Gleib, 2009](#)). Cependant, peu de travaux ont porté sur l'effet inhibiteur des polyphénols de feuilles de caroube (CLP) sur le cancer colorectal. Dans cette optique, la présente étude a été menée afin d'étudier l'activité anti-tumorale du CLP et pour caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels CLP a exercé son effet apoptotique et la phase d'arrêt du cycle cellulaire dans des lignées cellulaires cancéreuses du côlon.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons évalué les activités antioxydante, anticancéreuse et chimio-préventive, de l'extrait de polyphénols des feuilles de *Ceratonia siliqua* L. Pour ce faire, l'activité antioxydante de cet extrait a été évaluée par les tests de DPPH et FRAP.

Par la suite, le mécanisme d'action de l'effet anticancéreux de cet extrait a été étudié en utilisant des lignées de cellules cancéreuses du côlon dont 03 étaient d'origine humaine (HCT-116, HT29 et SW-480) et une lignée d'origine murine (CT-26). Plusieurs tests ont été utilisés afin d'évaluer l'effet anticancéreux et préventif de l'extrait de *Ceratonia siliqua* L., en déterminant la DL50 par le test de viabilité, passant par la cytométrie en flux pour évaluer l'apoptose précoce et tardive ; ainsi que la phase d'arrêt du cycle cellulaire. Par la suite, la révélation par western blot a permis de détecter quelques protéines impliquées dans la cascade apoptotique à savoir la caspase-9, les protéines PARP, P-p53 et P-p38 MAPK. Enfin, l'effet anti-tumoral a été testé sur des souris Balb/c transplantées avec des cellules CT-26 en utilisant l'infusion des feuilles de caroube à la place de l'eau contrairement au lot témoin.

Dans le présent manuscrit, nous commencerons par faire une synthèse bibliographique, présentant le cancer colorectal d'un point de vue général, sa fréquence, son étiologie et la relation paradoxale entre aliments et cancer, nous poursuivrons en décrivant la mort cellulaire et les mécanismes moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose. Enfin, nous passerons en revue les travaux faits sur les polyphénols et leurs effets sur le cancer du côlon plus particulièrement, nous développerons les effets thérapeutiques et préventifs des polyphénols de feuilles de *Ceratonia siliqua* L.

Les parties matériels et méthodes, résultats et discussion, seront présentées respectivement dans les chapitres suivants.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale et nous présenterons des perspectives à notre travail.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Cancer colorectal

On attribue aux cancers « une origine clonale », à partir d'une seule cellule somatique, dont les mécanismes régulateurs de la croissance, de la différenciation, et de la prolifération ont été gravement perturbés. De plus, les caractères nouveaux acquis sont transmis à la descendance cellulaire. Alors, les cellules tumorales n'obéissent plus aux mécanismes de contrôle d'une croissance normale chez l'hôte ([Prescott et al., 1982](#)).

Selon Larousse médicale, le cancer est une maladie qui a pour mécanisme une prolifération cellulaire anarchique, incontrôlée et incessante. Cette prolifération anarchique du cancer s'oppose à la prolifération contrôlée, harmonieuse et le plus souvent intermittente qui caractérise les tissus normaux ; et qui n'a lieu que pour réparer les pertes cellulaires accidentelles par plaie ou agression et les pertes naturelles par le vieillissement.

Le terme cancer recouvre un vaste ensemble de maladies, cataloguées selon les cellules et les tissus à partir desquels les cancers se forment. La tumeur développée dans un organe (tumeur primitive) va se greffer à distance sur d'autres organes (cerveau, poumon, foie, etc.), en passant par les voies lymphatiques ou sanguines. Ces tumeurs secondaires qui reproduisent la structure de la tumeur mère, s'appellent des métastases.

1.1. Incidence du cancer colorectal

Le cancer est l'une des causes majeures de décès dans le monde. Effectivement en 2012, plus de 14,1 millions de nouveaux cas de CRC et 8,2 millions de décès sont survenus à travers le monde. Le CRC se positionne au 3^{ème} rang des cancers les plus couramment diagnostiqués (1,36 million) précédé par le cancer du sein (1,67 million) et des poumons (1,82 million). Par ailleurs, c'est la 4^{ème} cause de mortalité par cancer avec 694 000 décès (Fig. 1) après les cancers du poumon, du foie, de l'estomac avec respectivement 1600, 745, 723 mille décès en 2012 ([Ferlay et al., 2015](#)).

En Algérie, la mortalité par le CRC est classée deuxième chez les hommes 1005 décès par an (soit 9,3%) après le cancer du poumon, de même pour les femmes avec 1001 décès par an après le cancer du sein (soit 9,2%).

Le taux de CRC varie selon les régions; les taux étaient traditionnellement plus élevés dans les pays développés et industriels, alors que les pays moins développés avaient des taux plus bas. Néanmoins, l'incidence du CRC augmente considérablement dans de nombreux pays en développement. Les taux en Europe de l'Est, qui ont récemment subi une transition économique majeure, ont déjà atteint ou dépassé ceux des pays occidentaux industriels ([Center et al., 2009](#)).

De même, les rapports des régions de l'Asie de l'Est, tels que Hong Kong, Taiwan, la Chine urbaine, Singapour et la Thaïlande, indiquent une augmentation rapide de l'incidence du CRC, proche des taux déclarés dans les populations occidentales ([Sung et al., 2005](#) ; [Khuhaprema & Srivatanakul, 2008](#)).

De même, une augmentation de l'incidence du CRC a également été observée dans les pays d'Asie occidentale qui ont été historiquement considérés comme ayant des taux très bas de la maladie. Par exemple, des études épidémiologiques en Iran ont montré que le taux du CRC, bien que toujours relativement faible, a considérablement augmenté au cours des trois dernières décennies ([Malekzadeh et al., 2009](#)).

Par conséquent, [Karsa et al. \(2010\)](#) prévoyait que l'incidence du CRC augmenterait de façon spectaculaire au cours de la prochaine décennie, en s'appuyant sur un doublement des taux, la plupart des nouveaux cas se produiraient dans les pays en développement.

1.2. Cancer colorectal et environnement

L'accroissement du CRC dans les pays en développement est attribuée aux changements environnementaux, provoqués par la transition économique ([Center et al., 2009](#)).

Les facteurs environnementaux, tels que les régimes alimentaires, le tabagisme et la forte consommation d'alcool, sont considérés comme affectant le risque de CRC ([Bishehsari, 2013](#)). L'effet de l'habitude et du style de vie sur le CRC a été souligné par les études de migration, qui démontrent une augmentation des taux du CRC dans les groupes ethniques initialement à faible risque lorsqu'ils ont migré vers des zones à haut risque ([Dunn et al., 1975](#); [McMichael & Giles, 1998](#); [Yavari et al., 2006](#)).

Un mode de vie sédentaire et un régime "occidental", riche en matières grasses et en viande et généralement pauvres en fibres et céréales non raffinées, font partie des principales causes qui augmenteraient l'incidence du CRC ([Tseng & DeVillis, 2000](#); [Wiseman, 2008](#)).

Une diminution de l'activité physique et une tendance à la consommation d'un régime plus occidental ont été présentées de façon omniprésente dans les pays d'Asie centrale et occidentale et d'Afrique du Nord ([Malekzadeh et al., 2009](#); [Kelishadi et al., 2013](#)).

Un changement similaire dans le mode de vie et les habitudes alimentaires s'est produit dans les pays d'Europe de l'Est lors de la transition des économies de marchés prévus aux marchés ouverts, ce qui a entraîné une augmentation de la disponibilité des aliments, la consommation de produits raffinés et l'augmentation de l'obésité ([Center et al., 2009](#)).

De même, dans les pays d'Asie de l'Est, les changements alimentaires et l'obésité ont précédé l'augmentation de l'incidence du CRC ([Minami et al., 2006](#) ; [Matsushita et al., 2008](#) ; [Zhang et al., 2012](#)). L'obésité et le syndrome métabolique, caractérisés par l'intolérance au glucose et la dyslipidémie, se sont révélés être associés à un risque plus élevé d'adénomes du côlon du CRC. La hausse des taux d'obésité et le syndrome métabolique est de plus en plus signalée dans les pays en développement, suite à l'amélioration du statut économique et l'urbanisation rapide ([Misra & Khurana, 2008](#) ; [Kelishadi, 2007](#)).

Un rôle prépondérant de l'environnement et le régime sur le risque de CRC est également suggéré par la structure par âge de la maladie dans les pays en transition épidémiologique. Ces pays sont généralement témoins d'une proportion plus élevée de jeunes cas de CRC, alors que les taux sont relativement faibles chez les personnes âgées. L'incidence du CRC qui est plus élevée dans les sous-groupes les plus jeunes de ces populations, suggère une modification récente des facteurs de risque environnementaux qui ont touché les individus qui ont partagé ces expositions pendant l'enfance et l'adolescence ([Ansari et al., 2006](#)). L'association proposée de profil alimentaire et du CRC est décrite dans la *fig. 2*, qui compare le modèle de la consommation alimentaire régionale dans le monde, tel que rapporté par l'OMS, avec la diffusion mondiale du CRC, en fonction des données de [Globocan 2008](#).

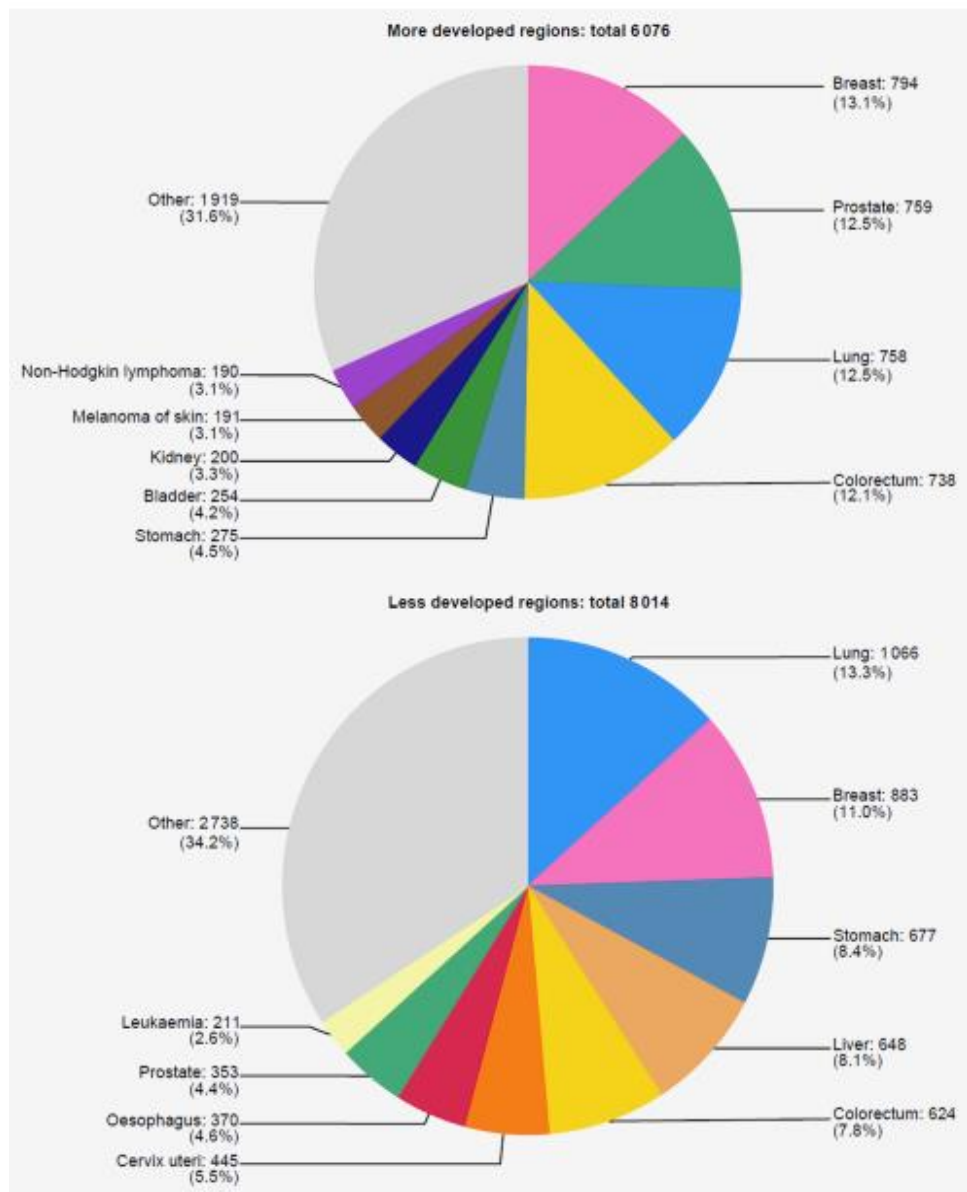
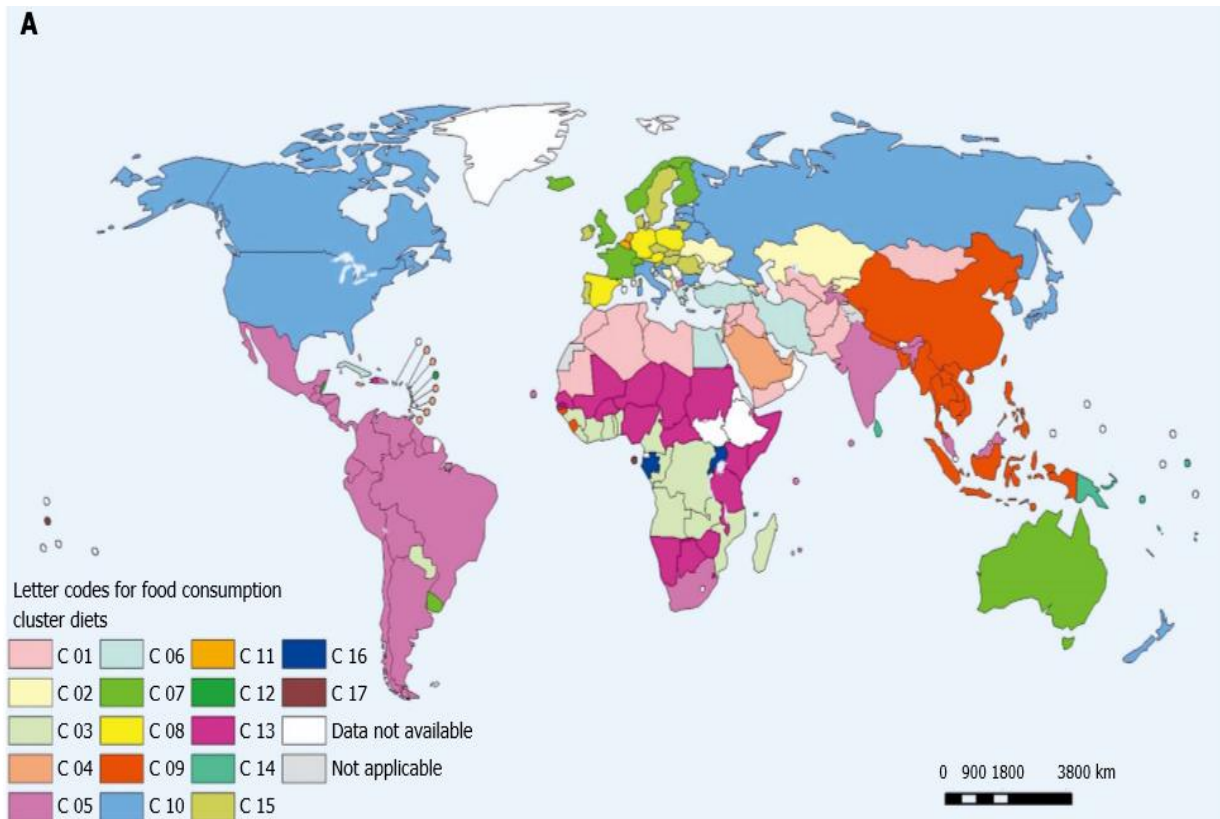
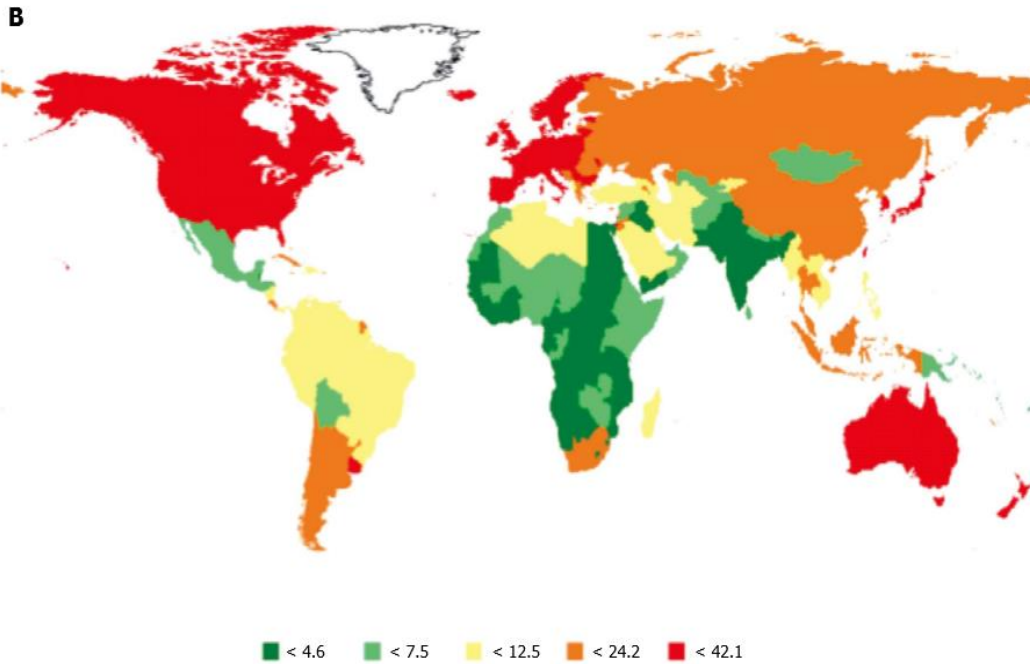


Figure 1. Estimation du nombre globale des nouveaux cas des pays les plus développés (a) et les moins développés (b), en proportion pour les deux sexes confondus en 2012. (Ferlay *et al.*, 2015).

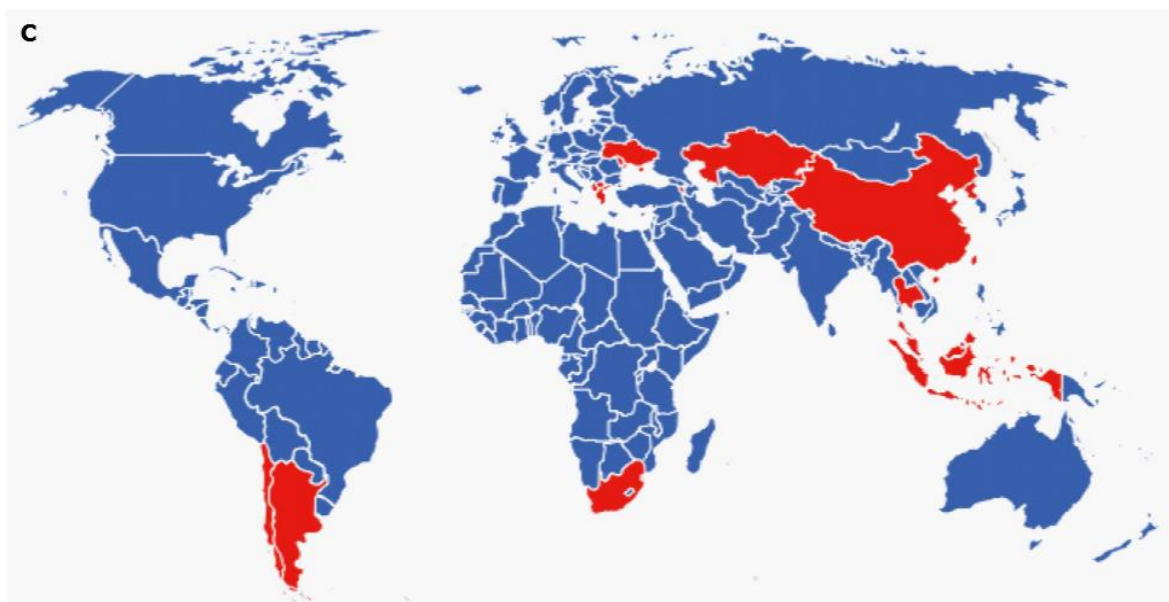


A: Analyse globale de grappes basée sur 62 aliments marquants provenant des données sur l'approvisionnement alimentaire 2002-2007, reproduit avec la permission de l'Organisation Mondiale de la Santé GEMS / Food dieting analysis 2012 (détails à <http://www.who.int/foodsafety/chem/gems/en/index1.html>). L'analyse a défini 17 grappes de régime représentant 179 pays pour lesquels des données sur l'approvisionnement alimentaire étaient disponibles. Ici, nous mettons en évidence deux grands groupes alimentaires basés sur la consommation de viande et de graisse, les principaux facteurs de risque du cancer colorectal (CRC). Les grappes G7, 8, 10, 11 et 15 sont dans le groupe des matières grasses élevées, caractérisées par la prédominance de la consommation de viande de mammifères (tous > 108 g / j) et une consommation élevée de graisse totale (tous > 73 g / j). Le faible groupe viande-graisse se compose de grappes avec une consommation inférieure de viande de mammifères (tous < 80 g / j) et une consommation globale plus faible de graisse (tous < 51 g / j). Il est intéressant de noter que d'autres facteurs alimentaires à haut risque pour le CRC, tels que l'apport global total élevé (> 2000 g / j) et la consommation totale d'alcool (> 200 g / j) sont également associés au groupe de régime à base de graisse de viande. Le groupe faible en graisse de viande a généralement une consommation totale plus faible (sauf le groupe G2) et une consommation d'alcool totale plus faible (sauf le groupe G16). Le profil alimentaire dans le groupe à faible teneur en viande est plus hétérogène, avec des apports variables d'autres aliments, comme les fruits, les légumes et les céréales;

Figure 2. Comparaison de la consommation alimentaire régionale dans le monde et la propagation mondiale du cancer colorectal, en fonction des données de Globocan 2008.



B: taux d'incidence normalisés par âge du CRC (ASR) pour 100000 individus par région géographique, extrait de Globocan 2008 (Ferlay *et al.*, 2010). Ici, nous définissons des régions avec ASR age-standardized incidence rates (ASR) de ≥ 24.2 à haut débit (rouge et orange), et les régions avec ASR < 24.2 (vert clair, vert foncé et jaune) comme faible taux;



C: Correspondance visuelle des taux régionaux de CRC et des schémas alimentaires, en fonction des groupes définis ci-dessus. La correspondance se produit lorsqu'une région à forte teneur en viande-graisse ait un taux élevé pour le CRC, ou lorsqu'une région à régime faible en matière grasse-viande est à faible taux de CRC. Les régions où les taux de CRC correspondent à un schéma alimentaire sont en bleu, celles où elles ne correspondent pas en rouge (c.-à-d. Régions de CRC à taux élevé avec un régime à faible teneur en viande ou des régions de CRC à faible taux avec un régime à forte teneur en viande).

Il existe une concordance dans la plupart des régions du monde entre le régime alimentaire, principalement classé par la portion de viande et de graisse animale dans les aliments consommés, et le taux de CRC. La plupart des cas de CRC sont considérés comme sporadiques, et seule une faible proportion est due à des syndromes génétiques connus. Cela souligne un rôle important de l'environnement dans le développement du CRC (**Migliore et al., 2011**). Cependant, les facteurs génétiques peuvent modifier les effets de l'environnement dans la prédisposition à la maladie. Ceci est suggéré par le risque inégal du CRC dans différents groupes ethniques dans la même région. Par exemple, bien que l'incidence du CRC augmente dans tous les groupes ethniques à Singapour et chez les malais, les taux sont plus élevés chez les individus chinois et malais (**Center et al., 2009 ; Wang et al., 2004**). Les disparités dans les taux de CRC sont également observées entre la population juive et la population arabe en Israël (**Fireman et al., 2001**).

En plus des facteurs génétiques encore inconnus, les expositions environnementales liées à l'origine ethnique pourraient contribuer aux différences entre les taux de CRC entre groupes ethniques distincts dans une même région ou pays géographique. Malgré la corrélation globale entre le CRC et le régime alimentaire mis en évidence par les preuves épidémiologiques, les résultats des études de cas-témoins et de cohorte ont été controversés (**Bishehsari, 2013**). De nombreux examens et méta-analyses ont été menés afin de tester l'association de composés diététiques simples et le risque du CRC. Le fond mondial de la recherche sur le cancer a conclu que, en plus de l'obésité et du manque d'exercice, il existe des preuves convaincantes d'une consommation élevée de viande pour affecter le risque du CRC (**Wiseman, 2008**).

Les disparités entre les études alimentaires peuvent refléter en partie le fait que l'effet de chaque composant alimentaire est confondu par d'autres composants dans les aliments (**Hu, 2002**).

À cet égard, les associations entre les formes alimentaires et les maladies peuvent être obtenues en appliquant une approche analytique globale, telle que les analyses de grappes et de facteurs, pour classer les individus en grappes ayant une similarité mondiale dans les habitudes alimentaires (**Jacobs & Steffen, 2003 ; Slattery, 2008**). En appliquant cette approche à une grande cohorte prospective, **Kesse et al., 2006** ont constaté un risque accru d'adénomes et d'adénomes à haut risque avec l'alimentation occidentale, riches en graisses, produits animaux et snacks et peu nourrissants d'origine

végétale. Le risque du CRC le plus élevé a été observé chez le groupe à forte consommation de viande. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres chercheurs ([Flood et al., 2008](#)). Les effets directs ou indirects des facteurs diététiques sur la tumorigénie colique et intestinale ont également été démontrés dans les études en laboratoire et chez les animaux ([Lund et al., 2011](#)). Dans l'ensemble, ces études appuient la forte influence de l'environnement, y compris le régime, sur la prédisposition au CRC.

1.3. Altérations génétiques et épigénétiques

Les altérations moléculaires qui sous-tendent le développement du CRC ont été largement étudiées au cours des deux dernières décennies. Notre compréhension actuelle du CRC à l'échelle moléculaire provient principalement d'études menées sur des tumeurs provenant de populations occidentales. Les tumeurs des pays en développement n'ont pas été analysées de manière approfondie, mais les données disponibles montrent que les principales voies moléculaires correspondent à celles impliquées dans le CRC «occidental». Néanmoins, le large spectre des mutations semble souvent distinctif, reflétant différents facteurs environnementaux et/ou génétiques ([Chan et al., 2005](#)).

[Bishehsari et al. \(2006\)](#) ont montré que les CRC en Iran, en tant que ceux provenant de zones à haut risque, portent des altérations génétiques dans des gènes majeurs tels que le K-RAS et le p53, mais les mutations sont tout à fait distincts et pourraient être liés à différentes expositions environnementales. Des résultats similaires ont été signalés dans d'autres pays qui sont en transition épidémiologique, mais ont encore une incidence du CRC relativement faible ([Al-Allawi et al., 2012](#) ; [Nieminen et al., 2012](#)). Comme cela a été décrit précédemment, plusieurs éléments appuient le rôle des facteurs environnementaux, tels que le régime, sur le CRC, mais les relations entre les facteurs de risques alimentaires et les modifications génétiques sont encore incomplètement comprises.

En outre, les altérations épigénétiques essentielles au processus d'empreinte génomique, telles que les modifications des histones et la méthylation de l'ADN ; ainsi que les modifications des ARN non codants, impliquées principalement dans la régulation post-transcriptionnelle, peuvent affecter les modèles d'expression des gènes

indépendants ou combinaison avec des changements héréditaires ou somatiques dans la séquence d'ADN.

La méthylation de l'ADN, c'est-à-dire la conversion de la cytosine en 5-méthylcytosine, se produit normalement à des dinucléotides CpG isolés, tandis que les régions enrichies en CpG, appelées îles CpG, principalement situées près des promoteurs de gènes, sont généralement hypométhylées (Curtin *et al.*, 2011). La méthylation anormale des îlots de CpG peut désactiver l'expression des gènes conduisant à une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur dans le processus de carcinogenèse (Curtin *et al.*, 2011).

Par exemple, l'hyperméthylation de MLH1 (un gène majeur de répartition par correspondance) représente plus de 60% des CRC insaturés par microsatellites non héréditaires et peut être trouvée dans plus d'un cinquième de tous les cas de CRC (Kuismanen *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2013). La méthylation d'autres gènes impliqués dans le CRC, tels que APC, MGMT, GATA-4 et GATA-5, et FXR ont également été décrits (Kim *et al.*, 2010 ; Sayin *et al.*, 2013).

D'autre part, l'instabilité génétique pourrait également être causée par l'hypométhylation génomique globale (Kim *et al.*, 2011). Des études ont identifié le nombre de différents gènes hypométhylés dans le CRC, tels que CARD 14, CCDC116, TIAM1 et MAEL, qui peuvent avoir divers effets sur la signalisation, par exemple par le facteur nucléaire kappa B (NF-kB) ou par d'autres cellules qui ont des fonctions pertinentes pour la carcinogenèse du CRC comprenant l'adhésion cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, la migration cellulaire et la différenciation (Schnekenburger & Diederich, 2012).

Ces altérations épigénétiques peuvent être fortement affectées par les habitudes alimentaires, car plusieurs composants alimentaires peuvent modifier le profil de méthylation du génome. Les polyphénols, abondants dans le thé vert, favorisent la déméthylation et peuvent réactiver des gènes suppresseurs de tumeurs qui ont été inactivés par la méthylation du promoteur (Yang *et al.*, 2008). Les effets sur le motif de méthylation ont également été signalés pour d'autres composés naturels potentiellement protecteurs, tels que la quercétine, l'acide folique et le sélénium (Tan *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2008 ; Zeng *et al.*, 2011).

L'hyperméthylation peut également affecter l'expression des MicroARN (miARN). Les MiRNAs sont des ARN non codants courts d'environ 19 à 28 nucléotides qui affectent

l'expression des gènes et / ou la traduction de l'ARNm en liant les régions non traduites des gènes cibles (Lao & Grady, 2011).

De nombreux miARN ciblant les voies de suppresseurs de tumeur et oncogènes se sont révélés être modifiés dans le CRC (Rossi *et al.*, 2012) de même, il a été constaté que leur expression peut être affectée par le régime alimentaire (Zhu *et al.*, 2011 ; Parasramka *et al.*, 2012). Les régimes à risque élevé semblent provoquer une régulation négative des miARN suppresseurs de tumeur et une progression du CRC (Zhu *et al.*, 2011). La diminution du processus de tumorigénèse lors de l'utilisation de facteurs diététiques qui sont généralement considérés comme abaissant le risque de CRC, a été associée à la normalisation du modèle d'ARNm dérégulé (Parasramka *et al.*, 2012 ; Davidson *et al.*, 2009).

Par exemple, on a constaté que le niveau de la famille d'ARNm let-7 augmentait avec la consommation végétale de légumes dans des tumeurs de côlon de rat (induites par une amine hétérocyclique à partir de viande cuite) conduisant à la normalisation des protéines liées au cancer, telles que c-myc et p53 (Parasramka *et al.*, 2012). La modification des histones est un autre mode d'altération épigénétique qui affecte l'expression des gènes en régulant la structure et l'activité de la chromatine (Bannister & Kouzarides, 2011). L'acétylation et la méthylation des histones, entre autres modifications, modulent le modèle d'expression génique lors de la différenciation cellulaire, et peuvent entraîner l'activation d'oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur dans le CRC (Bannister & Kouzarides, 2011).

Les expériences, *in vitro* et *in vivo*, ont proposé une modification de l'histone, par exemple, l'inhibition des histones désacétylases et l'hyperacétylation des histones, en tant que mécanisme impliqué dans l'effet anti-cancérogène de certains composants alimentaires tels que les acides gras à chaîne courte, l'ail, les métabolites végétaux et autres composés organiques (Lu *et al.*, 2008; Dashwood & Ho, 2007 ; Scharlau *et al.*, 2009 ; Nian *et al.*, 2009).

Certains de ces composants alimentaires agissent par des récepteurs nucléaires, qui peuvent être une cible de stratégies thérapeutiques ou préventives pour le CRC (voir chapitre aliment, nutriments et cancer).

Les altérations épigénétiques peuvent également être cibles d'autres facteurs de risque environnementaux (Biliński *et al.*, 2012). D'autres mécanismes suggérés pour méditer

l'effet du régime alimentaire sur le CRC comprennent les effets cytotoxiques et mutagènes des métabolites alimentaires ou leurs sous-produits sur l'épithélium colorectal. D'autre part, les métabolites alimentaires peuvent contribuer à la carcinogenèse du CRC par le stress oxydatif, la régulation immunitaire et les altérations dans le milieu inflammatoire de la muqueuse (Ferguson *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2011 ; Barone *et al.*, 2012).

La réactivité à l'environnement, en particulier le régime alimentaire, et la réversibilité potentielle, a fait de l'épigénétique une cible prometteuse pour les interventions alimentaires dans la chimioprévention du CRC (Schnekenburger & Diederich, 2012; Gingras & Béliveau, 2011). Pour atteindre cet objectif, les aberrations épigénétiques qui se produisent au début de la maladie et qui sont modifiables par les agents alimentaires doivent être mieux caractérisées (Verma, 2012).

En outre, il est prédit qu'une contribution majeure à la chimio-prévention du CRC, découlera d'interventions pharmacologiques, ciblant les récepteurs nucléaires qui contrôlent les voies métaboliques impliquées dans la prolifération et la différenciation des entérocytes normaux et dans la tumorigénèse du CRC.

1.4. L'obésité et le mode de vie

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'obésité et un mode de vie sédentaire sont associés à un risque accru de CRC. Plusieurs voies moléculaires ont été liées aux effets de l'obésité et de l'inactivité physique sur le CRC.

L'hyper-insulinémie, conséquence d'une augmentation de l'apport calorique, induit un facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) -I, ce qui peut favoriser la croissance cellulaire et inhiber l'apoptose (Becker *et al.*, 2009). La voie de l'insuline qui favorise la prolifération des lésions pré-néoplasiques de souris ApcMin/+, est régulée à la hausse dans le tissu du CRC humain et est associée à un comportement tumoral agressif et à une métastase (Fenton *et al.*, 2005 ; Giovannucci, 2007 ; Esposito *et al.*, 2012). L'insuline peut également induire des hormones stéroïdes impliquées dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Moschos & Mantzoros, 2002). Les facteurs de croissance des polypeptides et les cytokines libérés à partir des tissus adipeux, connus sous le nom d'adipokines, ont des niveaux anormaux dans l'obésité, en raison de la régulation systémique de la signalisation insuline / IGF-I, des hormones stéroïdiennes et des

médiateurs inflammatoires (Maury & Brichard, 2010 ; de Heredia *et al.*, 2012 ; Bardou *et al.*, 2013 ; Vongsuvan *et al.*, 2013). Le niveau élevé de leptine et le faible niveau d'adiponectine ont été associés au CRC dans les modèles de souris (Endo *et al.*, 2011 ; Padidar *et al.*, 2011 ; Moon *et al.*, 2013).

Dans l'état physiologique, les actions prolifératives, de survie et pro-invasives de la leptine, *via* des voies telles que PI3-kinase/AKT et JAK-STAT, sont compensées par les effets antiprolifératifs et antiangiogènes de l'adiponectine (Barb *et al.*, 2007 ; Shehzad *et al.*, 2012 ; Vansaun, 2013 ; Uddin *et al.*, 2014).

Par ailleurs, l'obésité est associée à une inflammation chronique de bas grade (Yehuda-Shnaidman & Schwartz, 2012). Une littérature croissante appuie le rôle de l'inflammation chronique dans la promotion du CRC (Terzić *et al.*, 2010; Moossavi & Bishehsari, 2012). L'état pro-inflammatoire de l'obésité est caractérisé par une libération non-régulée de cytokines inflammatoires pro-tumorigènes, telles que l'IL-6 et IL-17, à partir d'adipocytes et de macrophages associés, ainsi que par une modification de la composition immunitaire de la muqueuse (Gil *et al.*, 2007 ; Federico *et al.*, 2010). D'autres facteurs de style de vie, tels que le tabagisme chronique et la consommation d'alcool, contribuent à l'inflammation pro-carcinogène (Oyesanmi *et al.*, 2010; Biliński *et al.*, 2012 ; Chu *et al.*, 2013).

Le tabagisme, en plus de l'induction de l'inflammation et des altérations épigénétiques et génétiques, peut affecter d'autres voies menant au CRC. Le stress oxydatif lié au tabac, résultant des niveaux accrus d'espèces d'oxygène réactif (ROS), et des métabolites de la fumée tels que les nitrosamines, par des effets sur les récepteurs de la signalisation de la nicotine, peut conduire à une régulation ascendante de la signalisation MAPK, de l'activation de COX2 et de la métalloprotéinase matricielle (MMP). Aussi, la formation accélérée adduit d'ADN active la réparation d'excision de base (BER) (Hecht *et al.* 1999; Ye *et al.*, 2005 ; Lodovici & Bigagli, 2009 ; Chu *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la consommation excessive d'alcool chronique peut accélérer l'initiation et la progression du CRC à travers de multiples mécanismes cellulaires, y compris l'inflammation et l'épigénétique, comme discuté précédemment. De même, une augmentation de la génération de ROS et de l'oxydase de NADPH, associée à des déficiences vitaminiques liées à l'alcoolisme (Bs et A), peut affecter les propriétés apoptotiques (Ex. PI3K / AKT), prolifératives (Ex. ERK1 / 2) et les voies métastatiques (Ex. VEGF et MMP) (Oyesanmi *et al.*, 2010 ; Forsyth *et al.*, 2010 ; Haas *et al.*, 2012).

Chapitre 2 : Mort cellulaire : induction de l'apoptose, arrêt du cycle cellulaire

2.1. L'apoptose

En 1972, les travaux de Kerr ont défini deux types de mort cellulaire. Le premier, appelé nécrose, se caractérise par une augmentation rapide du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et mitochondriale, et le relargage du contenu lysosomal dans l'environnement intercellulaire. Ce processus provoque aussi une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant. Le second, connu sous le nom d'apoptose, est défini comme une mort cellulaire programmée. Ce mécanisme requiert des signaux cellulaires spécifiques qui permettent à la cellule de contrôler sa propre destruction de manière non inflammatoire ([Kerr, 1972](#)).

2.2. Rôle physiologique de l'apoptose

L'apoptose est impliquée dans de nombreux processus physiologiques. Elle permet notamment l'élimination des cellules surnuméraires lors de l'embryogénèse ainsi que le renouvellement tissulaire et cellulaire. Lors du développement du système immunitaire, l'apoptose joue un rôle dans la sélection lymphocytaire, puisqu'elle permet de supprimer des lymphocytes T et B auto-immuns. Ainsi, la présence d'anomalies au sein des voies de signalisation apoptotiques peut induire des pathologies bénignes ou malignes. De même, un excès d'apoptose peut être impliqué dans certaines maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer, ou dans certains déficits immunitaires comme le SIDA ([Ameisen *et al.*, 1995](#) ; [Cotman & Anderson, 1995](#)).

A l'inverse, un défaut d'apoptose peut favoriser l'émergence de maladies auto-immunes ou de cancers. En effet, les cellules tumorales présentent fréquemment des défauts au sein des voies apoptotiques, ce qui favorise leur prolifération et peut leur conférer une résistance aux traitements par chimiothérapie ([Golstein *et al.*, 1999](#) ; [Williams, 1991](#)).

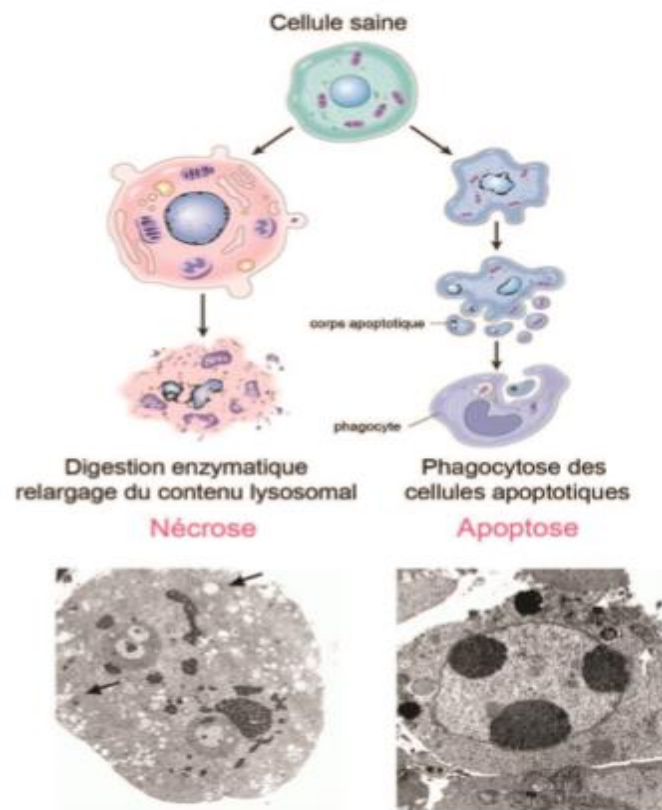


Figure 3. Comparaison des caractéristiques morphologiques des cellules en apoptose et en nécrose (Kroemer *et al.*, 2005)

2.3. Caractérisation morphologique et biochimique de l'apoptose

D'un point de vue morphologique, l'apoptose est caractérisée par une condensation du cytoplasme, accompagnée d'une diminution du volume cellulaire. On observe également, lors de ce processus, une condensation de la chromatine ainsi qu'une fragmentation du noyau.

Les fragments de noyau et les organites intacts sont progressivement inclus dans des vésicules, ces dernières bourgeonnent à partir de la membrane plasmique, puis sont expulsés sous forme de corps apoptotiques. Ces vésicules vont ensuite être phagocytées par les macrophages circulants (Kerr, 2002).

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altération biochimiques spécifiques ; les mitochondries des cellules apoptotiques vont subir de nombreuses modifications, telles qu'une diminution de leur potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) et une modification de leur perméabilité (Marchetti *et al.*, 1996 ;

Zamzami et al., 1996), ce qui favorise le relargage du cytochrome c de l'espace inter-membranaire vers le cytoplasme (**Kluck et al., 1997 ; Yang et al. 1997**).

L'apoptose est également caractérisée par la perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique. Ainsi, les phosphatidyl-sérines (PS), phospholipides anioniques présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules saines, vont se déplacer dans le feuillet externe et être externalisés à la surface cellulaire. Ce mécanisme permet la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages et leur élimination par phagocytose (**Fadok et al., 1992**).

D'un point de vue biochimique l'apoptose est associée à l'activation de protéases spécifiques, les caspases, et à la fragmentation inter-nucléosomique de l'ADN (**Wyllie et al., 1981 ; Zakeri et al., 1993**).

L'apoptose est un processus rapide qui requiert de l'énergie et dépend de la transcription de gènes codant des protéines pro-apoptotiques (**Leist et al., 1997**). Elle peut être induite par deux grandes voies de signalisation. La première, dite extrinsèque, est déclenchée par la liaison de ligands aux récepteurs de mort présents à la surface des cellules. La deuxième, dite intrinsèque ou voie mitochondriale, est activée par une altération de certains organites tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique (RE) ou le noyau.

2.4. Les différentes voies de l'apoptose

2.4.1. La voie extrinsèque de l'apoptose

Cette voie est initiée par la fixation d'un ligand extracellulaire sur son récepteur à domaine de mort, situé à la surface de la membrane plasmique. Ces derniers appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor Receptor) et possèdent un motif intracellulaire très conservé, d'environ 80 acides aminés, nommé « domaine de mort » (death domain). Ce motif est nécessaire à l'activation du processus de mort cellulaire en réponse à l'engagement du récepteur.

La liaison du ligand à son récepteur entraîne la trimérisation de celui-ci et le recrutement de molécules adaptatrices comme FADD (Fas-Associated Protein with Death Domain) ou TRADD (TNFR Associated Death Domain protein) qui vont elles-mêmes recruter les caspases initiateuses de l'apoptose, formant ainsi un complexe

oligomérique appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Kischkel *et al.*, 1995 ; Peter & Krammer, 2003).

La formation de ce complexe permet l'activation des caspases initiateuses de l'apoptose, notamment la caspase-8, qui va induire, à son tour, le clivage et l'activation des caspases dites « effectrices » de l'apoptose comme la caspase-3. L'activation de ces protéases entraîne le clivage de différents substrats aboutissant à la mort cellulaire (Nagata, 1999).

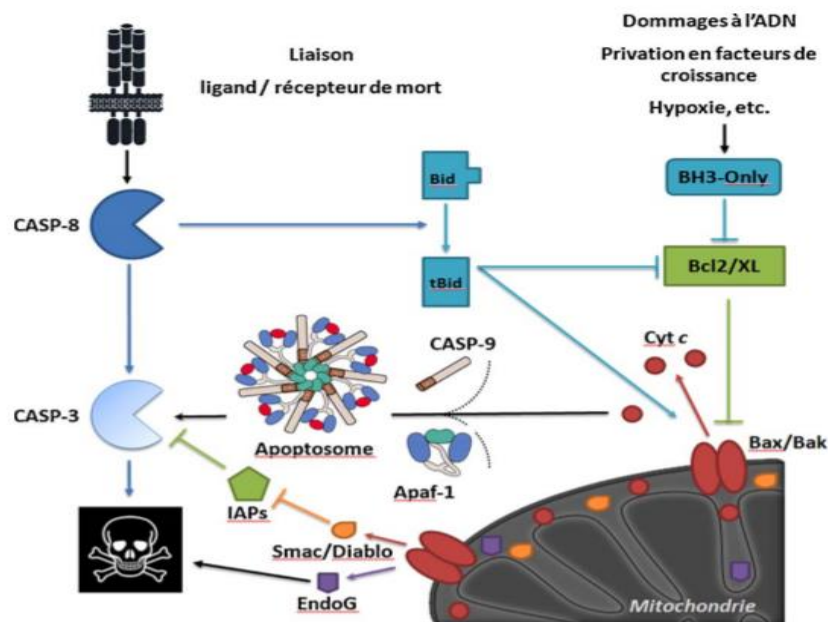


Figure 4. Les voies d'activation de l'apoptose. Il existe deux voies majeures dans la signalisation apoptotique : la voie des récepteurs de mort (à droite) initiée par des signaux extracellulaires comme Fas ligand ou le TNF- α , qui active directement des protéases (clivant leurs substrats au niveau d'un résidu aspartate) baptisées caspases (caspases-8 et caspase-3), et la voie mitochondriale (à gauche) initiée par divers signaux (dommages de l'ADN, carence en facteurs trophiques, hypoxie, irradiation, etc.) qui aboutit à une modification de la perméabilité de la membrane externe des mitochondries. Les protéines de la famille Bcl-2, selon qu'elles soient pro- (Bax/Bak et membres BH3-only) ou anti-apoptotiques (ex: Bcl-2/Bcl-xL), régulent positivement ou négativement la perméabilité mitochondriale et la libération de facteurs apoptogéniques, tel que le cytochrome c qui participe avec Apaf-1 à la formation de l'apoptosome, Smac/Diablo (deux bloqueurs de IAPs, qui sont des inhibiteurs de caspases), et l'endonucléase G (qui participe à la fragmentation apoptotique de la chromatine). La protéine BH3-only Bid, dont le clivage par la caspase-8 libère la forme active tBid, constitue un relais entre les deux voies d'apoptose.

2.4.2. La voie intrinsèque de l'apoptose

Cette voie est connue aussi sous le nom de la voie mitochondriale, est induite par divers stimuli comme la présence de dommages à l'ADN, induits par exemple par des radiations ionisantes, une privation en facteurs de survie, une activation d'onco-protéines ou de suppresseurs de tumeurs comme la protéine p53. La mitochondrie possède un rôle

central dans l'activation de cette voie finement régulée par les membres de la famille Bcl-2 (Wang, 2001). L'initiation de la voie intrinsèque se traduit d'abord par une chute du potentiel mitochondrial. La perméabilité de la mitochondrie est alors modifiée, favorisant le passage de nombreuses molécules de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytoplasme.

Parmi ces molécules on distingue la protéines Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspases)/DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis (IAP)- Binding protein with Low pI), le facteur AIF (Apoptosis-Inducing Factor), l'endonucléase G (EndoG), la protéine Omi/HtrA2 (High-Temperature-Requirement protein A2) ainsi que le cytochrome c. Ce dernier interagit dans le cytoplasme avec l'ATP et la protéine AAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) permettant ainsi son activation *via* un changement de conformation (Li *et al.*, 1997). APAF-1 peut alors interagir et activer la caspase-9 pour former l'apoptosome (Jiang & Wang, 2000). La caspase-9 va à son tour activer les caspases effectrices de l'apoptose comme la caspase-3 et la caspase-7, rejoignant ainsi la voie extrinsèque (Slee *et al.*, 1999).

Ces deux voies de mort cellulaire peuvent, dans certains cas, être complémentaires. En effet, la voie mitochondriale peut être activée pour amplifier le signal apoptotique déclenché par la voie extrinsèque.

2.5. Les différents acteurs de l'apoptose

2.5.1. Les récepteurs de mort

Les membres de la superfamille des récepteurs au TNF (TFNR) sont impliqués dans le contrôle du système immunitaire, de l'homéostasie cellulaire et du développement ; ils peuvent également activer la différenciation, la survie ou la mort par apoptose (Schneider & Tschopp, 2000). Huit récepteurs de mort sont actuellement connus : TNF-R1 (DR1), Fas (CD95/APO-1/DR2), DR3 (APO-3/TRAMP/WSL1/LARD), DR4 (TRAIL1/APO-2), DR5 (TRAILR2/KILLER/TRICK2), DR6 (Pan *et al.*, 1998) le récepteur de l'ectodysplasine A ou (EDA-R) et le récepteur au NGF (Nerve Growth Factor) (Bhardwaj & Aggarwal, 2003 ; Lavrik *et al.*, 2005 ; Wajant, 2003). Les voies de signalisation apoptotiques activées par les récepteurs de mort conduisent, d'une manière générale, à l'activation des caspases initiatrices de l'apoptose.

Il existe également un autre sous-groupe de récepteurs homologues au récepteur du TNF, appelés les « decoy » récepteurs (DcR). Parmi les membres de ce groupe, on distingue le DcR1 (Sheridan *et al.*, 1997) et le DcR2 (Marsters *et al.*, 1997) qui sont des récepteurs membranaires ainsi que le DcR3 (Pitti *et al.*, 1998) qui est une protéine soluble sécrétée. Ces récepteurs ne sont pas capables de transmettre le signal de mort cellulaire, ils sont plutôt considérés comme des inhibiteurs des récepteurs de mort.

En effet, des domaines extra-cellulaires des DcR1 et DcR2 sont tous les deux capables de fixer le ligand TRAIL, entrant ainsi en compétition avec les récepteurs DcR4 et DcR5. Cependant, DcR1 ne possède pas de région cytoplasmique, et celle de DcR2, plus courte qu'un domaine de mort typique, ne permet la transmission d'un signal apoptotique. DcR3 peut se fixer à Fas L avec la même affinité que Fas. De ce fait, DcR3 inhiberait, par compétition avec Fas, l'apoptose induite par Fas.

2.5.2. Les caspases

La mort cellulaire par apoptose nécessite l'activation d'une famille de protéases à cystéine appelées caspases en raison de leur nature et de la spécificité de leur site actif (cystein aspartic acid-specific proteases). A ce jour, 18 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Treize d'entre elles sont fonctionnelles chez l'homme : les caspases -1 à -10, -12, -14 et la caspase -16 dont la fonction n'est pas encore bien caractérisée (Eckhart *et al.*, 2008).

Ces protéases possèdent toutes un site catalytique comprenant un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique très conservée de type : Gln-Ala-Cys-X-Gly (X pour un résidu arginine, glutamine ou acide aspartique), elles reconnaissent puis clivent les chaînes polypeptidiques de leurs substrats, au niveau d'un résidu aspartique en position P1. Leur structure primaire comprend un pro-domaine amino-terminal de taille variable, un domaine central, qui deviendra après clivage la grande sous-unité (20 kDa) de la caspase, et un domaine carboxy-terminal qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10 kDa). Ces enzymes sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de zymogène inactif (pro-caspase). Elles sont activées par un double clivage, l'un éliminant le pro-domaine N-terminal et l'autre séparant les deux sous-unités. L'assemblage de deux grandes sous-unités, qui contiennent le site actif, avec deux sous-unités aboutit à la formation d'un hétérotétramère enzymatiquement actif (Nicholson & Thornberry, 1997 ; Rotonda *et al.*, 1996).

Une classification des caspases a été suggérée selon trois critères différents :

- la spécificité de reconnaissance du site de clivage sur leur substrat,
- la longueur de leur domaine
- leur place dans la cascade apoptotique.

Les caspases -1, -4, -12 et -14 constituent un groupe de caspases impliquées dans les mécanismes de l'inflammation et de la différenciation. Les autres caspases seront toutes impliquées dans l'apoptose et sont divisées en deux classes. On distingue les caspases initiatrices (caspase -2, -8, -9 et -10) qui possèdent un pro-domaine long, des caspases exécutoires (caspases -3, -6 et -7) qui présentent au contraire un pro-domaine court.

Le prodomaine des caspases initiatrices possèdent des domaines de type DED (Death Effector Domain) pour les caspases -8 et -10, ou CARD (Caspase Requirement Domain) pour les caspases -2 et -9 qui permettent leur recrutement au niveau de complexes multi-protéiques comme le DISC dans le cas des caspases -8 et -10 ou l'apoptosome dans le cas de la caspase-9 (Kischkel *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1997). Les caspases alors activées par hétéro-tétramérisation et clivage auto-protéolytique, vont cliver à leur tour les caspases -3, -6 et -7. De ce fait, les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution assurée par les caspases effectrices.

Jusqu'à présent, de nombreux substrats des caspases effectrices ont été identifiés. La plupart sont impliqués dans le maintien de l'intégrité cellulaire (actine, lamines nucléaires, foridine), dans les mécanismes de réparation de l'ADN (PARP pour Poly ADP-Ribose Polymérase, DNA-PKs pour DNA-dependent Protein Kinase, ATM pour Ataxia Telangiectasia Mutated) ou dans la régulation du cycle cellulaire (pRB, p27, MDM2) (Danial & Korsmeyer, 2004). L'activation des caspases effectrices constitue un point de non-retour dans la cascade de signalisation conduisant à la mort des cellules par apoptose.

2.5.3. La famille de Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'apoptose, notamment de la voie intrinsèque. Ces protéines ont été identifiées en 1984 comme proto-oncogènes dans les lymphocytes B folliculaires (Croce *et al.*, 1984). Dans ces lymphomes, la translocation chromosomique (t14 ; t18) (q23 ; q21) conduit à

l'expression constitutive de Bcl-2. Depuis, de nombreux homologues de Bcl-2 ont été identifiés, l'ensemble constituant la famille Bcl-2.

Chez les mammifères, cette famille est composée d'une vingtaine de membres caractérisés par la présence d'au moins un des quatre motifs hautement conservés : BH1, BH2, BH3 et BH4 (Bcl-2 Homology Domain) (Reed *et al.*, 1996). Certains de ces domaines sont impliqués dans les interactions entre les différents membres de la famille pour former des homo- ou des hétéro-dimères. Cette famille de protéine est divisée en trois groupes sur la base de leur structure, du nombre de motifs BH, et de l'activité fonctionnelle (Youle & Strasser, 2008) :

- Les membres anti-apoptotiques sont principalement représentés par Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 et Mcl-1. Ces protéines possèdent des structures très similaires et comportent (à l'exception de A1) un domaine C-terminal hydrophobe et transmembranaire (TM). Ce dernier permet l'ancrage des protéines dans la membrane externe de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique (RE) ;
- Les membres pro-apoptotiques « Bax-like » sont représentés par Bax, Bak et Bok. Leur structure se caractérise par la présence des trois domaines BH1, BH2 et BH3 ;
- Les membres pro-apoptotiques « BH3 only » sont représentés par Bid, Bad, Bim, Bik, Puma, Bmf, HRK et Noxa. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un seul motif BH, le domaine central BH3, essentiel pour leur fonction pro-apoptotique.

La localisation subcellulaire des différents membres de la famille Bcl-2, varie en fonction de leur structure et de leur état d'activation. En dehors de toute stimulation apoptotique, certains comme Bcl-2, Mcl-1, Bak et Bik sont constitutivement présents à la membrane des mitochondries et/ou du réticulum endoplasmique (RE). Bcl-xL et Bcl-w sont retrouvés à la fois dans la membrane mitochondriale et de manière diffuse dans le cytosol. La protéine Bax est quant à elle essentiellement cytosolique et se trouve dans une conformation monomérique fermée. Son domaine C-terminal est alors séquestré par une poche hydrophobique formée par ses domaines BH1, BH2 et BH3.

Lorsque l'apoptose est stimulée, Bax change de conformation et s'insère dans la membrane externe des mitochondries grâce à son domaine C-terminal (Nechushtan *et al.*, 1999).

2.6. Cycle cellulaire

Les cellules somatiques sont normalement complètement dépendantes des voies de signalisation afin de se diviser et de proliférer. Ce n'est qu'en recevant des signaux mitogènes spécifiques (des mitogènes tels que les facteurs de croissance), indiquant un environnement approprié pour que les cellules augmentent et commencent à proliférer (**Evan & Vousden, 2001**). Les cellules entrent dans le cycle cellulaire à la fin de la phase G1, après avoir reçu une exposition suffisante aux mitogènes, et sont vérifiées pour détecter les dommages à l'ADN pour confirmer qu'ils possèdent toutes les machines requises pour une division réussie. Les voies qui régulent le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire sont perturbées par les cancers (**Evan & Vousden, 2001**).

Un exemple d'une protéine de point de contrôle importante, dont le gène est supprimé dans certains cancers est la protéine Retinoblastoma (Rb) ; celle-ci agit comme une protéine gate keeper, contrôlant l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire, et lorsqu'il est inactivé, la cellule peut proliférer de manière incontrôlable (**Weinberg, 1995**).

Le cycle cellulaire est une série d'événements qui conduisent à la division cellulaire et à la duplication d'une cellule. Dans ce cycle, plusieurs points de contrôle sont présents qui régulent la progression à travers différentes étapes, sur la base d'une série de réactions biochimiques complexes. Ce mécanisme complexe est contrôlé par une sous-famille de kinases cyclines-dépendantes (CDK) (**Schwartz & Dickson, 2009**). Comme son nom l'indique, la fonctionnalité des CDK dans la régulation du cycle cellulaire dépend de leur association avec une sous-unité activée appelée cycline, comme illustrée dans la **fig. 5**. Ces cyclines activent les CDK en se liant à eux. En ce qui concerne leur rôle enzymatique, les CDK sont des sérine et thréonine kinases qui phosphorylent leurs substrats pour modifier leurs fonctions (**Schwartz & Dickson, 2009**).

2.6.1. Cyclines-CDK et cancer

Dans le cas du cancer, les défauts du cycle cellulaire sont souvent générés par des changements dans l'activité CDK à la suite de mutations accumulées. Ces mutations sont caractérisées par une prolifération anarchique des cellules due à la signalisation mitogénique constitutive et à l'hyper-activation de divers CDK.

Les occurrences qui en résultent sont favorables à la formation de tumeur en raison de la division cellulaire amplifiée et non réglementée. CDK un aspect de la formation du cancer due à l'aberration du cycle cellulaire, est basé sur la déréglementation des CDK interphases ([Schwartz & Dickson, 2009](#)).

En outre, les translocations des cyclines D1 et D3, les amplifications, les mutations d'anti-sens et les niveaux élevés de protéines ont été observés dans de multiples types de cancer. Ces mutations et anomalies augmentent l'activité de la cycline D, entraînant une progression du cycle cellulaire vers la phase S et la prolifération cellulaire ([Ashgar et al., 2015](#)). Alors que la cycline D semble être impliquée dans de nombreux types de cancers, elle n'est pas la seule cycline mal réglementée. On a également signalé que la cycline E était surexprimée dans le cancer du sein et du côlon ([Vermeulen et al., 2003](#)).

2.6.2. CKI

Dans les cellules normales, l'activité CDK est régulée par deux types d'inhibiteurs: les protéines INK4 (INK4A, INK4B, INK4C, INK4D) et les protéines de la famille Cip/Kip (p21, p27 et p57) ([Schwartz & Dickson, 2009](#)). Ensemble, ces inhibiteurs du cycle cellulaire fonctionnent comme un système de freinage qui inhibe la prolifération dans de multiples types de tissus. En raison de l'activité inhibitrice de CKI, qui conduit à la suppression de la croissance par pRb, les CKI possèdent un rôle fonctionnel suppresseur de tumeur. L'importance de ces inhibiteurs de kinases peut s'expliquer par la présence de protéines p27 mutantes incapables de se lier aux complexes CDK-cyclines ([Vermeulen et al., 2003](#)).

2.6.3. Thérapies ciblées par cycle cellulaire

Les voies complexes impliquées dans la signalisation oncogénique sont une obscurité contre les thérapies cibles. En raison de l'hétérogénéité génétique acquise, à partir de mutations accumulées, les cellules cancéreuses sont capables de contourner et d'échapper aux thérapies cliniques qui visent des protéines ou des voies spécifiques.

Il existe actuellement un certain nombre de stratégies thérapeutiques qui visent à contrôler le niveau de l'activité CDK, les approches dites « indirectes » incluent la surexpression de CKI, les peptides synthétiques à activité CKI, l'inhibiteur de la cycline et les modulateurs de l'état phosphorylé par CDK. Pour les traitements liés à l'inhibition

directe de l'activité CDK, les inhibiteurs simultanés fonctionnent jusqu'à présent par inhibition compétitive de la liaison de l'ATP à la CDK, ce qui entraîne la rupture de l'activation du CDK et l'arrêt du cycle cellulaire (Vermeulen *et al.*, 2003).

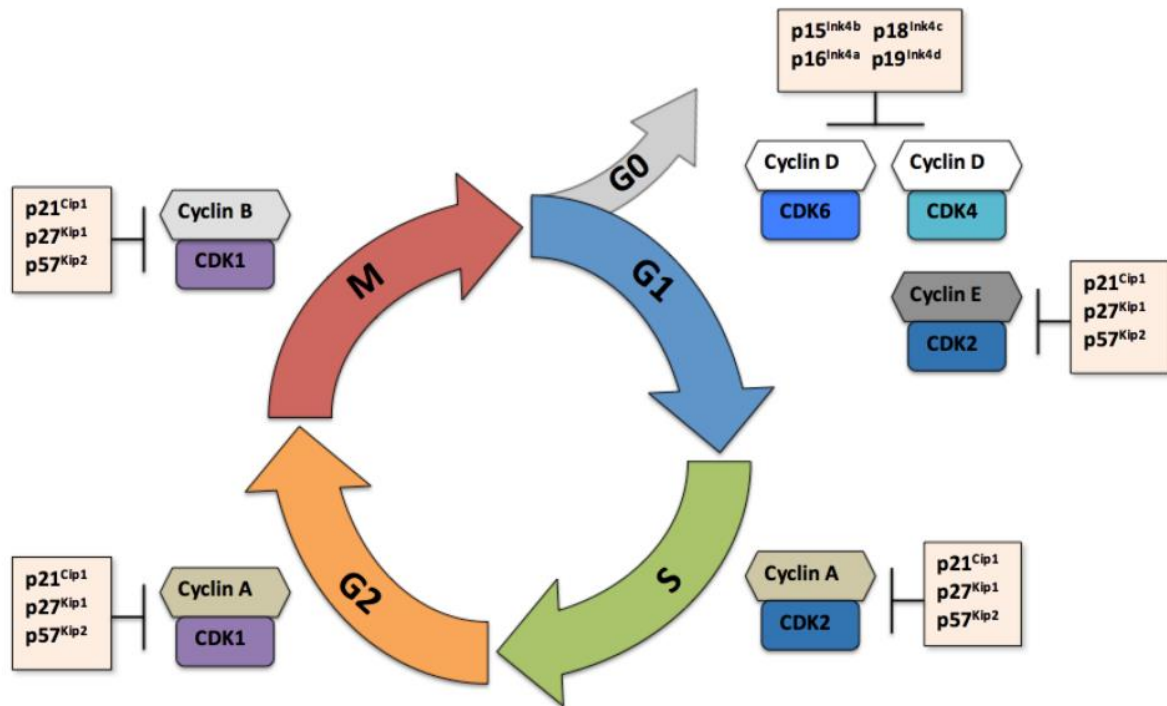


Figure 5. Schéma des points de régulation du cycle cellulaire (Schwartz & Dickson, 2009).

2.6.4. La protéine p53

Le suppresseur de tumeur p53 est une protéine de 383 acides aminés, qui joue un rôle majeur dans la prévention du développement tumoral (Leblanc & May, 2002). D'une façon plus précise, lorsque p53 est stimulée par la présence d'une molécule endommagée, dite mutée, elle activera alors l'expression de ses différents gènes cibles qui sont impliqués dans le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire (Carvajal *et al.*, 2005). En immobilisant la progression du cycle cellulaire avant son entrée en phase de synthèse de l'ADN (phase S) ou en phase de mitose (phase M), p53 prévient la propagation de dommages à l'ADN et facilite sa réparation. En fait, ces arrêts sont médiés de manière prédominante par p21, un des gènes cible de p53 (Carvajal *et al.*, 2005).

Notons que les réponses les plus importantes et les plus fréquentes engendrées par l'activation de p53 sont l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

Chapitre 3 : Aliments, nutriments et cancer

Avant le vingtième siècle, le cancer colorectal était relativement rare mais l'incidence a augmenté considérablement surtout dans les cinquantes dernières années. Plusieurs facteurs de risque ont été proposés, notamment l'adoption d'une alimentation occidentalisée, l'obésité et l'inactivité physique ([Wiseman, 2008](#) ; [Center & Jemal, 2009](#)).

Selon la recherche bibliographique, il n'est plus à prouver l'association entre l'alimentation et le cancer colorectal. On peut relever donc que les aliments riches en protéines animales, alcool et graisses saturées sont pro-oncogènes tandis qu'une alimentation à teneur élevée en fruits et légumes (polyphénols), en vitamines et minéraux pourrait avoir un effet anti-cancérigène.

3.1. Aliments ou nutriments pro-oncogènes

3.1.1. Viande rouge

La viande rouge peut être directement liée à l'incidence du cancer colorectal ou indirectement, étant donné que les régimes riches en viande peuvent être déficients en d'autres composants alimentaires, tels que les fibres et les polyphénols des fruits et légumes. La cuisson de la viande à des températures élevées peut entraîner la formation d'amines hétérocycliques mutagènes et cancérigènes, et ce, par l'interaction de la créatinine musculaire avec les acides aminés ([Sugimura, 2004](#)) ainsi que la formation de composés N-nitroso ([Cross & Sinha, 2004](#)).

Faire frire, griller ou cuire sur du charbon peut potentiellement induire ces changements. L'hème dans la viande peut agir comme un agent de nitrosation favorisant ainsi la formation de composés N-nitroso. Les viandes les plus foncées sont plus abondantes en hème que les viandes blanches et, par conséquent, une consommation élevée de viande rouge (bœuf, porc ou agneau) pourrait augmenter le risque de cancer colorectal ([Lakshmi et al., 2005](#) ; [Kuhnle & Bingham, 2007](#)).

Le fer héminique a été positivement associé dans la littérature avec le développement de cancer colorectal ([Shaheen et al., 2003](#)).

Une revue systématique des études prospectives par [Sandhu *et al.*](#) a déterminé qu'une augmentation de 100 g de la consommation quotidienne de toutes les viandes ou viandes rouges était associée à un accroissement de 12 à 17% du risque de cancer colorectal.

Contrairement à cela, une étude de cohorte prospective de 45 496 femmes par le National Cancer Institute ([Flood *et al.*, 2003](#)), n'a montré aucune association entre la consommation de viande rouge, de viande transformée, ou de viande bien cuite et le risque de cancer colorectal.

3.1.2. Lipides et graisses saturées

Les graisses peuvent jouer différents rôles dans la carcinogenèse colorectale *via* des mécanismes distincts tels que la régulation à la hausse de l'apoptose, l'inhibition de l'interleukine-1 et la synthèse du facteur de nécrose tumorale- α , l'inhibition de la COX-2 et la modulation de l'environnement redox dans les cellules du côlon ([Vanamala *et al.*, 2008](#); [Sanders *et al.*, 2004](#)).

[Satia-Abouta *et al.* \(2003\)](#) ont démontré une augmentation du risque de cancer colorectal avec une augmentation de l'apport énergétique total. Les lipides alimentaires fournissent une riche source d'énergie, et donc les régimes riches en lipides, en particulier les graisses animales, peuvent augmenter le risque de cancer colorectal ([Hamer *et al.*, 2008](#); [Burnstein, 1993](#)). Contrairement à cela, il existe de grandes études de cohortes qui ne soutiennent pas l'effet de la graisse alimentaire sur le cancer du côlon ([Giovannucci *et al.*, 1994](#) ; [Pietinen *et al.*, 1999](#)).

Des études de cas-témoins ([Franceschi *et al.*, 1998](#)) et de cohorte prospective ([Willett *et al.*, 1990](#)) ont démontré une augmentation du risque de cancer colorectal chez les personnes ayant une consommation accrue de graisses saturées (Les graisses saturées se retrouvent principalement dans les produits animaux, y compris la viande rouge et les produits laitiers, tels que le fromage et le beurre. L'huile de coco, le lait de coco, l'huile de palme et le beurre de cacao sont toutes des sources de graisses saturées d'origine végétale),

Les résultats de l'étude Dietary Approaches to Stop Hypertension Diet (DASH) menée par ([Fung *et al.*, 2010](#)) sur 130 000 participants ont révélé une réduction du risque relatif de 20% chez les patients qui consommaient moins de graisses animales.

Dans une méta-analyse, [Alexander et al., \(2009\)](#) n'a pas trouvé d'association indépendante entre la consommation de graisses animales et le risque de cancer colorectal.

3.1.3 L'Alcool

L'apport de 30 grammes d'alcool par jour, est associé à un risque accru de cancer colorectal par rapport à une faible consommation. [Giovannucci et al. \(1995\)](#) ont montré que les hommes de la cohorte HPFS qui buvaient plus de deux boissons alcoolisées par jour avaient un risque deux fois plus élevé de cancer du côlon.

Le mécanisme par lequel l'alcool peut être lié à la carcinogenèse est inconnu, mais les voies proposées comprennent sa capacité à réduire le folate ([Seitz et al., 1990](#)), favoriser la méthylation anormale de l'ADN ([Choi et al., 1999](#)), retarder la réparation de l'ADN, modifier la composition des sels biliaires ou induire le cytochrome p450 pour activer les carcinogènes ([Kune & Vitetta, 1992](#)).

En effet, les femmes aux niveaux sériques faibles de folates qui consommaient de grandes quantités d'alcool, présentaient un risque plus élevé de cancer colorectal ([Kato et al., 1999](#)).

Un grand nombre d'études ont suggéré une association entre la consommation d'alcool, l'adénome colique ainsi que le risque de cancer colorectal ([Cho et al., 2004](#); [Chan & Giovannucci, 2010](#); [Ferrari et al., 2007](#)).

D'autre part, l'étude menée [Park et al., \(2006\)](#) n'a pas trouvé d'association entre la consommation totale d'alcool et la mortalité toutes causes confondues dans le cancer colorectal.

L'effet bénéfique de la consommation de vin rouge pourrait être attribué au rôle protecteur des polyphénols plutôt que sa teneur en alcool ([Scalbert et al., 2005](#)).

3.2. Aliments ou nutriments protecteurs contre le cancer colorectal

Une bonne hygiène de vie comprenant une alimentation saine et une activité physique régulière peuvent diminuer l'incidence du CRC.

3.2.1. Polyphénols

Les polyphénols sont une classe de produits chimiques connus pour leurs nombreux avantages, notamment leurs effets antioxydants ([Ramos, 2008](#)), l'inhibition de la

prolifération cellulaire ([Kuntz et al., 1999](#)), l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire ([Ramos et al., 2007](#)), l'interaction avec les voies apoptotiques et les propriétés anti-angiogéniques et anti-métastases ([Araújo et al., 2011](#)).

Les études cas-témoins, la culture cellulaire et les études sur les animaux ont démontré un rôle protecteur contre les cancers colorectaux ([Johnson, 2007](#) ; [Manson, 2003](#)).

3.2.2. Curcumine

Il a été montré que la curcumine agit en inhibant l'invasion cellulaire ([Chen et al., 2006](#)) et en ayant des propriétés anti-inflammatoires ([Su et al., 2006](#)). Il a été montré que la curcumine est impliquée dans la réduction du nombre et de la taille des adénomes de l'iléon et le rectum chez les patients atteints de polypose adénomateuse familiale ([Cruz-Correa et al., 2006](#)).

3.2.3. Flavonoïdes

L'apigénine et la cyanidine, sont des flavonoïdes se trouvant dans le persil et le céleri, les fraises et des cerises respectivement pouvant inhiber la carcinogenèse du côlon, et ce, en induisant l'apoptose dans des modèles animaux ([Chung et al., 2007](#) ; [Kim et al., 2008](#)). La quercétine qui est abondante dans les oignons, le brocoli et les pommes a réduit la croissance cellulaire en interagissant avec la β -caténine ([Park et al., 2006](#)) et par induction de l'apoptose ([Kim et al., 2007](#)).

3.2.4. Autres composés phyto-chimiques

- **Phénols naturels** : L'exemple même de ces molécules qui sont plus petites que les polyphénols est le resvératol, celui-ci se trouve dans la peau des raisins et du vin rouge, des études ont montré qu'il pourrait inhiber les métastases en réduisant l'hypoxie inductible du facteur-1 α et MMP-9 exprimés dans les colonocytes ([Wu et al., 2008](#)).
- **Caroténoïdes** : Les caroténoïdes sont des pigments naturels dont certains peuvent être transformés par le corps en vitamine A. Le β -carotène qui fait parti de cette famille se trouve dans les carottes, l'huile de palme rouge et la citrouille. Le lycopène est un autre exemple de pigment phyto-chimique trouvé dans les tomates, les pastèques, la papaye, les abricots et les agrumes. Les caroténoïdes

présenteraient des propriétés anti-oxydantes, antiprolifératives et anti-inflammatoires (Tang *et al.*, 2008 ; Joo *et al.*, 2009 ; Choi *et al.*, 2006).

- **Isothiocyanates** : Ce sont des composés phyto-chimiques contenant du soufre que l'on trouve en abondance dans le chou, les navets, le brocoli, le chou-fleur...etc. Ils se sont révélés posséder une activité chimio-préventive (Lai *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2009 ; Choi *et al.*, 2009) contre le cancer du côlon.

De manière générale, les régimes riches en polyphénols et autres composés phyto-chimiques tels que les caroténoïdes, les isothiocyanates et les phénols naturels se sont avérés être protecteurs contre le cancer colorectal.

3.2.5. Le thé vert

L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) est la catéchine la plus abondante dans le thé vert. Les bénéfices ont non seulement été montrés *in vitro* et sur des modèles animaux (Scarbet *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2000 ; Demeule *et al.*, 2002) mais aussi dans de grandes études de population. La consommation de thé vert a été associée à une réduction de 40% du risque de cancer colorectal, dans une étude de 69 710 de femmes chinoises (Yang *et al.*, 2007).

3.2.6. Le café

Plusieurs méta-analyses d'études de cohorte et de cas-témoins ont révélé que la consommation importante de café, est associée à un risque moindre de cancer colorectal (Giovannucci, 1998; Yu *et al.*, 2011 ; Galeone *et al.*, 2010).

Cependant, il existe des incohérences entre les études cas-témoins et les études prospectives, ainsi que les différences notées entre le sexe et la race (Li *et al.*, 2013).

3.2.7. Fibres alimentaires, fruits et légumes

L'hypothèse selon laquelle la consommation élevée de fibres peut réduire le risque de cancer colorectal a été postulée suite à l'observation de la faible incidence du cancer colorectal chez les populations africaines qui consomment une alimentation riche en fibres (Burkitt, 1969).

L'effet de l'alimentation par rapport aux adénomes colorectaux et à la récurrence de l'adénome a été exploré dans plusieurs études. Les aliments riches en son de blé

([Alberts et al., 2000](#)), les fruits et légumes ([Schatzkin et al., 2000](#)), les agrumes ([Michels et al., 2006](#)), les légumes crucifères ([Millen et al., 2007](#)), peuvent conférer une protection contre les adénomes colorectaux et par la suite un carcinome colorectal. Certaines études prospectives n'ont pas montré cette association ([Alberts et al., 2000](#) ; [Schatzkin et al., 2000](#)).

Les données de l'étude prospective européenne sur le cancer et la nutrition (EPIC), l'étude de dépistage du cancer de la prostate, du poumon, du colorectal et de l'ovaire (PLCO) et de la mammographie suédoise ont montré un risque réduit du cancer colorectal et d'adénomes colorectaux parmi les personnes qui consommaient de grandes quantités de fibres, en particulier de grains de fruits et légumes ([van Duijnhoven et al., 2009](#) ; [Terry et al., 2001](#)).

Cependant, dans une méta-analyse d'études prospectives, [Park et al.](#) ont suggéré qu'une consommation élevée de fibres alimentaires n'était en fait pas associée à un risque réduit de cancer colorectal ([Park et al., 2005](#)). Dans une récente méta-analyse de la cohorte prospective et des études cas-témoins sur des fibres diététiques, les auteurs suggèrent une réduction de 10% du risque de cancer colorectal pour chaque apport de 10 g / jour de fibres alimentaires totales et de fibres de céréales. Le grain entier était également inversement associé ([Aune et al., 2011](#)).

3.2.8. Oméga 3 (n-3)

Les études épidémiologiques et les populations consommant un grand nombre d'huiles de poisson polyinsaturées, présentaient des taux plus faibles de cancer du côlon ([Blot et al. 1975](#)). Cela a conduit à l'hypothèse que les régimes riches en acides gras n-3 peuvent réduire le risque de cancer colorectal.

Au contraire, [Daniel et al. \(2009\)](#) ont signalé que l'une des principales sources alimentaires d'acides gras oméga-3, l'acide alpha-linolénique, était associée à un risque accru du cancer colorectal chez les femmes et que l'apport en oméga-6 était inversement lié au risque de cancer colorectal chez les hommes ([Daniel et al., 2009](#)). Dans leur cohorte, [Sasazuki et al. \(2011\)](#) n'a trouvé aucune preuve que les acides oméga-6 a augmenté le risque.

[Butler et al. \(2009\)](#) ont montré que les AGPI marins n-3 diététiques étaient positivement associés au cancer colorectal avancé. Une méta-analyse chinoise des études prospectives de près d'un demi-million d'individus n'a pas montré d'effet

protecteur des propriétés des acides gras n-3 sur le risque de cancer colorectal ([Shen et al., 2012](#)).

En fait, un examen systématique de vingt études de cohorte prospectives a révélé que la supplémentation alimentaire en acides gras oméga-3 ne devrait pas prévenir le cancer ([MacLean et al., 2006](#)).

3.2.9. Acide folique / acide folique (vitamine B9)

[Manson et al. \(2007\)](#) a montré que la supplémentation en folate alimentaire peut être responsable de la réduction de l'incidence du cancer colorectal aux États-Unis et au Canada. Cependant, [Giovanucci \(2002\)](#) a montré comment le folate alimentaire réduit le risque de cancer colorectal ou d'adénome, mais pas lorsque le folate provenait de suppléments. Toutefois, ce même auteur a suggéré que la supplémentation en folate pourrait être associée à un risque plus élevé de récurrence d'adénome et peut même être nocif pour les patients ayant une histoire antérieure de cancer du côlon.

3.2.10. Calcium et vitamine D

On pense que la vitamine D et le calcium exercent leurs effets protecteurs en diminuant la prolifération cellulaire, en inhibant l'angiogenèse, en stimulant l'apoptose et en favorisant la différenciation cellulaire ([Peters et al., 2001](#)).

[Garland et al.](#) a proposé que des niveaux inférieurs de vitamine D puissent expliquer l'augmentation de la mortalité due au cancer du côlon dans les latitudes élevées ([Garland et al., 1980](#)). D'autres études épidémiologiques ont montré que les décès dus au cancer colorectal se sont révélés plus élevés dans les régions où le soleil est moins fréquent ([Tangpricha et al., 2001](#)). Les populations qui consomment des quantités plus élevées de poisson frais, de crustacés, de calcium et de vitamine D ont une incidence plus faible de cancer colorectal ([Kato et al., 1997](#)) et peuvent même avoir le plus faible taux de cancer du côlon et du rectum en Europe et en Amérique du Nord ([Dalberg et al., 1999](#)).

Le calcium a été jugé avoir un effet protecteur sur le risque de cancer colorectal, mais pas dans d'autres études ([Kampman et al., 1994](#) ; [Martínez et al., 1996](#)).

En ce qui concerne les polypes colorectaux, une étude d'intervention de trois ans portant sur le calcium et les antioxydants n'a révélé aucun effet sur la croissance des polypes mais on peut leur prétendre un rôle protecteur contre la formation d'adénomes

(Hofstad *et al.*, 1998). Une consommation plus élevée de calcium seul (Baron *et al.*, 1999) ou combinée à la vitamine D (Grau *et al.*, 2003) s'est révélée être une protection contre la récurrence de l'adénome.

3.2.11. Zinc

Des études *in vitro* ont suggéré que la supplémentation en zinc peut influencer positivement la réponse des cellules tumorales, aux médicaments anticancéreux, en modifiant ainsi l'expression des gènes des cellules cancéreuses du côlon (Sheffer *et al.*, 2011). Une étude prospective plus récente de Zhang *et al.* n'a pas montré de rôle pour l'apport en zinc avec le risque de cancer colorectal, mais les auteurs ont mis en évidence une association inverse possible entre le zinc alimentaire et le cancer du rectum chez les femmes (Zhang *et al.*, 2011).

3.2.12. Sélénium

La supplémentation en sélénium dans les compléments alimentaire, à base de levure de bière, a été associée à une réduction jusqu'à 50% de l'incidence du cancer colorectal (Reid *et al.*, 2006 ; Clark *et al.*, 1996). D'autres études contredisent ces découvertes et ne montrent aucune association significative (van den Brandt *et al.*, 1993 ; Wallace *et al.*, 2003). Par conséquent, les études ne fournissent pas actuellement de preuves pour la supplémentation en sélénium.

3.2.13. Microbiote intestinal

Des expériences sur des modèles animaux ont montré que ces oligo-fructants (exemple de l'inuline) peuvent réduire le nombre de foyers de cryptes aberrants (Verghese *et al.*, 2002) et influencer l'activité des cellules tueuses naturelles et la production d'IL-10 (Roller *et al.*, 2004). On peut trouver des oligo-fructants naturels dans des aliments tels que les oignons, les artichauts, l'ail, les asperges et la chicorée.

Les mécanismes proposés comprennent la promotion de la croissance d'espèces de Lactobacilles probiotiques qui maintiennent la santé de l'épithélium et régulent négativement la réponse inflammatoire (McGarr *et al.*, 2005). Comme les Bifidobactéries et les Lactobacilli sont sélectivement stimulés à croître, cela peut se produire au détriment des bactéries pathogènes (Bosscher *et al.*, 2009). Les autres

avantages du microbiote comprennent la synthèse de vitamines comme le folate ([Rossi et al., 2011](#)).

Comme mentionné précédemment, la viande cuite à des températures élevées contient des niveaux élevés d'amines hétérocycliques qui se sont révélés fermentés par le microbiote intestinal. Les sous-produits de ce processus peuvent endommager l'ADN et augmenter le risque du cancer colorectal ([Huycke & Gaskins, 2004](#)).

3.2.14. Mode de vie

Outre l'alcool et le tabagisme ([Bostick et al., 1994](#)), d'autres facteurs liés au mode de vie ont également été associés au risque de développer un cancer colorectal.

Il a été démontré qu'une activité physique élevée pouvait réduire le risque jusqu'à 40%. Tandis que des études ont rapporté des résultats défavorables chez les patients qui sont obèses ([Payne, 1990 ; Ning et al., 2010 ; Renehan et al., 2008](#)), souffrent du diabète ([Payne, 1990 ; Khaw et al., 2004](#)) ou utilisent la pilule contraceptive orale ([Tsilidis et al., 2010](#)).

Il est à noter qu'une élévation de la taille du corps ([Payne, 1990 ; Hughes et al., 2012](#)), un état post-ménopausique ([Tsilidis et al., 2010 ; Zervoudakis et al., 2011](#)) et une exposition endogène aux œstrogènes ([Zervoudakis et al., 2011](#)) sont des facteurs non modifiables qui peuvent augmenter le risque.

Chapitre 4 : Polyphénols et activités biologiques

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale « composés phénoliques » concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (Fleuriet *et al.*, 2005).

Les classes de polyphénols les plus importantes sont les acides phénoliques, qui comprennent des structures polymères telles que des tanins hydrolysables, des lignanes, des stilbènes et des flonotiques. Les flavonoïdes comprennent des flavonols (par exemple la quercétine et le kaempferol, les flénonides les plus répandus dans les aliments), les flavones, les iso-flavones, les flavanones, les anthocyanidines (pigments responsables de la couleur de la plupart des fruits), les flavanols (catéchines-monomères et proanthocyanidines-polymères, connus sous le nom de tanins condensés) (Manach *et al.*, 2004).

4.1. Les acides phénoliques

On distingue deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres (Manach *et al.*, 2004). Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide p-coumarique, férulique, sinapique et caféique. Ce dernier, se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de nombreux fruits et à forte concentration dans le café (El Gharras, 2009).

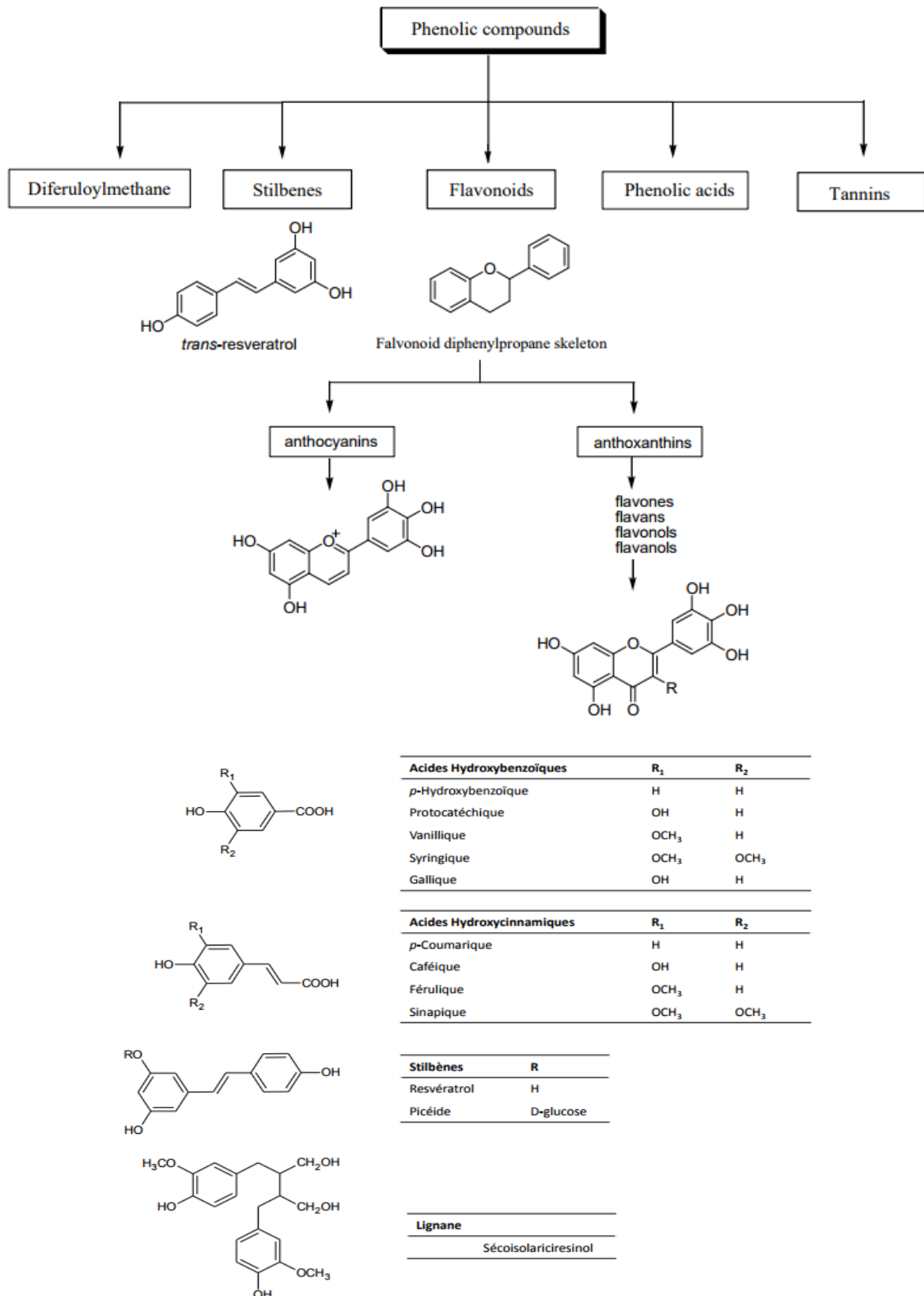


Figure 6. Classification des polyphénols (en haut) et structures des composés phénoliques non flavonoïques (en bas) (El Gharras, 2009).

L'acide caféique, à la fois libre et estérifié, est généralement l'acide phénolique le plus abondant et représente entre 75% et 100% de la teneur totale en acide hydroxycinnamique de la plupart des fruits. Les acides hydroxycinnamiques se trouvent dans toutes les parties du fruit, bien que les concentrations les plus élevées soient observées dans les parties extérieures des fruits mûrs. Les concentrations diminuent généralement au cours de la maturation, mais les quantités totales augmentent à mesure que le fruit augmente de taille.

L'acide férulique est l'acide hydroxycinnamique le plus abondant trouvé dans les céréales, qui constituent sa principale source alimentaire. Lorsqu'il est présent sous forme libre dans les tomates, il est efficacement absorbé (Bourne & Rice-Evans, 1998). Cependant, l'acide férulique est également le polyphénol principal présent dans les céréales, dans lequel il est estérifié en arabinoxylanes des parois cellulaires du grain. La teneur en acide férulique du grain de blé est de ~ 0,8-2 g/kg de poids sec, ce qui peut représenter jusqu'à 90% des polyphénols totaux (Sosulski *et al.*, 1982; Lempereur *et al.*, 1997). On le trouve principalement dans les parties extérieures du grain.

4.2. Les stilbènes

Ces composés se trouvent en très petite quantité dans notre alimentation. Le plus commun d'entre eux est le resvératrol qui a été considérablement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales (El Gharras, 2009).

4.3. Les lignanes

Les lignanes sont formés de deux unités de phénylpropane. Les céréales, les fruits et certains légumes contiennent également des traces de ces mêmes lignanes, mais les concentrations dans les graines de lin sont 1 000 fois plus élevées que les concentrations dans ces autres sources alimentaires (Adlercreutz & Mazur, 1997). Les lignanes sont métabolisés par la micro-flore intestinale. Ainsi, il existe sans doute d'autres lignanes d'origine végétale qui sont des précurseurs de l'entériodiol et de l'entérocolone et qui n'ont pas encore été identifiés (Heinonen *et al.*, 2001).

4.4. Les flavonoïdes

- **Les flavonols** : ce sont les flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine. Celle-ci est réputée de posséder un pouvoir antioxydant puissant en raison de sa structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres. A des concentrations de l'ordre de 15 à 30 mg/kg de matière fraîche, on les retrouve dans l'oignon, les brocolis, les poireaux et les myrtilles. La glycosylation avec un glucose ou un rhamnose est très fréquente ([Manach et al., 2004](#)).
- **Les flavones** : cette sous-classe se trouve être la moins abondante dans les fruits et légumes. Les flavones sont constitués principalement de lutéoline et apigénine glycosylés. Les seules denrées comestibles connues à ce jour qui en possèdent sont le persil et le céleri ([Manach et al., 2004](#)).
- **Les flavanones** : sont présents dans les tomates, la menthe, on les trouve aussi en quantités importantes dans le citron. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron. La position 7 est le siège de la glycosylation ([El Gharras, 2009](#)).
- **Les isoflavones** : les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, qui peuvent être glycosylés ou non. On les rencontre également dans les légumineuses ([El Gharras, 2009](#)).
- **Les flavanols** : ils existent soit sous forme de monomères (l'unité la plus simple est la catéchine) soit sous forme polymérique appelés les proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, mais le chocolat et le thé sont les principales sources de ce composé ([El Gharras, 2009](#)).
- **Les anthocyanes** : on retrouve ces pigments naturels dans les plantes vasculaires. Ils ont l'aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux ce qui leur confère des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Ils se caractérisent aussi par leur capacité anti-oxydante, plusieurs études sur leurs activités biologiques peuvent en témoigner ([Castaneda-Ovando et al., 2009](#)).

4.5. Biodisponibilité des polyphénols

Même si un composé a de fortes activités anti-oxydantes ou autres activités biologiques *in vitro*, il se peut qu'il ait une faible activité biologique *in vivo* si peu ou pas de composé atteint les tissus cibles. Les polyphénols les plus abondants de notre alimentation ne sont pas nécessairement ceux qui ont le meilleur profil de biodisponibilité. Par conséquent, il n'est pas seulement important de savoir à quel point un nutriment est présent dans des aliments spécifiques ou compléments diététiques, mais il est encore plus important de savoir à quel point il est biodisponible (D'Archivio *et al.*, 2010).

Le terme "biodisponibilité" a été utilisé à l'origine dans la pharmacologie pour définir le concept du "taux et la mesure dans laquelle un médicament atteint son site d'action". Bien que plusieurs définitions de la biodisponibilité aient été suggérées, la plus appropriée semble être la fraction d'un nutriment ingéré ou composé qui atteint la circulation systémique et les sites spécifiques, où il peut exercer son caractère ou action biologique (Porrini & Riso, 2008).

En d'autres termes, cela signifie simplement combien de quantité ingérée de polyphénols est capable d'exercer ses effets bénéfiques sur les tissus cibles.

La biodisponibilité varie largement parmi les polyphénols et, pour certains composés, parmi les sources alimentaires, selon la forme qu'ils contiennent. Les concentrations plasmatiques des métabolites totaux varient de 0 à 4 $\mu\text{moles/L}$ avec une prise de 50 mg d'aglycone équivalent (Manach *et al.*, 2005).

Les principaux facteurs qui influencent la biodisponibilité des polyphénols alimentaires chez l'homme sont indiqués dans le tableau 1, ci-dessous.

- Les polyphénols qui sont les mieux absorbés chez les humains sont les isoflavones, l'acide gallique, suivis des catéchines, les flavanones et les glucosides de quercétine, avec des cinétiques différentes.
- Les polyphénols les moins absorbés sont les proanthocyanidines, les catéchines du thé et les anthocyanines.

Les données pour d'autres polyphénols sont encore trop limitées. La cinétique plasmatique diffère entre les classes de polyphénols, avec une concentration maximale après 1,5 h ou 5,5 h selon le site d'absorption intestinale (Manach *et al.*, 2005).

L'excrétion urinaire relative est actuellement utilisée pour estimer le taux d'absorption minimal mais, lorsque les polyphénols sont fortement excrétés par la bile, comme pour l'EGCG et la génistéine, l'absorption est sous-estimée.

L'acide chlorogénique est surprenant, car ce composé doit être hydrolysé par la microflore avant absorption (dans la seule étude établie). Cependant, l'acide chlorogénique a été fourni en tant que liquide (café) à des volontaires à jeun, ce qui pourrait avoir accéléré la cinétique d'absorption (Nardini et al., 2002).

En ce qui concerne les demi-vies d'élimination, il semble que les catéchines, l'acide gallique et les flavanones n'ont aucune chance de s'accumuler dans le plasma avec une ingestion répétée. Certains de leurs métabolites peuvent avoir une demi-vie plus longue. Néanmoins, la quercétine, avec une plus longue demi-vie, pourrait s'accumuler dans le plasma avec une ingestion répétée (Manach et al., 2005).

Tableau 1. Principaux facteurs affectant la biodisponibilité des polyphénols alimentaires chez l'homme.

Facteurs externes	Les facteurs environnementaux (c'est-à-dire l'exposition au soleil, le degré de maturité); disponibilité alimentaire
Facteurs liés au traitement des aliments	Traitements thermiques; homogénéisation; lyophilisation; cuisson et méthodes de préparation culinaire; espace de rangement
Facteurs liés à l'alimentation	Matrice alimentaire; présence d'effecteurs positifs ou négatifs de l'absorption (c'est-à-dire la graisse, la fibre)
Interaction avec d'autres composés	Liaisons avec des protéines (c.-à-d. Albumine) ou avec des polyphénols avec un mécanisme d'absorption similaire
Facteurs liés aux polyphénols	Structure chimique; concentration dans les aliments; dose ingérée
Facteurs liés à l'hôte	Facteurs intestinaux (c'est-à-dire activité enzymatique, temps du transit intestinal; microflore colique). Facteurs systémiques (c.-à-d. genre et âge; troubles et / ou pathologies; la génétique; état physiologique)

PROBLEMATIQUE

Ceratonia siliqua L, communément appelée caroube, appartient à la famille de Leguminosae. La qualité nutritionnelle de la farine de caroube a encouragé son utilisation comme matériau additif alimentaire (Biner *et al.*, 2007). Les gousses de caroube ont traditionnellement été utilisées à des fins alimentaires animales et humaines, et les graines sont principalement utilisées pour l'extraction de la gomme. Les feuilles et les fruits de cette plante sont fréquemment utilisés pour guérir diverses maladies.

Plusieurs études ont été menées sur différentes parties du caroubier pour leur teneur en composés bioactifs, y compris les polyphénols, qui présentent des antioxydants (Ben Hsouna *et al.*, 2011), hypo-glycémiques (Mokhtari *et al.*, 2011), anxiolytiques-sédatifs (Avallone *et al.*, 2002), antimicrobiens (Aissani *et al.*, 2012) et les propriétés néphroprotectives (Ahmed, 2010). Les activités antitumorales et anti-prolifératives de l'extrait de gomme de caroube ont été largement étudiées; Klenow *et al.*, (2008) et Klenow & Gleib (2009) ont signalé que l'extrait aqueux de fibres de caroube inhibait la prolifération des lignées colorectales humaines (HT29 et LT97). Custódio *et al.* (2011) ont démontré que l'extrait de méthanol des pulpes de fruits de caroube réduisait la viabilité du cancer du sein (MDA-MB-231) et des lignées cellulaires du cancer du col de l'utérus (HeLa). Cependant, les propriétés anticancéreuses de l'extrait de feuille de caroube sont moins documentées. En effet, Custódio *et al.* (2011) ont observé que l'extrait de méthanol d'une feuille de caroube exerçait des activités cytotoxiques, antiprolifératives et anticancéreuses sur les cellules cancéreuses cervicales HeLa. En outre, Corsi *et al.* (2002) ont rapporté que la perfusion de feuille de caroube lyophilisée induit une apoptose dans la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire de souris (T1).

Étant donné que peu d'études ont porté sur l'effet inhibiteur des polyphénols de feuilles de caroube (CLP) sur le cancer colorectal, la présente étude a été conçue pour étudier l'activité anti-tumorale de CLP et pour caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels CLP a exercé son effet apoptotique et la phase d'arrêt du cycle cellulaire dans les lignées cellulaires colorectales.

Cette étude a pour but de valoriser le caroubier algérien sachant que c'est un arbre très répandu se caractérisant d'une variabilité génétique affectant sa teneur en polyphénols.

MATÉRIELS & MÉTHODES

1. Préparation du Matériel végétal

La plante *Ceratonia siliqua*, identifiée par le Pr Benabadji N (Laboratoire de Botanique, Université de Tlemcen), a été collectée dans la région de Nedroma (Tlemcen) au Nord-Ouest de l'Algérie. Les feuilles de la plante ont été séchées à l'ombre à température ambiante. Après cette opération, les feuilles ont été broyées et stockées dans des flacons en verre opaques.



Figure 7. Arbre du caroubier, feuilles du caroubier

2. Analyses Physicochimiques

2.1. Détermination du pourcentage d'humidité

La détermination du pourcentage d'humidité des feuilles de caroube a été réalisée par méthode d'étuvage (AOAC 950.01, 1990). Environ 2g de feuilles sont séchés par étuvage à 103°C pendant 3 heures (jusqu'à masse constante), puis refroidis pendant une heure au dessiccateur. La perte de masse observée à la suite de cet étuvage est alors assimilée à la masse d'eau contenue dans l'échantillon. Le taux d'humidité correspond à la moyenne des résultats des trois essais, exprimé en g d'eau/100g de feuilles.

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = [(P_2 - P_3) / (P_2 - P_1)] \times 100$$

P_1 : masse en g du vase de tare.

P₂ : masse en g du (vase de tare+échantillon) avant séchage.

P₃ : masse en g du (vase de tare+échantillon) après séchage.

2.2. Détermination quantitative des métabolites primaires

2.2.1. Dosage des sucres totaux par la méthode de [Dubois et al. \(1956\)](#)

Le dosage des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques par hydrolyse acide (l'acide sulfurique). L'analyse repose sur des techniques colorimétriques, dont le principe est basé sur la condensation par estérification d'un chromogène (Phénol) avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, 5- hydroxy-méthyl-furfural et de l'acide 5-formylfuroïque. Les chromophores ainsi formés de couleur jaune-orange absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité des sucres présents ([Ruiz, 2005](#)). La teneur en sucres est exprimée en µg/mL (converti en g/L) de α D+ Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe).

Mode opératoire

- 20 mL d'acide sulfurique (0,5 M) sont ajoutés à 0,5 g d'échantillon. L'ensemble est alors placé dans une étuve à 105°C pendant 3 h ;
- Le Becher contenant le mélange est ensuite transvasé dans une fiole et le volume est ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée. La solution ainsi obtenue est filtrée puis conservée à 4°C ;
- Des dilutions de 1/3 sont ensuite réalisées à partir de ce filtrat (3 essais) ;
- Dans des tubes en pyrex (Ø 2 cm), nous avons déposé avec précaution 1 mL de chaque essai, 1 mL de phénol à 5% et 5 mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 96% ;
- Après les avoir vortexés, les tubes ont été mis dans l'étuve pendant 5 min à 100°C, puis laissés dans l'obscurité pendant 30 min ;
- La densité optique a été lue à une longueur d'onde $\lambda = 490$ nm.

Expression des résultats

La teneur en sucres totaux est calculée à partir des densités optiques obtenues de l'échantillon analysé, en se référant à la courbe d'étalonnage.

2.2.2. Détermination de la teneur en lipides

Principe

L'extraction des lipides, des feuilles de caroube, a été réalisée dans un appareil type Soxhlet en présence d'un solvant organique (n-hexane). Après l'élimination de ce dernier par évaporation dans un rotavapeur, l'extrait obtenu représente la matière grasse contenue dans la prise d'essai. Dans le cadre de notre étude, nous avons évalué la teneur en huile selon la méthode [\(ISO 659, 1988\)](#).

L'échantillon à analyser subit un séchage à l'étuve à 40°C pendant 14 h et ce afin d'éliminer le reste d'humidité.

Mode opératoire

- Environ 5g d'échantillon à analyser sont placés dans une cartouche à extraction.
 - Un ballon préalablement séché dans une étuve, puis refroidi dans un dessiccateur, est pesé à 1mg près (m_i).
 - La cartouche contenant la prise d'essai, est placée dans l'appareil à extraction, puis la quantité nécessaire de solvant est versée dans le ballon.
 - Le ballon est alors adapté à l'appareil à extraction sur une plaque chauffante et le chauffage est conduit dans des conditions telles que le débit du reflux soit d'au moins trois gouttes par seconde (ébullition modérée, non tumultueuse).
-
- **Première extraction:** Après une extraction d'une durée de 4 h puis refroidissement, la cartouche est enlevée de l'appareil à extraction puis placée dans un courant d'air afin d'éliminer la majeure partie du solvant résiduel.
 - **Deuxième extraction:** Le contenu de la cartouche est broyé, puis replacé dans la cartouche, d'une façon à récupérer toutes les particules résiduelles dans le broyeur. La cartouche est ensuite remise dans l'appareil à extraction. Après une extraction de 2 h et refroidissement, la cartouche est enlevée de l'appareil à extraction et le solvant est éliminé puis le broyage est répété comme décrit ci-dessus.
 - **Troisième extraction:** L'échantillon est replacé dans la cartouche, en récupérant sa totalité comme précédemment puis la cartouche est remise dans l'appareil à extraction. Une troisième extraction est procédée comme décrit précédemment pendant 2 h, en utilisant le même ballon.

- **Elimination du solvant et pesée de l'extrait:** par distillation sur évaporateur rotatif, la majeure partie du solvant contenu dans le ballon est éliminée. Les dernières traces de solvant sont chassées en chauffant le ballon durant environ 30 à 60 min dans l'étuve réglée à $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ à la pression atmosphérique. Après refroidissement du ballon dans le dessiccateur jusqu'à la température ambiante et pendant au moins 1 h, il est pesé à 1 mg près. Un deuxième chauffage est ensuite effectué pendant 20 à 30 min dans les mêmes conditions, suivi d'un refroidissement et d'une pesée. La différence entre les deux pesées ne doit pas dépasser 5 mg, si ce n'est pas le cas, les opérations de chauffage, de refroidissement et de pesée sont répétées jusqu'à ce que la différence entre deux pesées successives ne dépasse pas 5 mg. La masse finale du ballon est m_f .

Expression des résultats

La teneur en huile, exprimée en pourcentage de masse du produit est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en huile (\%)} = [(m_f - m_i) / m_e] \times 100$$

m_f : masse finale du ballon.

m_i : masse du ballon vide .

m_e : masse initiale de l'échantillon à analyser.

2.2.3. Détermination de la teneur en fibres brutes (AOAC, 1993)

Elle est réalisée par la méthode de **Henneberg et Stohmann (1860)** appelée aussi la méthode **Weende** en utilisant un extracteur de fibres brutes **FIWE-VELP SCIENTIFICA**.

Principe

Une solution d'hydroxyde de sodium permet de solubiliser les hémicelluloses, alors que l'acide sulfurique hydrolyse la cellulose, en laissant la lignine sous forme de résidu poudreux brun-noir. La procédure analytique suivante a été appliquée :

- Les solutions d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 1,25 % et d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1,25 % ont été préparées.
- 1 g environ d'échantillon a été broyé et pesé avec une précision de 1 mg (P_0).

- Les creusets contenant l'échantillon ont été placés dans l'extracteur des fibres.
- 150 mL d'acide sulfurique à 1,25% ont été alors ajoutés dans la colonne, après préchauffage de cette solution afin de réduire le temps nécessaire à l'ébullition.
- Après l'ajout de 3 à 5 gouttes de n-octanol (agent anti-moussant), nous avons laissé bouillir pendant exactement 30 min à partir du début de l'ébullition.
- L'acide sulfurique a été évacué.
- Les creusets ont été lavés trois fois avec 30 mL d'eau distillée chaude, en connectant à chaque fois l'air comprimé pour mélanger le contenu des creusets.
- Après avoir vidangé le dernier lavage, 150 mL d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1,25% préchauffé et 3 à 5 gouttes d'agent anti-moussant (n-octanol) ont été ajoutées. Nous avons ensuite laissé bouillir l'ensemble pendant 30 min.
- Après évacuation de la solution de KOH, le résidu a été lavé 3 fois avec 30 mL d'eau distillée chaude, en le reliant chaque fois à de l'air comprimé pour remuer le contenu du creuset.
- Le dernier lavage a été effectué avec de l'eau distillée froide pour permettre aux creusets de refroidir, puis le contenu des creusets a été lavé trois fois avec 25 mL d'acétone, en ayant mélangé à chaque fois à l'aide de l'air comprimé.
- Après avoir retiré les creusets, on a déterminé le poids sec après séchage dans un four à 105°C pendant une heure ou jusqu'à obtention d'un poids constant (P_1). Ce poids représente les fibres brutes plus la teneur en cendres en comparaison avec le poids initial.
- Les creusets ont été placés dans un four à moufle à 550°C pendant 3 h et repesés après refroidissement dans un dessiccateur.
- Le résidu restant dans les creusets est pesé (P_2).
- La différence des poids représente le contenu en fibres brutes, sans les cendres, en comparaison avec l'étape précédente.

Expression des résultats

La teneur des fibres brutes est calculée par la formule présentée ci-dessous :

$$\text{Fibres brutes (\%)} = (P_1 - P_2) / P_0 \times 100$$

P_0 : poids de l'échantillon à analyser.

P_1 : poids des creusets + l'échantillon avant l'incinération.

P_2 : poids des creusets + l'échantillon après l'incinération.

2.2.4. Détermination de la teneur en cendres (Audigié *et al.*, 1980)

Principe

Les cendres totales sont le résidu de composés minéraux qui reste après incinération d'un échantillon contenant des substances organiques d'origine animale, végétale ou synthétique. Il consiste en une incinération dans un four à moufle, dans des creusets en porcelaine, à une température de 750°C jusqu'à ce que les résidus deviennent blancs après refroidissement.

Mode opératoire

- Une pré-incinération des creusets en porcelaine a été effectuée à 300°C pendant 15 min.
- Après refroidissement, les creusets ont été pesés vides (P_1) puis avec 1 g d'échantillon (P_2).
- L'ensemble a été ensuite introduit dans un four à moufle réglé à 750°C jusqu'à ce que le contenu ait pris une couleur blanche grisâtre qui, après refroidissement dans un dessiccateur, devient uniquement blanchâtre.
- Une dernière pesée des creusets (P_3) a été enfin réalisée.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$\text{Cendres (\%)} = [(P_2 - P_3) / (P_2 - P_1)] \times 100$$

P_1 : poids du creuset vide.

P_2 : poids du creuset + l'échantillon avant incinération.

P_3 : poids du creuset + l'échantillon après incinération.

3. Dosage des métabolites secondaires et évaluation du pouvoir antioxydant

3.1. Extraction des composés phénoliques (Jimoh *et al.*, 2010)

Mode opératoire:

Afin d'obtenir trois extraits: aqueux, acétonique et méthanolique, un procédé d'extraction des échantillons a été effectué comme suit:

- L'échantillon (2g) a été macéré dans 40 mL de chaque solvant d'extraction (eau, acétone ou méthanol) avec un rapport de (7/7/6) respectivement, la solution a été maintenue sous agitation pendant 2 h;
- Le mélange a été centrifugé ;
- Le surnageant a été récupéré, et l'échantillon a été extrait pour une seconde fois, avec 40 mL du solvant d'extraction;
- La solution a été centrifugée (surnageant b) ;
- Les deux surnageants (a+b) ont été réunis et évaporés avec un rotavapeur jusqu'à élimination de la phase organique ;
- La phase aqueuse ainsi récupérée ,a été extraite avec du n-hexane, afin d'éliminer les lipides ;
- La phase aqueuse a été évaporée à sec, à température réduite de 40 à 45°C, à l'aide d'un rotavapeur;
- Les résidus obtenus ont été récupérés dans 6mL de méthanol.

3.2. Dosage colorimétrique des polyphénols totaux: méthode de Folin-Ciocalteu (1927)

Principe

Ce dosage repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphomolybdique. Lorsqu'il y a une oxydation des phénols, ce réactif est réduit en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux des composés phénoliques oxydés. Cette coloration est mesurée au spectrophotomètre en utilisant l'acide gallique comme étalon (Brune *et al.* 1991 ; Dendougui, 2010).

Mode opératoire

Les polyphénols sont dosés par colorimétrie comme suit:

- A 500 μL de l'extrait, nous avons ajouté: 2500 μL du réactif Folin 10 fois dilué puis 2000 μL de Na_2CO_3 à 7,5%;
- Le mélange a été bien agité puis incubé à l'obscurité pendant 1h à 20°C;
- La lecture de l'absorbance des différentes concentrations, a été faite contre un blanc, à 765 nm par un spectrophotomètre.

* Une gamme d'étalonnage qui consiste à lire les absorbances des différentes concentrations d'acide gallique a été préparée comme suit:

- Une solution mère d'acide gallique de concentration 0,3 mg/mL a été préparée;
- A partir de cette solution mère, les dilutions filles suivantes ont été préparées: 0,21 - 0,15 - 0,105 - 0,075 - 0,06 - 0,045 - 0,024 mg/mL.
- 500 μL de chaque dilution fille, ainsi la solution mère, ont été traités en suivant la même procédure décrite ci-dessus pour l'échantillon.

Expression des résultats

A partir des densités optiques obtenues, nous avons pu déduire la teneur en polyphénols dans l'échantillon selon l'équation suivante:

$$\text{Abs} = 8,5529 C + 0,0566$$

Où: Abs: absorbance,

C: la concentration des phénols totaux rapportés à l'acide gallique en mg/mL.

3.3. Dosage colorimétrique des flavonoïdes

Principe

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes, la soude forme ensuite un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm ([Ardestani & Yazdanparast, 2007](#)).

Mode opératoire : Les flavonoïdes totaux sont dosés par colorimétrie comme suit:

- 700µL d'extrait sont mis dans des tubes, auquel est ajouté 2 mL d'eau distillée, puis 150 µL NaNO₂ à 15%;
- Après deux intervalles consécutifs de 6 min, 150µL (AlCl₃, 6H₂O) à 10%, puis 2000 µL NaOH à 4 % ont été rajoutés;
- Les tubes sont incubés pendant 15 min à température ambiante;
- La lecture de l'absorbance des différentes concentrations, est faite contre un blanc, à 510 nm dans un spectrophotomètre, UV-Vis modèle Agilent Technologies Cary 60.

* La courbe d'étalonnage a été établie comme suit:

- Une solution mère méthanolique de catéchine à 0.4 mg/mL a été préparée;
- Les dilutions filles suivantes ont été préparées : 0,36 - 0,28 - 0,2 - 0,12 - 0,08 - 0,04 mg/mL;
- 700 µL de chaque concentration ont été traités avec la même procédure décrite ci-dessus pour l'échantillon.

Expression des résultats : A partir des densités optiques obtenues, nous avons pu déduire la teneur en polyphénols dans l'échantillon selon l'équation suivante:

$$\text{Abs} = 3,9144 C + 0,0142$$

Où: Abs: absorbance.

C: la concentration des flavonoïdes rapportée à la catéchine en mg/mL.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg CEQ/g).

3.4. Extraction des tanins condensés

200 mg de matériel végétal broyé, ont été mis en présence de 10 mL de MeOH absolu dans un tube à essai. L'ensemble a été vortexé pendant 20 min. Après avoir centrifugé, la solution à 3000 g pendant 10 min, le surnageant a été récupéré (Butler & Brotherton, 1982).

Dosage des tanins condensés

400 µL de l'extrait sont ajoutés à 600 µL d'acide acétique glacial. Ajouter ensuite 5 mL du « working reagent » aux échantillons de sorte à mettre un intervalle de 1 min entre un

échantillon et le suivant. Incuber dans le bain à 30°C pendant 20 min. Lire l'absorbance à 510 nm (Butler & Brotherton, 1982).

3.5. Evaluation du pouvoir antioxydant par le DPPH

Principe

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est pratiquement le radical libre le plus stable. En solution (le méthanol ou l'éthanol), le DPPH est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 à 517nm. En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle (forme d'hydrazine). Ce passage de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance (DO), qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH (fig. 8).

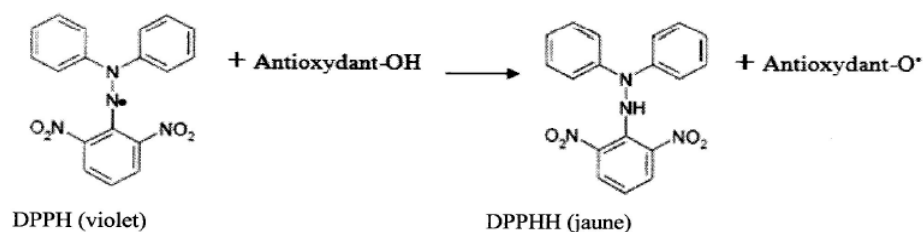


Figure 8. Principe de réduction du radical DPPH.

Conventionnellement une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydante (Lee et al., 2004).

Mode opératoire

- 50 μ L de chaque solution méthanolique des différents extraits (extrait des polyphénols, n-butanol et acétate d'éthyle pour l'extrait des flavonoïdes) à différentes concentrations, sont ajoutés à 1950 μ L d'une solution méthanolique de DPPH à 0,004 g/100mL. Pour chaque solution, un blanc a été préparé suivant sa concentration.
- Pour le contrôle négatif, il a été préparé parallèlement en mélangeant 50 μ L de méthanol avec 1950 μ L de la solution de DPPH utilisée.
- Les tubes ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante, la lecture des différentes concentrations, a été effectuée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 515 nm.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés selon la formule qui suit (Yen et Duh, 1994) :

$$\% \text{ du DPPH} = (\text{DO}_{\text{Contrôle (0)}} - \text{DO}_{\text{Echantillon (t)}}) / \text{DO}_{\text{Contrôle (0)}} \times 100$$

% du DPPH : pourcentage de réduction ou d'inhibition du DPPH.

DO_{Contrôle (0)} : densité optique du contrôle à t = 0 min.

DO_{Echantillon (t)} : densité optique de l'antioxydant à t = 30 min.

A partir de la variation du pourcentage de réduction de DPPH, en fonction de la concentration de l'extrait phénolique, nous pourrions déterminer graphiquement l'EC₅₀ qui est définie comme étant la concentration de l'antioxydant (l'extrait ou composé) nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du DPPH.

3.6. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Le protocole expérimental suivi est celui de Karagözler *et al.*, 2008.

1 mL de l'échantillon à différentes concentrations (concentrations initiales : 0,1mg/mL, 0,25mg/mL et 0,75mg/mL), est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10%, sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. 2,5 mL du surnageant sont ajoutés à 2,5 mL d'eau distillée et 500 µL d'une solution de chlorure du fer (FeCl₃, 6H₂O) à 0,1% sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies, et dans les mêmes conditions expérimentales.

Expression des résultats :

Pour explorer les résultats obtenus, les graphes en fonction de l'absorbance des extraits, sont tracés en fonction des différentes concentrations utilisées.

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

4. Effet anti-cancéreux de l'extrait polyphénolique des feuilles de *Ceratonia siliqua*

4.1. Culture cellulaire et traitements

Les lignées cellulaires utilisées sont trois lignées de cellules cancéreuses coliques humaines: HCT-116, HT-29 et SW-480 et une lignée cellulaire murine CT-26 provenant toutes de l'American Type Culture Collection (ATCC).

Les milieux de cultures utilisées pour l'entretien :

- **Pour HCT-116 et CT-26** : DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) à 4,5 g/L de Glucose, 2mM de L-Glutamine (Dutsher), supplémenté en antibiotiques (pénicilline 100U/mL ; Streptomycine 100µg/mL (Dutsher), ainsi que 6% de SVF (sérum de Veau foetal).

- **Pour HT-29 et SW-480**: DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) à 4,5 g/L de Glucose, 2mM de L-Glutamine (Dutsher), supplémenté en antibiotiques (pénicilline 100U/mL ; Streptomycine 100µg/mL (Dutsher), ainsi que 10% de SVF (sérum de Veau foetal).

Les lignées sont cultivées dans un incubateur sous atmosphère contrôlée à 37°C et à 5% CO₂. Le passage des cellules est réalisé, lorsqu'elles sont à 80% de confluence, ce qui représente environ 2 à 3 passages par semaine.

Pour cela, les cellules sont lavées avec du tampon PBS sans calcium et sans magnésium stérile (Dutsher) puis recouvertes de 1 mL de trypsine/EDTA (Dutsher) avant d'être placées à 37°C pendant 5 minutes. L'arrêt de la trypsination est effectué par l'ajout d'un grand volume de milieu complet (12 mL environ). Les cellules sont ensuite réensemencées à une dilution de 1 :10 pour les différentes lignées cellulaires.

4.2. Traitements CLP, GA, *m*-CA et 5-FU

Pour préparer une solution mère de CLP 10mg/mL, l'extrait a été réduit à sec sous azote avant d'être repris avec le volume nécessaire de PBS.

L'acide *m*-coumarique (*m*-CA) et le 5-fluorouracil (5-FU) utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich. La solution de (*m*-CA) est préparée dans du PBS selon les concentrations voulues. Le 5-FU (2,5 µM) est préparé dans du DMEM.

4.3. Traitements avec inhibiteur

L'inhibiteur des capases (FMK-ZVAD) provient de chez (Sigma). L'inhibiteur est conservé à -20°C, dilué dans du DMSO, utilisé à une concentration finale de 50 µM (ZVAD).

Le traitement avec CLP est réalisé 1h après l'ajout de l'inhibiteur.

4.4. Mesure de la prolifération cellulaire et viabilité

La viabilité cellulaire est évaluée par comptage au bleu Trypan au microscope à contraste de phase après 24 h d'incubation sous atmosphère humide à 95% d'air et 5% CO₂. Les cellules qui excluent le bleu Trypan sont considérées comme viables. Les cellules sontensemencées en plaque 24 puits à raison de 30 000 cellules par puits, puis traitées à des concentrations croissantes de CLP (de 0 à 100 µg/mL). Les cellules adhérentes ont ensuite été trypsinées, et diluées dans une solution de bleu Trypan à 0,5%. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez.

4.5. Evaluation de l'apoptose par marquage Annexin V et 7AAD

Environ 200 000 cellules ont étéensemencées dans une plaque à 6 puits. Après 24 h, le milieu a été changé et les cellules :

HCT-116 et CT-26 ont été :

- pré-incubées ou non avec N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluorométhylcétone 50 µM (z-VAD-fmk) pendant 1 h, puis traitées pendant 24 h avec CLP (20 µg/mL),
- traitées avec différents traitements CLP (10 µg/mL et 20 µg/mL), (acide gallique 460 µM), m-CA (10 mM), (5-FU, 10 µM) ;
- traitées en combinaison avec du 5-fluorouracile (5-FU, 10 µM): CLP (10 µg / mL et 20 µg / mL), (acide gallique 460 µM), m-CA (10 mM).

De même, HT-29 et SW-480 ont également été traitées pendant 24h avec différents traitements combinés ou non avec du 5-fluorouracile (5-FU, 10 µM): CLP (10 µg / mL et 20 µg / mL) et GA (460 µM).

Les cellules flottantes et adhérentes, celles-ci ont été détachées avec la trypsine, ont été récupérées dans des tubes Falcon de 15mL, lavées puis centrifugées deux fois avec du PBS froid pendant 5 min à 1500xg. Par la suite, le surnageant a été éliminé et la mort cellulaire a été déterminée, par marquage à APC-Annexine V et un intercalant de l'ADN 7-amino-

actinomycine D (7-AAD), avec le Kit de Détection d'Apoptose APC-Annexine V de BioLegend, selon les recommandations de la fabrication. Les cellules ont été incubées dans la solution de marquage (pour chaque tube contenant 200µL de tampon (binding buffer) sont ajoutés 4µL d'annexin V et 3µL de 7AAD) pendant 20 minutes, à température ambiante à l'obscurité, avant l'analyse par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson) ; le traitement des cytogrammes a été réalisé par le logiciel FlowJo version 10 (Tree Star).

Les cellules uniquement marquées à l'Annexin V (AnV+/7AAD-) sont considérées comme étant en stade précoce de l'apoptose. Les cellules doublement marquées à l'Annexin V et 7AAD (AnV+/7AAD+) sont au stade tardif de l'apoptose et enfin les cellules uniquement marquées au 7AAD (AnV-/7AAD+) sont les cellules en nécrose.

4.6 Mesure de l'activité caspase-3/7

L'analyse de l'activité caspase-3/7 est évaluée avec le kit FAM-FLICATM caspase 3/7 assay (Immunochemistry Technologies), selon les recommandations du fabricant. Le kit utilise le substrat de la caspase-3/7 LETD-FMK, conjugué au FITC qui se lie à la caspase-3/7 active dans les cellules apoptotiques.

Les cellules flottantes et adhérentes sont collectées et culotées par centrifugation à 400g pendant 5 min. Le culot est repris avec 500µL de milieu de culture, auquel est ajouté 2µL de FLICA. Après une incubation d'une heure à 37°C (agitation toutes les 20 minutes), les cellules sont lavées 2 fois et passées au cytomètre en flux.

4.7. Western Blotting

Le western-blot comprend trois principales étapes qui sont réalisées comme suit :

4.7.1. Extraction des protéines

Les cellules HCT-116 et CT-26 ont étéensemencées dans des boîtes de 100 mm² à raison de 2 x 10⁶ par boîte. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été traitées avec CLP (20 µg/mL) pendant 24 h. Les cellules flottantes sont récupérées dans des tubes Eppendorf et centrifugées, le surnageant est éliminé, puis le culot de cellules est lavé avec de PBS froid et centrifugé à 800 g pendant 5 min à 4°C.

Les cellules adhérentes sont lavées 2 fois avec du PBS à 4°C, puis incubées pendant 30 min à 4 °C avec 200 µL de tampon de lyse : le tampon RIPA (Tris-base 1 M pH 7,4, NaCl 5 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%) supplémenté en DTT (1 mM), PMSF (1 mM), antiphosphatases (P5726, Sigma) et anti-protéases (065K4070, Sigma). Les cellules sont ensuite raclées avec un Rubber Policeman.

Les cellules adhérentes ainsi que flottantes, sont récupérées dans des tubes à 15 mL, puis passées à l'aiguille (25 G) et incubées dans la glace pendant 15 min. Les débris cellulaires sont culotés par une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C, et le surnageant contenant les protéines est récupéré puis stocké à -80°C.

Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode BCA. Les protéines réduisent le Cu^{2+} en Cu^{1+} en milieu alcalin, or le BCA est un réactif spécifique du Cu^{1+} formant un complexe pourpre ayant une absorption maximale à 570 nm, *l'absorbance étant proportionnelle à la concentration de protéines.*

Afin de déposer la même quantité sur le gel de séparation, un dosage des protéines dans chaque lysat est indispensable. Les échantillons en triplicata sont ajoutés au réactif BCA/ Cu^{2+} (Sigma), avec un rapport 50 :1, le tout est incubé à 37°C pendant 30 min. La plaque de 96 puits, est lue au spectrophotomètre à 570 nm avec le logiciel MRX Revelation.

Après avoir déterminé la concentration en protéines des échantillons, à partir de la gamme étalon réalisée avec de l'albumine (Bovine Serum Albumine, BSA), ceux-ci sont dilués afin d'obtenir une concentration finale de 1 µg/µL dans un volume final de 200 µL, dont 30 µL de tampon de charge (Composition du Tampon de charge 5X : 10% (p/v) SDS (sodium dodécylsulfate), 40% (v/v) Glycérol, 25% (v/v) Tris 1M pH=6,8, 20% (v/v) β-mercaproéthanol, 0,005% (p/v) Bleu de Bromophénol).

4.7.2. Migration et transfert

Afin de dénaturer les protéines, chaque échantillon est traité thermiquement à 95°C pendant 5 minutes, puis déposé sur un gel d'acrylamide/ bisacrylamide 10 % contenant du SDS 0,1%. La migration est effectuée dans un tampon Tris-glycine (Tris 72 mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1%),

Environ 80 µg de protéines, additionnés de tampon de charge coloré (Tris-HCl 0,03 M pH 6.8 ; DTT 0,05 M ; glycérol 8% ; bleu de bromophénol 0,05% ; SDS 2% ; β- mercapto-éthanol 2,5%), sont dénaturés 3 minutes à 95°C, puis déposés sur un gel d'acrylamide/

bisacrylamide à 8% contenant du SDS 0,1%. La migration est effectuée dans un tampon Tris-glycine (Tris 72 mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1%), puis le gel est transféré sur une membrane PVDF (Polyfluorure de vinylidène, Perkin Elmer) dans un tampon Tris-glycine.

L'étape de migration des protéines s'est déroulée comme suit :

- Le gel de séparation à 10 %, le gel de concentration à 5% ainsi que le gel de blocage sont préparés selon le tableau 2. Ces gels sont coulés et placés délicatement dans la cuve d'électrophorèse.

Tableau 2. Compositions des gels de migration

	Blocage (x4)	Séparation 10% (x4)	Concentration 5% (x4)
40 % Acrylamide/Bis	1 mL	5 mL	1,61 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	3,125 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	5 mL	-
10% SDS	-	200 µL	125 µL
Eau bidistillée	1 mL	9,7 mL	7,95 mL
TMED	10 µL	10 µL	12,5 µL
10 % APS	50 µL	100 µL	125 µL

- La cuve d'électrophorèse a été remplie par la solution de migration.

- 80 µg de lysat protéique sont déposés soigneusement dans chaque puits en mettant dans le premier puits un marqueur de taille.

- La migration peut commencer, une fois que la cuve est connectée au courant électrique à 80 V. Après que les échantillons protéiques forment une ligne droite entre le gel de concentration et le gel de séparation, le voltage peut être augmenté à 110 V et les protéines peuvent migrer aisément jusqu'à ce que la séparation soit complètement atteinte.

Lorsque le temps de migration est terminé, chaque gel est transposé sur une membrane de PVDF, l'ensemble est renfermé dans ce qu'on appelle une cassette, ensuite les protéines sont transférées électriquement à l'aide du tampon de transfert à 300 mA pendant 75 min à 4°C.

4.7.3. Immunoblotting et révélation

Les membranes ainsi obtenues sont saturées pendant 1 h à température ambiante dans un tampon salin TBS-T (TBS 1X ; Tween-20 0,1%) contenant 5% de BSA. Durant cette étape, les protéines dans la solution de BSA se lient à la membrane dans tous les sites non-occupés par la protéine-cible. Lorsque les anticorps sont appliqués lors de l'étape suivante, ils vont donc s'attacher uniquement sur les sites de liaison de la protéine-cible, ce qui réduit le bruit de fond.

Après l'incubation, trois lavages de 5 min chacun, par du TBS-T sont effectués pour éliminer l'excès du BSA. Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires **(Annexe)** dilués dans du TBS-T, 2,5% BSA pendant une nuitée à 4°C. Les membranes sont lavées quatre fois avec du TBS-T pendant 5 min sous agitation, à température ambiante. Les membranes sont par la suite incubées avec les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase pendant 1 h à température ambiante. Les membranes sont lavées quatre fois avec du TBS-T puis deux fois avec du TBS pendant 5 min sous agitation à température ambiante.

La protéine d'intérêt (sondes marquées) est détectée grâce à la technique de la chimiluminescence amplifiée (Enhanced Chemiluminescence) ECL fourni par Clarity™, Western ECL Substrat, Biorad, à l'obscurité et exposés grâce à une station d'acquisition d'image (Chemi-Doc MPImager Station, Biorad).

4.7.4. Stripping des membranes

Une membrane peut être réutilisée pour plusieurs marquages, à condition d'éliminer les anticorps attachés, en utilisant la solution d'arrachage d'anticorps « Stripping Buffer ». Tout d'abord, la membrane est lavée par du TBS-T trois fois pendant 5 minutes à température ambiante, pour éliminer le reste du réactif de chemiluminescence, ensuite par de l'eau distillée pendant 5 min pour éliminer le TBS-T.

La membrane est introduite avec la solution d'arrachage d'anticorps (stripping solution), deux fois pendant 10 min à température ambiante. Après, trois lavages au TBS pendant 5 min et pareillement avec du TBS-T aussi, la membrane est prête pour être utilisée une autre fois après saturation à 5 % de BSA.

Il est à noter que la β -actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences du fait que, sa concentration est la même au niveau de toutes les cellules (contrôle interne).

4.8. Analyse du cycle cellulaire par Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est utilisée pour déterminer la distribution des cellules coliques dans le cycle cellulaire. Les cellules HCT-116 et CT-26 ont étéensemencées au préalable pendant 24h à raison de 120 000 cellules/ puits dans une plaque à 6 puits. Après traitements durant 24h avec les différents traitements : (combinés ou non avec du 5-fluorouracile (5-FU, 10 μ M): CLP (10 μ g/mL et 20 μ g/mL), (acide gallique 460 μ M), *m*-CA (10 mM), les cellules sont lavées (centrifugation 405 g, 5min, 4°C) et resuspendues dans 100 μ L de PBS.

La fixation des cellules a été alors réalisée en ajoutant au goutte à goutte 2 fois 1 mL d'une solution d'éthanol à 70% froid (-20°C) tout en vortexant, puis les cellules ont été mises à incuber pendant une nuitée à -20°C. Passé ce délai, les cellules ont été centrifugées (405g, 5 min, 4°C) et le culot cellulaire a été repris par 1 mL de PBS supplémenté de 100 μ g/mL de RNase (Euromedex, France) et 10 μ g/mL de marqueur fluorescent d'iodure de propidium (Immunochemistry, USA), puis on a laissé incuber à l'obscurité pendant 1 heure à 37°C avant le passage des tubes au cytomètre. Le contenu en ADN des cellules a été évalué par cytométrie sur FACSCalibur (Becton Dickinson), et les données ont été analysées en utilisant la version 3.3.11 du logiciel ModFit LT.

4.9. Expérimentation animale

L'expérimentation *in vivo* a été réalisée sur des souris Balb/c, ces dernières ont été élevées et maintenues selon les consignes du comité d'éthiques pour l'expérimentation animale de l'Université de Bourgogne, Dijon, France. Antérieurement aux expérimentations, les animaux ont été habitués aux conditions de l'animalerie pendant au minimum une semaine.

Afin de provoquer la formation de tumeurs, 300 000 cellules de cancer du côlon de souris CT-26 ont été injectées en sous-cutanée à des souris Balb/c mâles. Les souris ont été réparties par la suite en deux groupes, le premier (06 souris) recevant le régime standard et l'eau de robinet, le second (06 souris) recevant le même régime standard mais l'infusion de feuilles de Caroube en remplacement de l'eau de boisson.

Les tumeurs palpables des souris ont été mesurées trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse, et ce, jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ainsi, La surface des tumeurs est calculée comme suit : (longueur x largeur). Après plus de trois semaines d'expérimentation, les souris ont été sacrifiées par translocation cervicale.

4.10. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type (écart-type d'erreur) pour un nombre donné d'expériences (n). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica (version 4.1, Statsoft, Paris, France). La significativité des différences entre les valeurs moyennes a été déterminée par ANOVA à sens unique, suivie du test de différence la plus faible (LSD) de Fisher. Les différences avec $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

RÉSULTATS & DISCUSSION

Résultats

1. Métabolites primaires et secondaires

La composition phyto-chimique des feuilles de caroube est présentée dans le tableau ci-dessus :

Tableau 3. Composition phyto-chimique des feuilles de caroube

Composition en métabolites primaires	Pourcentages
Teneur en eau	12,38%
Matières grasses	4,45%
Cendres	4,608%
Sucres	5,541%
Fibres brutes	11,77%
Composition en métabolites secondaires	mg/g
Polyphénols en équivalent acide gallique	6,88 mg/g à 11,55 mg/g
Flavonoïdes en équivalent catéchines (phase acétate d'éthyle)	1,056 mg/g
Flavonoïdes en équivalent catéchines (phase n-butanol)	1,132 mg/g
Tanins condensés en équivalent catéchine	6,61 mg/g

2. Teneur en Polyphénols et pouvoir antioxydant

L'extraction des polyphénols par les solvants méthanol/acétone/eau selon les proportions 7/7/6 a permis d'obtenir un extrait vert, et ce, en macérant (deux fois) 2g de poudre des feuilles de *C. siliqua* dans 40 mL de mélange de solvant. La teneur en polyphénols dans les extraits de feuilles de caroube a ensuite été estimée à 9,215 mg équivalent d'acide gallique/g de matière sèche (**voir annexe**), en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu.

L'estimation quantitative des flavonoïdes, en utilisant la méthode du trichlorure d'aluminium, a montré que cet extrait est riche en flavonoïdes avec un taux estimé à 1,056 mg équivalent de catéchine/g de matière sèche de l'extrait en phase d'acétate d'éthyle et 1,132 mg équivalent de catéchine/g de matière sèche en phase n-butanol (Tableau 2).

La teneur en tanins condensés a été estimée à 6,61 mg équivalent de catéchine/g de matière sèche.

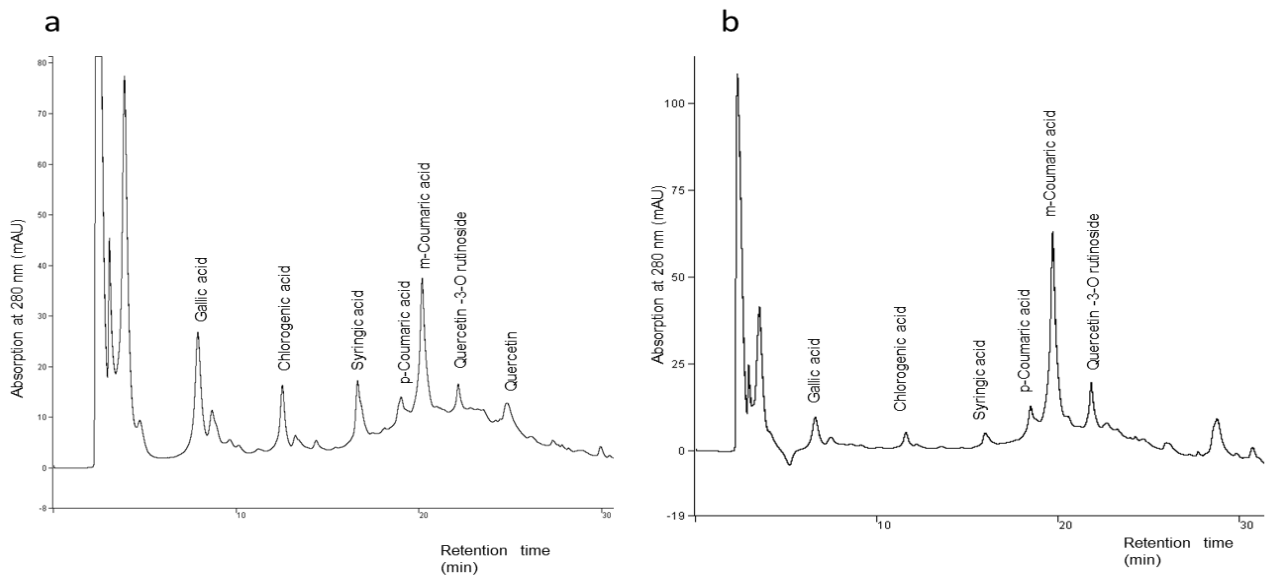


Figure 9. Pics représentatifs des différents composants de l'extrait de polyphénols (a) et de l'infusion (b) de feuilles de caroube

L'analyse HPLC (**Fig. 9**) a montré que les feuilles de caroube contiennent des teneurs relativement élevées en acide *m*-coumarique et acide gallique 2192,37 et 1445,37 $\mu\text{g/g}$ de matière sèche, respectivement (Tableau 4).

Tableau 4. Composition en composés phénoliques des feuilles de caroube

Composés phénoliques	CLP $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de feuilles	Infusion $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de feuilles
Acide gallique	1445,377	166,872
Acide chlorogénique	834,9131	44,499
Acide syringique	1216,493	97,342
Acide <i>p</i> -coumarique	1197,841	266,996
Acide <i>m</i> -coumarique	2192,378	1423,980
Quercétine 3-O-rutinoside	1159,291	250,309
Quercétine	1168,708	-

Pouvoir antioxydant par le test de DPPH

L'activité antioxydante de nos extraits exprimée en EC_{50} a été déterminée graphiquement. Elle est définie comme étant la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du DPPH en solution. Selon la courbe de

régression linéaire, l'EC50 des polyphénols CLP a été estimé à 0,001 mg/mL (**Figure 10**) ce qui confirme que les extraits de polyphénols de feuilles de caroube ont un pouvoir antioxydant puissant. Le même effet a été constaté, pour les extraits de flavonoïdes avec des EC50 de 0,0006 mg/mL et 0,0014 mg/mL pour les phases acétate d'éthyle et n-Butanol respectivement. Ces valeurs sont nettement inférieures aux antioxydants de référence BHA (EC50 = 0,0227 mg/mL) et BHT (EC50 = 0,0255 mg/mL).

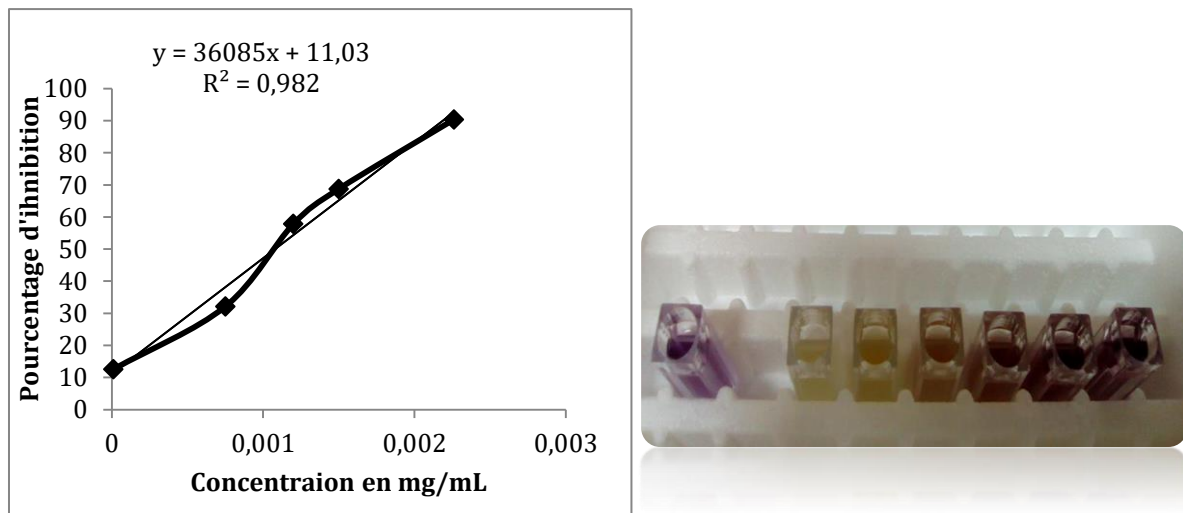


Figure 10. (à gauche) courbe d'inhibition par le radical de piégeage de radicaux libre DPPH des polyphénols CLP, (à droite) photo montrant une gamme de couleurs du mauve foncé au jaune clair selon les concentrations des extraits de CLP et leur capacité à piéger le radical libre de DPPH.

Pouvoir antioxydant par le test de FRAP

Le pouvoir réducteur des trois extraits est mesuré en fonction de leur absorbance, à partir de la courbe d'acide ascorbique. Les valeurs présentées dans la **fig. 11**, montrent le pouvoir réducteur de ces trois extraits à différentes concentrations, en comparaison avec l'acide ascorbique comme témoin positif.

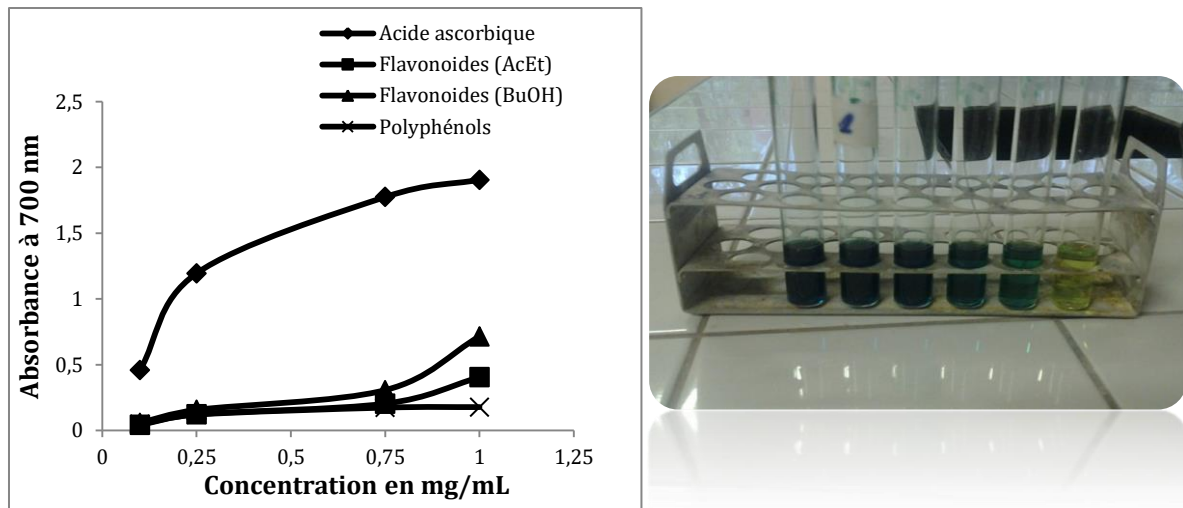


Figure 11. (à gauche) pouvoir réducteur des polyphénols totaux, flavonoïdes (Bu-OH) et (AcEt) DPPH des polyphénols CLP, (à droite) photo montrant une gamme de couleurs du bleu-vert foncé au jaune clair selon les concentrations des extraits de CLP et leur capacité à piéger le radical libre de fer

3. Viabilité cellulaire

La teneur assez importante en polyphénols des feuilles de caroube a suscité notre intérêt pour l'utiliser comme agent anticancéreux potentiel. Par conséquent, nous avons d'abord entrepris une analyse de l'effet CLP sur la viabilité des cellules cancéreuses du côlon. Le test d'exclusion au bleu de Trypan a montré que le CLP réduisait significativement la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante (**fig. 12**). L'IC₅₀ a été estimé à 5 µg / mL pour la lignée CT-26, 20 µg / mL pour les HCT-116 et SW-480; et 40 µg / mL pour les HT-29.

De plus, le CLP à une concentration de 50 µg / mL a induit plus de 90% de mort cellulaire pour les lignées CT-26, HCT-116 et SW-480. Cependant, une concentration de 100 µg / mL de CLP était nécessaire pour atteindre 90% de la mort cellulaire pour les HT-29.

Par conséquent, nous avons opté d'utiliser des doses moins toxiques de CLP: c'est-à-dire 10 µg / mL et 20 µg / mL, pour toutes les expériences suivantes.

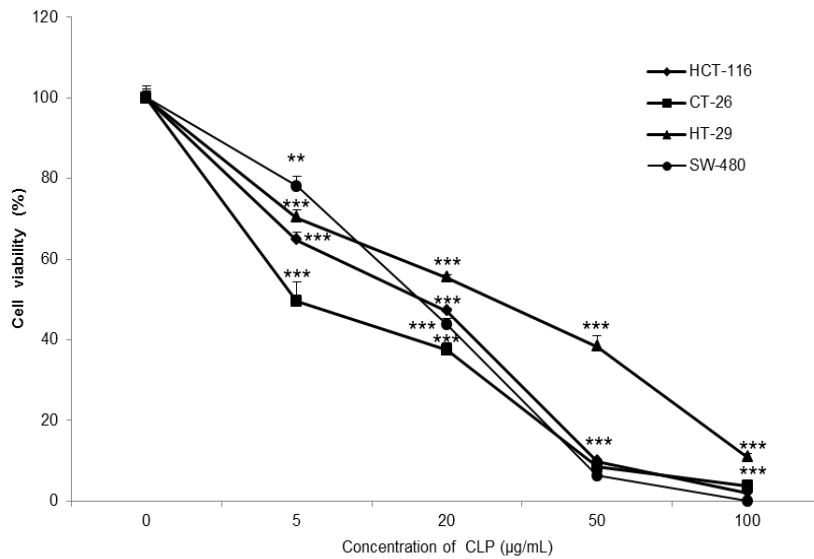


Figure 12. Effets du CLP à différentes concentrations sur la viabilité cellulaire des cellules HCT-116, CT-26, HT-29 et SW-480

4. Test d'apoptose

Nous avons effectué des marquages à l'annexine-V/7-AAD pour étudier l'apoptose cellulaire induite par CLP. Il est intéressant de noter que nos résultats ont démontré que le traitement CLP induit, de manière dose-dépendante, la mort cellulaire principalement par apoptose (Anx-V positif) avec un faible effet nécrotique (Anx-V négatif et 7-AAD positif). En outre, les cellules HCT-116 et CT-26 étaient les plus sensibles au traitement CLP (20 µg / mL), étant donné que plus de 40% et 70% des cellules traitées par HCT-116 et CT-26 étaient respectivement en stade d'apoptose tardive (**fig. 14**).

A titre de comparaison, nous avons étudié l'effet apoptotique des polyphénols majeurs de feuilles de caroube, l'acide gallique (GA) et l'acide m-coumarique (m-CA) et le 5-FU couramment utilisé pour le traitement CRC. Dans les cellules HCT-116 et HT-29, les résultats obtenus montrent que GA (460 µM) induit un niveau apoptotique plus élevé que celui induit par CLP 20 µg/mL, alors que m-CA (10 mM, concentration la plus couramment utilisée) et 5-FU 10 µM, exerçaient moins d'effet apoptotique que CLP 20 µg/mL sur les HCT-116 et CT-26.

Cependant, le co-traitement de 5-FU avec CLP induit des effets apoptotiques similaires à ceux présentés par CLP (20 µg/mL) seul sur des cellules HCT-116 (**fig. 14B**).

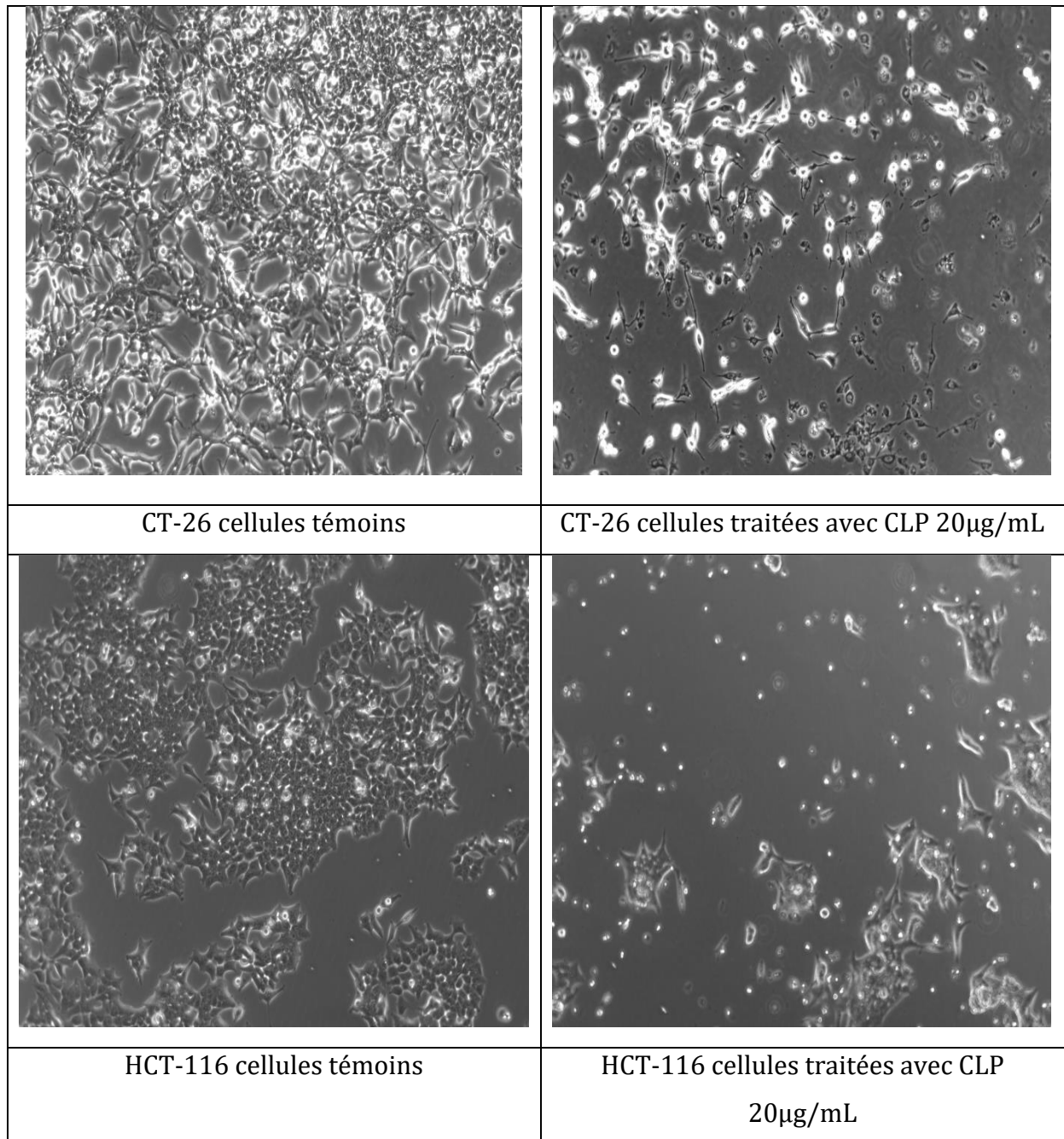
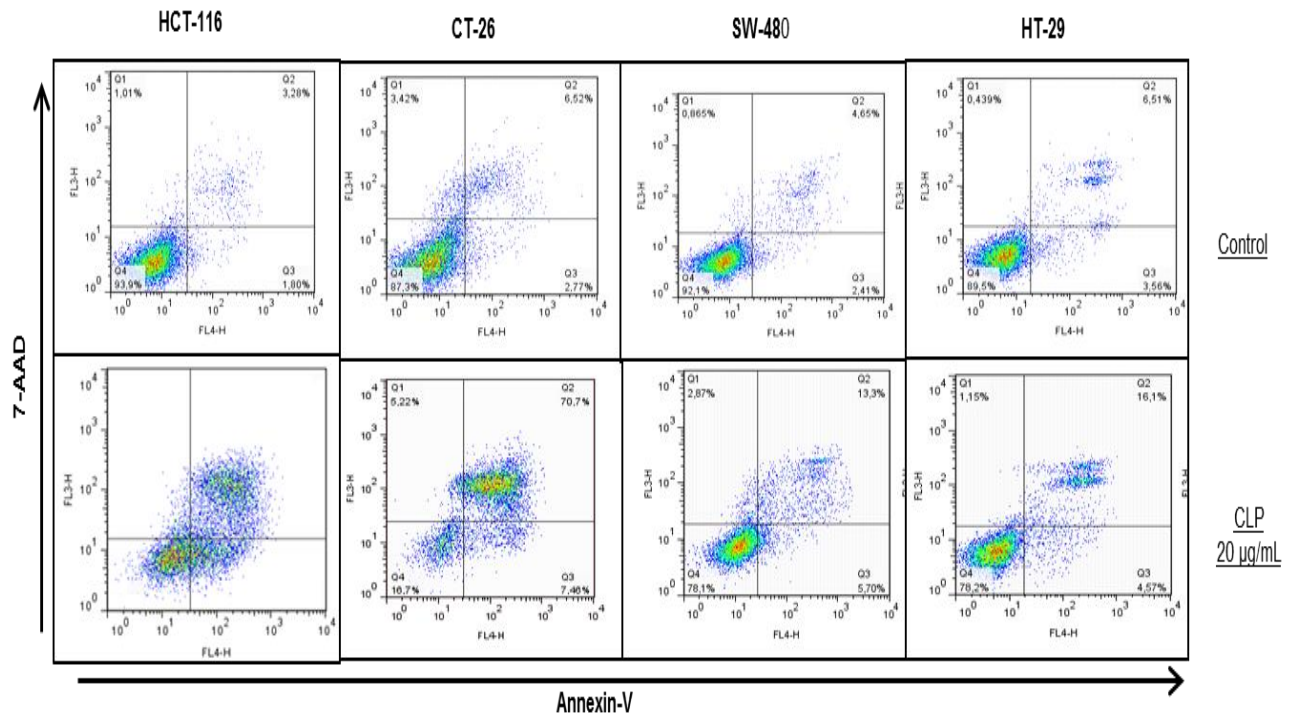
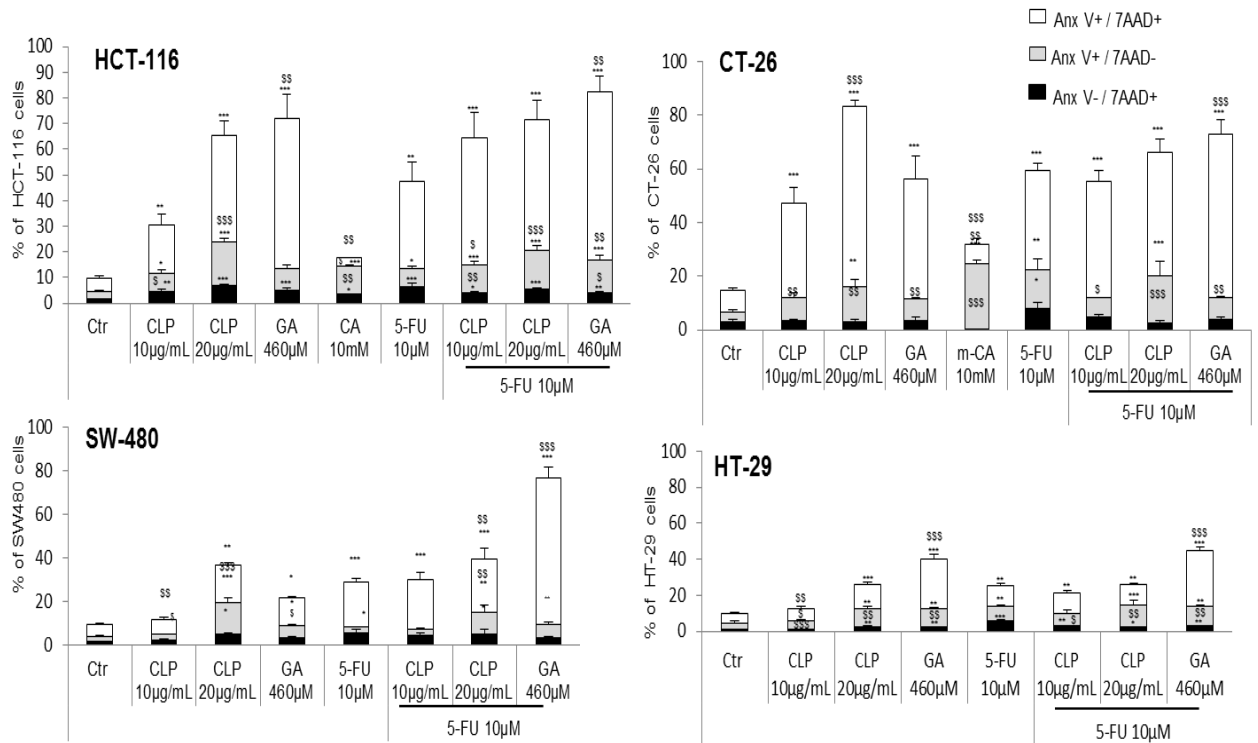


Figure 13. Observation au microscope électronique de l'effet du CLP sur la viabilité cellulaire

A



B



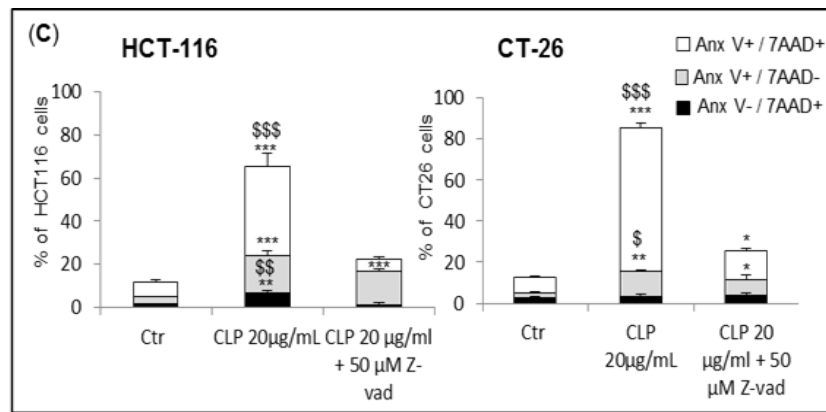


Figure 14. Effet de CLP sur l'induction de l'apoptose des cellules HCT-116, CT-26, HT-29 et SW-480 (a) et (b). Test d'inhibiteurs de l'apoptose Z-vad sur les cellules HCT-116 et HT-29 (c).

Ces cellules mortes semblent bien avoir subi une apoptose caspase-dépendante, étant donné la diminution significative de la mort cellulaire lorsque HCT-116 et CT-26 ont été co-traitées avec z-VAD-fmk, un inhibiteur de caspase pan (**fig. 14C**).

Le mécanisme moléculaire de l'apoptose induite par le CLP dans les deux lignées cellulaires sensibles, CT-26 et HCT-116, a également été exploré.

5. Détection des protéines liées à l'apoptose

L'activation de p53 dans les cellules conduit à l'apoptose ou à l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, la phosphorylation de p53 pourrait être induite par p38 MAPK. Dans notre étude, nous avons observé que le CLP induit la phosphorylation des protéines p38 MAPK et p53 dans les cellules HCT-116 et CT-26.

Ainsi, le CLP a induit, de manière dose-dépendante, l'activation de la caspase-9, une composante essentielle en aval de p53 et l'activation dans les cellules HCT-116 et CT-26. En effet, le CLP a déclenché le clivage pro-caspase-9 dans ses deux fragments actifs. L'activation de la caspase-9 induite par le CLP a été associée à un important clivage de son substrat aval, PARP. GA (460 µM) a induit un clivage similaire de caspase-9 et de PARP à ceux induits par le CLP (20 µg/mL).

A

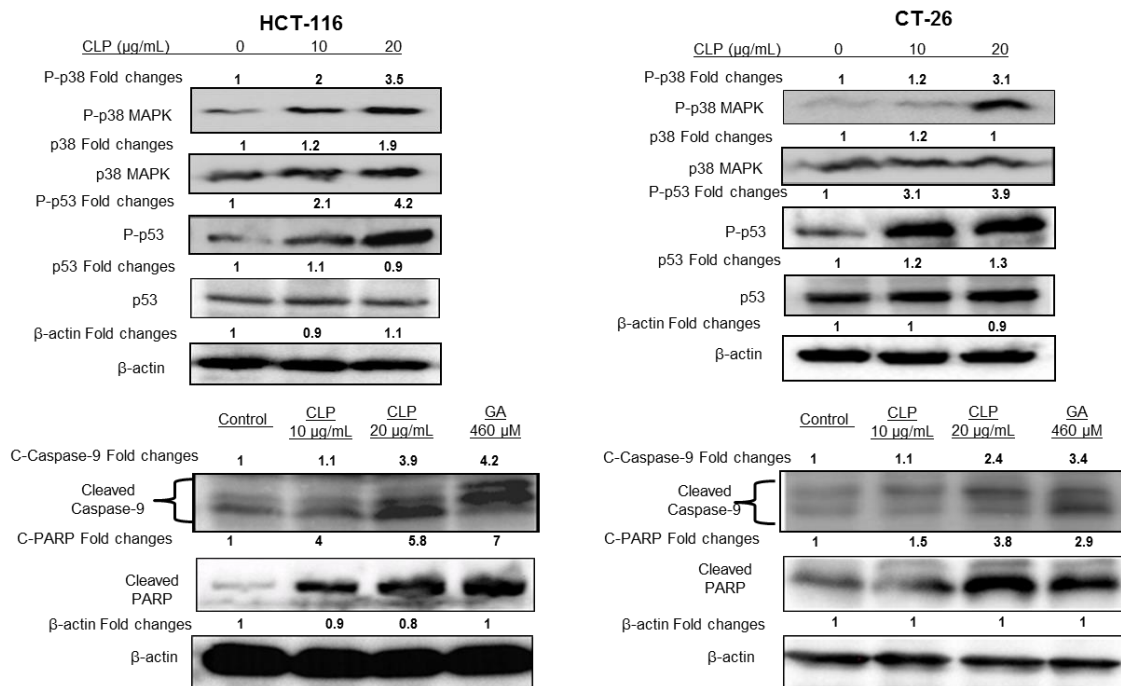


Figure 15A. Analyse par western-blot : (en haut) des protéines p38 et p 53 dans les cellules HCT-116 et CT-26 traitées pendant 24h avec CLP 10 et 20 µg/mL ; (en bas) des caspases-9 clivées et PARP dans les cellules HCT-116 et CT-26 traitées pendant 24h avec CLP 10 et 20 µg/mL, ou GA (460 µM) pendant 24h.

6. Détection de l'activité de caspase-3 et caspase-7

Nous avons observé que le CLP augmentait, de manière dose-dépendante, les activités caspase-3 et caspase-7 dans les cellules cancéreuses du côlon. À la concentration de 20 µg/mL, les cellules HCT-116 (28,4%) et CT-26 (35,4%) étaient positives pour l'activation des caspases 3 et 7 induites par le CLP (**figure 13B**).

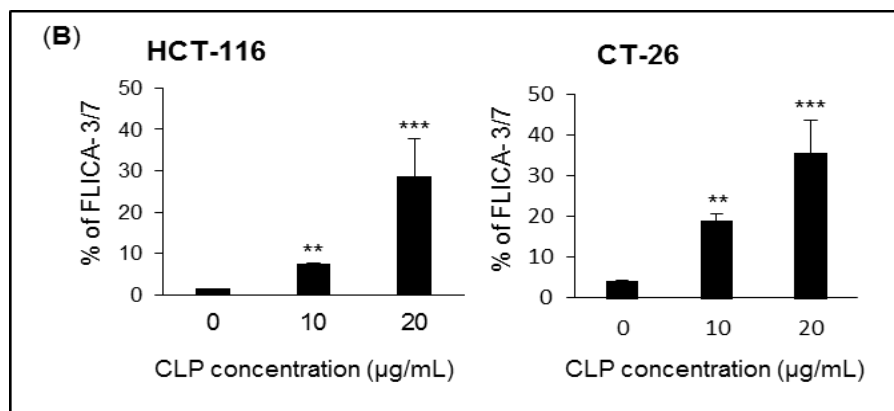


Figure 15B. activation des caspases 3/7 exprimée en pourcentage de FLICA caspase-3/7-AAD positives dans les cellules HCT-116 et CT-26 traitées avec CLP à 10 ou 20 µg/mL.

7. Cycle cellulaire

Il a été préalablement montré que l'induction de l'apoptose était corrélée à la dérégulation du cycle cellulaire. L'effet du CLP sur la progression de ce cycle cellulaire a été analysé par la suite, en utilisant le marquage à l'iodure de propidium. Les résultats obtenus montrent que le CLP (20 µg/mL) induisait l'arrêt du cycle cellulaire des lignées CRC en phase G1. Comme le montrent les **figures 16A et 16B**, la répartition des populations de cellules entre les différentes phases du cycle cellulaire dans les HCT-116 était la suivante: 46,96% dans G1, 35,58% dans S et 17,45% dans G2/M. Le traitement CLP (20 µg/mL) a augmenté la population G1 à 57,43% et a diminué la population cellulaire dans G2/M à 8,93%.

Dans les CT-26, la répartition de la population cellulaire entre les phases du cycle cellulaire était la suivante: 40,18% dans G1, 41,26% en S et 18,54% en G2/M. Le traitement par CLP (20 µg/mL) a augmenté la population G1 à 53,56% et a diminué la population cellulaire dans G2/M à 9,33% (**Figure 16A et 16B**). De même, GA et *m*-CA ont induit l'arrêt du cycle cellulaire dans G1.

Cependant, le 5-FU a induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase S dans les deux lignées cellulaires avec une disparition de cellules en phase G2/M.

L'augmentation de p27, un inhibiteur de la kinase cycline-dépendante (CDK), est probablement responsable de l'arrêt en phase G1. L'analyse par transfert de western blot a montré que le CLP a augmenté l'expression de p27, en fonction de la dose par rapport aux cellules non traitées.

Nous avons également observé que le CLP diminuait l'expression de CDK2, tandis qu'il augmentait l'expression de la cycline A dans les cellules HCT-116 et CT-26. Toutefois, le CLP n'a augmenté la cycline E que dans les cellules HCT-116 (**figure 16C**).

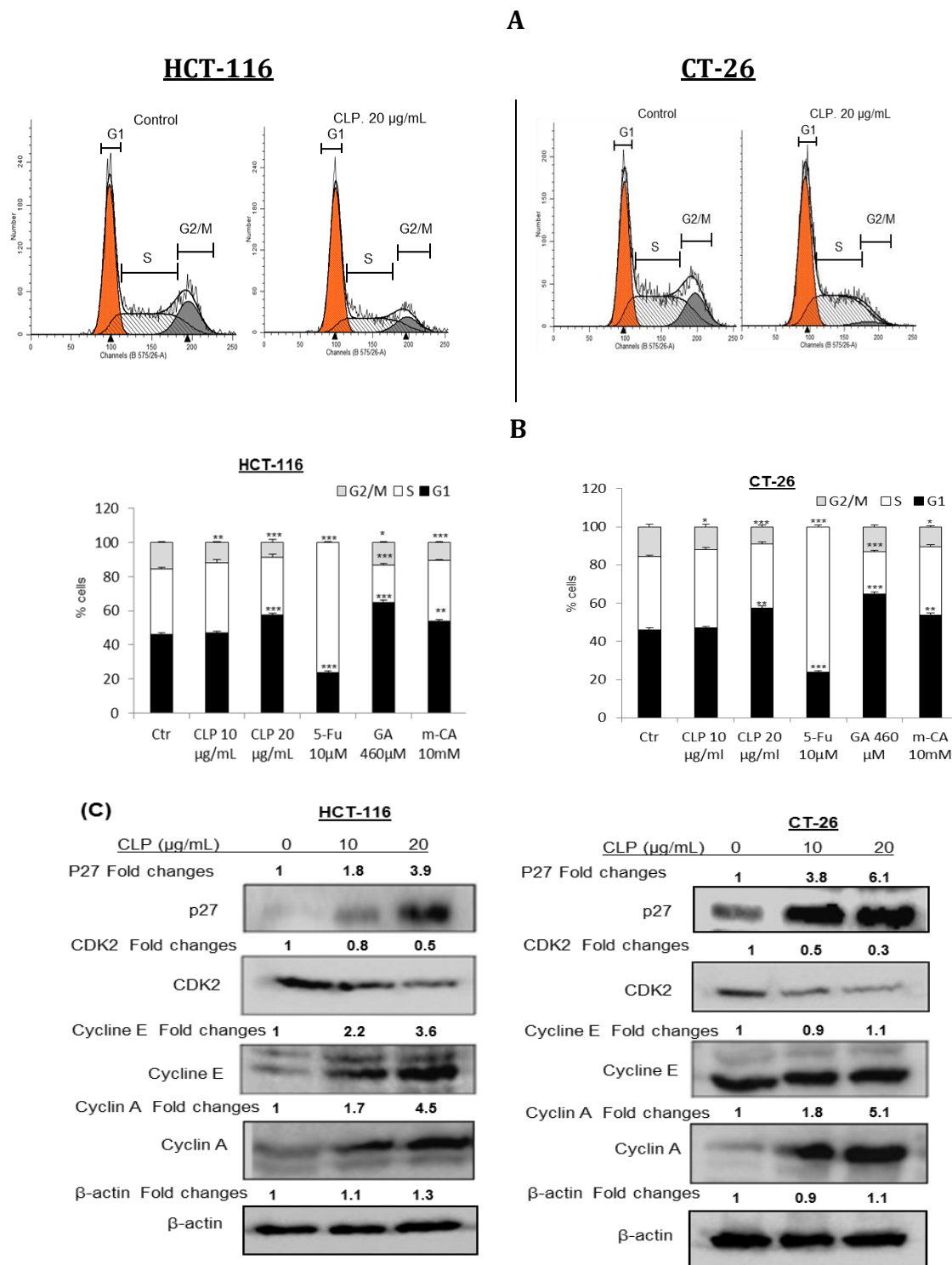


Figure 16. Effet de CLP sur l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire des cellules HCT-116 et CT-26. (A) profil représentatif du cycle cellulaire des cellules HCT-116 et CT-26 traitées avec CLP 20 µg/mL pendant 24h. (B) Analyses des phases G1, S et G2/M du cycle cellulaire des cellules traitées avec CLP, 5-FU, GA ou CA. (C) Analyses par Western blot des protéines p27, CDK2, cycline E et cycline A exprimées dans les cellules HCT-116 et CT-26 traitées avec CLP.

8. Croissance tumorale

Les propriétés anti-prolifératives des feuilles de caroube ont été évaluées *in vivo*, dans un modèle de cancer provoqué chez des souris. Après la transplantation sous-cutanée de cellules cancéreuses de côlon CT-26 chez des souris BALB/c, on a observé la progression de la tumeur du colon et on a montré que l'infusion des feuilles de caroube (administrée par biberon), réduisait la croissance des cellules CT-26 implantées par rapport au témoin. Cette réduction de la croissance tumorale, commençait à être significative 11 jours après la transplantation des cellules CT-26. Cette inhibition a été maintenue jusqu'au jour 19 où le CLP a réduit de 42% la taille de la tumeur par rapport aux témoins (figure 17).

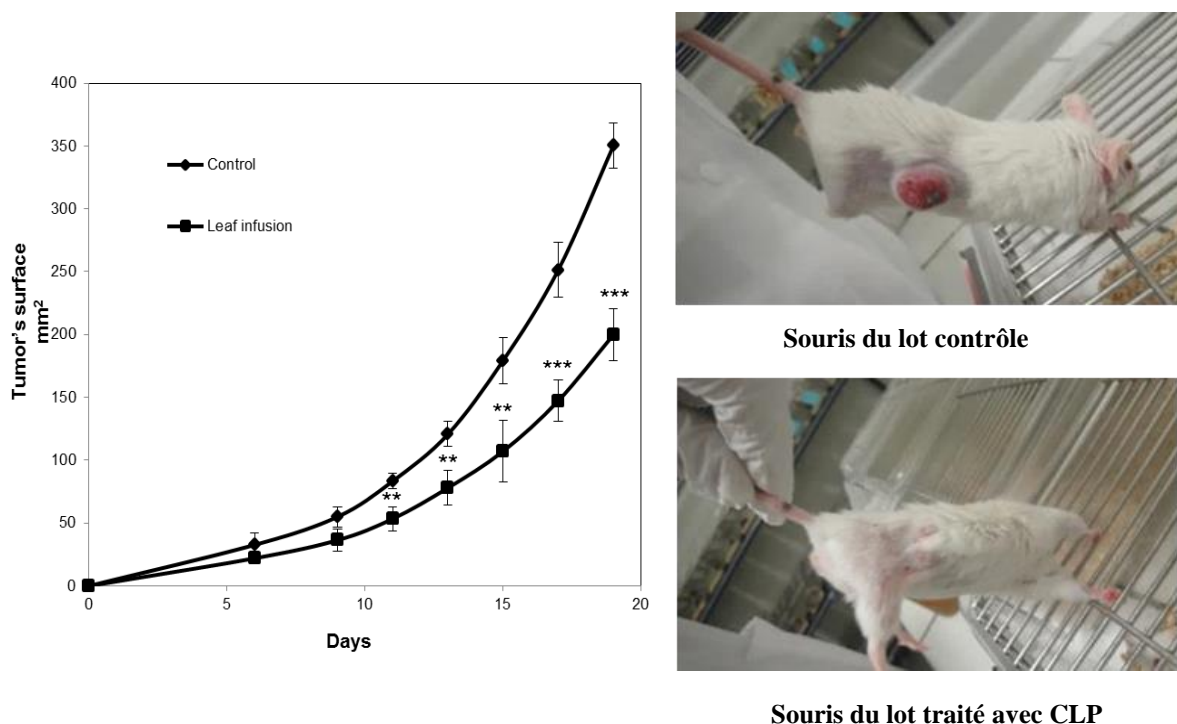


Figure 17. (à gauche) Courbe de croissance des tumeurs transplantées aux souris Balb/c recevant ou non l'infusion comme traitement ; (à droite) photo de souris du lot contrôle (en haut) photos de souris traitées avec l'infusion de CLP (en bas).

Discussion

La découverte d'agents anticancéreux idéaux qui sont non toxiques et hautement efficaces, avec des mécanismes d'action connus, est un défi majeur dans le traitement du cancer (Khan & Mukhtar, 2008). Les plantes contiennent des constituants bioactifs et possèdent des propriétés antioxydantes, qui jouent un rôle important dans la thérapeutique. Il y a un intérêt émergent dans l'application chimio-thérapeutique des composés végétaux naturels bioactifs, en particulier les polyphénols qui pourraient prévenir les incidences du cancer (Vauzour *et al.*, 2010; Esakkirajan *et al.*, 2014).

Dans le présent travail, les effets antioxydants, anticancéreux et anti-tumoraux des extraits polyphénoliques, obtenus à partir des feuilles de la plante *Ceratonia siliqua* L. ont été évalués *in vivo* et *in vitro*.

Extraction et dosage des polyphénols

La plante a, dans un premier temps, été séchée à l'ombre, puis rendue sous forme de poudre. En effet, il est recommandé d'utiliser un matériel végétal sec, afin d'éviter la dégradation enzymatique de certains composants comme les flavonoïdes glycosides, qui se dégradent facilement en cas d'un matériel frais ou non séché. De plus, le séchage inhibe la fermentation bactérienne qui peut causer directement cette dégradation. Par ailleurs, le séchage de la plante à l'ombre prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et protège la plante contre les radiations ultraviolettes de la lumière solaire (Sarker *et al.*, 2005).

Selon Mebirouk-Boudechiche *et al.* (2014), *Ceratonia siliqua* présente un faible taux de matières azotées totales (8,44% MS par rapport aux autres espèces étudiées), ceci peut être dû aux différences entre les légumineuses dans l'accumulation de l'azote, durant leur période de croissance. Compte tenu de la teneur élevée en matières azotées totales, l'utilisation de ces légumineuses est indiquée comme supplément protéique aux fourrages de mauvaise qualité et aux sous-produits fibreux. Cette proposition doit être envisagée avec précaution, car la digestibilité de l'azote est dépendante des composés phénoliques et en particulier, les tanins (Tolera *et al.*, 1997). Par contre, *C. siliqua* détient une matière minérale relativement élevée (29%) par rapport aux autres espèces étudiées et par rapport à nos résultats. Selon Spears (1994), la concentration en éléments minéraux des plantes varie fortement avec le type de sol, le climat et le stade de la maturité.

Mebirouk-Boudechiche et al. (2014) ont trouvé une composition en métabolites secondaires relativement importante comparée à nos résultats. Elle comprend 23,35 de phénols totaux (en g équivalent acide tannique/kg MS); 20,11 de tanins totaux (en g équivalent acide tannique/kg par MS) et 4,75 de tanins condensés (en g équivalent leucocyanidine/kg par MS). Ces différences sont probablement dues en partie aux différentes techniques de dosage utilisées ainsi qu'à la variabilité dans la composition chimique qui peut aussi représenter un facteur majeur (**AOAC, 1990 ; Pino et al., 2005**). Ces discordances peuvent être dues également au stade de croissance des plantes étudiées et/ou à la saison de collecte (**Salem, 2005**), et à la nature du site de prélèvement (**Makkar & Becker, 1993**).

Dans la présente étude, l'extraction des polyphénols contenus dans la poudre des feuilles de *Ceratonia siliqua* L., a été réalisée en utilisant la méthode de **Liyana-Pathirana & Shahidi, (2006)** légèrement modifiée par **Nani et al., (2015)**. Cette méthode spécifique consiste à utiliser un système d'extraction de trois solvants comprenant eau/méthanol/acétone, ce qui a permis d'avoir un extrait vert et limpide après centrifugation.

Les extraits de diéthyle éther, de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle de trois variétés de feuilles de *Ceratonia siliqua* L. (femelles greffées, femelles spontanées, mâles spontanés) cultivées au Maroc ont été étudiées pour leur teneur en phénols totaux. Le contenu total en phénols a été mesuré par le réactif Folin-Ciocalteu en termes d'équivalent acide gallique. Les résultats obtenus ont montré que le contenu phénolique total provenant des différents extraits des trois catégories de *Ceratonia siliqua* L. se situe entre 0,45 et 2,64 (g/L GAE) (**El Hajaji et al., 2010**). Ces résultats sont en accord avec la teneur en polyphénols des feuilles de caroube que nous avons obtenue (9,215 mg/g de MS équivalent AG correspondant à 2,263 mg/mL GAE).

Il s'avère donc que les feuilles de caroube sont riches en polyphénols (**Custódio et al., 2011**). Nous avons observé aussi que la teneur phénolique totale en feuilles de caroube est légèrement supérieure à celle rapportée par **Corsi et al., 2002**.

L'analyse HPLC a montré que l'acide gallique et l'acide *m*-coumarique représentent la principale classe de polyphénols dans le CLP. Cependant, la teneur en GA dans notre étude est inférieure à celle rapportée par **Corsi et al., 2002 et Custódio et al., 2011**. Cette différence est éventuellement due à différents facteurs phyto-pathogènes, qui sont directement liés à diverses conditions géographiques, génétiques et culturelles

(Avallone *et al.*, 1997). Les techniques utilisées et les méthodes de préparation des échantillons pourraient également être responsables des différences observées dans les concentrations en polyphénols (Custódio *et al.*, 2011).

Par conséquent, nous ne pouvons exclure la présence d'autres composés mineurs ou non identifiés tels que les gallotannins et les glycosides. Les différences de résultats pourraient résulter des méthodes d'extraction et de l'origine de la plante. Par exemple: Aissani *et al.*, (2012) ont extrait des polyphénols de feuilles de caroube avec du méthanol (1:10, p/v) sans étape supplémentaire pour éliminer les composés neutres. Ils ont observé et identifié seulement quatre composés : acide gallique; (-)- épigallo-catéchine-3-gallate; myricitrine et l'isoquercitine, parmi 11 composés présents dans leur chromatogramme. Ben Hsouna *et al.* (2011) ont extrait les polyphénols des feuilles de caroube par macération dans 80% d'éthanol. L'extrait a été séché, mis en suspension dans de l'eau et réparti séquentiellement avec du n-hexane, du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle. Ils ont rapporté que l'extrait de l'acétate-éthyle de l'extrait de feuilles de *C. siliqua* contenait principalement de l'acide syringique, de la myricétine, des glycosides et des dérivés des acides galliques. Toutefois, leur méthode d'extraction est différente de la nôtre. De plus, les extractions successives vont changer la proportion de polyphénols dans chaque extrait par rapport à un extrait total de méthanol-acétone-eau.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Bouli *et al.* (2010) qui ont identifié et quantifié les composés polyphénoliques des extraits éthanoliques de gousses de caroubiers (six régions du Maroc), et ceci par analyse HPLC, couplée à la spectrométrie de masse par ionisation par électrospray (HPLC-ESI-MS) et par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS). Au total, cinquante-deux composés phénoliques ont été identifiés avec un rendement variant de 9,15 mg/g à 55,73 mg/g. Les composés polyphénoliques prédominants dans tous les extraits de gousses de caroube analysés étaient l'acide gallique, le glucoside gallate et le glucoside acide gallique. L'acide gallique était le principal acide phénolique libre dans les gousses de caroube représentant 17,96 à 32,92% des phénoliques totaux présents.

Néanmoins, la teneur en GA dans notre étude est inférieure à celle rapportée par Corsi *et al.*, 2002 et Custódio *et al.*, 2011. Cette différence est éventuellement due à différents facteurs phyto-pathogènes qui sont directement liés à diverses conditions géographiques, génétiques et culturelles (Avallone *et al.*, 1997). Les techniques

utilisées et les méthodes de préparation des échantillons pourraient également être responsables des différences observées dans les concentrations en polyphénols (Custódio *et al.*, 2011).

De la même façon, Fadel *et al.* (2011) ont analysé la composition phénoliques des extraits acéto-aqueux des pulpes et des graines du caroubier de deux localités différentes du Sud-ouest marocain, à savoir Izouika « caroubier forestier » et Reggada « plantation privée » par HPLC à barrettes de diodes. L'identification et la quantification des composés phénoliques de ces extraits ont été réalisées en prenant comme standards l'acide gallique, l'acide syringique, l'acide *p*-coumarique, l'acide *m*-coumarique, l'acide benzoïque et l'Hydroxytyrosol. Le profil phénolique de la pulpe était dominé par l'acide coumarique de 17,05% et 20,52% à Reggada et Izouika respectivement ainsi que l'acide gallique de 12,57% à Reggada et et 17,8% à Izouika. Dans les extraits des graines, l'acide coumarique et l'acide gallique sont également les acides phénoliques majoritaires, l'acide coumarique représente 8,07% à Izouika et 8,18% à Reggada alors que l'acide gallique représente 5,01% à Izouika et 3,95% à Reggada. Ils ont conclu que globalement la différence, entre les teneurs des phénols totaux des pulpes et celui des graines, est très peu significative entre les deux localités. Ces données concordent avec nos résultats et prouvent encore une fois que les composés phénoliques majoritaires du caroubier de façon générale (pulpes et graines dans l'études de Fadel *et al.*, 2011, feuilles dans le cas de notre étude) sont l'acide gallique et l'acide coumarique.

Activité antioxydante par le test de DPPH et FRAP

La capacité anti-radicalaire ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier. Le mécanisme principal d'action des composés phénoliques (Φ -OH), est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome d'hydrogène sur le DPPH alors transformé en une molécule stable DPPHH (Popovici *et al.*, 2010).

L'activité antioxydante la plus élevée a été observée dans l'extrait d'acétate d'éthyle des trois catégories de feuilles de carabes, comparé aux autres extraits étudiés. Les données obtenues ont montré, en effet, que les extraits d'acétate d'éthyle présentaient une activité élevée. L'activité la plus faible a été obtenue par l'extrait de feuilles dans le

dichlorométhane. Il a également constaté que l'activité d'élimination des radicaux libres de l'extrait d'acétate d'éthyle de la catégorie féminine greffée (IC50 = 0,41 g / L) était plus forte que celle de l'extrait d'acétate d'éthyle de la catégorie féminine spontanée (IC50 = 0,45 g / L) et de l'éthyle extrait d'acétate de catégorie masculine spontanée (IC50 = 1,50 g / L) ([El Hajaji et al., 2010](#)).

L'activité antioxydante des trois extraits (polyphénols, flavonoïdes phase BuOH et AcEt) a été évaluée en utilisant la méthode FRAP. Cette dernière a l'avantage d'être simple, rapide et reproductible. C'est un essai universel qui peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux ([Li et al., 2008](#)).

La présence de réducteurs dans les extraits conduit à la réduction du fer Fe³⁺ complexe ferricyanide à la forme de fer ferreux. De cette manière, le Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu verte dans le milieu réactionnel à 700 nm. En d'autres termes, le système FeCl₃/K₃Fe(CN)₆ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi quantitative » des concentrations de polyphénols, qui participent à la réaction redox ([Amarowicz et al., 2004](#)).

Effet anticancéreux

Il a été démontré que les polyphénols de feuilles de caroube ont des effets bénéfiques sur plusieurs maladies dont le cancer ([Custódio et al., 2011](#) ; [Corsi et al., 2002](#)). [Custódio et al](#) ont rapporté qu'un extrait riche en polyphénols de feuilles de caroube a fortement diminué la viabilité de la lignée cellulaire d'adénocarcinome cervical humain (HeLa), mais dans une moindre mesure la viabilité des cellules cancéreuses de prostate (DU-145), du sein (MDA-MB-231) et du côlon (HCT-116). [Corsi et al.](#) ont observé que les extraits de feuilles et de gousses de *Ceratonia siliqua* L. présentaient des effets antiprolifératifs sur la lignée de carcinome hépatocellulaire de souris. Cependant, à notre connaissance, aucun rapport ne traite du mécanisme moléculaire du CLP dans le CRC.

Il s'est avéré que les feuilles de caroube soient riches en polyphénols ([Custódio et al., 2011](#)). Dans la présente étude, nous avons observé une teneur phénolique totale en feuilles de caroube légèrement supérieure à celle rapportée par [Corsi et al., 2002](#).

Nous avons également remarqué que les extraits de CLP, induisaient la mort cellulaire du CRC à faible concentration, avec une IC50 d'environ 20 µg/mL. Cette concentration est très intéressante comparée à celles utilisées par [Tigrine et al., \(2013\)](#) sur

différentes lignées cellulaires cancéreuses (adénocarcinome du sein, carcinome du côlon, neuroblastome, hépatome, carcinome du col de l'utérus), et dont le traitement aux extraits méthanoliques de feuilles de *Cleome arabica*, a réduit le nombre de cellules de manière dose-dépendante (IC₅₀= 175± 30 µg/mL).

Il est important de noter aussi qu'une IC₅₀ de polyphénols inférieure à 30 µg/mL, a été considérée comme prometteuse pour la recherche de nouveaux agents anticancéreux (Dos Santos *et al.*, 2010). La sensibilité de la lignée cellulaire du CRC au traitement CLP, observée dans notre étude, est la suivante : CT-26 > HCT-116 > SW-480 > HT-29. Ceci est en partie conforme aux résultats obtenus par Custódio *et al.*, 2011, qui ont observé que les polyphénols de l'extrait méthanolique des feuilles de caroube réduisaient la viabilité des cellules HCT-116. Cependant, ces auteurs ont indiqué que la valeur de l'IC₅₀ était 20 fois plus élevée (400 µg/mL) que les valeurs obtenues dans notre étude.

Effet synergique des polyphénols

Plutôt qu'un seul composé, des combinaisons de polyphénols peuvent viser des phases de chevauchement et de complémentarité du processus cancérogène augmentant ainsi l'efficacité et la puissance de l'effet chimio-préventif (Signorelli *et al.*, 2005 ; de Kok *et al.*, 2008). Par exemple, un effet synergique lorsque EGCG est utilisé en combinaison avec d'autres flavan-3-ol, tels que l'épicatéchine (de Kok *et al.*, 2008, Shimizu *et al.*, 2005), entraînant l'inhibition de la croissance et de la prolifération des cellules et l'induction de l'apoptose dans les cellules CRC, a été documenté (Shimizu *et al.*, 2005, Suganuma *et al.*, 1999). Le même effet synergique se produit lorsque EGCG est combiné avec des médicaments thérapeutiques, tels que des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Sulindac et Tamoxifène) (Suganuma *et al.*, 1999) ou avec des médicaments utilisés en chimiothérapie (5-Fluorouracile, Oxaliplatine, ou Paclitaxel) (Shimizu *et al.*, 2005). Dans d'autres types de cellules, le resvératrol et la quercétine interagissent de manière plus qu'additive dans l'activation de la caspase-3 et la libération du cytochrome c, induisant l'apoptose (Mouria *et al.*, 2002); *via* l'inhibition de la croissance cellulaire et de l'ADN synthèse (El Attar & Virji, 1999); et l'arrêt des cellules dans G₀/G₁ et la S phase du cycle cellulaire (Mertens-Talcott & Percival, 2005).

De même, Klenow *et al.* (2008) ont indiqué que l'AG représentait le constituant majeur de l'extrait aqueux des polyphénols de la fibre de caroube disponible dans le commerce

(gousses). Il est intéressant de noter que les polyphénols de caroubier ont réduit le nombre de cellules HT-29 de manière dose dépendante jusqu'à 10 µg/mL, mais cet effet n'a pas été reproduit pour des concentrations équimolaires de GA. Ainsi, l'induction de la mort cellulaire par le CLP peut s'expliquer par l'effet synergique entre les composés bioactifs, y compris GA (Subramanian *et al.*, 2016, Bin-Chuan *et al.*, 2009), et CA (Jaganathan *et al.*, 2013), ainsi que d'autres composés phénoliques, notamment l'acide chlorogénique (Nkondjock, 2009) et la quercétine (Jaganathan *et al.*, 2013; Janicke, *et al.*, 2005 ; Gibellini *et al.*, 2011).

Induction de l'apoptose

L'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses peut être considérée comme une stratégie utile pour le développement de médicaments anticancéreux (Hu & Kavanagh, 2003). Nous avons observé que le CLP induit la mort cellulaire principalement *via* l'apoptose comme illustré par un nombre élevé de cellules positives de l'annexine-V. En effet, z-VAD-fmk réduit significativement la coloration de l'annexine-V induite par le traitement CLP, confirmant le rôle des caspases dans l'apoptose induite par le CLP.

La nécrose induite par CLP était faible et représentait moins de 10% de la mort cellulaire dans HCT-116 et CT-26.

Le polyphénol GA qui est assez majoritaire dans le CLP, a induit un effet apoptotique plus significatif que le CLP dans HT-29. Par ailleurs, le CLP a induit un effet apoptotique plus important que le GA dans CT-26.

Ces observations indiquent que la sensibilité au traitement diffère d'une lignée cellulaire à une autre.

GA est connu pour induire la mort cellulaire programmée dans diverses lignées cellulaires de cancer de tumeurs, y compris la leucémie, le poumon, le côlon et le cancer de l'estomac (Bin-Chuan *et al.*, 2009; Inoue *et al.*, 1994; Yoshioka *et al.*, 2000).

Par ailleurs, Giftson *et al.* ont signalé que GA pouvait exercer un effet chimio-préventif significatif sur la carcinogenèse du côlon induite par la 1,2-diméthylhydrazine (DMH).

L'acide coumarique (CA), un autre polyphénol majeur dans le CLP, a également présenté un effet apoptotique mais dans une moindre mesure que l'AG et le CLP dans les cellules

HCT-116 et CT-26. Il a également été démontré que CA induisait l'apoptose dans les cellules de cancer du côlon HCT-5 et présentait un effet anti-invasion dans les cellules (A549) d'adénocarcinome du poumon humain (Jaganathan *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2013).

La chirurgie et la chimiothérapie sont les principales techniques utilisées dans le traitement du cancer colorectal et le 5-fluorouracile (5-FU) est l'agent chimiothérapeutique de choix pour son traitement (Sasaki *et al.*, 2010). Il a été largement utilisé pour le traitement des tumeurs solides, y compris le cancer colorectal, du sein, de la tête et du cou (Folprecht & Köhne, 2004). En pénétrant dans la cellule tumorale, le 5-FU peut exercer des effets cytotoxiques par l'inhibition de la thymidylate synthetase (TS) ou par incorporation dans l'ARN et l'ADN, ce qui conduit à l'activation de l'apoptose (Stelling *et al.*, 2013, Wyatt & Wilson, 2009).

Nous avons également observé que 5-FU, induit la mort cellulaire dans une moindre mesure que le CLP, en particulier dans les cellules HCT-116 et CT-26. Nous avons observé que GA a potentialisé l'effet apoptotique de 5-FU dans HT-29 et SW-480. Cependant, nos résultats ne montrent pas un effet additif de CLP et 5-FU, suggérant que CLP et 5-FU pourraient partager des cibles communes.

Il faut savoir que L'oxaliplatine, utilisé en association avec le 5-fluorouracile (5-FU) et leucovorine [FOLFOX : FOL- acide Folinique (leucovorine) ; F - Fluorouracile (5-FU) ; OX - Oxaliplatine (Eloxatine)] pour le CRC métastatique, a conduit à des taux de réponses de 45%, avec une survie médiane approchant 2 ans, (Meyerhardt & Mayer, 2005 ; Alberts *et al.*, 2005 ; Cassidy *et al.*, 2004), et a été jugé très efficace comme adjuvant selon Andre (2004). Malgré des réalisations impressionnantes, tous les CRC métastatiques deviennent finalement résistants à l'oxaliplatine, avec une période médiane de progression de 8 mois (Goldberg *et al.*, 2004). Comme pour l'oxaliplatine, la résistance au 5-fluouracile a également été observée chez les patients atteints de CRC (Zhang *et al.*, 2008).

Et c'est dans cette optique que de nouvelles stratégies sont en cours d'exploration pour surmonter la résistance chimio-thérapeutique. Il est également nécessaire de concevoir de nouveaux médicaments pour une thérapie tumorale plus sélective.

A partir de ces premiers résultats et des observations réalisées, sur les différentes lignées cellulaires au cours des traitements, deux lignées ont été sélectionnées (HCT-116 et CT-26), pour tenter de déterminer la voie d'apoptose et la phase impliquées dans l'induction de la mort et l'arrêt du cycle cellulaire.

Induction de la voie intrinsèque

Les mécanismes de l'apoptose sont complexes, impliquant plusieurs cascades d'événements moléculaires. Deux principales voies apoptotiques sont habituellement décrites: la voie des récepteurs extrinsèques ou de la mort et la voie intrinsèque ou mitochondriale ([Eum & Lee, 2011](#)). Dans les deux cas, lorsque les membranes mitochondriales externes deviennent perméables, le cytochrome c est libéré dans le cytosol ([Henry-Mowatt et al., 2004](#); [Susin et al., 1999](#); [Liu et al., 1996](#); [Yang et al., 1997](#); [Hockenbery et al., 2002](#)). Le cytochrome c se lie à Apaf-1 qui recrute l'initiateur caspase, la procaspase-9 à l'apoptosome, où la procaspase-9 est activée et clivée dans sa forme active. La caspase-9 activée, à son tour, clive et active d'autres caspases en aval telles que la caspase-3 ([Green & Reed, 2009](#); [Skulachev, 1998](#)) qui clive en aval divers substrats, y compris PARP ([Tewari et al., 1995](#); [Basu et al., 2002](#)). En effet, la caspase-3 joue un rôle central dans la phase d'exécution terminale de l'apoptose ([Hirsch et al., 1998](#)).

Au cours des dernières décennies, un nombre croissant de preuves a montré que les polyphénols, comme la quercétine et la lutéoline, peuvent moduler directement différentes voies du processus apoptotique et/ou l'expression de protéines régulatrices, comme la libération du cytochrome c avec activation ultérieure de la caspase-9 et caspases-3 ([Chyesunong et al., 2004](#); [Michels et al., 2005](#)).

Nos résultats ont révélé que l'extrait de CLP, de manière dose-dépendante, a activé la caspase-9, la caspase-7 et la caspase-3. Ce dernier clivait la protéine PARP (116 kDa) pour générer un fragment de 89 kDa. Ces observations concordent avec celles de [Corsi et al.](#) qui ont rapporté que les polyphénols de l'extrait aqueux de feuilles de caroube, induit l'activation de caspase-3 dans la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire de souris.

D'autres travaux ont rapporté l'effet des feuilles de plantes sur l'induction de la voie apoptotique. Nous pouvons citer les résultats de [Tigrine et al. \(2013\)](#) qui ont montré que les extraits méthanoliques de feuilles de *Cleome arabica* (100 and 200 µg/ml), augmentaient trois fois l'activation de la cascade apoptotique impliquant l'activation de la caspase-3 et le clivage de son substrat poly (ADP-ribose) polymérase (PARP).

Par ailleurs, [Zerriouh et al. \(2017\)](#) ont démontré que les extraits de polyphénols à partir de feuilles d'oléastre (*Olea europaea var. Sylvestris*) induisaient la voie apoptotique intrinsèque (voie mitochondriale) et ce, en activant les caspase-3, -7 et -9 en impliquant ainsi la diminution du potentiel de la membrane mitochondriale et une libération du cytochrome c.

Nonobstant, il y a aussi des polyphénols qui peuvent induire la voie extrinsèque. Les polyphénols extraits de différentes baies à savoir les pro-anthocyanidines induisaient ainsi la voie des caspases-8 mais pas la voie des caspases-9 dans des cellules cancéreuses du colon SW480-TRAIL-sensitif et SW620-TRAIL-résistant ([Minker et al., 2015](#)).

[Yi et al. \(2016\)](#) qui ont travaillé sur des cellules cancéreuses du colon LOVO ont montré quant à eux que les polyphénols à partir de cônes à pin (*Pinus koraiensis*) pouvaient non seulement favoriser l'apoptose intrinsèque en augmentant la libération du cytochrome c (cyt c) et en activant les caspases-9 et -3, mais également induire une apoptose extrinsèque en activant la caspase-8. Ils ont déduit aussi que la catéchine et la taxifoline, les principales composantes de ces polyphénols, pouvaient contribuer à l'activité anti-tumorale de ces derniers.

Il existe également un nombre croissant de preuves qui démontre que l'inactivation du gène p53 dans la majorité des cancers humains entraîne une dérégulation des processus de naissance et de mort des cellules ([Levine, 1997; Ko & Prives, 1996](#)).

Des travaux ont suggéré que les signaux de mort de p53 conduisent à une activation pro-active de la famille Bcl-2 Bax, de la caspase-9 et de l'Apaf-1 ([Schuler et al., 2000 ; Toshiyuki & Reed, 1995; Yin et al., 1997](#)). p53 est un substrat en aval de p38 MAPK, et des polyphénols (tels que le resvératrol) ont été signalés pour induire la phosphorylation p53 et l'activation par p38 MAPK ([She et al., 2001](#)).

Nos résultats ont également montré que CLP induit de manière dose-dépendante la phosphorylation p38 MAPK et p53. Fait intéressant, p38 est connu pour activer p53 qui peut induire l'arrêt du cycle cellulaire, afin de laisser du temps pour la réparation de l'ADN (Thornton & Rincon, 2009).

Phases d'arrêt du cycle cellulaire

Dans certains cancers, il a été montré que la régulation négative de p53 est associée à une régulation négative de p27 qui agit comme un suppresseur de tumeur en contrôlant la progression du cycle cellulaire. Dans la présente étude, nous avons observé que le CLP, y compris CA et GA induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S tandis que, comme prévu, 5-FU le contrôle positif, induit le cycle cellulaire en phase S.

Le cycle cellulaire est étroitement surveillé par des points de contrôle à G1/S et G2/M (Niculescu *et al.*, 1998) qui impliquent différents complexes de kinases cycline-dépendantes (CDK). La progression du cycle cellulaire est également régulée par l'équilibre relatif entre les concentrations cellulaires d'inhibiteurs CDK, tels que les protéines p21 et p27 de la famille Cip/Kip (Sherr & Roberts, 1999). Il a été montré que p27 interagit avec la cycline E-CDK2 induisant l'arrêt du cycle cellulaire dans G1.

Nous avons remarqué que le CLP induit une augmentation de p27, associée à une diminution de CDK2 dans les deux lignées cellulaires. En outre, le traitement par CLP a augmenté la cycline A dans les deux lignées cellulaires et la cycline E dans HCT-116. L'induction par le CLP de l'arrêt du cycle cellulaire G1/S pourrait résulter de l'augmentation de l'expression de p27 associée aux diminutions de CDK. Une telle corrélation entre l'accumulation de p27 induite par le polyphénol, les dérèglements de la cycline A et E et la régulation négative de la CDK2 en phase G1/S a déjà été rapportée (Abdoul-Azize *et al.*, 2013; Pozo-Guisado *et al.*, 2002; Sherr & Roberts, 1999 ; Subramanian *et al.*, 2016).

Toutefois, il y a des composés phénoliques qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, comme pour le cas des résultats de Lin *et al.* (2012) qui ont révélé que le traitement par 6-gingérol induisait significativement l'arrêt du cycle en phase G2/M et avait une légère influence sur la phase sous-G1 dans les cellules LoVo. Par conséquent, les niveaux de cyclines, les kinases cycline-dépendantes (CDK) et leurs protéines

régulatrices impliquées dans la transition S-G2/M ont été étudiés. Leurs résultats ont révélé que les niveaux de cycline A, cycline B1 et CDK1 ont diminué; en revanche, les niveaux des régulateurs négatifs du cycle cellulaire p27Kip1 et p21Cip1 ont été augmentés en réponse au traitement par 6-gingerol.

Effet anti-tumoral (*in vivo*)

Récemment, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont étudié le contenu phénolique des infusions de plantes pour leurs effets antiprolifératifs contre plusieurs types de cancer. Dans l'étude de [Moreno-Jimenez et al. \(2015\)](#) par exemple, les infusions de *Quercus* ont été préparées puis administrées comme seule source de boisson aux rats mâles Sprague-Dawley (1% p/v) pendant toute la période expérimentale de 26 semaines. À la semaine 4, les rats ont reçu huit injections sous-cutanées de DMH (1,2-diméthylhydrazine), induisant la carcinogenèse du côlon (21 mg/kg de poids corporel), et ce, une fois par semaine. Leurs résultats ont montré que les adénocarcinomes étaient nettement inférieurs dans le groupe traité par *Quercus sideroxylla* par rapport au groupe DMH.

De même, les résultats de [\(Yang et al., 2012\)](#) ont confirmé l'effet antiprolifératif de l'infusion de thé au cacao vert (4 g/L) chez les souris « *nude* » à la xénogreffe HepG2 (Carcinome hépatocellulaire humain). La croissance de la tumeur a été inhibée efficacement par cette infusion de manière dose-dépendante comme indiqué par la diminution du volume tumoral et du poids de la tumeur après 4 semaines de traitement [\(Yang et al., 2012\)](#).

Pour évaluer, *in vivo*, les propriétés anticancéreuses de la feuille de caroube, l'effet des infusions de ces feuilles a été étudié, chez des souris transplantées par de cellules CT-26. Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'infusion de feuilles de caroube réduisait significativement la croissance de la tumeur CT-26, et confirment l'utilisation potentielle de feuilles de *Ceratonia siliqua* L. pour la chimio-prévention de la CRC.

Nos résultats concordent avec ceux de [Zerriouh et al. \(2017\)](#) qui ont évalué l'effet de l'infusion de feuilles d'oléastre sur la croissance de xénogreffe de HCT-116 chez des souris « *nude* » athymiques. Ces auteurs ont observé que l'infusion de feuilles d'oléastre limitait la croissance tumorale HCT-116 *in vivo*.

L'approche que nous avons adoptée a été inspirée de celle de [Corsi et al., \(2002\)](#) qui ont étudié l'effet de l'infusion sur des cellules hépatiques de souris.

Cette approche n'induit aucun stress par rapport au gavage oral. C'est un point important car nous étudions la croissance tumorale qui pourrait être modifiée par un stress répété causé par des injections intra-péritonéales ou un gavage oral.

L'infusion de feuilles de caroube a été administrée comme "boisson" (en biberon) à des souris portant des tumeurs afin d'imiter la manière naturelle de consommation de plantes riches en polyphénols, comme le thé. [Fu et al., \(2011\)](#), par exemple, ont observé une teneur élevée en polyphénols dans cinquante et une infusions de plantes et de thé, qui présentaient une activité antioxydante. En outre, l'acide gallique et l'acide coumarique semblaient être des composés polyphénoliques majeurs présents dans les infusions de ces feuilles.

Comme la consommation de thé et d'infusion à base de plantes a augmenté rapidement ces dernières années, notre objectif était de fournir de nouvelles informations sur l'activité anti-carcinogène de l'infusion des feuilles de caroube pour les nutritionnistes et le grand public.

CONCLUSION

Le caroubier *Ceratonia siliqua* L, est une légumineuse typiquement méditerranéenne, largement répartie en Algérie, et qui possède une diversité phénotypique remarquable. Les différentes parties du caroubier sont largement utilisées, à savoir : les gousses, traditionnellement utilisées à des fins alimentaires animales et humaines, les graines, principalement utilisées pour l'extraction de la gomme, et enfin, les feuilles ainsi que les fruits qui sont fréquemment utilisés pour guérir diverses maladies.

Plusieurs études ont été menées sur différentes parties du caroubier vu leur teneur en composés bioactifs, y compris les polyphénols. Cependant, peu d'entre elles, ont porté sur l'effet inhibiteur des polyphénols de feuilles de caroube (CLP) sur le cancer colorectal.

Ce travail a été consacré à l'évaluation des activités anti-oxydante, anticancéreuse et chimio-préventive des extraits de polyphénols des feuilles de *Ceratonia siliqua*. Il vise ainsi à élucider les mécanismes moléculaires par lesquels CLP a exercé son effet apoptotique et la phase d'arrêt du cycle cellulaire dans les lignées cellulaires du CRC.

L'activité anti-proliférative a été évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Le CLP exerçait un effet cytotoxique dose-dépendant par induction de l'apoptose sur les lignées cellulaires du CRC, avec un IC50 d'environ 20 µg/mL pour les quatre lignées cellulaires (HCT-116, HT-29, SW-480 et CT-26). Le CLP induisait également la voie apoptotique intrinsèque à travers l'activation des caspase-9, caspase-7 et caspase-3 ainsi que le clivage PARP dans les cellules HCT-116 et CT-26. En outre, l'examen de la distribution du cycle cellulaire a montré que le CLP a déclenché une accumulation des cellules cancéreuses en phase G1 par l'activation de la p53.

Les composés individuels, l'acide gallique et l'acide *m*-coumarique ont exercé un effet similaire au CLP mais à une concentration plus élevée, ce qui suggère l'existence d'un effet synergique entre les polyphénols dans l'activité du CLP.

L'activité anti-tumorale a été établie par l'effet de l'infusion des feuilles de caroube, sur la réduction de manière significative, la croissance tumorale des CT-26 chez les souris Balb/c.

A la lumière de ces résultats, on peut s'avancer à conclure que l'extrait de polyphénols des feuilles de *Ceratonia siliqua* L, peut jouer le rôle d'un agent chimio-protecteur et aussi d'un agent anti-tumoral.

Toutefois, d'autres études restent nécessaires afin de compléter ce travail en s'intéressant notamment à l'étude et à l'identification des différents composants de l'extrait brut des feuilles de *Ceratonia siliqua*. Également, pour bien approfondir nos connaissances sur les différentes fractions à savoir les flavonoïdes ou les tanins pourvus de ces activités biologiques et aussi pour investiguer d'une manière plus laborieuse les différentes actions potentielles de ces composés et leur synergie.

Il serait également judicieux d'entreprendre des études ultérieures en utilisant un autre modèle *in vivo* avec des souris nues (*nude mice*) greffées par des tumeurs des cancers humains en leur administrant les extraits de polyphénols sous forme lyophilisée dissoutes dans l'eau afin d'aboutir à l'application des molécules isolées et purifiées de cette plante comme substituants des molécules chimiques à effets secondaires indésirables.

Notre étude a démontré que le CLP était à l'origine d'intéressants effets antiprolifératifs *in vivo* et *in vitro* et de remarquables propriétés pro- apoptotiques et anti-tumorales.

Par conséquent, il est nécessaire d'appuyer davantage ces résultats en effectuant des essais précliniques, afin d'étudier la cinétique du CLP, de pouvoir déterminer les doses effectives extrapolables chez l'humain et de confirmer l'absence de survenue d'effets indésirables à long terme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abdoul-Azize, S., Bendahmane, M., Hichami, A., Dramane, G., Simonin, A. M., Benammar, C., ... Khan, N. A. (2013).** Effects of Zizyphus lotus L. (Desf.) polyphenols on Jurkat cell signaling and proliferation. *International Immunopharmacology*, 15(2), 364–371.
- **Adlercreutz, H. & Mazur, W. (1997).** Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, 29, 95–120.
- **Afrin, S., Giampieri, F., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Varela-López, A., J. L. Quiles, Mezzetti B. & Battino M. (2016).** Chemopreventive and Therapeutic Effects of Edible Berries: A Focus on Colon Cancer Prevention and Treatment. *Molecules*, 21(2), 169
- **Aissani, N., Coroneo, V., Fattouch, S., & Caboni, P. (2012).** Inhibitory effect of carob (*Ceratonia siliqua*) leaves methanolic extract on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), 9954–9958.
- **Al-Allawi, N. A., Ismaeel, A. T., Ahmed, N. Y., & Merza, N. S. (2012).** The frequency and spectrum of K-ras mutations among Iraqi patients with sporadic colorectal carcinoma. *Indian journal of cancer*, 49(1), 163-168
- **Alberts, D. S., Martínez, M. E., Roe, D. J., Guillén-Rodríguez, J. M., Marshall, J. R., Van Leeuwen, J. B., ... & Earnest, D. L. (2000).** Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. *New England Journal of Medicine*, 342(16), 1156-1162.
- **Alberts, S. R., Horvath, W. L., Sternfeld, W. C., Goldberg, R. M., Mahoney, M. R., Dakhil, S. R., ... & Donohue, J. H. (2005).** Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *Journal of clinical oncology*, 23(36), 9243-9249.
- **Alexander, D. D., Cushing, C. A., Lowe, K. A., Scurman, B., & Roberts, M. A. (2009).** Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer. *The American journal of clinical nutrition*, 89(5), 1402-1409.
- **Ameisen, J. C., Estaquier, J., Idziorek, T., & De Bels, F. (1995).** The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis. *Trends in cell biology*, 5(1), 27-32.
- **Andre, C. M., Oufir, M., Hoffmann, L., Hausman, J. F., Rogez, H., Larondelle, Y., & Evers, D. (2009).** Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6), 517-524.
- **Andre, T. (2004).** Multicenter international study of oxaliplatin/5-fluorouracil/leukovorin in the adjuvant treatment of colon cancer (MOSAIC) investigators: oxaliplatin, fluorouracil and leukovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*, 50, 2243-2251.
- **Ansari, R., Mahdavinia, M., Sadjadi, A., Nouraie, M., Kamangar, F., Bishehsari, F., ... & Darvish-Moghadam, S. (2006).** Incidence and age distribution of

- colorectal cancer in Iran: results of a population-based cancer registry. *Cancer letters*, 240(1), 143-147.
- **AOAC (1990)**. Official Methods of Analysis. *Association of Official Analytical Chemists*, 15th Edition, Washington, D.C. USA.
 - **AOAC International. (1990)**. (Association of Official Analytical Chemist) *Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists*. 15th Ed. Gaithersburg, USA: AOAC Press; 1990.
 - **AOAC International. (1993)**. Methods of analysis for nutrition labeling. Airlington, USA.
 - **Araújo, J. R., Gonçalves, P., & Martel, F. (2011)**. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31(2), 77-87.
 - **Ardestani, A., & Yazdanparast, R. (2007)**. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of Teucrium polium on in vitro protein glycooxidation. *Food and chemical toxicology*, 45(12), 2402-2411.
 - **Ardestani, A., & Yazdanparast, R. (2007)**. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of Teucrium polium on in vitro protein glycooxidation. *Food and chemical toxicology*, 45(12), 2402-2411.
 - **Ashgar, U., Witkiewicz, A.K., Turner, N.C., Knudsen, E.S., (2015)**. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 14(2):130-46.
 - **Audigié, C.L., Figarelle, J., Zons, Z. (1980)**. Manipulation d'analyses biochimiques. *Ed. Doin. Paris*. 88-97.
 - **Aune, D., Chan, D. S., Lau, R., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011)**. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Bmj*, 343, d6617.
 - **Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., & Monzani, A. (1997)**. Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), 166-172.
 - **Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011)**. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395.
 - **Barb, D., Williams, C. J., Neuwirth, A. K., & Mantzoros, C. S. (2007)**. Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *The American journal of clinical nutrition*, 86(3), 858S-866S.
 - **Bardou, M., Barkun, A. N., & Martel, M. (2013)**. Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 62(6), 933-947.
 - **Baron, J. A., Beach, M. F., Mandel, J. S., Van Stolk, R. U., Haile, R. W., Sandler, R. S., ... & Bond, J. H. (1999)**. Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. *New England Journal of Medicine*, 340(2), 101-107.
 - **Barone, M., Lofano, K., De Tullio, N., Licino, R., Albano, F., & Di Leo, A. (2012)**. Dietary, endocrine, and metabolic factors in the development of colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal cancer*, 43(1), 13-19.

- **Basu, A., Das, M., Qanungo, S., Fan, X. J., DuBois, G., & Haldar, S. (2002).** Proteasomal degradation of human peptidyl prolyl isomerase pin1-pointing phospho Bcl2 toward dephosphorylation. *Neoplasia*, 4(3), 218-227.
- **Becker, S., Dossus, L., & Kaaks, R. (2009).** Obesity related hyperinsulinaemia and hyperglycaemia and cancer development. *Archives of physiology and biochemistry*, 115(2), 86-96.
- **Ben Hsouna, A., Saoudi, M., Trigui, M., Jamoussi, K., Boudawara, T., Jaoua, S., & Feki, A. El. (2011).** Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of Ceratonia siliqua leaf extract against CCl 4 induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(12), 3183–3191.
- **Beresford, S. A., Johnson, K. C., Ritenbaugh, C., Lasser, N. L., Snetselaar, L. G., Black, H. R., ... & Brunner, R. L. (2006).** Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *Jama*, 295(6), 643-654.
- **Bhardwaj, A., & Aggarwal, B. B. (2003).** Receptor-mediated choreography of life and death. *Journal of clinical immunology*, 23(5), 317-332.
- **Bidoli, E., Franceschi, S., Talamini, R., Barra, S., & La Vecchia, C. (1992).** Food consumption and cancer of the colon and rectum in North-Eastern Italy. *International Journal of Cancer*, 50(2), 223-229.
- **Bilinski, P., Wojtyla, A., Kapka-Skrzypczak, L., Chwedorowicz, R., Cyranka, M., & Studzinski, T. (2012).** Epigenetic regulation in drug addiction. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(3).
- **Bin-Chuan, J. I., Hsu, W. H., Yang, J. S., Hsia, T. C., Lu, C. C., Chiang, J. H., ... Chung, J. G. (2009).** Gallic Acid Induces Apoptosis via Caspase-3 and Mitochondrion-Dependent Pathways in Vitro and Suppresses Lung Xenograft Tumor Growth in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7596–7604.
- **Bingham, S. A., Day, N. E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., ... & Tjønneland, A. (2003).** Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The lancet*, 361(9368), 1496-1501.
- **Bingham, S. A., Norat, T., Moskal, A., Ferrari, P., Slimani, N., Clavel-Chapelon, F., ... & Overvad, K. (2005).** Is the association with fiber from foods in colorectal cancer confounded by folate intake?. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 14(6), 1552-1556.
- **Bishehsari, F. J. (2013).** B. Cancers of the Colon and Rectum; A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Management.
- **Bishehsari, F., Mahdavinia, M., Malekzadeh, R., Verginelli, F., Catalano, T., Sotoudeh, M., ... & Semeraro, D. (2006).** Patterns of K-ras mutation in colorectal carcinomas from Iran and Italy (a Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale study): influence of microsatellite instability status and country of origin. *Annals of oncology*, 17(suppl 7), vii91-vii96.

- **Blot, W. J., Lanier, A., Fraumeni Jr, J. F., & Bender, T. R. (1975).** Cancer mortality among Alaskan natives, 1960–69. *Journal of the National Cancer Institute*, 55(3), 547-554.
- **Bosscher, D., Breynaert, A., Pieters, L., & Hermans, N. (2009).** Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol*, 60(Suppl 6), 5-11.
- **Bostick, R. M., Potter, J. D., Kushi, L. H., Sellers, T. A., Steinmetz, K. A., McKenzie, D. R., ... & Folsom, A. R. (1994).** Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). *Cancer Causes and Control*, 5(1), 38-52.
- **Bouli, A. A., Hansali, M., & Owen, R. W. (2010).** Determination of phenolic composition of carob pods grown in different regions of Morocco. *Journal of Natural Products*, 3.
- **Bourne, L.C. & Rice-Evans, C. (1998).** Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 253, 222–227.
- **Burkitt, D. (1969).** Related disease—related cause?. *The Lancet*, 294(7632), 1229-1231.
- **Burnstein, M. J. (1993).** Dietary factors related to colorectal neoplasms. *Surgical Clinics of North America*, 73(1), 13-29.
- **Butler, L. G., Price, M. L., & Brotherton, J. E. (1982).** Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(6), 1087-1089.
- **Butler, L. M., Wang, R., Koh, W. P., Stern, M. C., Yuan, J. M., & Yu, M. C. (2009).** Marine n-3 and saturated fatty acids in relation to risk of colorectal cancer in Singapore Chinese: A prospective study. *International journal of cancer*, 124(3), 678-686.
- **cancer: a review. The American journal of clinical nutrition**, 86(3), 836S-842S.
- **Cassidy, J., Taberbero, J., Twelves, C., Brunet, R., Butts, C., Conroy, T., ... & Schöffski, P. (2004).** XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(11), 2084-2091.
- **Castaneda-Ovando, A., M. d. L. Pacheco-Hernandez, M. E. Paez-Hernández, J. A. Rodriguez et C. A. Galan-Vidal (2009).** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113(4), 859-871.
- **Catalano, L., Franco, I., Nobili, M. D., & Leita, L. (1999).** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents. A comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica (Italy)*, 43, 193-205.
- **Center, M. M., Jemal, A., & Ward, E. (2009).** International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 18(6), 1688-1694.
- **Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A., & Ward, E. (2009).** Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 59(6), 366-378.

- **Chan, A. O., Soliman, A. S., Zhang, Q., Rashid, A., Bedeir, A., Houlihan, P. S., ... & Kandilci, A. (2005).** Differing DNA methylation patterns and gene mutation frequencies in colorectal carcinomas from Middle Eastern countries. *Clinical cancer research*, 11(23), 8281-8287.
- **Chan, A. T., & Giovannucci, E. L. (2010).** Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2029-2043.
- **Chen, A., Xu, J., & Johnson, A. C. (2006).** Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. *Oncogene*, 25(2), 278-287.
- **Cho, E., Smith-Warner, S. A., Ritz, J., Van Den Brandt, P. A., Colditz, G. A., Folsom, A. R., ... & Holmberg, L. (2004).** Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Annals of internal medicine*, 140(8), 603-613.
- **Choi, H. J., & Park, J. H. Y. (2009).** Induction of G1 and G2/M cell cycle arrests by the dietary compound 3, 3'-diindolylmethane in HT-29 human colon cancer cells. *BMC gastroenterology*, 9(1), 39.
- **Choi, S. W., Stickel, F., Baik, H. W., Kim, Y. I., Seitz, H. K., & Mason, J. B. (1999).** Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific DNA hypomethylation in rat colon. *The Journal of nutrition*, 129(11), 1945-1950.
- **Choi, S. Y., Park, J. H. Y., Kim, J. S., Kim, M. K., Aruoma, O. I., & Sung, M. K. (2006).** Effects of quercetin and β -carotene supplementation on azoxymethane-induced colon carcinogenesis and inflammatory responses in rats fed with high-fat diet rich in ω -6 fatty acids. *Biofactors*, 27(1-4), 137-146.
- **Chu, K. M., H Cho, C., & Y Shin, V. (2013).** Nicotine and gastrointestinal disorders: its role in ulceration and cancer development. *Current pharmaceutical design*, 19(1), 5-10.
- **Chung, C. S., Jiang, Y., Cheng, D., & Birt, D. F. (2007).** Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin. *Molecular carcinogenesis*, 46(9), 773-782.
- **Chyesunong, E. T., Nguyen, T. T. T., Ong, C. K., & Lee (2004).** Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncology Reports*, 11, 727-733.
- **Clark, L. C., Combs, G. F., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., ... & Krongrad, A. (1996).** Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. *Jama*, 276(24), 1957-1963.
- **Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C., & Baraldi, M. (2002).** Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73(7-8), 674-684.
- **Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C., & Baraldi, M. (2002).** Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73(7-8), 674-684.

- **Cotman, C. W., & Anderson, A. J. (1995).** A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 10(1), 19-45.
- **Croce, C. M., Tsujimoto, Y., Erikson, J., & Nowell, P. (1984).** Chromosome translocations and B cell neoplasia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 51(3), 258-267.
- **Cross, A. J., & Sinha, R. (2004).** Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and molecular mutagenesis*, 44(1), 44-55.
- **Cruz-Correa, M., Shoskes, D. A., Sanchez, P., Zhao, R., Hyland, L. M., Wexner, S. D., & Giardiello, F. M. (2006).** Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(8), 1035-1038.
- **Curtin, K., Slattery, M. L., & Samowitz, W. S. (2011).** CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Pathology research international*, 2011.
- **Custódio, L., Escapa, A. L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., ... Romano, A. (2011).** In vitro cytotoxic effects and apoptosis induction by a methanol leaf extract of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 1987-1996.
- **D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010).** Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International journal of molecular sciences*. 11, 1321-1342.
- **Dalberg, J., Jacobsen, O., Nielsen, N. H., Steig, B. A., & Storm, H. H. (1998).** Colorectal cancer in the Faroe Islands--a setting for the study of the role of diet. *Journal of epidemiology and biostatistics*, 4(1), 31-36.
- **Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004).** Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- **Daniel, C. R., McCullough, M. L., Patel, R. C., Jacobs, E. J., Flanders, W. D., Thun, M. J., & Calle, E. E. (2009).** Dietary intake of ω -6 and ω -3 fatty acids and risk of colorectal cancer in a prospective cohort of US men and women. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 18(2), 516-525.
- **Dashwood, R. H., & Ho, E. (2007).** Dietary histone deacetylase inhibitors: from cells to mice to man. In *Seminars in cancer biology*, 17(5), 363-369
- **Davidson, L. A., Wang, N., Shah, M. S., Lupton, J. R., Ivanov, I., & Chapkin, R. S. (2009).** n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis*, 30(12), 2077-2084.
- **de Heredia, F. P., Gómez-Martínez, S., & Marcos, A. (2012).** Obesity, inflammation and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(02), 332-338.
- **de Kok, T. M., van Breda, S. G., & Manson, M. M. (2008).** Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *European journal of nutrition*, 47(2), 51-59.

- **del Pino, M. C. Á., Hervás, G., Mantecón, Á. R., Giráldez, F. J., & Frutos, P. (2005).** Comparison of biological and chemical methods, and internal and external standards, for assaying tannins in Spanish shrub species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(4), 583-590.
- **Derry, M. M., Raina, K., Agarwal, C. & Agarwal. R. (2013).** Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Front Oncol.*, 14;3:119.
- **Dos Santos, H. M., Oliveira, D. F., De Carvalho, D. A., Pinto, J. M. A., Campos, V. A. C., Mourão, A. R. B., ... Costa-Lotuf, L. V. (2010).** Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicines*, 64(2), 231-238.
- **DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- **Dunn, J. E. (1975).** Cancer epidemiology in populations of the United States—with emphasis on Hawaii and California—and Japan. *Cancer research*, 35(11 Part 2), 3240-3245.
- **Duthie, S. J. (2011).** Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(1), 101-109.
- **Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J. L., Sipos, W., Uthman, A., ... & Tschachler, E. (2008).** Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Molecular biology and evolution*, 25(5), 831-841.
- **El Gharras, H. (2009).** Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology* 44(12), 2512-2518.
- **El Hajaji, H., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., ... & Lachkar, M. (2010).** Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of Carob tree leaves from Morocco. *Records of Natural Products*, 4(4), 193.
- **ElAttar, T. M., & Virji, A. S. (1999).** Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. *Anti-Cancer Drugs*, 10(2), 187-194.
- **Endo, H., Hosono, K., Uchiyama, T., Sakai, E., Sugiyama, M., Takahashi, H., ... & Nakajima, A. (2011).** Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut*, 60, 1363-1371
- **Esakkirajan, M., Prabhu, N. M., Arulvasu, C., Beulaja, M., Manikandan, R., Thiagarajan, R., ... Dhanasekaran, G. (2014).** Anti-proliferative effect of a compound isolated from *Cassia auriculata* against human colon cancer cell line HCT 15. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 120, 462-466.

- **Esposito, D. L., Aru, F., Lattanzio, R., Morgano, A., Abbondanza, M., Malekzadeh, R., ... & Moschetta, A. (2012).** The insulin receptor substrate 1 (IRS1) in intestinal epithelial differentiation and in colorectal cancer. *PLoS One*, 7(4), e36190.
- **Eum, K. H., & Lee, M. (2011).** Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 348(1-2), 61-68.
- **Evan, I.G., Vousden, K.H. (2001).** Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 411:342-348.
- **Fadel, F., Fattouch, S., Tahrouch, S., Lahmar, R., Benddou, A., & Hatimi, A. (2011).** The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds (Les composés phénoliques des pulpes et des graines de *Ceratonia siliqua*). *J. Mater. Environ. Sci*, 2(3), 285-292.
- **Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992).** Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148(7), 2207-2216.
- **Federico, A., D'Aiuto, E., Borriello, F., Barra, G., Gravina, A. G., Romano, M., & De Palma, R. (2010).** Fat: a matter of disturbance for the immune system. *World J Gastroenterol*, 16(38), 4762-72.
- **Fenton, J. I., Hord, N. G., Lavigne, J. A., Perkins, S. N., & Hursting, S. D. (2005).** Leptin, insulin-like growth factor-1, and insulin-like growth factor-2 are mitogens in ApcMin/+ but not Apc+/+ colonic epithelial cell lines. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 14(7), 1646-1652.
- **Ferguson, L. R., Philpott, M., & Karunasinghe, N. (2004).** Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198(1), 147-159.
- **Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010).** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.
- **Ferrari, P., Jenab, M., Norat, T., Moskal, A., Slimani, N., Olsen, A., ... & Clavel-Chapelon, F. (2007).** Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *International journal of cancer*, 121(9), 2065-2072.
- **Fireman, Z., Sandler, E., Kopelman, Y., Segal, A., & Sternberg, A. (2001).** Ethnic differences in colorectal cancer among Arab and Jewish neighbors in Israel. *The American journal of gastroenterology*, 96(1), 204-207.
- **Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., Macheix, J.J. (2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes pp 121-216.
- **Flood, A., Rastogi, T., Wirfält, E., Mitrou, P. N., Reedy, J., Subar, A. F., ... & Schatzkin, A. (2008).** Dietary patterns as identified by factor analysis and colorectal cancer among middle-aged Americans. *The American journal of clinical nutrition*, 88(1), 176-184.

- **Flood, A., Velie, E. M., Sinha, R., Chatterjee, N., Lacey Jr, J. V., Schairer, C., & Schatzkin, A. (2003).** Meat, fat, and their subtypes as risk factors for colorectal cancer in a prospective cohort of women. *American journal of epidemiology*, 158(1), 59-68.
- **Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927).** On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological Chemistry*, 73(2), 627-650.
- **Folprecht, G., & Köhne, C. H. (2004).** The role of new agents in the treatment of colorectal cancer. *Oncology*, 66(1), 1-17.
- **Forsyth, C. B., Tang, Y., Shaikh, M., Zhang, L., & Keshavarzian, A. (2010).** Alcohol stimulates activation of Snail, epidermal growth factor receptor signaling, and biomarkers of epithelial–mesenchymal transition in colon and breast cancer cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(1), 19-31.
- **Franceschi, S., La Vecchia, C., Russo, A., Favero, A., Negri, E., Conti, E., ... & Decarli, A. (1998).** Macronutrient intake and risk of colorectal cancer in Italy. *International journal of cancer*, 76(3), 321-324.
- **Fu, L., Xu, B. T., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xu, X. R., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2011).** Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *International journal of molecular sciences*, 12(4), 2112-2124.
- **Fung, T. T., Hu, F. B., Wu, K., Chiuve, S. E., Fuchs, C. S., & Giovannucci, E. (2010).** The Mediterranean and Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diets and colorectal cancer. *The American journal of clinical nutrition*, 92(6), 1429-1435.
- **Galeone, C., Turati, F., La Vecchia, C., & Tavani, A. (2010).** Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of case–control studies. *Cancer Causes & Control*, 21(11), 1949-1959.
- **Garland, C. F., & Garland, F. C. (1980).** Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer?. *International journal of epidemiology*, 9(3), 227-231.
- **Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., ... Cossarizza, A. (2011).** Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- **Giftson, J. S., Jayanthi, S., & Nalini, N. (2010).** Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Investigational New Drugs*, 28(3), 251–259.
- **Gil, A., Aguilera, C. M., Gil-Campos, M., & Cañete, R. (2007).** Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *British Journal of Nutrition*, 98(S1), S121-S126.
- **Gingras, D., & Béliveau, R. (2011).** Colorectal cancer prevention through dietary and lifestyle modifications. *Cancer Microenvironment*, 4(2), 133-139.
- **Giovannucci, E. (1998).** Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *American Journal of Epidemiology*, 147(11), 1043-1052.
- **Giovannucci, E. (2002).** Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *The Journal of nutrition*, 132(8), 2350S-2355S.

- **Giovannucci, E. (2007).** Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon
- **Giovannucci, E., Rimm, E. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (1995).** Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(4), 265-273.
- **Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., & Willett, W. C. (1994).** Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer research*, 54(9), 2390-2397.
- **Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R. F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K., ... & Alberts, S. R. (2004).** A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(1), 23-30.
- **Golstein, P., Ojcius, D. M., & Young, J. D. E. (1991).** Cell death mechanisms and the immune system. *Immunological reviews*, 121(1), 29-65.
- **Grau, M. V., Baron, J. A., Sandler, R. S., Haile, R. W., Beach, M. L., Church, T. R., & Heber, D. (2003).** Vitamin D, calcium supplementation, and colorectal adenomas: results of a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(23), 1765-1771.
- **Green, D. R., & Reed, J. C. (1998).** Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309.
- **Haas, S. L., Ye, W., & Löhr, J. M. (2012).** Alcohol consumption and digestive tract cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 15(5), 457-467.
- **Hamer, H. M., Jonkers, D. M. A. E., Venema, K., Vanhoutvin, S. A. L. W., Troost, F. J., & Brummer, R. J. (2008).** Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27(2), 104-119.
- **Hecht, S. S. (1999).** DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1), 127-142.
- **Heinonen, S., Nurmi, T. & Liukkonen, K. (2001).** In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 49, 3178-3186.
- **Henry-Mowatt, J., Dive, C., Martinou, J.-C., & James, D. (2004).** Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene*, 23(16), 2850-2860.
- **Hirsch, T., Xiang, J., Chao, D. T., Korsmeyer, S. J., Scaife, J. F., Colell, A., ... Williamson, J. R. (1998).** Caspases: Enemies Within. *Science*, 281(August), 1312-1316.
- **Hockenbery, D. M., Giedt, C. D., O'Neill, J. W., Manion, M. K., & Banker, D. E. (2002).** Mitochondria and apoptosis: new therapeutic targets. *Advances in cancer research*, 85, 203-242.
- **Hofstad, B., Almendingen, K., Vatn, M., Andersen, S. N., Owen, R. W., Larsen, S., & Osnes, M. (1998).** Growth and recurrence of colorectal polyps: a double-

- blind 3-year intervention with calcium and antioxidants. *Digestion*, 59(2), 148-156.
- **Hope, C., Planutis, K., Planutiene, M., Moyer, M. P., Johal, K. S., Woo, J., ... & Holcombe, R. F. (2008).** Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention. *Molecular nutrition & food research*, 52(S1).
 - **Howe, G. R., Benito, E., Castelleto, R., Cornée, J., Estève, J., Gallagher, R. P., ... & Kune, S. (1992).** Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 84(24), 1887-1896.
 - **Hu, F. B. (2002).** Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Current opinion in lipidology*, 13(1), 3-9.
 - **Hu, W., & Kavanagh, J. J. (2003).** Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The Lancet Oncology*, 4(12), 721-9.
 - **Huang, Y. C., Chang, Y. H., & Shao, Y. Y. (2006).** Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry*, 98(3), 529-538.
 - **Hughes, L. A., Williamson, E. J., van Engeland, M., Jenkins, M. A., Giles, G. G., Hopper, J. L., ... & van den Brandt, P. A. (2012).** Body size and risk for colorectal cancers showing BRAF mutations or microsatellite instability: a pooled analysis. *International journal of epidemiology*, 41(4), 1060-1072.
 - **Huycke, M. M., & Gaskins, H. R. (2004).** Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Experimental Biology and Medicine*, 229(7), 586-597.
 - **Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T., Sakagushi, N., Ogihara, Y., & Yabu, Y. (1994).** Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
 - **ISO 659. (1988).** Graines oléagineuses – détermination de la teneur en huile. *International Organisation for Standardization (ISO)*. Geneva.
 - **Jacobs, D. R., & Steffen, L. M. (2003).** Nutrients, foods, and dietary patterns as exposures in research: a framework for food synergy. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3), 508S-513S.
 - **Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., & Mandal, M. (2013).** Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19(43), 7726-7734.
 - **Janicke, B., Önning, G., & Oredsson, S. M. (2005).** Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6658-6665.
 - **Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011).** Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.
 - **Jimoh, F. O., Adedapo, A. A., & Afolayan, A. J. (2010).** Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water

- extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food and chemical toxicology*, 48(3), 964-971.
- **Johnson, I. T. (2007)**. Phytochemicals and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(02), 207-215.
 - **Joo, Y. E., Karrasch, T., Mühlbauer, M., Allard, B., Narula, A., Herfarth, H. H., & Jobin, C. (2009)**. Tomato lycopene extract prevents lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling but worsens dextran sulfate sodium-induced colitis in NF- κ B EGFP mice. *PLoS One*, 4(2), e4562.
 - **Kampman, E., Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A., & van't Veer, P. (1994)**. Fermented dairy products, calcium, and colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Cancer Research*, 54(12), 3186-3190.
 - **Karsa, L. V., Lignini, T. A., Patnick, J., Lambert, R., & Sauvaget, C. (2010)**. The dimensions of the CRC problem. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 24(4), 381-396.
 - **Kato, I., Akhmedkhanov, A., Koenig, K., Toniolo, P. G., Shore, R. E., & Riboli, E. (1997)**. Prospective study of diet and female colorectal cancer: the New York University Women's Health Study. *Nutr Cancer*, 28, 276-81.
 - **Kato, I., Dnistrian, A. M., Schwartz, M., Toniolo, P., Koenig, K., Shore, R. E., ... & Riboli, E. (1999)**. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *British Journal of Cancer*, 79(11-12), 1917.
 - **Kelishadi, R. (2007)**. Childhood overweight, obesity, and the metabolic syndrome in developing countries. *Epidemiologic reviews*, 29(1), 62-76.
 - **Kelishadi, R., Motlagh, M. E., Roomizadeh, P., Abtahi, S. H., Qorbani, M., Taslimi, M., ... & Karimi, M. (2013)**. First report on path analysis for cardiometabolic components in a nationally representative sample of pediatric population in the Middle East and North Africa (MENA): the CASPIAN-III Study. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 62(3), 257-265.
 - **Kesse, E., Clavel-Chapelon, F., & Boutron-Ruault, M. C. (2006)**. Dietary patterns and risk of colorectal tumors: a cohort of French women of the National Education System (E3N). *American journal of epidemiology*, 164(11), 1085-1093.
 - **Khan, N., & Mukhtar, H. (2008)**. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Letters*, 269(2), 269-280.
 - **Khaw, K. T., Wareham, N., Bingham, S., Luben, R., Welch, A., & Day, N. (2004)**. Preliminary communication: glycated hemoglobin, diabetes, and incident colorectal cancer in men and women: a prospective analysis from the European prospective investigation into cancer-Norfolk study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(6), 915-919.
 - **Khuhaprema, T., & Srivatanakul, P. (2008)**. Colon and rectum cancer in Thailand: an overview. *Japanese journal of clinical oncology*, 38(4), 237-243.
 - **Kim, H. J., Kim, S. K., Kim, B. S., Lee, S. H., Park, Y. S., Park, B. K., ... & Cho, S. D. (2010)**. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8643-8650.

- **Kim, J. M., Kim, J. S., Yoo, H., Choung, M. G., & Sung, M. K. (2008).** Effects of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation in vitro and in vivo. *J. Agric. Food Chem*, 56(18), 8427-8433.
- **Kim, M. S., Lee, J., & Sidransky, D. (2010).** DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(1), 181-206.
- **Kim, Y. H., Kwon, H. S., Kim, D. H., Shin, E. K., Kang, Y. H., Park, Y., ... & Kim, J. K. (2009).** 3, 3'-diindolylmethane attenuates colonic inflammation and tumorigenesis in mice. *Inflammatory bowel diseases*, 15(8), 1164-1173.
- **Kim, Y. H., Lee, H. C., Kim, S. Y., Yeom, Y. I., Ryu, K. J., Min, B. H., ... & Rhee, J. C. (2011).** Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations. *Annals of surgical oncology*, 18(8), 2338-2347.
- **Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995).** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, 14(22), 5579.
- **Klenow, S., Gleib, M., Haber, B., Owen, R., & Pool-Zobel, B. L. (2008).** Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food and chemical toxicology*, 46(4), 1389-1397.
- **Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (1997).** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275(5303), 1132-1136.
- **Ko, L. J., & Prives, C. (1996).** p53: puzzle and paradigm. *Genes & development*, 10(9), 1054-1072.
- **Kuhnle, G. G. C., & Bingham, S. A. (2007).** Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans*, 35, 1355-7.
- **Kuismanen, S. A., Holmberg, M. T., Salovaara, R., de la Chapelle, A., & Peltomäki, P. (2000).** Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *The American journal of pathology*, 156(5), 1773-1779.
- **Kune, G. A., & Vitetta, L. (1992).** Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutrition and cancer*, 18(2), 97-111.
- **Kuntz, S., Wenzel, U., & Daniel, H. (1999).** Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European journal of nutrition*, 38(3), 133-142.
- **Lai, K. C., Huang, A. C., Hsu, S. C., Kuo, C. L., Yang, J. S., Wu, S. H., & Chung, J. G. (2010).** Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human colon cancer HT29 cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 and urokinase plasminogen (uPA) through PKC and MAPK signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(5), 2935-2942.

- **Lakatos, P. L., Kiss, L. S., & Miheller, P. (2011).** Nutritional influences in selected gastrointestinal diseases. *Digestive Diseases*, 29(2), 154-165.
- **Lakshmi, V. M., Nauseef, W. M., & Zenser, T. V. (2005).** Myeloperoxidase potentiates nitric oxide-mediated nitrosation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 1746-1753.
- **Lamprecht, S. A., & Lipkin, M. (2003).** Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature reviews cancer*, 3(8), 601-614.
- **Lao, V. V., & Grady, W. M. (2011).** Epigenetics and colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(12), 686-700.
- **Lavrik, I., Golks, A., & Krammer, P. H. (2005).** Death receptor signaling. *Journal of cell science*, 118(2), 265-267.
- **Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., & Nicotera, P. (1997).** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 185(8), 1481-1486.
- **Lempereur, I., Rouau, X. & Abecassis, J. (1997).** Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25, 103–110.
- **Levine, A. J. (1997).** P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3), 323–331.
- **Li, G., Ma, D., Zhang, Y., Zheng, W., & Wang, P. (2013).** Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies. *Public health nutrition*, 16(02), 346-357.
- **Li, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W., & Chen, F. (2008).** Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 385-390.
- **Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489.
- **Li, X., Yao, X., Wang, Y., Hu, F., Wang, F., Jiang, L., ... & Zhao, Y. (2013).** MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PLoS One*, 8(3), e59064.
- **Lin, C. B., Lin, C. C., & Tsay, G. J. (2012).** 6-Gingerol inhibits growth of colon cancer cell LoVo via induction of G2/M arrest. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- **Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996).** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), 147-157.
- **Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2006).** Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(4), 1256-1264.

- **Lodovici, M., & Bigagli, E. (2009).** Biomarkers of induced active and passive smoking damage. *International journal of environmental research and public health*, 6(3), 874-888.
- **Lu, R., Wang, X., Sun, D. F., Tian, X. Q., Zhao, S. L., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2008).** Folic acid and sodium butyrate prevent tumorigenesis in a mouse model of colorectal cancer. *Epigenetics*, 3(6), 330-335.
- **Lund, E. K., Belshaw, N. J., Elliott, G. O., & Johnson, I. T. (2011).** Recent advances in understanding the role of diet and obesity in the development of colorectal cancer. *Proceedings of the nutrition society*, 70(02), 194-204.
- **MacLean, C. H., Newberry, S. J., Mojica, W. A., Khanna, P., Issa, A. M., Suttorp, M. J., ... & Morton, S. C. (2006).** Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *Jama*, 295(4), 403-415.
- **Makkar, H. P., & Becker, K. (1993).** Behaviour of tannic acid from various commercial sources towards redox, metal complexing and protein precipitation assays of tannins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(3), 295-299.
- **Malekzadeh, R., Bishehsari, F., Mahdavinia, M., & Ansari, R. (2009).** Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in Iran: a review. *Arch Iran Med*, 12(2), 161-169.
- **Malekzadeh, R., Bishehsari, F., Mahdavinia, M., & Ansari, R. (2009).** Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in Iran: a review. *Arch Iran Med*, 12(2), 161-9.
- **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79:727-47.
- **Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005)** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81, 230S- 42S.
- **Manson, M. M. (2003).** Cancer prevention—the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends in molecular medicine*, 9(1), 11-18.
- **Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., ... & Kroemer, G. (1996).** Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 184(3), 1155-1160.
- **Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., ... & Ashkenazi, A. (1997).** A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Current Biology*, 7(12), 1003-1006.
- **Martínez, M. E., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Hunter, D. J., Speizer, F. E., ... & Willett, W. C. (1996).** Calcium, vitamin D, and the occurrence of colorectal cancer among women. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(19), 1375-1382.
- **Mason, J. B., Dickstein, A., Jacques, P. F., Haggarty, P., Selhub, J., Dallal, G., & Rosenberg, I. H. (2007).** A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important

biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16(7), 1325-1329.

- **Mason, J. B., Dickstein, A., Jacques, P. F., Haggarty, P., Selhub, J., Dallal, G., & Rosenberg, I. H. (2007).** A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16(7), 1325-1329.
- **Matsushita, Y., Takahashi, Y., Mizoue, T., Inoue, M., Noda, M., & Tsugane, S. (2008).** Overweight and obesity trends among Japanese adults: a 10-year follow-up of the JPHC Study. *International Journal of Obesity*, 32(12), 1861-1867.
- **Maury, E., & Brichard, S. M. (2010).** Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, 314(1), 1-16.
- **McGarr, S. E., Ridlon, J. M., & Hylemon, P. B. (2005).** Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *Journal of clinical gastroenterology*, 39(2), 98-109.
- **McMichael, A. J., & Giles, G. G. (1988).** Cancer in migrants to Australia: extending the descriptive epidemiological data. *Cancer Research*, 48(3), 751-756.
- **Mebirouk-Boudechiche, L., Cherif, M., Boudechiche, L., & Sammar, F. (2014).** Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie. *Revue Méd. Vét*, 165, 11-12.
- **Mertens-Talcott, S. U., & Percival, S. S. (2005).** Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer letters*, 218(2), 141-151.
- **Meyerhardt, J. A., & Mayer, R. J. (2005).** Systemic therapy for colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 352(5), 476-487.
- **Michels, G., Wätjen, W., Niering, P., Steffan, B., Thi, Q. H. T., Chovolou, Y., ... & Kahl, R. (2005).** Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology*, 206(3), 337-348.
- **Michels, K. B., Giovannucci, E., Chan, A. T., Singhania, R., Fuchs, C. S., & Willett, W. C. (2006).** Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Research*, 66(7), 3942-3953.
- **Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Coppedè, F. (2011).** Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *BioMed Research International*, 2011.
- **Millen, A. E., Subar, A. F., Graubard, B. I., Peters, U., Hayes, R. B., Weissfeld, J. L., ... & Ziegler, R. G. (2007).** Fruit and vegetable intake and prevalence of colorectal adenoma in a cancer screening trial. *The American journal of clinical nutrition*, 86(6), 1754-1764.
- **Minami, Y., Nishino, Y., Tsubono, Y., Tsuji, I., & Hisamichi, S. (2006).** Increase of colon and rectal cancer incidence rates in Japan: trends in incidence rates in Miyagi Prefecture, 1959-1997. *Journal of epidemiology*, 16(6), 240-248.

- **Minker, C., Duban, L., Karas, D., Järvinen, P., Lobstein, A., & Muller, C. D. (2015).** Impact of procyanidins from different berries on caspase 8 activation in colon cancer. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- **Misra, A., & Khurana, L. (2008).** Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93 (11 supplement 1), s9-s30.
- **Mokhtari, M., Sharifi, S., & Shahamir Tabatabaee, M. (2011).** The effect of hydro-alcoholic seeds extract of *Ceratonia siliqua* on the blood glucose and lipids concentration in diabetic male rats. *International Conference on Life Science and Technology*, IPCBEE vol.3, 82-86.
- **Moon, H. S., Liu, X., Nagel, J. M., Chamberland, J. P., Diakopoulos, K. N., Brinkoetter, M. T., ... & Mantzoros, C. S. (2012).** Salutary effects of adiponectin on colon cancer: in vivo and in vitro studies in mice. *Gut*, 62, 561-570
- **Moossavi, S., & Bishehsari, F. (2012).** Inflammation in sporadic colorectal cancer. *Archives of Iranian Medicine (AIM)*, 15(3), 166-170
- **Moreno-Jimenez, M. R., Trujillo-Esquivel, F., Gallegos-Corona, M. A., Reynoso-Camacho, R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., ... Ramos-Gomez, M. (2015).** Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 144–153.
- **Moschos, S. J., & Mantzoros, C. S. (2002).** The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology*, 63(4), 317-332.
- **Mouria, M., Gukovskaya, A. S., Jung, Y., Buechler, P., Hines, O. J., Reber, H. A., & Pandol, S. J. (2002).** Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *International Journal of Cancer*, 98(5), 761-769.
- **Nagata, S. (1999).** Fas ligand-induced apoptosis. *Annual review of genetics*, 33(1), 29-55.
- **Nani, A., Belarbi, M., Ksouri-Megdiche, W., Abdoul-Azize, S., Benammar, C., Ghiringhelli, F., ... & Khan, N. A. (2015).** Effects of polyphenols and lipids from *Pennisetum glaucum* grains on T-cell activation: modulation of Ca²⁺ and ERK1/ERK2 signaling. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 426.
- **Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F, Scaccini, C. (2002).** Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem.* 50, 5735– 41.
- **Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T., & Youle, R. J. (1999).** Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO journal*, 18(9), 2330-2341.
- **Nian, H., Delage, B., Ho, E., & Dashwood, R. H. (2009).** Modulation of histone deacetylase activity by dietary isothiocyanates and allyl sulfides: studies with sulforaphane and garlic organosulfur compounds. *Environmental and molecular mutagenesis*, 50(3), 213-221.
- **Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997).** Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences*, 22(8), 299-306.

- **Niculescu, A. B., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., & Reed, S. I. (1998).** Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 629–643.
- **Nieminen, T. T., Shoman, S., Eissa, S., Peltomäki, P., & Abdel-Rahman, W. M. (2011).** Distinct genetic and epigenetic signatures of colorectal cancers according to ethnic origin. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 21, 202-211
- **Ning, Y., Wang, L., & Giovannucci, E. L. (2010).** A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obesity reviews*, 11(1), 19-30.
- **Nkondjock A (2009).** Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. *Cancer Lett* 2009; 277: 121-125.
- **Oyesanmi, O., Snyder, D., Sullivan, N., Reston, J., Treadwell, J., Schoelles, K.M. (2010).** Alcohol consumption and cancer risk: understanding possible causal mechanisms for breast and colorectal cancers. *Evidence Report/Technology Assessment*, (197), 1-151
- **Padidar, S., Farquharson, A. J., Williams, L. M., Kelaiditi, E., Hoggard, N., Arthur, J. R., & Drew, J. E. (2011).** Leptin up-regulates pro-inflammatory cytokines in discrete cells within mouse colon. *Journal of cellular physiology*, 226(8), 2123-2130.
- **Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., ... & Dixit, V. M. (1998).** Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS letters*, 431(3), 351-356.
- **Parasramka, M. A., Dashwood, W. M., Wang, R., Abdelli, A., Bailey, G. S., Williams, D. E., ... & Dashwood, R. H. (2012).** MicroRNA profiling of carcinogen-induced rat colon tumors and the influence of dietary spinach. *Molecular nutrition & food research*, 56(8), 1259-1269.
- **Park, C. H., Chang, J. Y., Hahm, E. R., Park, S., Kim, H. K., & Yang, C. H. (2005).** Quercetin, a potent inhibitor against β -catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(1), 227-234.
- **Park, S. M., Lim, M. K., Shin, S. A., & Yun, Y. H. (2006).** Impact of prediagnosis smoking, alcohol, obesity, and insulin resistance on survival in male cancer patients: National Health Insurance Corporation Study. *Journal of clinical oncology*, 24(31), 5017-5024.
- **Park, Y., Hunter, D. J., Spiegelman, D., Bergkvist, L., Berrino, F., van den Brandt, P. A., ... & Giovannucci, E. (2005).** Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *Jama*, 294(22), 2849-2857.
- **Payne, J. E. (1990).** Colorectal carcinogenesis. *ANZ Journal of Surgery*, 60(1), 11-18.
- **Peter, M. E., & Krammer, P. H. (2003).** The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), 26-35.

- **Peters, U., McGlynn, K. A., Chatterjee, N., Gunter, E., Garcia-Closas, M., Rothman, N., & Sinha, R. (2001).** Vitamin D, calcium, and vitamin D receptor polymorphism in colorectal adenomas. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10(12), 1267-1274.
- **Peters, U., Sinha, R., Chatterjee, N., Subar, A. F., Ziegler, R. G., Kulldorff, M., ... & Hayes, R. B. (2003).** Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *The Lancet*, 361(9368), 1491-1495.
- **Pietinen, P., Malila, N., Virtanen, M., Hartman, T. J., Tangrea, J. A., Albanes, D., & Virtamo, J. (1999).** Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men. *Cancer Causes & Control*, 10(5), 387-396.
- **Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., ... & Godowski, P. J. (1998).** Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, 396(6712), 699-703.
- **Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *e-Revue de génie industriel*, N° 4, pp1313-8871.
- **Porrini, M., Riso, P. (2008).** Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutr. Metab. Cardiovasc Dis.* 18, 647-650.
- **Potter, J. D. (1999).** Colorectal cancer: molecules and populations. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(11), 916-932.
- **Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B., & Fernandez-Salguero, P. M. (2002).** The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: Cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochemical Pharmacology*, 64(9), 1375-1386.
- **Ramos, S. (2007).** Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(7), 427-442.
- **Ramos, S. (2008).** Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular nutrition & food research*, 52(5), 507-526.
- **Reed, J. C., Zha, H., Aime-Sempe, C., Takayama, S., & Wang, H. G. (1996).** Structure—Function Analysis of Bcl-2 Family Proteins. In *Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation VI* (pp. 99-112). Springer US.
- **Reid, M. E., Duffield-Lillico, A. J., Sunga, A., Fakih, M., Alberts, D. S., & Marshall, J. R. (2006).** Selenium supplementation and colorectal adenomas: an analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *International journal of cancer*, 118(7), 1777-1781.
- **Rehnan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F., & Zwahlen, M. (2008).** Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet*, 371(9612), 569-578.
- **Roller, M., Femia, A. P., Caderni, G., Rechkemmer, G., & Watzl, B. (2004).** Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-

- enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. *British Journal of Nutrition*, 92(06), 931-938.
- **Rossi, M., Amaretti, A., & Raimondi, S. (2011).** Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*, 3(1), 118-134.
 - Rossi, S., Di Narzo, A. F., Mestdagh, P., Jacobs, B., Bosman, F. T., Gustavsson, B., ... & Delorenzi, M. (2012). microRNAs in colon cancer: a roadmap for discovery. *FEBS letters*, 586(19), 3000-3007.
 - **Rotondal, J., Nicholsonz, D. W., Fazilz, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., ... & Ruel, R. (1996).** The three—dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature structural biology*, 3(7).
 - **Ruiz G. (2005).** Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges, discipline : Chimie appliquée-Chimie des substances Naturelles. 258.
 - **Salem, A. F. Z. (2005).** Impact of season of harvest on in vitro gas production and dry matter degradability of *Acacia saligna* leaves with inoculum from three ruminant species. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 67-79.
 - **Sanders, L. M., Henderson, C. E., Hong, M. Y., Barhoumi, R., Burghardt, R. C., Wang, N., ... & Lupton, J. R. (2004).** An increase in reactive oxygen species by dietary fish oil coupled with the attenuation of antioxidant defenses by dietary pectin enhances rat colonocyte apoptosis. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3233-3238.
 - **Sandhu, M. S., White, I. R., & McPherson, K. (2001).** Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10(5), 439-446.
 - **Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2005).** *Natural products isolation* (Vol. 20). Springer Science & Business Media.
 - **Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., ... & Kaneko, M. (2010).** Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC cancer*, 10(1), 370.
 - **Sasazuki, S., Inoue, M., Iwasaki, M., Sawada, N., Shimazu, T., Yamaji, T., ... & Tsugane, S. (2011).** Intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids and development of colorectal cancer by subsite: Japan Public Health Center-based prospective study. *International journal of cancer*, 129(7), 1718-1729.
 - **Satia-Abouta, J., Galanko, J. A., Potter, J. D., Ammerman, A., Martin, C. F., & Sandler, R. S. (2003).** Associations of total energy and macronutrients with colon cancer risk in African Americans and Whites: results from the North Carolina colon cancer study. *American journal of epidemiology*, 158(10), 951-962.
 - **Sayin, S. I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H. U., Bamberg, K., ... & Bäckhed, F. (2013).** Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell metabolism*, 17(2), 225-235.

- **Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- **Scharlau, D., Borowicki, A., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Miene, C., ... & Gleis, M. (2009).** Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 39-53.
- **Schatzkin, A., Lanza, E., Corle, D., Lance, P., Iber, F., Caan, B., ... & Kikendall, J. W. (2000).** Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. *New England Journal of Medicine*, 342(16), 1149-1155.
- **Schneider, P., & Tschopp, J. (2000).** Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, 74(2), 281-286.
- **Schnekenburger, M., & Diederich, M. (2012).** Epigenetics offer new horizons for colorectal cancer prevention. *Current colorectal cancer reports*, 8(1), 66-81.
- **Schuler, M., Bossy-Wetzell, E., Goldstein, J. C., Fitzgerald, P., & Green, D. R. (2000).** P53 Induces Apoptosis By Caspase Activation Through Mitochondrial Cytochrome C Release. *J Biol Chem*, 275(10), 7337-7342.
- **Schwartz, G.K. & Dickson, M.A. (2009).** Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3): 153-66.
- **Sedkaoui, C. (2015)** thèse de **Doctorat** en Sciences Médicales. Université de Tizi-Ouzou.
- **Seibel, J., Molzberger, A. F., Hertrampf, T., Laudenschlager, U., & Diel, P. (2009).** Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *European journal of nutrition*, 48(4), 213-220.
- **Seitz, H. K., Simanowski, U. A., Garzon, F. T., Rideout, J. M., Peters, T. J., Koch, A., ... & Maiwald, M. (1990).** Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology*, 98(2), 406-413.
- **Shaheen, N. J., Silverman, L. M., Keku, T., Lawrence, L. B., Rohlf, E. M., Martin, C. F., ... & Sandler, R. S. (2003).** Association between hemochromatosis (HFE) gene mutation carrier status and the risk of colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(2), 154-159.
- **She, Q.-B., Bode, A. M., Ma, W.-Y., Chen, N.-Y., & Dong, Z. (2001).** Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.*, 61(4), 1604-1610.
- **Sheffer, M., Simon, A. J., Jacob-Hirsch, J., Rechavi, G., Domany, E., Givol, D., & D'Orazi, G. (2011).** Genome-wide analysis discloses reversal of the hypoxia-induced changes of gene expression in colon cancer cells by zinc supplementation. *Oncotarget*, 2(12), 1191-1202.
- **Shehzad, A., Iqbal, W., Shehzad, O., & Lee, Y. S. (2012).** Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)*, 11(1), 8-20.

- **Shen., X.J., Zhou., J.D., Dong J.Y., Ding., W.Q., & Wu. , J.C. (2012).** Dietary intake of n-3 fatty acids and colorectal cancer risk: a meta-analysis of data from 489 000 individuals. *British Journal of Nutrition*, 108, 1550-1556.
- **Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., ... & Goddard, A. D. (1997).** Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, 277(5327), 818-821.
- **Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999).** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13(12), 1501-1512.
- **Shimizu, M., Deguchi, A., Lim, J. T., Moriwaki, H., Kopelovich, L., & Weinstein, I. B. (2005).** (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 11(7), 2735-2746.
- **Signorelli, P., & Ghidoni, R. (2005).** Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(8), 449-466.
- **Skulachev, V. P. (1998).** Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS letters*, 423(3), 275-280.
- **Slattery, M. L. (2008).** Defining dietary consumption: is the sum greater than its parts?. *The American journal of clinical nutrition*, 88(1), 14-15.
- **Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., ... & Green, D. R. (1999).** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology*, 144(2), 281-292.
- **Sosulski, F., Krygier, K. & Hogge, L. (1982).** Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 30, 337-340.
- **Spears, J. W. (1994).** Minerals in forages. *Forage quality, evaluation, and utilization*, (foragequalityev), 281-317.
- **Stelling, A. L., Toher, D., Uckermann, O., Tavkin, J., Leipnitz, E., Schweizer, J., ... & Kirsch, M. (2013).** Infrared spectroscopic studies of cells and tissues: triple helix proteins as a potential biomarker for tumors. *PloS one*, 8(3), e58332.
- **Su, C. C., Chen, G. W., Lin, J. G., WU, L. T., & CHUNG, J. G. (2006).** Curcumin inhibits cell migration of human colon cancer colo 205 cells through the inhibition of nuclear factor kappa B/p65 and down-regulates cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expressions. *Anticancer research*, 26(2A), 1281-1288.
- **Subramanian, A. P., Jaganathan, S. K., Mandal, M., Supriyanto, E., & Muhamad, I. I. (2016).** Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 22(15), 3952.
- **Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E., & Fujiki, H. (1999).** Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with (-)-epicatechin, sulindac,

- or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. *Cancer Research*, 59(1), 44-47.
- **Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., & Nagao, M. (2004).** Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95(4), 290-299.
 - **Sung J.J., Lau J.Y., Goh K.L., Leung W.K. (2005).** Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening. *Lancet Oncol*; 6: 871-876
 - **Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., ... & Larochette, N. (1999).** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446.
 - **Tan, S., Wang, C., Lu, C., Zhao, B., Cui, Y., Shi, X., & Ma, X. (2009).** Quercetin is able to demethylate the p16INK4a gene promoter. *Chemotherapy*, 55(1), 6-10.
 - **Tang, F. Y., Shih, C. J., Cheng, L. H., Ho, H. J., & Chen, H. J. (2008).** Lycopene inhibits growth of human colon cancer cells via suppression of the Akt signaling pathway. *Molecular nutrition & food research*, 52(6), 646-654.
 - **Tangpricha, V., Flanagan, J. N., Whitlatch, L. W., Tseng, C. C., Chen, T. C., Holt, P. R., ... & Holick, M. F. (2001).** 25-Hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *The Lancet*, 357(9269), 1673-1674.
 - **Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., & Wolk, A. (2001).** Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(7), 525-533.
 - **Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010).** Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114.
 - **Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., ... Dixit, V. M. (1995).** Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, 81(5), 801-809.
 - **Thornton, T. M., & Rincon, M. (2009).** Non-Classical P38 Map Kinase Functions : Cell Cycle Checkpoints and Sur- vival, 5(1), 44-52.
 - **Tigrine, C., Bulzomi, P., Leone, S., Bouriche, H., Kameli, A., & Marino, M. (2013).** Cleome arabica leaf extract has anticancer properties in human cancer cells. *Pharmaceutical biology*, 51(12), 1508-1514.
 - **Tolera, A., Khazaal, K., & Ørskov, E. R. (1997).** Nutritive evaluation of some browse species. *Animal Feed Science and Technology*, 67(2-3), 181-195.
 - **Toshiyuki, M., & Reed, J. C. (1995).** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2), 293-299.
 - **Trock, B., Lanza, E., & Greenwald, P. (1990).** Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(8), 650-661.
 - **Tsai, C.-M., Yen, G.-C., Sun, F.-M., Yang, S.-F., & Weng, C.-J. (2013).** Assessment of the anti-invasion potential and mechanism of select cinnamic acid derivatives on human lung adenocarcinoma cells. *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), 1890-900.

- **Tseng, M., & DeVillis, R. F. (2000).** Correlates of the “western” and “prudent” diet patterns in the us. *Annals of epidemiology*, 10(7), 481-482.
- **Tsilidis, K. K., Allen, N. E., Key, T. J., Bakken, K., Lund, E., Berrino, F., ... & Boutron-Ruault, M. C. (2010).** Oral contraceptives, reproductive history and risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *British journal of cancer*, 103(11), 1755-1759.
- **Uddin, S., Hussain, A. R., Khan, O. S., & Al-Kuraya, K. S. (2014).** Role of dysregulated expression of leptin and leptin receptors in colorectal carcinogenesis. *Tumor Biology*, 35(2), 871-879.
- **Vainio, H., & Weiderpass, E. (2006).** Fruit and Vegetables in Cancer Prevention. *Nutrition and cancer*, 54(1), 111-142
- **Van Den Brandt, P. A., Goldbohm, R. A., van't Veer, P., Bode, P., Dorant, E., Hermus, R. J., & Sturmans, F. (1993).** A prospective cohort study on toenail selenium levels and risk of gastrointestinal cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 85(3), 224-229.
- **van Duijnhoven, F. J., Bueno-De-Mesquita, H. B., Ferrari, P., Jenab, M., Boshuizen, H. C., Ros, M. M., ... & Thorlacius-Ussing, O. (2009).** Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 89(5), 1441-1452.
- **Vanamala, J., Glagolenko, A., Yang, P., Carroll, R. J., Murphy, M. E., Newman, R. A., ... & Lupton, J. R. (2007).** Dietary fish oil and pectin enhance colonocyte apoptosis in part through suppression of PPAR δ /PGE 2 and elevation of PGE 3. *Carcinogenesis*, 29(4), 790-796.
- **VanSaun, M. N. (2013).** Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 1926-1932.
- **Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., Spencer, J. P. E. (2010).** Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*, 2, 1106-1131.
- **Verghese, M., Rao, D. R., Chawan, C. B., & Shackelford, L. (2002).** Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced preneoplastic aberrant crypt foci in mature Fisher 344 rats. *The Journal of nutrition*, 132(9), 2804-2808.
- **Verma, M. (2012).** Cancer control and prevention by nutrition and epigenetic approaches. *Antioxidants & redox signaling*, 17(2), 355-364.
- **Vermeulen, K., Bockstaele, D.R.V. & Berneman, Z.N. (2003).** The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36: 131-149.
- **Vongsuvan, R., George, J., Qiao, L., & van der Poorten, D. (2013).** Visceral adiposity in gastrointestinal and hepatic carcinogenesis. *Cancer letters*, 330(1), 1-10.
- **Wajant, H. (2003).** Death receptors. *Essays in biochemistry*, 39, 53-71.
- **Wallace, K., Byers, T., Morris, J. S., Cole, B. F., Greenberg, E. R., Baron, J. A., ... & Karagas, M. R. (2003).** Prediagnostic Serum Selenium Concentration and the

- Risk of Recurrent Colorectal Adenoma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 12(5), 464-467.
- **Wang, H., Seow, A., & Lee, H. P. (2004)**. Trends in cancer incidence among Singapore Malays: a low-risk population. *Annals-academy of medicine Singapore*, 33(1), 57-62.
 - **Wang, X. (2001)**. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 15(22), 2922-2933.
 - **Weinberg, RA. (1995)**. The Retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81:323-330.
 - **Willett, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rosner, B. A., & Speizer, F. E. (1990)**. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *New England Journal of Medicine*, 323(24), 1664-1672.
 - **Wiseman M. (2008)**. The second World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc*;67:253-6.
 - **Witte, J. S., Longnecker, M. P., Bird, C. L., Lee, E. R., Frankl, H. D., & Haile, R. W. (1996)**. Relation of vegetable, fruit, and grain consumption to colorectal adenomatous polyps. *American Journal of Epidemiology*, 144(11), 1015-1025.
 - **Wu, H., Liang, X., Fang, Y., Qin, X., Zhang, Y., & Liu, J. (2008)**. Resveratrol inhibits hypoxia-induced metastasis potential enhancement by restricting hypoxia-induced factor-1 α expression in colon carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(9), 613-621.
 - Wyatt, M. D., & Wilson, D. M. (2009). Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cellular and molecular life sciences*, 66(5), 788-799.
 - **Wyllie, A. H., Beattie, G. J., & Hargreaves, A. D. (1981)**. Chromatin changes in apoptosis. *The Histochemical Journal*, 13(4), 681-692.
 - **Yang, C. S., Fang, M., Lambert, J. D., Yan, P., & Huang, T. H. (2008)**. Reversal of hypermethylation and reactivation of genes by dietary polyphenolic compounds. *Nutrition reviews*, 66(suppl 1), S18-S20.
 - **Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., ... & Wang, X. (1997)**. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275(5303), 1129-1132.
 - **Yang, X. rong, Wang, Y. yuan, La, K. K., Peng, L., Song, X. hong, Shi, X. gang, ... Ye, C. xing. (2012)**. Inhibitory effects of cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) in human hepatocellular carcinoma HepG2 in vitro and in vivo through apoptosis. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(9), 1051-1057.
 - **Yavari, P., Hislop, T. G., Bajdik, C., Sadjadi, A., Nourai, M., Babai, M., & Malekzadeh, R. (2006)**. Comparison of cancer incidence in Iran and Iranian immigrants to British Columbia, Canada. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7(1), 86-90

- **Yehuda-Shnaidman, E., & Schwartz, B. (2012).** Mechanisms linking obesity, inflammation and altered metabolism to colon carcinogenesis. *Obesity reviews*, 13(12), 1083-1095.
- **Yi, N. Y., Wu, W. K., Shin, V. Y., & Cho, C. H. (2005).** A mechanistic study of colon cancer growth promoted by cigarette smoke extract. *European journal of pharmacology*, 519(1), 52-57.
- **Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., & Van Dyke, T. (1997).** Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*, 385(6617), 637.
- **Yoshioka, K., Kataoka, T., Hayashi, T., Hasegawa, M., Ishi, Y., & Hibasami, H. (2000).** Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. *Oncology Reports*, 7(6), 1221-1224.
- **Youle, R. J., & Strasser, A. (2008).** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(1), 47-59.
- **Yu, X., Bao, Z., Zou, J., & Dong, J. (2011).** Coffee consumption and risk of cancers: a meta-analysis of cohort studies. *BMC cancer*, 11(1), 96.
- **Yun, J. M., Afaq, F., Khan, N., & Mukhtar, H. (2009).** Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. *Molecular carcinogenesis*, 48(3), 260-270.
- **Zakeri, Z. F., Quaglino, D. A. N. I. E. L., Latham, T., & Lockshin, R. A. (1993).** Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *The FASEB journal*, 7(5), 470-478.
- **Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Masse, B., & Kroemer, G. (1996).** Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS letters*, 384(1), 53-57.
- **Zeng, H., Yan, L., Cheng, W. H., & Uthus, E. O. (2011).** Dietary selenomethionine increases exon-specific DNA methylation of the p53 gene in rat liver and colon mucosa. *The Journal of nutrition*, 141(8), 1464-1468.
- **Zeriuoh, W., Nani, A., Belarbi, M., Dumont, A., de Rosny, C., Aboura, I., ... & Apetoh, L. (2017).** Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *PloS one*, 12(2), e0170823.
- **Zervoudakis, A., Strickler, H. D., Park, Y., Xue, X., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., & Gunter, M. J. (2011).** Reproductive history and risk of colorectal cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(10), 826-834.
- **Zhang, J., Dhakal, I. B., Zhao, Z., & Li, L. (2012).** Trends in mortality from cancers of the breast, colon, prostate, esophagus, and stomach in East Asia: role of nutrition transition. *European Journal of Cancer Prevention*, 21(5), 480-489.

- **Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., & Chen, W. S. (2008).** 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*, 13(8), 1551-1569.
- **Zhang, X., Giovannucci, E. L., Smith-Warner, S. A., Wu, K., Fuchs, C. S., Pollak, M., ... & Ma, J. (2011).** A prospective study of intakes of zinc and heme iron and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Causes & Control*, 22(12), 1627.
- **Zhu, H., Dougherty, U., Robinson, V., Mustafi, R., Pekow, J., Kupfer, S., ... & Joseph, L. (2011).** EGFR signals downregulate tumor suppressors miR-143 and miR-145 in western diet-promoted murine colon cancer: role of G1 regulators. *Molecular cancer research*, 9(7), 960-975.

ANNEXES

Dosage des polyphénols totaux (méthode de Folin-Ciocalteu)

Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

Pour chaque série de détermination, une gamme d'étalonnage est nécessaire, une solution mère (SM) de concentration 50 mg/mL d'acide gallique est préparée,

- A partir de la solution mère, réaliser différentes concentrations : 0,05mg/mL, 0,07mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13mg/L, 0,22mg/mL et 0,5mg/mL,

Mettre dans chaque tube :

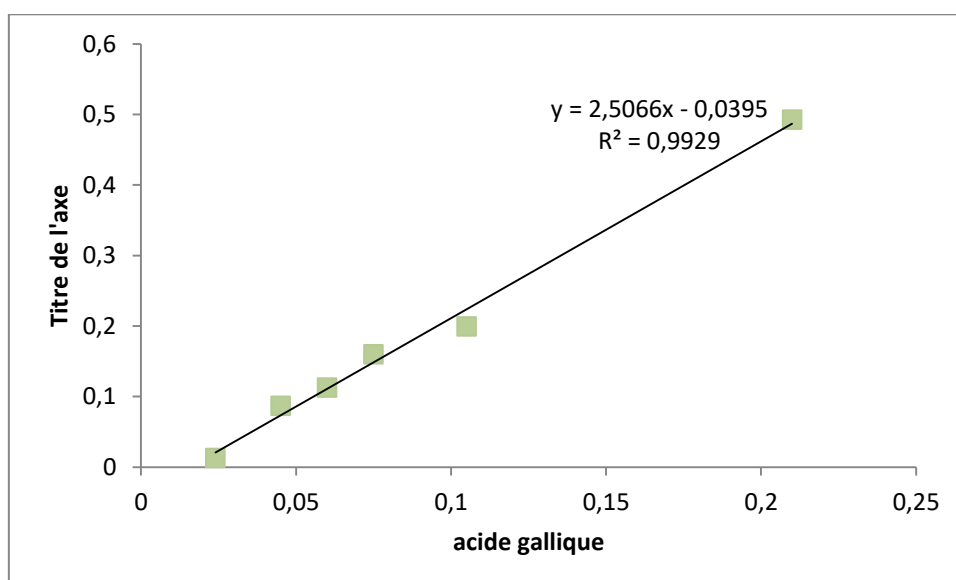
- 10 µL de la solution mère de chaque concentration,

- 1,7 mL d'eau distillée

- 300 µL de réactif de Folin-Ciocalteu,

- Après 3 min, nous avons ajouté 0,5 mL de Na₂CO₃ à 7,5%,

- Les tubes sont laissés à l'obscurité pendant 30 min, nous avons déterminé la densité optique à 760 nm par rapport au témoin,



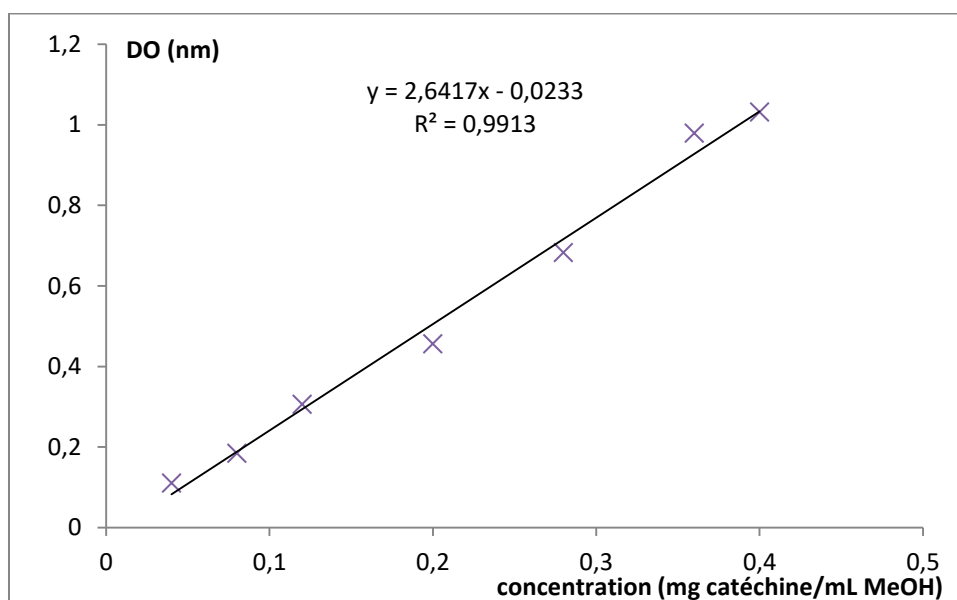
La gamme d'étalon des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique au chlorure d'ammonium (AlCl_3),

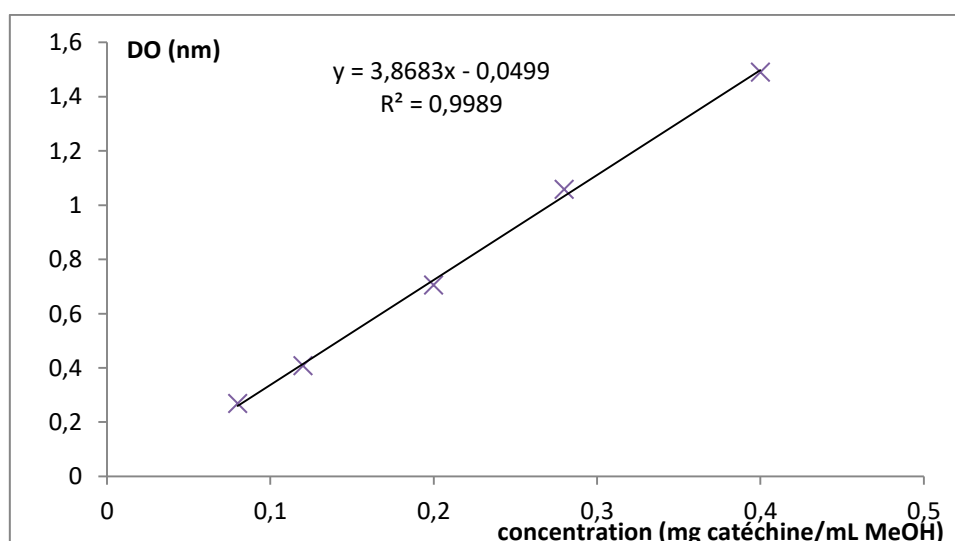
-À partir d'une solution mère de catéchine, on prélève différentes concentrations : 0,005 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,03 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,05 mg/mL,

- nous avons ajouté ensuite 1 mL d' AlCl_3 dans chaque tube,

-après 15 min à l'obscurité nous avons l'absorbance à 430 nm,



La gamme d'étalon des tanins condensés



Préparation du working reagent (tanins condensés)

Préparation des réactifs

1 % de vanilline dans l'acide acétique glacial (0,25 g vanilline dans 25 mL acide acétique glacial) 8 % d'HCl concentré (2 mL d'HCl concentré dans 25 mL acide acétique glacial), Il est à noter que toutes les manipulations doivent se faire dans un bain à 30°C

Preparation of working reagent

Un volume de 1 % vanilline est mélangé avec le même volume de 8% de la solution d'HCl, The working vanilline reagent est mis dans le bain avant de commencer les analyses, Prendre 400 µL de l'extrait méthanolique et ajouter 600 µL d'acide acétique ,

Détermination de la teneur en eau de la feuille de CS

	Vase de tare vide	masse de l'échantillon	Vase de tare + ech	Vase de tare + ech (3h après)	Le lendemain	La reneur en eau
1	70,984	2,013	72,999	72,762	72,752	12,27
2	97,699	2,015	99,684	99,445	99,436	12,30
3	60,156	2,012	62,169	61,925	61,916	12,57

La teneur en eau = 12,38%

Détermination de la teneur en lipides : (solvant utilisé : hexane) avec cartouche pdt 8h méthode ISO

- Pds du ballon vide : 96,813g
- Masse de l'échantillon : 5,0060g
- Teneur en huile= $[(97,036-96,813)/5,006] \times 100 = 4,455\%$

La teneur en matière grasse = 4,455%

Détermination de la teneur en cendres (nouvelle méthode AOAC)

	Pds du creuset vide	Masse de l'ech	Pds du creuset vide + Masse de l'ech	Teneur en cendres
1	11,143	0,511	11,657	4,305%
2	11,450	0,501	11,953	4,79%
3	12,766	0,507	13,276	4,73%

La teneur en cendres = 4,608%

	Pds du creuset vide	Masse de l'ech	Pds du creuset vide + Masse de l'ech	Pds du creuset après incinération	Teneur en cendres
1	19,7529	1,0001	20,7532	19,8000	4,709%
2	19,4392	1,0001	20,4393	19,4845	4,529%
3	20,4815	1,0004	21,4819	20,5283	4,678%

La teneur en cendres = 4,638%

Tableau des anticorps utilisés lors des Western blot

Anti-corps	WB dilutions	Source/hôte	Numéro du catalogue	fournisseur	Poids moléculaire (KDa)
Anti-Mouse IgG2b-HRP Secondary Antibody	1:4000	Mouse	1076	Biomol	
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:400	Rabbit	7074	Cell Signaling Technology, Inc.	
Caspase-3	1:1000	Rabbit	#9662	Cell Signaling Technology, Inc.	17, 19, 35
Caspase-8 (1C12)	1:1000	Mouse mAb	#9746	Cell Signaling Technology, Inc.	18, 43, 57
Caspase-9 (C9)	1:1000	Mouse mAb	#9508	Cell Signaling Technology, Inc.	51 /39/37 (R,M).
Caspase-9 Antibody (Human Specific)	1:1000	Rabbit	#9502	Cell Signaling Technology, Inc.	35, 37, 47 (H)
CDK2 (78B2)	1 :1000	Rabbit	#2546	Cell Signaling Technology, Inc.	33
Cleaved PARP (Asp214)	1 :1000	Rabbit (Human Specific)	#9541	Cell Signaling Technology, Inc.	89
Cleaved PARP (Asp214)	1:1000	Rabbit (Mouse Specific)	#9544	Cell Signaling Technology, Inc.	89
Cyclin A	1 :1000	rabbit polyclonal antibody	(H-432): sc-751	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	54

cyclin E	1 :500	rabbit polyclonal antibody	(M-20): sc-481	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	53
p27	1 :500	rabbit polyclonal IgG	(M-197): sc-776	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	27
P38	1:2000	Rabbit IgG	622401	BioLegend	38
p53 (1C12)	1 :1000	Mouse mAb	#2524	Cell Signaling Technology, Inc.	53
PARP Antibody	1 :0000	Rabbit	#9542	Cell Signaling Technology, Inc.	89, 116
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	1:1000	Rabbit IgG	#4511	Cell Signaling Technology, Inc.	43
Phospho-p53 (Ser15)	1:1000	Rabbit	#9284	Cell Signaling Technology, Inc.	53
β-actin	(1 :5000 -1 :20 000)	mouse monoclonal IgG ₁	(C4): sc-47778	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	43/15 kDa

Ceratonia siliqua المعروفة بالخرروب، من فصيلة البقوليات، جد منتشرة في بلدان البحر الأبيض المتوسط.

من خلال هذا العمل قمنا بدراسة المستخلص البوليفينولي لأوراق شجرة الخروب النامية في منطقة تلمسان (الجزائر) حيث عمدنا الى تحديد، أولا: التركيب الكيميائي للنبته، ثانيا: نشاط مضادات الأكسدة، ثالثا: الآثار المضادة للسرطان باستعمال خلايا القولون (HCT 116, HT 29, SW 480 et CT 26) عن طريق قياس بقاء الخلايا حية داخل غرفة عداد خلايا الدم و كذلك تقييم موت الخلايا المبرمج بتقييم نشاط انزيم (3 et 9) caspase بطريقة western blot و cytométrie en flux أيضا توزيع دورة الخلايا بواسطة cytométrie en flux. تأثير مقاومة الأورام تم اختباره على فئران Balb/c المحقونة بخلايا CT26 و ذلك بتقييم نقيع أوراق الخروب بدلا عن الماء مقارنة بالمجموعة الشاهدة.

أظهرت نتائج تحليل مستخلصات البوليفينول لأوراق الخروب مستوى عالي من حمض القاليك و حمض الكوماريك، بالمقابل لاحظنا أن لهذه المستخلصات، تأثير سام على الخلايا يعتمد على الجرعة لإحداث الموت المبرمج للخلايا السرطانية للقولون، ما يقارب 20 ميكروغرام/ممل جرعة كافية لقتل 50 % من المجموعة.

قامت المستخلصات البوليفينولية بإحداث طريق داخلي للموت المبرمج و ذلك بتنشيط انزيم Caspase 9 و حل PARP داخل خلايا HCT-116 و CT-26. إضافة الى ذلك قامت هذه المستخلصات بتوقيف الدورة الخلوية في المرحلة G1 و ذلك بتنشيط p53 و تغيير ترجمة البروتينات الداخلة في تعديل الدورة الخلوي (p27, CDK, cycline E et A). تبين أيضا من خلال النتائج أن حمض القاليك و حمض الكوماريك بوليفينولات تظاهي بعملها عمل المستخلصات البوليفينولية مما يوحي بعمل تآزري بين البوليفينولات. فيما يخص نقيع أوراق الخروب فقد قلص و بطريقة فعالة نمو ورم CT-26 لدى الفئران.

نخلص أخيرا من خلال نتائج هذه الدراسة أنه يمكننا استعمال مستخلصات البوليفينول لأوراق الخروب للوقاية من سرطان مستقيم القولون.

الكلمات المفتاحية: الخروب (*Ceratonia siliqua* L)، الأوراق، البوليفينولات، سرطان مستقيم القولون، مضادات الأورام، الموت المبرمج، دورة الخلية.

Résumé

Ceratonia siliqua L. (Fabaceae), communément appelé « elkaroub » est un arbre très répandu dans les pays méditerranéens. Dans la présente étude, l'extrait polyphénolique des feuilles de *Ceratonia siliqua* est étudié: (i) screening phytochimique, (ii) activité antioxydante (iii) effets anticancéreux en utilisant des lignées de cellules du colon HCT-116, HT-29, SW-480 et CT-26, par la mesure de la viabilité des cellules par une chambre d'hémocytomètre ainsi que l'évaluation de la mort cellulaire par apoptose (activité de caspase -3 et -9 par western blot et cytométrie en flux) et la distribution de leur cycle cellulaire en utilisant un cytomètre en flux. L'effet anti-tumoral a été testé sur des souris Balb/c transplantées avec des cellules CT-26 en utilisant l'infusion des feuilles de caroube à la place de l'eau contrairement au lot témoin. L'analyse du profil phénolique par HPLC des extraits phénolique de feuilles de caroube a montré une teneur élevée d'acide gallique et d'acide *m*-coumarique.

Nous avons observé que CLP exerçait un effet cytotoxique dépendant de la dose par induction de l'apoptose sur les lignées cellulaires du CRC, avec un IC50 d'environ 20 µg/mL. CLP a induit une voie apoptotique intrinsèque à travers l'activation caspase-9 et le clivage PARP dans les cellules HCT-116 et CT-26. En outre, le CLP a induit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1 par l'activation de la p53 et en modulant l'expression des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (P27, CDK, cycline E et cycline A). L'acide gallique et *m*-coumarique semblent être les polyphénols actifs de CLP puisqu'ils miment légèrement l'activité de CLP induisant ainsi l'activité synergique entre les polyphénols. L'infusion de feuilles de caroube a réduit de façon intéressante la croissance de la tumeur CT-26 chez les souris Balb/c. Cette étude suggère CLP pourrait être utilisé dans la prévention du CRC.

Mots-clés: Caroube (*Ceratonia siliqua* L.), feuilles, polyphénols, cancer colorectal, anti-tumoral, apoptose, cycle cellulaire.

Abstract

Ceratonia siliqua L. (Fabaceae), commonly called "elkaroub" is a tree very common in Mediterranean countries. In this study, the polyphenolic extract *Ceratonia siliqua* leaves is studied for (i) phytochemical screening, (ii) antioxidant activity (iii) anti-cancer effects of colon cells HCT-116, HT-29, SW-480 and CT-26 by measuring cell viability by a hemocytometer chamber as well as evaluating cell death by apoptosis and the distribution of their cell cycle using a flow cytometer. The anti-tumor effect was tested on the Balb / c mice transplanted with the CT-26 cells using the infusion of carob leaves instead of the water on the contrary to the control group. HPLC analysis of the phenolic content of CLP showed a high amount of gallic acid and *m*-coumaric acid.

We observed that CLP had a dose-dependent cytotoxic effect by inducing apoptosis on CRC cell lines with an IC50 of about 20µg/mL. CLP induced an intrinsic apoptotic pathway through caspase-9 activation and PARP cleavage in HCT-116 and CT-26 cells. Moreover, CLP induced cell cycle arrest in the G1 phase through p53 activation and modulating the expression of the proteins involved in the regulation of the cell cycle (P27, CDK, cyclin E and cyclin A). Individual compounds, gallic acid and *m*-coumaric acid, seem to be the active polyphenols of CLP since they slightly mimic the activity of CLP, signifying the existence of synergistic effect between polyphenols in CLP activity. Interestingly, the carob leaf infusion reduced CT-26 tumor growth in BALB/c mice. This study suggests CLP can be used in the prevention of CRC.

Keywords: Carob (*Ceratonia siliqua* L.), leaves, polyphenols, colorectal cancer, caspases, apoptosis, cell cycle.