

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA BEJAIA.



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Filière : Sciences Biologique

Option : Pharmaco-Toxicologie.

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du Diplôme

MASTER

Thème :

**Aspect moléculaire de l'effet des Alcaloïdes sur des
Lignées Cellulaires du Cancer du Pancréas
(Recherche Bibliographique)**

**Présenté par : HIMI Lydia
GUESSERI Nour El Houda**

Soutenu le : 21 /09/2021

Devant le jury composé de :

M^{me} ABDERRAHIM.S

M^{me} BOUGOFFA. K

M^r HARFI. T

MCB

MCB

MAA

Président

Encadreur

Examineur

Année Universitaire : 2020 /2021



Dédicaces

-C'est avec joie et immense plaisir que je dédie ce modeste travail tout d'abord

❖ **A mes chers parents**

- Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai guerre vous remercier comme il se doit. Votre affection, bienveillance, et présence à mes côtés a toujours été ma source de force et un guide pour que je puisse affronter les différents obstacles.

- Vous avez toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

❖ **A mon très cher binôme LYDIA**

- Toutes les lettres et tous les mots, ne sauraient décrire ta douceur, ta gentillesse et ton respect, et de m'avoir supporté tout au long de ce travail.

- Ce fut un grand plaisir de t'avoir connue, et reconnue comme une sœur, copine, binôme et de pouvoir travailler avec toi, ainsi que de partager les plus merveilleux moments qui resteront un souvenir gravé.

❖ **A tous les membres de ma famille**

- Une source d'espoir et de motivation a été partagée avec une cousine particulière, pouvoir m'aider et consacrer du temps pour moi, était un geste important et gravé dans ma mémoire, Mezemate Celia.

-A ma chère tante kouka qui est une deuxième maman pour moi.

❖ **A tous mes amis (es)**

- Mes amis(es) représentent pour moi une 2^{ème} famille, pour cela j'apprécie énormément leur soutien mentale et physique durant ce travail.

❖ **A vous les lecteurs**

- A qui j'offre mes sincères respects et meilleures salutations.

Puisse dieu vous donner santé, courage, et que du bonheur Incha'Allah

HOUDA



Dédicaces

-A l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce travail et avec un cœur plein d'amour et de fierté que je le dédie aux êtres qui me sont les plus chères.

❖ *A mes chers parents*

-Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et toute mon affection pour leur soutien tout au long de mes études, de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs, d'affronter toutes les difficultés de la vie.

Ma mère, mon père que dieu vous procure bonne santé et longue vie.

❖ *A mon cher binôme HOUDA*

-De m'avoir montré beaucoup de patience durant les moments les plus stressants, pour ton soutien moral, ta compréhension, une merveilleuse personne que j'ai pu connaître, malgré les hauts et les bas qu'on a subis on a su surmonter les obstacles fiers de nous, ensemble on a été à la hauteur pour réaliser et achever ce travail.

- Ta présence m'a été d'un grand support, les moments qu'on a partagés ensemble resteront gravé à jamais dans ma mémoire.

❖ *Mes dédicaces s'adressent aussi*

-A mes chers frères pour leur soutien et encouragement.

-A ma chère grand-mère, mon grand-père, ma chère tante dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

-Ainsi qu'à tous les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu.

-A mes chères amies qui m'ont toujours écoutée et encouragée pendant toute cette période.

-A tout ce qui a pris place dans mon cœur.

LYDIA

Remerciement

-On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé, la volonté et la force d'entamer et de terminer ce mémoire.

-Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de notre chère promotrice Mme BOUGOFFA-SADAOUI, on la remercie pour la qualité exceptionnelle de son encadrement, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation.

-Notre remerciement s'adresse également à Dr. BENIDIRI, pour le temps qui nous a accordé, son aide et son encouragement pour continuer et aller plus loin.

-Nous remercions également toutes personnes ayant fournis des efforts, pour gérer notre formation académique et faire de nous un exemple à servir au futur.

- Nous remercions, nous même, notre santé et notre volonté de continuer sans s'arrêter car toutes les circonstances vécus ces deux dernières années n'ont pas été facile moralement et physiquement.

- Nous remercions l'ensemble des membres de jury M^{me} ABDERRAHIM et M^r HARFI pour avoir accepté de juger ce travail.

-Nos remerciements s'adressent vivement et chaleureusement à M^r HARFI, pour son aide et soutien inconditionnel. Ce fut un très grand plaisir de vous avoir parmi nous en se jour si spécial et qui représente pour vous une dernière soutenance a jugé afin de clôturer votre carrière.

- Nous ne saurions enfin terminer ces remerciements sans un mot de gratitude à nos chères parents, qui, sans eux, sans leur présence à nos côtés, leurs patiences, et leurs soutiens, nous ne sommes rien aujourd'hui.

« La réussite est l'accumulation d'échecs, d'erreurs, de faux départs, de confusion et la volonté de continuer malgré tout »

NICK GLEASON

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Cancer du Pancréas

I. ACTEUR CELLULAIRES ET CANCER.....	3
I.1. Cycle Cellulaire.....	3
I.2. Régulation du Cycle Cellulaire.....	4
I.3. Altérations Génétiques.....	5
II. MORT CELLULAIRE PROGRAMEE	6
III. PANCREAS.....	7
III.1. Description.....	7
III.2. Physiologie.....	8
III.3. Principales Fonctions.....	9
IV. CANCER DU PANCREAS.....	9
IV.1. Epidémiologie et Facteurs de Risques.....	10
IV.2. Diagnostic Moléculaire.....	11
IV.3. Traitements.....	11
IV.3.1. Marge Chirurgicale.....	12
IV.3.2. Chimiothérapie.....	12
IV.3.3. Radiothérapie.....	12

Chapitre II : Les Alcaloïdes Isoquinoléiques

I. ALCALOIDES.....	14
II. ALCALOIDES ISOQUINOLEINES	15
II.1. Berbérine.....	17
II.2. Sanguinarine.....	18
III. PREPARATION DES EXTRAITS ALCALOIDES.....	18

III.1. Récolte	<i>19</i>
III.2. Conservation	<i>19</i>
III.3. Broyage	<i>19</i>
III.4. Choix du Solvant d'Extraction	<i>19</i>
IV. EXTRACTION DES ALCALOÏDES	<i>20</i>
IV.1. Extraction par un Solvant en Milieu Alcalin	<i>20</i>
IV.2. Extraction par un Solvant en Milieu Acide	<i>21</i>
IV.3. Extraction Soxhlet	<i>22</i>

Chapitre III : Cancer du Pancréas et Alcaloïdes isoquinoléines

I. METHODOLOGIE	<i>23</i>
I.1. Test d'Exclusion au Bleu de Trypan	<i>25</i>
I.2. Analyse du Cycle Cellulaire (Cytométrie de flux, CMF)	<i>26</i>
I.3. Analyse Western Blot	<i>28</i>
I.4. Etude de la Mort Cellulaire Programmée par Double Marquage Annexine V /IP.	<i>32</i>
I.5. Test de Mesure des Espèces Réactives de l'Oxygène	<i>34</i>
II. RESULTATS	<i>36</i>
II.1. Effet Cytotoxique	<i>36</i>
II.2. Distribution des Cellules dans les Phases du Cycle Cellulaire	<i>38</i>
II.3. Effet sur les Protéines Régulatrices du Cycle Cellulaire	<i>39</i>
II.4. Apoptose Cellulaire après Traitement	<i>40</i>
II.5. Niveaux de ROS Intracellulaire	<i>45</i>
III. DISCUSSION GENERALE	<i>47</i>
-Conclusion & Perspectives	<i>54</i>
-Références Bibliographiques	

Liste des Tableaux

Tableau I : Les différentes fonctions des deux parties pancréatiques..... *9*

Tableau II : Les facteurs de risques du cancer du pancréas..... *10*

Tableau III : Les détails des étapes du Western blot..... *30*

Liste des Figures

Figure 1 :	Les phases principales du cycle cellulaire.....	4
Figure 2 :	Anatomie du pancréas.....	8
Figure 3 :	Les principaux cycles azotés des alcaloïdes.....	15
Figure 4 :	Structure chimique du noyau isoquinoléine.....	16
Figure 5 :	Le noyau isoquinoléine dérivant de la tyrosine et la phénylalanine.....	16
Figure 6 :	Structure chimique de la berbérine.....	17
Figure 7 :	Structure chimique de la sanguinarine.....	18
Figure 8 :	Principe de l'extraction des alcaloïdes en milieu alcalin.....	21
Figure 9 :	Schéma de l'appareillage d'extraction au soxhlet.....	22
Figure 10 :	Photographies microscopiques des lignées cellulaires citées dans cette étude après 72h d'ensemencement (grossissement x10).....	25
Figure 11 :	Protocole du test d'exclusion au Bleu de Trypan sur des lignées cellulaires du cancer de pancréas.	26
Figure 12 :	Protocole d'analyse du cycle cellulaire par CMF.	27
Figure 13 :	Les étapes de réalisation du Western blot.	29
Figure 14 :	Profil de migration des marqueurs de poids moléculaires dans un gel à gradient 4-12%.....	32
Figure 15 :	Schéma illustrant le principe de détection des cellules apoptotiques par fixation : l'annexine V.....	33
Figure 16 :	Protocole du test de l'annexine V et analyse par CMF.	34
Figure 17 :	Protocole de mesure des ROS avec le colorant DCFH-DA.	35
Figure 18 :	Taux de croissance cellulaire après traitement de PANC-1(A et C) ou MIA-PaCa2 (B et D) des lignées cellulaire de cancer du pancréas avec de la BBR ou de la Gemcitabine.....	

Figure 19 : L'effet de la sanguinarine sur la viabilité cellulaire mesuré par l'analyse d'exclusion au bleu de Trypan sur les lignées AsPC-1 et BxPC-3.	38
Figure 20 : Analyse du cycle cellulaire par CMF.....	39
Figure 21 : Détection de l'état phosphorylé de l'ACC et l'AMPK par immunoblot respectivement sur Ser ⁷⁹	40
Figure 22 : Représentation en mode quadrant des pourcentages de cellules vivantes et mortes après double marquage IP/Annexine V.	41
Figure 23 : Analyse de l'apoptose cellulaire par CMF. A : les cellules PANC-1 B : les cellules MIA-PaCa2.	42
Figure 24 : Représentation graphique en histogramme de l'analyse de l'apoptose cellulaire par CMF. C : les cellules PANC-1. D : les cellules MIA-PaCa2.	42
Figure 25 : Analyse de l'apoptose par CMF induit par la sanguinarine sur les deux lignées cellulaires AsPC-1 et BxPC-3.....	43
Figure 26 : Analyse par western blot des niveaux des protéines Bcl-2, Bax, Bak, Bid et Bcl-XL dans les cellules AsPC-1 et BxPC-3 après traitement à la sanguinarine.....	44
Figure 27 : Niveaux d'espèces réactives oxygénées intracellulaires (ROS) après 72h de traitement à la BBR (B) Et Gemcitabine (A).	45
Figure 28 : Représentation de l'histogramme d'ADN après marquage à l'IP.	49

Liste des Abréviations

μM	M icromolaire
ACE	A ntigène C arcinoembryonnaire
ADN	A cide D ésoxyribonucléique
AMPK	P rotéine K inase A MP- D épendante
AMM	A utorisation De M ise Sur Le M arché
ARNm	A cide R iboNucléique m essenger
ATCC	A merican T ype C ulture C ollection
ATCD	A ntécédants
BAX	B cl2- A ssociated X Protein
BBR	B erberine
BCL-2	B - C ell L ymphoma 2
Bcl-XL	B - C ell L ymphoma- E xtra L arge
BID	B H3 I nteracting D omain D eath Agonist
BSA	A lbumine De S érum B ovin
BT	B leu De T rypan
CA 19-9	C arbohydate A ntigène
CDK	K inase C ycline D ependent
CDKI	C yclin- D ependent K inase I nhibitors
CDKN2A	C yclin- D ependent K inase I nhibitor 2A
CFTR	C ystic F ibrosis T ransmembrane Conductance R egulator
CIP/KIP	CDK I nhibiting P rotein
CIRC	C entre I nternational De R echerche Sur Le C ancer
CKI	C yclin K inase I nhibitor
CMF	C yto M étrie En F lux
CO2	D i O xide De C arbone
CP	C ancer Du P ancréas
CSC	C ellules S ouche C ancéreuse
DCF	D i C hloro F luorescein
DCFH-DA	D i C hloro F luorescein D iacetate
ECL	E nhanced C hemi L uminescence
EDTA	E thylene D iamine T etra A cetic
Fas	F ibroblast A Ssociated
FITC	F luorescein I so T hio C yanate

G1	Gap1
G2	Gap2
Gem	Gemcitabine
HRP	Horse Radish Peroxidase
IARC	International Agency For Research On Cancer
IC50	Concentration Inhibitrice Médiane
IP	Iodure De Propidium
IRM	Imagerie Par Resonance Magnétique
KDa	Kilo Daltons
K-RAS	V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
M	Mitose
MOPS	(3-(N-Morpholino) PropaneSulfonic Acid)
MTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
MTT	Micro Culture TéTrazolium
Nm	Nanomolaire
P15 (CDKN2B)	Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitors B
P16 (INK4)	P16 INhibitor Of Cyclin-Dependent Kinase 4
P18 (CDKN2C)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors
P21	Pocket Protein 21
P27 (CDKN1B)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors 1B
PAK4	Kinase Death Type PAK4
PBS	Phosphate Buffered Saline
PH	Potentiel Hydrogène
PI3K/AKT	Phospho-Inositide 3-Kinase
PM	Poids Moléculaire
Protéine Rb	Protéine De RétinoBlastome
PSM	Poste De Sécurité Microbiologique
PTP	Pore De Perméabilité Transitoire
PDAC	AdénoCarcinome Pancréatique Canalaire
QSP	Quantité Suffisante Pour
RIPA	RadioImmunoPrecipitation Assay Buffer
RNASE	RiboNucléase
ROS	Reactive Oxygen Species
S	Synthèse
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate

Ser	SER ine
SST2	Somato ST atin Receptor 2
STK11	Serine/ T hreonine K inase 11
TDM	T omo D ensito M étrie
TNFR	T umor N ecrosis F actor R eceptor
TP53	T umor P rotein 53
TRAIL	T NF- R elated- A poptosis- I ndicing- L igand
TSC	T GF- B - S timulated C lone
UV	U ltra- V iolet



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Bien qu'il ne soit ni contagieux ni infectieux, le cancer représente la deuxième cause de décès dans le monde (**Hanahan, 2011**), il résulte d'une dérégulation des systèmes de contrôle de la croissance cellulaire, ce qui entraîne la prolifération anarchique de plusieurs cellules. Ce processus forme au sein d'un tissu, une masse cellulaire anormale appelée « Tumeur » (**Beghoul, 2008**).

Le cancer du pancréas, ou adénocarcinome pancréatique, est un cancer de la glande pancréatique (située derrière l'estomac et qui sécrète les enzymes digestives), relativement rare mais son incidence semble en augmentation récente (**Debono et al.,2015**).

Il est admis que de nombreuses avancées sont à signaler dans le diagnostic et le traitement du cancer pancréatique ; cependant, de nombreux problèmes d'ordre cliniques et scientifiques demeurent sans solutions : liés à la prévention, au diagnostic, à la progression, à la recrudescence de la tumeur, aux traitements et enfin à la résistance aux thérapies (**Jingjingl et al., 2020**). Cependant l'issue n'est toujours pas garantie, il est donc nécessaire d'identifier de nouveaux candidats composés naturels pour faciliter la découverte de médicaments contre le cancer du pancréas (**Das et al.,2015**).

A cet effet, il a été prouvé que la phytothérapie pourrait être une source importante et précieuse avec un pouvoir puissant (**Das et al.,2015**) c'est pour cela les chercheurs se sont basés sur le monde naturel particulièrement sur un groupe nommé les alcaloïdes qui font l'objet de cet étude en raison de leurs activités biologiques et de leur diversité structurale. (**Guilbaud et al.,2001**).

Des études ont été lancées sur ces substances et année après année, leurs activités biologiques ont commencées à émerger et à être reconnue dans le domaine médical, faisant d'elles l'un des composants majeurs de plusieurs médicaments anticancéreux (**Liu et al.,2017**).

Parmi les centaines de métabolites secondaires naturels, les alcaloïdes incarnent le plus grand groupe de composés azotés organiques de faible poids moléculaire isolés de sources terrestres et marines ayant la capacité d'interagir avec un large spectre de molécules(**Jingjingl et al., 2020**). Sur des milliers d'alcaloïdes différents, environ 17 000 molécules ont affiché des activités biologiques et pharmacologiques prononcées. Par conséquent, les alcaloïdes ont sans aucun doute révolutionné la médecine (**Bonfili et al., 2008; Cragg et Newman, 2009**).

L'objectif de ce présent travail est de contribuer à la présentation bibliographique de l'effet anticancéreux des alcaloïdes iso quinoléiques contre des lignées cellulaires cancéreuses du pancréas humain.

Pour répondre à cet objectif, notre démarche est organisée en trois chapitres, **i)** dans le premier chapitre nous présentons un aperçu général sur le cancer du pancréas, ainsi que les facteurs favorisant son apparition, les acteurs cellulaires et les différents traitements existants. **ii)** Le deuxième chapitre est dédié à l'étude des métabolites secondaires plus précisément les alcaloïdes iso quinoléiques. **iii)** On terminera ce travail par un troisième chapitre, conçu à l'étude de l'effet anticancéreux des alcaloïdes iso quinoléiques à travers des tests et techniques réalisés par des auteurs avec un ordre chronologique (méthodologie, résultats et discussion) qui indiqueront l'efficacité ou l'inefficacité des molécules étudiées (BBR, Sanguinarine) vis-à-vis des lignées cellulaires PANC-1, MIA-PaCa2, AsPC-1 et BxPC3 du cancer pancréatique.



Chapitre I

Cancer du Pancréas

Le cancer pourrait être décrit comme une modification du patrimoine génétique au niveau d'une cellule qui va aboutir au développement et à la prolifération incontrôlée d'une tumeur. Toutefois il est impossible de le réduire à cela, puisqu'il requiert un ensemble de dérèglement moléculaire et cellulaire qui prend sens au niveau de l'individu (**Blanchard, 2003**).

Les gènes et en particulier les mutations génétiques jouent un rôle important dans le cancer et, à juste titre, on peut appeler le cancer « maladie génétique », on souligne d'ailleurs que les mutations sont nécessaires mais insuffisantes pour le cancer, mais peuvent être des effets aussi bien que des causes (**Plutynski, 2018**). Les agents de l'environnement externe contribuent également au développement de cancers, car ils peuvent provoquer des mutations ou perturber les mécanismes cellulaires. Pour cette raison, on peut appeler de nombreux cancers des « maladies environnementales » (**Plutynski, 2018**).

Certaines tumeurs peuvent laisser échapper des cellules tumorales qui vont envahir d'autres organes, formant des métastases. Celles-ci sont la principale cause des décès par cancer (**Nobili et al. ,2009 ; Pietras et Ostman, 2010**).

La cancérogenèse est un processus conduisant à la formation d'une tumeur, qui se déroule en trois phases : l'initiation, la promotion et la progression. Au cours de la première étape une cellule normale se transforme en une cellule cancéreuse nommée cellule initiée, ces cellules subissent une promotion tumorale en cellules pré-néoplasiques, qui évoluent en cellules néoplasiques. Ainsi l'apparition de tumeurs dotées de pouvoir invasif se fait durant l'étape de progression (**Rozenblum et al ,1997**).

I. Les acteurs cellulaires et le cancer

I.1. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est une série de modifications qui se produisent dans une cellule entre sa formation par division à partir d'une cellule mère et le moment où elle finit de se diviser en deux cellules filles (**Meijer et al. ,2006**). Ce processus extrêmement complexe en plusieurs phases est régulé par un grand nombre de protéines intervenant transitoirement et dans un ordre défini d'où on rencontre différentes phases du cycle (**Figure1**) :

▪ Interphase :

C'est une phase de croissance dans laquelle la cellule duplique et grossit son matériel génétique. C'est l'étape la plus longue du cycle cellulaire et se compose de trois phases :

- ✓ **G1** : phase de croissance cellulaire et synthèse de protéine et d'ARN. La cellule se prépare pour rentrer en phase S.
- ✓ **S** : phase de synthèse de l'ADN ou la cellule duplique à l'identique son matériel génétique.
- ✓ **G2** : c'est la seconde phase de croissance, la cellule poursuit la synthèse de protéine et d'ARN et vérifie que son ADN a été correctement répliqué. elle se termine lorsque la chromatine commence à se condenser, à ce moment-là, la cellule se prépare pour rentrer en Mitose.

▪ **Mitose :**

C'est un processus de division des cellules somatiques qui se fait selon les étapes suivantes : Prophase, Métaphase, Anaphase, Télophase, et enfin la Cytocinèse.

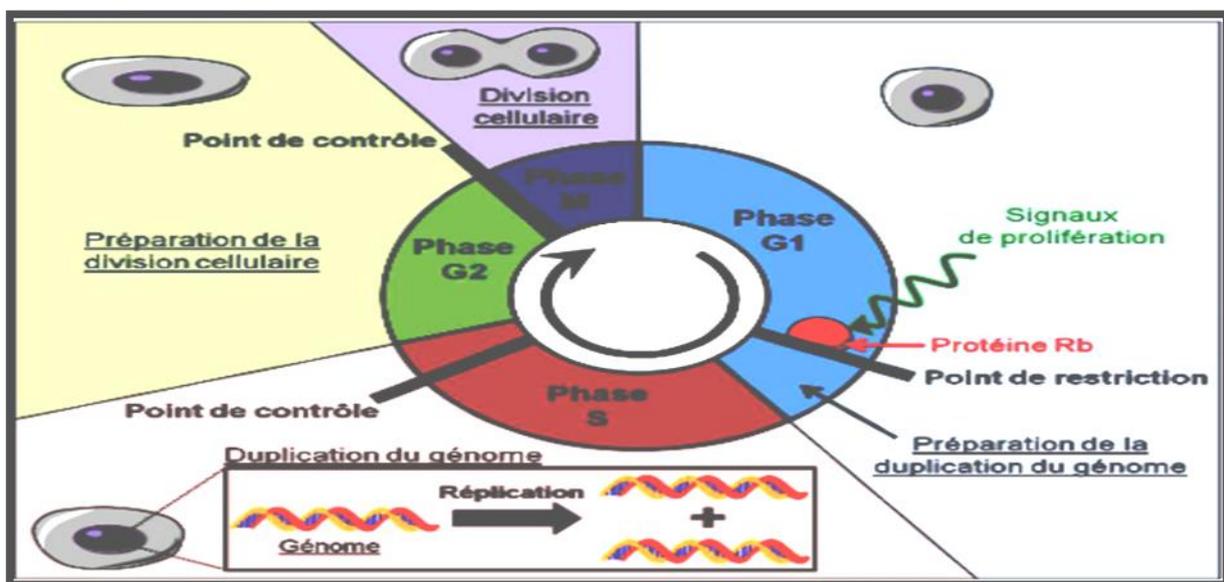


Figure 1 : Les phases principales du cycle cellulaire (Segala, 2012).

I.2. La régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire possède des contrôles qui permettent ou non sa poursuite. Des protéines interviennent dans ces processus et parmi eux on trouve des protéines effectrices comme les cyclines et les Kinase Cycline Dépendent (CDK). L'activité kinase nécessite la fixation d'une sous-unité activatrice nommée « Cycline » formée et dégradée au cours du cycle cellulaire (Evans *et al.* 1983). Ces complexes CDK/cycline vont jouer un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle (Schwartz et Shah, 2005).

L'activité des CDK va être inhibée lorsque celles-ci seront associées à des inhibiteurs protéiques, les CDKI (Cyclin-dependent kinase inhibitors), deux familles de CDKI ont été identifiées (**Schwartz et Shah, 2005**).

- ✓ La famille INK4 (Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4), composée des protéines p15, p16, p18 et p19, qui inactive les CDK en empêchant leur liaison aux cyclines au cours de la phase G1.
- ✓ la famille CIP/KIP (Cdk inhibiting protein), regroupant les protéines p21 et p27.

L'activité des CKI est dépendante de signaux intra et extracellulaires comme, par exemple, l'expression de p21 qui est sous le contrôle du suppresseur de tumeur p53.

Grâce à la précision de la régulation du cycle, le taux d'accidents est très faible. Cependant des proliférations incontrôlées s'observent.

I.3. Les altérations Génétiques

Il a été montré que l'existence de certaines mutations au sein de gènes bien identifiés confère une importante majoration du risque de cancer pancréatique(CP). Souvent, cette mutation à forte pénétrance prédispose à la survenue de plusieurs autres types de cancers, entraînant ainsi l'activation d'oncogènes ou la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs (**Jones S et al. ,2009**).

✓ Les oncogènes

Sont présents dans toutes les cellules normales sous forme de proto-oncogènes. Ils ont un rôle d'activateur du cycle cellulaire, de développement et de différenciation. Ils codent pour des protéines effectrices du cycle cellulaire transmettant un signal au noyau de la cellule pour entrer en mitose suite à de modifications génétiques. Les proto-oncogènes s'activent en oncogènes qui auront la propriété de transformer une cellule saine en cellule cancéreuse, a prolifération excessive ce qui favorise le développement de la dite « tumeur » (**Delpu et al. ,2011**).

✓ Un gène suppresseur de tumeur

Ces gènes dominants portés sur les deux allèles d'un chromosome, sont capables de bloquer le cycle cellulaire et ainsi d'inhiber la prolifération. Une altération dominante donne naissance à une protéine inactive laissant place à une prolifération incontrôlée et donc l'installation d'une tumeur

(Delpu *et al.*, 2011). Différents gènes suppresseurs de tumeurs sont atteints par cette perte de fonction lors du développement d'un CP, les principaux d'entre eux sont p53, p16, sst2 et SMAD4.

Le gène p53 : La protéine p53 joue un rôle central dans la réponse cellulaire à un stress cytotoxique en régulant le point de contrôle G1/S du cycle cellulaire, en participant au maintien de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. La perte de fonction de p53 durant la carcinogenèse conduit donc à une croissance inappropriée des cellules, une augmentation de la survie cellulaire et une instabilité génétique.(Pomerantz *et al.*, 1998). Lorsque p53 se lie à l'ADN, la production de la protéine p21 est stimulée. Cette protéine régule négativement la formation du complexe CDK-Cycline. (Rao *et al.*, 2017).

Le gène p16 : (9p21) se gène code pour une protéine inhibitrice de CDK telles que CDK4 ou CDK6. Cette inhibition entraîne un blocage de la formation des complexes CDK/cyclines et donc un arrêt en phase G1. P16 est donc un acteur du cycle cellulaire. L'absence de la protéine p16 induit une progression incontrôlée dans le cycle cellulaire et donc une prolifération accrue (Luo J *et al.*, 2007).

II. Mort Cellulaire Programmée

L'Apoptose, une mort cellulaire «programmée», donc génétiquement contrôlée, et un processus physiologique indispensable au développement des organismes pluricellulaires (Conradt, 2009).

Son déclenchement se fait suite à différentes stimuli extracellulaires ou intracellulaires et débute par une phase de latence qui est un processus réversible. La phase d'exécution de l'apoptose induit des modifications morphologiques conduisant à la mort cellulaire (Elmore, 2007).

Le cancer est parmi les maladies qui sont la conséquence d'une perturbation des mécanismes régulateurs ou effecteurs de l'apoptose (Dubois *et al.* 1998). En effet, un déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose est un acte important qui conduit à la cancérogenèse (Bold, Termuhlen et Mc Conkey, 1997).

La modulation de l'apoptose dans les tissus normaux et les cellules tumoraux est une stratégie intéressante pour améliorer la fenêtre thérapeutique et diminuer la toxicité (Koff, Ramachandiran, & Bernal-Mizrachi, 2015), autrement dit, l'objectif du traitement anticancéreux est d'induire la mort des cellules tumorales en évitant de cibler les cellules normales.

Enfin, l'apoptose est maintenue contrôlée car les Caspases sont synthétisées sous une forme précurseur « les pro-Caspases ». Lorsque les Caspases initiatrices (8 et 9) sont activées par oligomérisation, elles vont à leur tour activer les Caspases effectrices (3, 6 et 7) par clivage. Ces dernières vont hydrolyser une batterie de substrats donnant ainsi naissance à l'ensemble des caractéristiques biochimiques et morphologiques associées avec le phénotype de l'apoptose (**Fischer et al., 2003**). Le rôle des Caspases est d'inactiver les voies protectrices et d'activer les molécules qui vont participer à la destruction cellulaire (**Taylor et al, 2008**).

On estime que le cancer est à l'origine d'une mal prolifération cellulaire, qui touche les tissus et les organes, et parmi ces organes, le pancréas.

III. Le Pancréas

III.1 Description

Le pancréas est un organe abdominal digestif situé profondément dans l'espace rétro péritonéal, l'une des principales glandes annexes du tube digestif. Sa forme générale est triangulaire à base droite et à sommet gauche allongée transversalement (**Frank et al., 2004**). Chez l'homme il mesure environ 15 centimètres de long et atteint au niveau de la tête sa plus grande hauteur, qui est de 6 à 7 centimètres (**Frank et al., 2004**). Pour une masse allant de 70 à 100g (**LAFITTE et al., 2012**).

Le pancréas est une glande digestive accessoire composé de quatre parties (**Fig 2**).

- La tête qui correspond à la plus volumineuse partie de cet organe et qui s'insère dans le cadre du duodénum (**Pocock et al. ,2004**).
- Le corps, allongé et aplati dans le sens antéro-postérieur et en avant de la colonne vertébrale (**Henry, 1985**).
- L'isthme ou col : Reliant la tête au corps, il est rétréci situé en avant des vaisseaux mésentériques (**Henry, 1985**).
- La queue qui correspond à la partie terminale qui se prolonge jusqu'au bord de la rate (**Pocock et al. ,2004**). A gauche en direction du hile hépatique. (**Henry, 1985**).

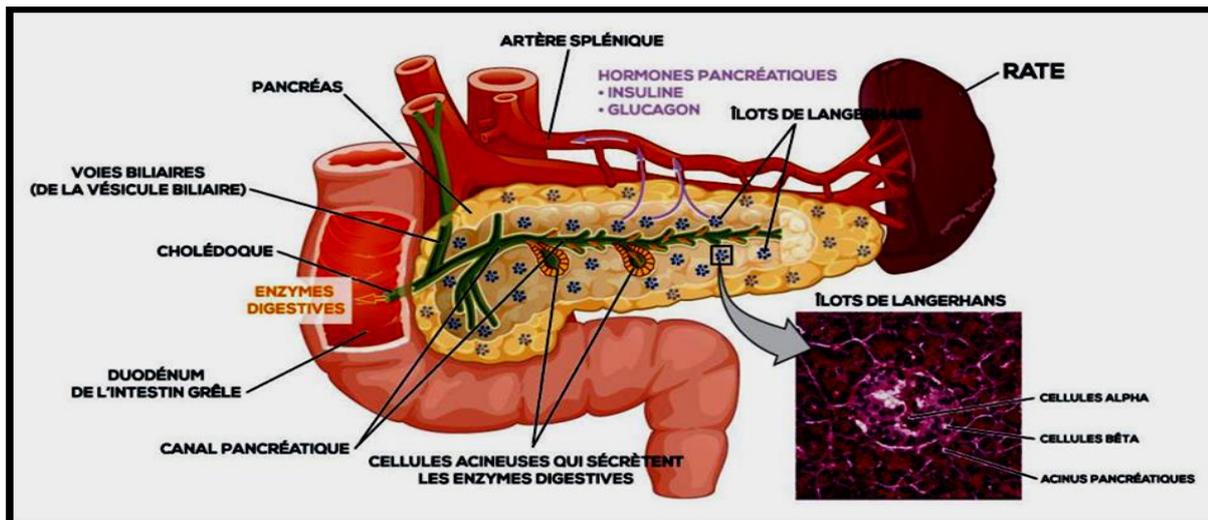


Figure 2 : Anatomie du pancréas (Blausen gallery, via Wikimedia Commons).

III.2. Physiologie du pancréas

Le pancréas est une glande amphicrine ou mixte à la fois exocrine et endocrine. C'est la deuxième plus grosse glande de l'organisme après le foie (Franck *et al.*, 2004).

✓ Le pancréas endocrine

Les îlots de Langerhans contenus dans le pancréas endocrine sont responsables de la sécrétion des hormones. Il existe quatre types cellulaires au sein des îlots : les cellules alpha qui sont localisées en périphérie des îlots et secrètent le glucagon qui est responsable de l'hyperglycémie, les cellules bêta localisés dans le centre des îlots et secrètent particulièrement l'insuline, les cellules delta et les cellules F qui secrètent respectivement la soma-statine et le polypeptide pancréatique (Morisset, 2008).

✓ Le pancréas exocrine

Environ 80 % de la masse glandulaire du pancréas est responsable de la sécrétion exocrine. Cette portion comprend au moins deux unités fonctionnelles.

- Les cellules acineuses (Chey et Chang, 2001), qui contribuent au processus de digestion des aliments par la sécrétion d'enzymes responsable de la dégradation des aliments en éléments simples (Anicotte *et al.*, 2004).
- Et les cellules Centro acineuses ou cellules des canaux pancréatiques, sécrétant les liquides et les électrolytes (Chey et Chang, 2001).

III.3. Principales Fonctions

Le pancréas joue un rôle central dans la digestion et l'absorption ainsi que dans l'utilisation et le stockage des substrats énergétiques (**Papin et Lang, 2009**).

Tableau I : les différentes fonctions des deux parties pancréatiques : (**Anicotte et al. ,2004 ; Papin et Lang, 2009 ; Chey et al. ,2009**).

Le pancréas endocrine	<p>Les Cellules alpha : secrètent le glucagon, une hormone hyperglycémiant. Ce qui permet de remonter la glycémie lorsque celle-ci devient inférieure à la normale.</p> <p>Les Cellules Bêta : sont responsables de la synthèse et la sécrétion de l'insuline, hormone hypoglycémiant.</p>
Le pancréas exocrine	<p>1-Neutraliser l'acidité gastrique par la production d'un suc pancréatique alcalin riche en bicarbonates.</p> <p>2-Produire les enzymes majeures de la digestion contribuent à la dégradation des nutriments sont : protéases, lipase, amylase, nucléases.</p>

IV. Cancer du Pancréas

Le cancer du pancréas devient un véritable fardeau préoccupant l'échelle mondiale. Il a été signalé comme le septième cancer le plus meurtrier au monde (**Canivet et al. ,2018**), et devrait devenir la deuxième cause de décès liée au cancer au cours des dix prochaines années (**Fisher et Berger, 2003**).

L'incidence du cancer du pancréas a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, Il est le 12^{ème} cancer le plus fréquent.

Selon le Centre international de recherche sur le cancer CIRC (IARC, globocan), ce cancer est un des rares en constante augmentation dans le monde : 458 918 cas ont été recensés en 2018, entraînant 432 242 décès, et le nombre devrait atteindre 484 486 cas en **2020**, 557 688 cas en **2025** et 815 276 cas en **2040** (**Biomarqueurs et Diagnostic ACOBIUM**).

Il est généralement diagnostiqué à un stade avancé et, par conséquent, le taux de survie est extrêmement faible, il devrait dépasser le cancer du sein, et la mortalité due à cette maladie devrait ainsi continuer d'augmenter à l'échelle mondiale (**Sene et al. ,1999**).

Malgré les progrès du développement médicamenteux et de la génétique moléculaire, l'incidence du CP est presque égale à 95,8% de mortalité (**Gudjonsson, 1987**). Ces faits justifient un besoin urgent d'intensifier les efforts en vue du développement de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques pour la prise en charge du CP. (**Ezzati et al. ,2005**).

IV.1. Epidémiologie et Facteurs de Risques

Comprendre l'épidémiologie du cancer du pancréas pourrait être la clé pour élucider son étiologie et donc la pierre angulaire de l'élaboration d'une stratégie thérapeutique (**Drouillard et al. ,2017**). Le CP est un enjeu majeur en oncologie digestive, son pronostic reste très pauvre avec une survie nette à cinq ans inférieure à 10 % (**Registre des tumeurs d'Alger, 2012**).

Selon le registre des tumeurs d'Alger son incidence est estimée seulement à 2,45 /105 habitant. Il touche deux fois plus les hommes que les femmes, généralement après 50 ans (**Parkin et al. ,2011**). Les facteurs de risque actuellement reconnus ne peuvent expliquer cette épidémiologie évolutive citant : le tabac, alcool, la prédisposition génétique (antécédents familiaux) ou encore le diabète (**tableau II**).

Tableau II : les facteurs de risques du cancer du pancréas (**Les traitements du cancer du pancréas, collection Guides patients Cancer info, INCa, décembre 2012 ; Khorana et al. ,2017**).

Tabac et alcool	Fumer est un acte dangereux, c'est le facteur de risque le plus identifié, d'ailleurs les fumeurs ont un risque relatif >2 de développer un CP. La consommation excessive d'alcool pourrait augmenter aussi le risque de CP.
Diabète	La pancréatite chronique augmente le risque du CP surtout dans les formes familiales génétiques. Le risque relatif varie entre 12 et 16 selon les études et est lié à la durée de la pancréatite (4% à 20%).
Prédisposition génétique ou (ATCD)	Les ATCD familiaux augmentent le risque de CP, il existe de rares formes familiales de CP. Le plus souvent dans le cadre de maladies prédisposant à plusieurs cancers (gènes BRCA2- gène STK11 du syndrome de Peurtz-jeghers, gène CDKN2A lié au syndrome des mélanomes familiaux). La plupart des cancers du pancréas présentent des mutations somatiques dans les gènes KRAS (80 %), p53 (50 %) et p16, qui sont associés au contrôle de la croissance tumorale.

IV.2. Diagnostic moléculaire

Le CP est souvent de diagnostic tardif, les signes vont varier en fonction de la localisation et de l'extension de la lésion. Les symptômes tel que (l'anorexie, la perte de poids, douleurs abdominales, ... etc.) n'apparaissent généralement que lorsque la tumeur est devenue métastatique (**Elsevier Masson SAS, 2015**). Les examens d'imagerie vont également visualiser la tumeur du pancréas (TDM et IRM) (**Wack, 2005**).

La biologie recherche des arguments indirects et les complications éventuelle de la tumeur, Il est donc nécessaire de disposer d'outils de diagnostics plus sensibles et d'approfondir la recherche au niveau moléculaire afin d'identifier plus de marqueurs tumoraux et assurer un diagnostic beaucoup plus précoce et les principaux marqueurs recherchés sont les suivants (**Pr Pascal Hammel, 2010**).

Carbohydre Antigène ou CA 19-9 : il a une valeur pronostique (>1000 ➡ tumeur souvent métastatique), il est aussi élevé en cas de cholestase, qui est fréquente dans les tumeurs de la tête du pancréas. Le taux sanguin de CA 19-9 ne permet pas d'établir un diagnostic, mais s'avère souvent utile pour obtenir un niveau de référence pour le suivi et pour évaluer la réponse au traitement (**Pr Pascal Hammel, 2010**).

K-ras : c'est un oncogène muté dans 80-90% des cancers. Il présente un réel intérêt diagnostique, et cette mutation est recherchée dans le suc pancréatique ou dans le produit de brassage du canal pancréatique (**Pr Pascal Hammel, 2010**).

IV.3. Traitements

Le choix de traitement dépend des caractéristiques du cancer, l'endroit où il est situé sur le pancréas, son type histologique (type cellules impliquées) et son stade (degré d'extension et degré d'agressivité) (**Khorana et al. ,2017**)

Une tumeur du pancréas est souvent considérée comme non résécable quand elle semble envahir les tissus adjacents, d'autres organes du corps, des ganglions lymphatiques ou des vaisseaux sanguins proches. Une cœlioscopie est parfois utilisée pour réaliser une biopsie, afin de détecter une petite invasion du péritoine et du foie (métastases). Cependant, l'étendue du cancer ne peut généralement être déterminée avec précision que lors de la chirurgie (**Cancer du pancréas, un guide pour les patients – Basé sur les recommandations de l'ESMO – v.2013.1**).

IV.3.1. La marge chirurgicale

Moins de 20% des CP sont accessible à une résection chirurgicale qui reste pourtant le seul traitement curatif.

Cette marge consiste à retirer la partie du pancréas sur laquelle la tumeur s'est développée. Une partie de l'intestin, de l'estomac, la vésicule biliaire et la rate peuvent également être enlevées pendant l'intervention pour éviter que des cellules cancéreuses se développent sur ces organes (**Khorana et al. ,2017**).

IV.3.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie utilise des médicaments qui détruisent les cellules qui ont la particularité de se diviser rapidement (**Evans et Wolff, 2008**). Elle a pour objectif de ralentir, voire d'arrêter la progression de la maladie, de diminuer la douleur et d'améliorer la qualité de vie du malade (**Khorana et al. ,2017**).

La Gemcitabine seule est encore la chimiothérapie standard pour les patients atteints d'un CP métastatique. La combinaison de Gemcitabine et de nab-paclitaxel s'est montrée supérieure au traitement par Gemcitabine seule. Par conséquent, cette combinaison peut être recommandée pour les patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique. La toxicité de ce protocole est plus élevée que celle de la Gemcitabine seule. Récemment, une étude, qui a analysé une combinaison de 3 agents chimio thérapeutiques, le 5- Fluoro-uracile, l'oxaliplatine et l'irinotécan, (protocole FOLFIRINOX), a montré des résultats intéressants en ce qui concerne la prolongation de la survie et le retardement de la détérioration de la qualité de vie (**Cancer du pancréas, un guide pour les patients – Basé sur les recommandations de l'ESMO – v.2013.1**).

IV.3.3. La radiothérapie

Pour des patients avec un cancer localement avancé, l'alternative pourrait être une chimiothérapie suivie par une combinaison de chimio-radiothérapie qui pourrait améliorer le taux de résection et ainsi la survie à distance (**Rivera et al. ,2009**). Le CP reste un défi thérapeutique majeur qui nécessite de toute urgence des options thérapeutiques nouvelles et améliorées (**Rivera et al. ,2009**).

En conclusion, toute perturbation irréversible des régulateurs amont ou des composants effecteurs aval de la machinerie de contrôle de la prolifération cellulaire et apoptotiques conduit à une tumorigenèse.

Toute molécule capable d'induire et d'activer les protéines régulatrices du cycle cellulaire et de l'apoptose pourrait être un remède efficace contre le cancer pancréatique. Pour cela, existe-il d'autres méthodes thérapeutiques alternatives qui réfèrent à la nature avec moins d'effet secondaire ?



Chapitre II

Les Alcaloïdes Isoquinoléïques

Actuellement plusieurs questions se sont soulevées concernant l'inefficacité et la sécurité des traitements chimiques utilisés en médecine (**Das et Dhanja, 2015**). La migration vers des produits d'origine naturelle constitue un refuge pour les chercheurs vu leurs avantages et l'intérêt thérapeutique qu'ils présentent.

Il ne fait aucun doute que les plantes médicinales, la forme la plus ancienne de médicaments employée par l'homme dans la lutte contre la plupart des maladies et troubles, pourrait servir de substitut sûr à de nombreux médicaments synthétiques utilisés dans les thérapies cliniques actuelles (**Das et Dhanja, 2015**).

La phytothérapie est l'art d'utiliser les plantes pour se soigner, elle constitue la source la plus importante et la plus précieuse d'agents naturels dont il a été prouvé qu'ils ont des effets puissants contre de nombreuses maladies, à savoir le cancer (**Das et Dhanja, 2015**).

Plusieurs preuves confirment que l'activité biologique de ces plantes provient principalement de leurs métabolites secondaires tels que les alcaloïdes (**Lu et al., 2012**).

En raison de leurs propriétés biologiques et de leurs diversités structurales, les alcaloïdes ont montrées des capacités antinéoplasiques, antiprolifératifs et apoptotiques prometteuses dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (**Lu et al., 2012**).

I. Les Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires naturels le plus souvent d'origine végétale contenant des structures cycliques avec au moins un atome d'azote basique incorporé à l'intérieur, bio-synthétisé à partir des acides aminés de faibles poids moléculaires, tels que la lysine, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (**Aniszewski et al., 2007**).

Les alcaloïdes représentent un groupe très diversifié de composés. La diversité structurale de cette famille est due au grand nombre d'acides aminés utilisés comme éléments constitutifs (**Aniszewski et al., 2007**).

En effet, le cycle peptidique qu'ils contiennent a un ou plusieurs de ses atomes d'hydrogène est remplacé par divers radicaux alkyles. Les principaux cycles azotés des alcaloïdes sont résumés ci-dessous :

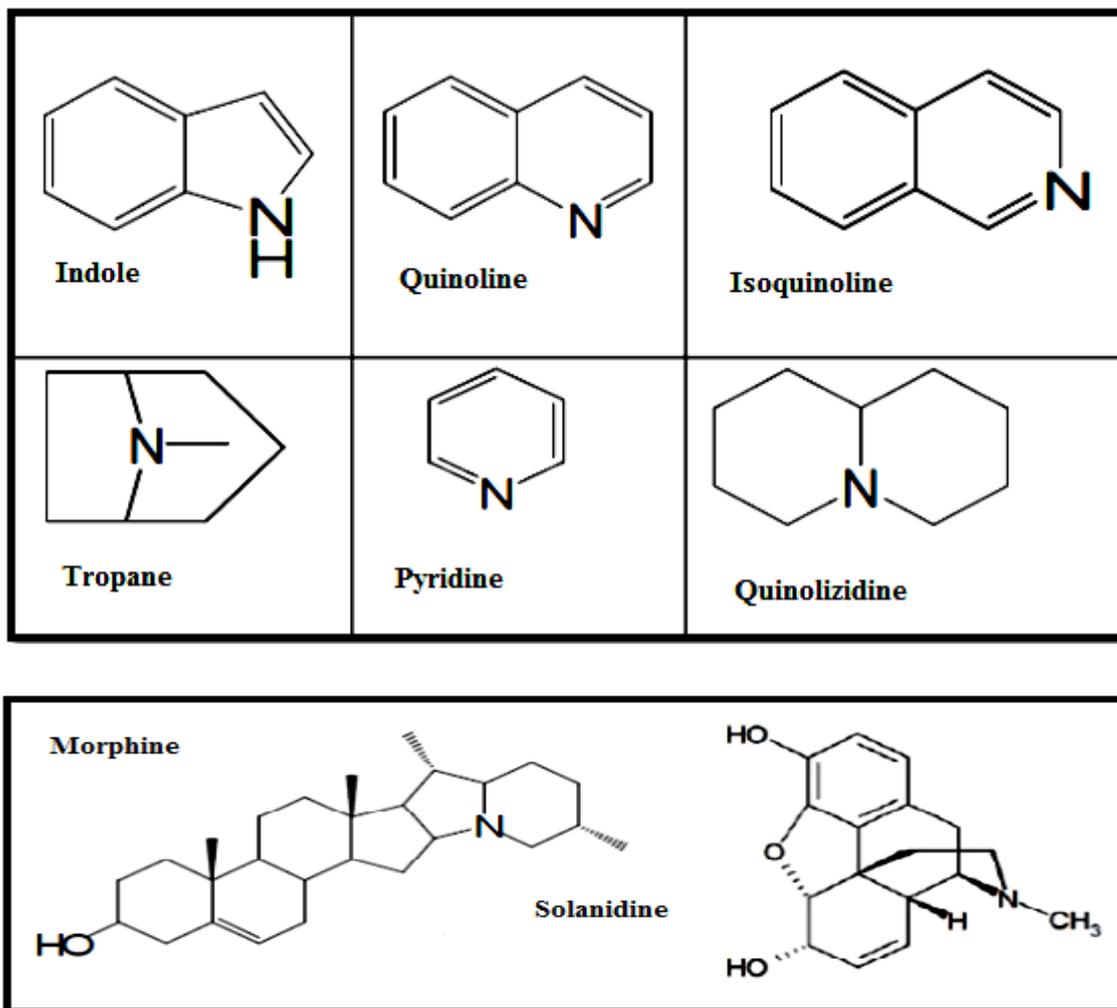


Figure 3 : les principaux cycles azotés des alcaloïdes (Wrobel *et al.*,1967).

Les alcaloïdes ne constituent pas une catégorie définie des composés chimiques en raison de la variété de leurs structures, certains scientifiques les classent selon leurs propriétés pharmacologiques ou encore selon leur distribution botanique.

D'autres classifications fondées sur la structure du cycle fondamental de la molécule sont également possibles donnant naissance à trois groupes à savoir : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes (Shakil,1998 ;Bruneton,2009).

II. Les Alcaloïdes Isoquinoléiques

Les alcaloïdes contenant le noyau isoquinoléine constituent une classe de substances présentant la deuxième plus grande diversité structurelle dans la nature, après les alcaloïdes indolique (Da *et al.*,2015).

C'est des composés aromatiques hétérocycliques (C₉H₇N) apparentés de la pyridine et isomères de la quinoléine, qui est une base organique, constituée d'un noyau pyridinique et d'un noyau benzénique (Figure 4) (Zhang *et al.*, 2007).

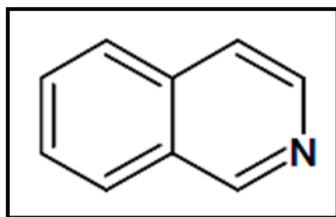


Figure 4 : Structure chimique du noyau isoquinoléine (Zhang *et al.*, 2007).

Ces composés sont bio génétiquement dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine, et comprennent un cycle isoquinoléine ou tétrahydroisoquinoléine comme caractéristique structurelle de base de leur squelette (Pandeya *et al.*, 2011).

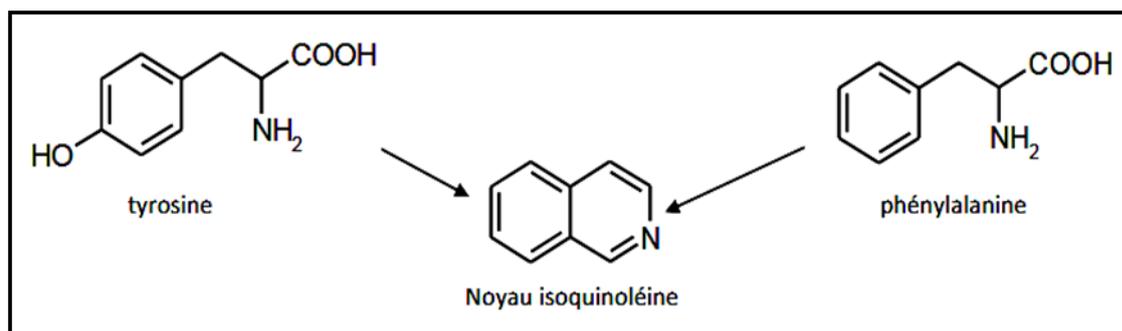


Figure 5 : le noyau isoquinoléine dérivant de la tyrosine et la phénylalanine (Pandeya *et al.*, 2011).

Les alcaloïdes isoquinoléïques ne constituent pas un groupe structurellement homogène. Sur la base des différents degrés d'oxygénation et des réarrangements intramoléculaires, de leur distribution et de la présence d'anneaux supplémentaires connectés au système principal, ils peuvent être divisés en huit sous-groupes :

- Benzylisoquinoléine.
- Benzophénanthridine.
- Aporphine.
- Protoberbérine.
- Protopine.
- La phtalide isoquinoléine.
- Le morphinane.
- Les alcaloïdes émétines (Pandeya *et al.*, 2011).

Parmi les sous-groupes répertoriés, les protoberbérines sont le groupe le plus important, elles constituent 25 % de toutes les structures élucidées des alcaloïdes isoquinoléiques, ce qui en fait les métabolites secondaires les plus répandus (Pandeya *et al.*,2011).

Les alcaloïdes isoquinoléines ont suscité un grand intérêt de la part des chimistes et des pharmacologistes en raison de leurs spectres d'activités biologiques et pharmacologiques. Ces molécules sont largement distribuées parmi les plantes des familles :

Renunculaceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Papavéraceae (pavot, chélidone), Fumariaceae (fumeterre), Rubiaceae (Zhang *et al.*,2007).

Dans ce document, on s'est intéressé à quelques alcaloïdes isoquinoléiques a savoir : « la Berbérine » et « la Sanguinarine ».

II.1. La Berbérine

La berbérine (BBR, 2,3-méthylènedioxy-9,10-diméthoxyprotoberbérine chlorure, C₂₀H₁₈ClNO₄, poids moléculaire, 371,817g/mol) (Fig 6) est un alcaloïde Isoquinoléine quaternaire isolé à partir d'une variété d'arbre naturel tel que le Berberis (*Berberis aquifolium*, *B. vulgaris* et *B. aristata*) (Zhang *et al.*,2017).

Elle se localise généralement dans l'écorce, les tiges, les rhizomes, et les racines. Un grand nombre d'étude ont montré que la BBR possède une variété de propriétés chimiques et pharmacologiques, citons : des effets antibactériens, antihypertenseurs, anti-inflammatoire, anti diabétiques, antioxydants,...etc (Mantena *et al.*,2006).

Ces dernières années, une grande attention a été accordée à l'effet anticancéreux de la BBR et d'autres dérivés de la protoberbérine, il a été rapporté que cet effet peut varier en fonction du type de cellule (Zhang *et al.*,2017).

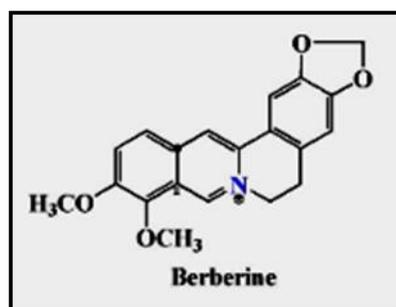


Figure 6 : structure chimique de la berbérine (Zhang *et al.*,2017).

II.2. La Sanguinarine

La sanguinarine (13-méthyl-[1,3] benzodioxolo [5,6-c]-1,3dioxolo [4,5-i] phénanthridinum) (**Fig 7**), est un alcaloïde Isoquinoléine quaternaire que l'on trouve principalement dans les plantes de famille Papavéracées y compris les racines de la plante *Sanguinaria canadensis*, *Chelidonium majus*. Elle est dotée d'un large spectre de propriétés pharmacologiques telles que les activités antioxydante, anticancéreuse, antivirale et anti-inflammatoire (**Vavreckova et al.,1996**).

En carcinogénèse pancréatique, les mécanismes moléculaires par lesquels la sanguinarine inhibe la croissance des cellules souches cancéreuses (CSC) n'ont jamais été examinés et sont donc très prometteurs pour le développement en tant qu'agent chimio-préventif ou curatif (**Burgeiro et al.,2013**).

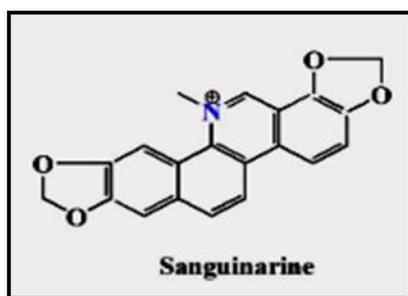


Figure 7: Structure chimique de la sanguinarine (**Vavreckova et al.,1996**).

III . Préparation des Extraits d'Alcaloïdes

En raison de la valeur élevée des alcaloïdes, des recherches ont essayé de trouver de nouvelles méthodes d'extraction et d'estimation de ces composés.

L'extraction des alcaloïdes repose en règle générale, sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état de sels et sur leur basicité, c'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, et dans les solvants organiques d'autres part. Des étapes pré-extractives sont indispensables avant de procéder au protocole d'extraction et cela pour un meilleur rendement possible en métabolites secondaires (**Bruneton, 1999**).

III.1. Récolte

La qualité des drogues végétales dépend en grande partie des soins apportés à leurs récoltes, le choix de la période de récolte dépend de la nature de l'organe récolté. La récolte obéit à la concentration maximale en principe actif qui se fait généralement le matin très tôt, beaucoup d'autres précautions sont donc recommandés. Il serait intéressant donc, pour la récolte, de choisir les hauteurs et où la plante est à son maximum en métabolites secondaire et avant lever du soleil (exposition aux UV par exemple) (**Bruneton, 1999**).

III.2. Conservation

Les plantes médicinales sont rarement utilisées à l'état fraîche elles doivent donc être conservés dans de bonnes conditions, car elles peuvent favoriser l'apparition de moisissures et le développement microbologique. Un certain nombre de réactions sont à l'origine de l'altération des drogues ce qui entraîne une perte des substances bioactives. Ces altérations le plus souvent sont de nature enzymatique (hydrolyse, oxydation, polymérisation) nécessitant la présence d'eaux et peuvent donc être éliminés par différents moyens notamment le séchage. Ce dernier permet la stabilisation des produits hydratés, par la réduction de la teneur en eau et l'abaissement subséquent de l'activité de l'eau de ces produits, le développement microbien et l'activité enzymatique sont alors inhibés (**Lingani et al. ,2005**).

III.3. Broyage

A pour but d'augmenter la surface de contact entre la poudre et le solvant. Le produit obtenu par le séchage est transformé en poudre grâce à un broyeur électrique. La poudre est conservée dans un récipient fermé à l'abri de la lumière. Le broyat va constituer donc, la matière sèche qui va servir à l'extraction (**Bruneton, 1999**).

III.4. Choix du solvant d'extraction

Un solvant ou un mélange de solvants doit être choisi en tenant compte de la ou des substances à extraire. Il convient d'utiliser des solvants indiqués dans la littérature comme étant appropriés à la classe de composés étudiée. Lorsque de telles informations ne sont pas disponibles, en règle générale, le solvant utilisé doit avoir une polarité similaire à celle des composés à extraire (**Bruneton,1999**).

IV. Extraction des alcaloïdes

C'est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme selon diverses techniques. L'extraction des alcaloïdes est basée sur la différence de solubilité en milieu acide et en milieu alcalin, ils vont ainsi pouvoir être séparés des autres constituants du végétal qui possèdent les mêmes solubilités quel que soit le PH (**Bruneton,1999**).

IV.1. Extraction par un Solvant en Milieu Alcalin

- La plante au départ est mise en poudre, pulvérisée pour faciliter l'extraction naturellement sous forme de sels.
- Rajouter de la potasse, du carbonate de sodium et extraire les alcaloïdes bases dans un solvant organique apolaire où ils seront bien dissous comme par exemple le dichloroéthane.
- Agiter, ensuite filtrer pour aboutir à une solution extractive organique qui renferme tous les alcaloïdes et quelques impuretés.
- Concentrer la solution par un chauffage doux et la mettre dans une ampoule à décanter.
- Rajouter de l'eau avec une goutte d'acide sulfurique ou chlorhydrique puis procéder à une extraction liquide-liquide.
- Agiter de façon adaptée et récupérer dans la phase aqueuse les alcaloïdes sels.
- Une solution aqueuse acide est obtenue. Toutes les impuretés apolaires sont éliminées dans le solvant épuisé.
- Réutiliser un solvant organique non miscible à l'eau, changer le pH, rebasculer en milieu alcalin.
- Les alcaloïdes sels redeviennent des bases et passent dans la phase organique.
- Concentrer par évaporation la phase organique pour récupérer un résidu d'alcaloïdes totaux à l'état de bases.

Les différentes étapes de cette extractions sont résumés sur le schéma ci-dessous (**Figure 8**) (**Bruneton,1999**).

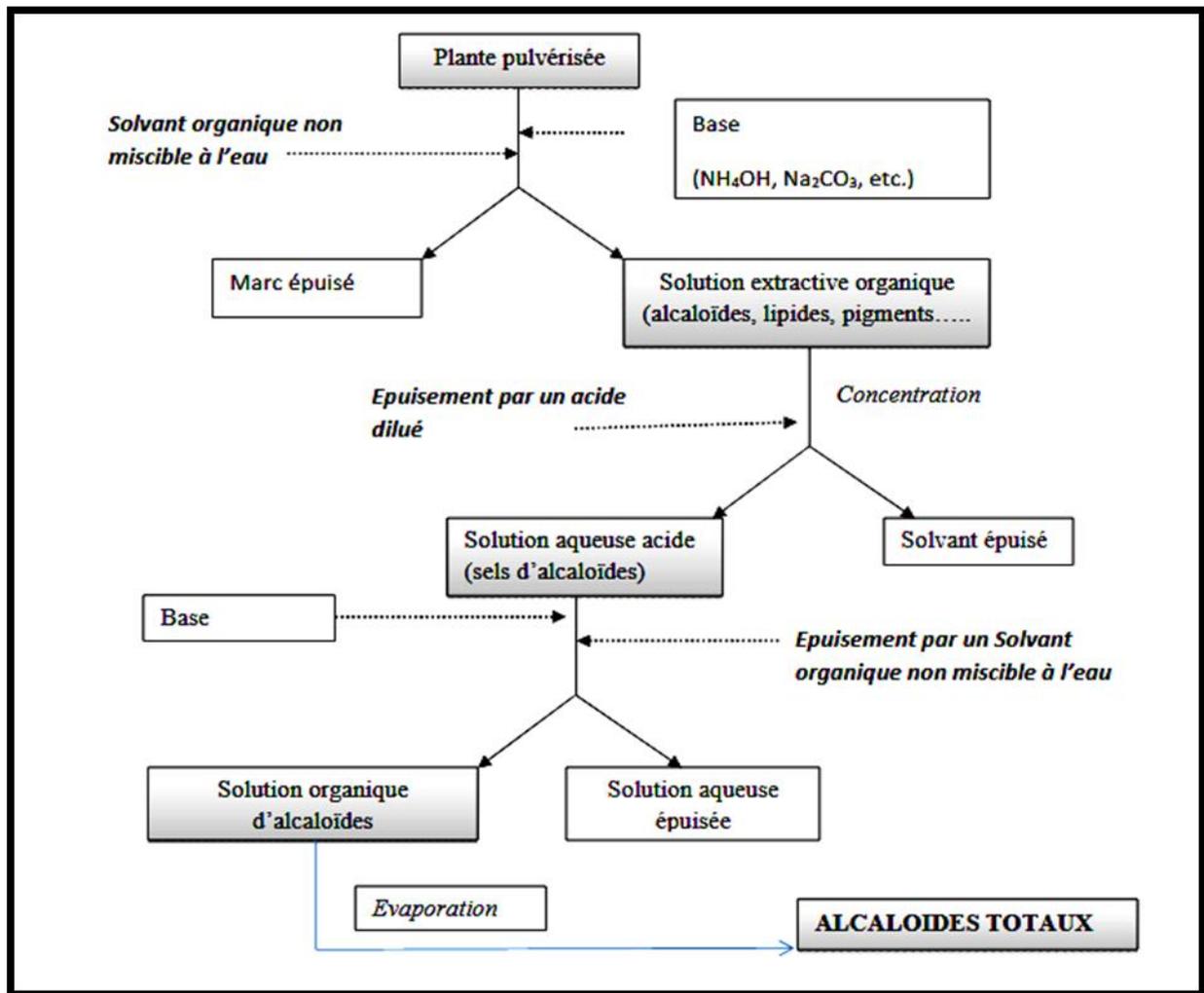


Figure 8 : Principe de l'extraction des alcaloïdes en milieu alcalin (Bruneton,1999).

IV.2. Extraction par un Solvant en Milieu Acide

- La drogue pulvérisée est traitée par une solution alcoolique acide.
- Ensuite évaporer à sec.
- Le résidu est repris par l'eau acide (alcalinisation).
- la solution aqueuse est épuisée par un solvant organique non polaire.
- Une solution organique d'alcaloïdes bases purifiés est obtenue.
- Evaporer le solvant.

Un résidu d'alcaloïdes totaux (bases) est le résultat final (Paris et Hurabielle, 1981).

IV.3. Extraction Soxhlet

L'extraction des alcaloïdes totaux de la drogue est aussi réalisée dans un appareil de Soxhlet avec un solvant organique. De manière à s'assurer de l'efficacité de l'extraction.

C'est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première (Bottin, 2006) (fig 9).

Protocole Générale

- Placer le produit dont on souhaite extraire un de ses substances constitutives dans la cartouche de cellulose.
- Puis dans le réservoir de soxhlet, remplir le ballon avec une quantité suffisante de solvant (prendre en compte la quantité qui sera piégée dans le réservoir en cours de manipulation) et surmonter l'extracteur d'un réfrigérant.
- A l'aide d'un chauffe-ballon, porter le solvant à ébullition, celui-ci passe par la tubulure et est condensé par le réfrigérant, il tombe alors dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise la substance à extraire.
- Le réservoir se remplit, dès que le niveau de solvant est à hauteur du coude il se vide automatiquement, le solvant et la substance à extraire sont entraînés dans le ballon.
- Pour une extraction correcte d'une substance il est recommandé de réaliser plusieurs cycles (Bottin, 2006).

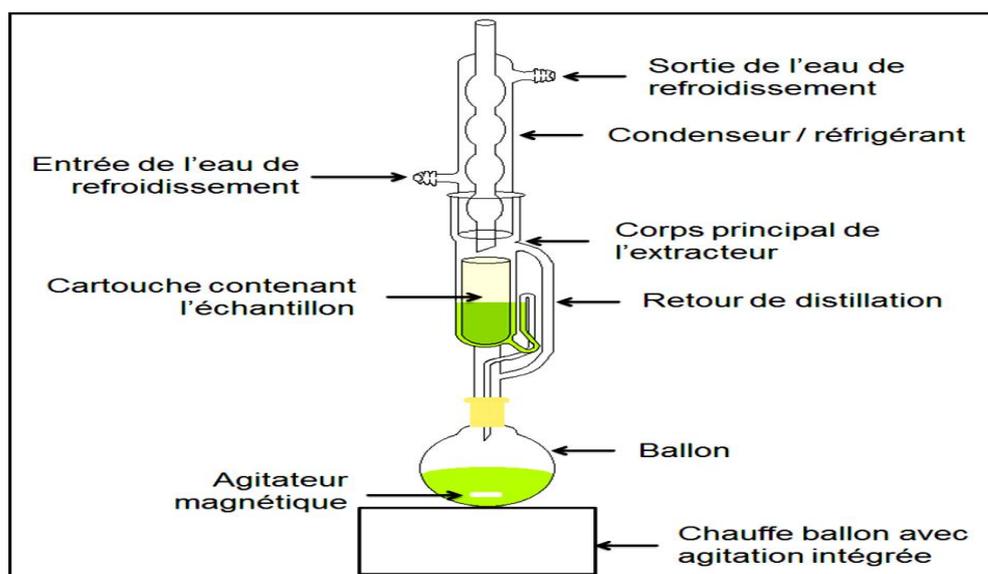


Figure 9 : Schéma de l'appareillage d'extraction au soxhlet (Bottin, 2006).



Chapitre III

Cancer du pancréas et Alcaloïdes Isoquinoléïques.

La culture cellulaire est étudiée depuis plusieurs années comme moyen alternatif pour produire de nouvelles molécules anticancéreuses. L'estimation de l'effet anticancéreux en culture cellulaire implique un ensemble de tests permettant une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire (**Barlovatz-meimon et al., 2003**).

Dans cette partie du document, on traitera quelques tests évalués pendant des recherches ultérieures afin de comprendre l'effet anticancéreux de quelques alcaloïdes isoquinoléiques à savoir : la Berbérine et la Sanguinarine (**Barlovatz-meimon et al., 2003**).

Entretien des lignées cellulaires

Les cellules sont maintenues en culture en flacon de 75 cm (des supports adaptés pour la culture de cellules adhérentes) dans leurs milieux adaptés, elles sont ensuite placées dans une étuve à 37°C, dont l'atmosphère saturée en humidité est enrichie à hauteur de 5% de CO₂. Afin de minimiser les risques de contaminations (bactérienne et fongique) on rajoute au milieu de l'antibiotique et antifongique, aussi les manipulations se sont effectuées sous une hotte à flux laminaire vertical à haute stérilité (**PSM** : Poste de Sécurité Microbiologique). Dans le but de maintenir des conditions de culture et une prolifération optimales des cellules, le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 heures (**Parc et al., 2015**).

Modèles cellulaires

L'utilisation de lignées cellulaires en culture *in-vitro* tient toujours une place importante dans la caractérisation du cancer et dans la recherche de nouveaux anticancéreux.

L'**American Type Culture Collection (ATCC)** est une société privée américaine, centre de ressources biologiques, dont la mission se concentre sur l'acquisition, l'authentification, la production, la conservation, le développement et la distribution de la norme de référence de micro-organismes, des lignées cellulaires et d'autres matériaux pour la recherche dans les sciences de la vie. L'ATCC a fourni à ce jour 22 lignées cellulaires issues de cancers du pancréas humain à différentes origines et caractéristiques (**Rozenblum et al, 1997**).

Cette étude a été consacrée, à la compréhension du comportement des alcaloïdes isoquinoléiques vis-à-vis de quelques lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques à savoir : PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1 et BxPC3.

- **PANC-1** : une lignée tumorale de phénotype intermédiaire présentant à la fois des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses adhérente aux flacons de culture cellulaire, isolée d'un carcinome pancréatique d'origine canalaire de tissu tumoral du pancréas obtenu à partir d'un homme de race blanche de 56 ans (**Michael et al. ,1975**). Ses cellules peuvent métastaser avec de faibles capacités de différenciation, ont tendance à s'agglomérer, une caractéristique qui peut être évitée avec la trypsinisation (**Fig 10a**) (**Thompson et Evonne ,2009**).
- **Mia PaCa-2** : Cellules individuelles adhérentes et amas lâchement attachés. La lignée cellulaire MIA PaCa-2 a été établie par A. **Yunis et al. en 1975** à partir de tissu tumoral du pancréas obtenu à partir d'un homme de race blanche de 65 ans. Elles présentent des mutations dans les gènes K-RAS, TP53 et CDKN2a/p16 (**Fig 10b**) (**Fisher et al. ,1998**).
- **AsPC-1** : Lignée adhérente, dérivée de xéno greffes de souris *nude* initiées avec des cellules d'ascite d'un patient atteint d'un cancer du pancréas. Isolée de tissu tumoral du pancréas obtenu à partir d'une femme de race blanche de 62 ans. Cette lignée exprime l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) ; l'antigène associé au pancréas humain ; antigène spécifique du pancréas humain ; mucine. (**Fig 10c**)
- **BxPC3** : une lignée tumorale présentant des caractéristiques épithéliales, Isolée de tissu tumoral du pancréas obtenu à partir d'une femme de 61 ans. Les cellules n'expriment pas le régulateur de conductance transmembranaire de la mucoviscidose (CFTR). (**Fig 10d**)

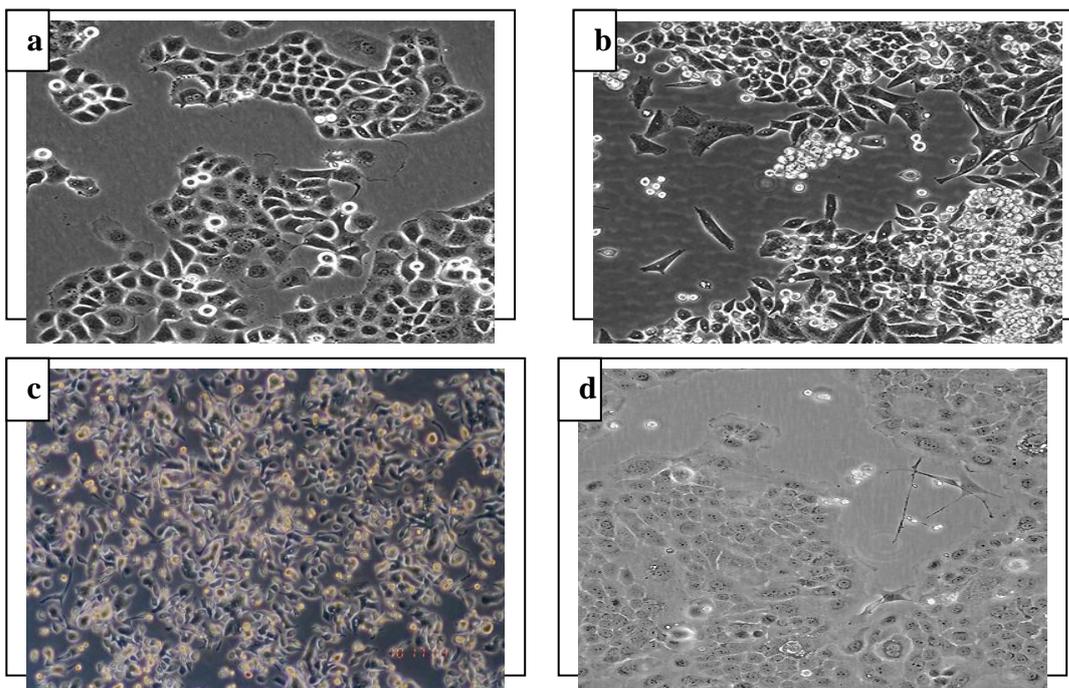


Figure 10 : Photographies microscopiques des lignées cellulaires citées dans cette étude après 72h d'ensemencement (grossissement x10) (**Base de données ATCC**)
a) PANC-1 ; b) Mia PaCa-2 ; c) AsPC-1 ; d) BxPC3a

Le long des tests, les deux premières lignées cellulaires (**PANC-1 et Mia PaCa-2**) ont fait l'objet de la caractérisation de l'effet de la **berbérine**, tandis que les deux dernières (**AsPC-1 et BxPC3**) ont permis l'évaluation de l'effet de la **sanguinarine**.

I.1. Test d'Exclusion au Bleu de Trypan

- **Principe**

Le test d'exclusion au Bleu Trypan est une méthode de coloration rapide des cellules mortes permettant d'évaluer le taux de mortalité cellulaire. Comme son nom l'indique, le principe de cette méthode repose sur le processus d'exclusion. Le Bleu Trypan est une molécule capable de pénétrer passivement à l'intérieur de la cellule et son exclusion nécessite de l'ATP que seules les cellules vivantes sont capables d'apporter. Les cellules mortes, dépourvues de cette source d'énergie ne peuvent pas refouler le Bleu Trypan et se trouvent, ainsi, seules colorées en bleu ce qui les distingue aisément des cellules vivantes qui demeurent incolores (**Aroussia et al. ,2015**).

• Protocole

L'effet des composés (Berberine et sanguinarine) sur la croissance cellulaire des lignées (PANC-1/ MIA-PaCa2 et ASPC-1/ BxPC3 respectivement) va pouvoir être évalué grâce à la réalisation de courbes de croissance afin de déterminer les IC_{50} de chaque lignée pour chaque molécule (Parc *et al.*, 2015).

- ✓ Le lot des cellules qui recevront le volume du solvant sans la molécule a testé correspond au control négatif
- ✓ Le lot des cellules qui recevront la **Gemcitabine** correspond au control positif.

Pour cela, le protocole de manipulation est schématisé ci-dessous (Fig 11)

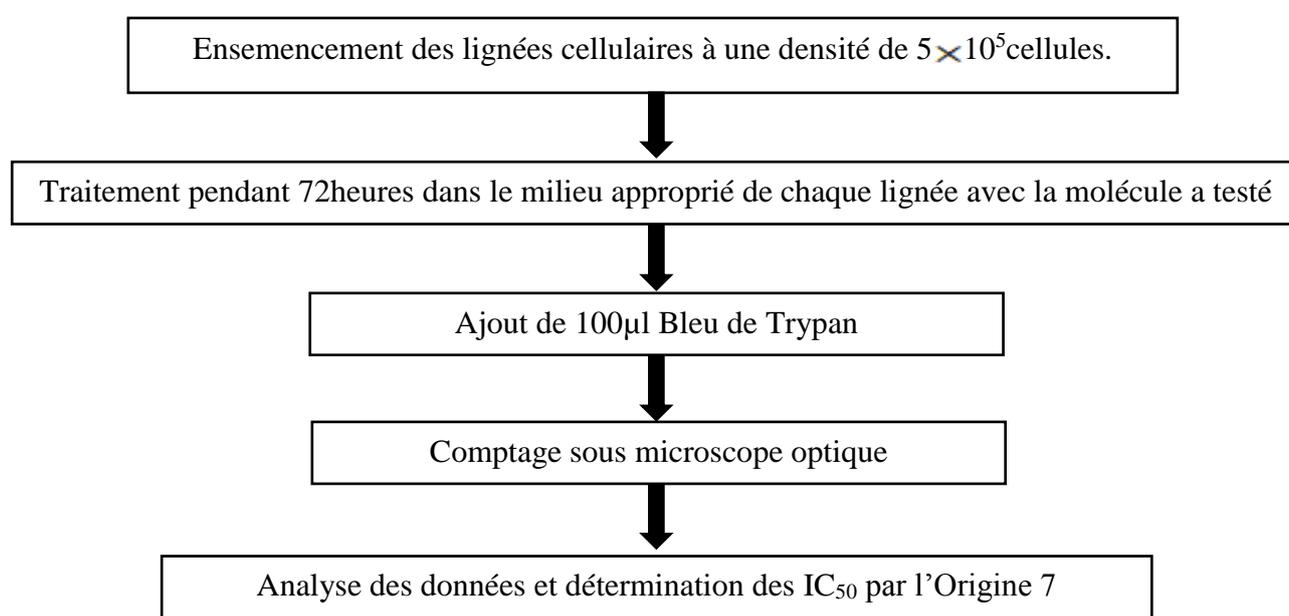


Figure 11 : Protocole du test d'exclusion au Bleu de Trypan sur des lignées cellulaires du cancer de pancréas (Parc *et al.*, 2015).

I.2. Analyse du cycle cellulaire (Cytométrie en flux, CMF)

La cytométrie de flux permet de caractériser la distribution des cellules dans chaque phase du cycle, en mesurant la quantité d'ADN présent dans la cellule et par conséquent une meilleure analyse du cycle cellulaire (Jacobberger *et al.*, 2011).

Pour cette analyse, la quantité d'ADN est déterminée par un marquage spécifique à l'aide d'un agent intercalant fluorescent, le plus utilisé est l'iodure de propidium (IP). La fluorescence émise par l'IP est mesurée cellule par cellule, ce qui permet d'entretenir un profil de fluorescence par la population cellulaire examinée et de déterminer le nombre et le

pourcentage de cellules dans chaque phases. Ainsi, la mesure du cycle cellulaire par cette méthode divise le cycle en trois phases : G₀/G₁, S et G₂/M (Jacobberger *et al.*, 2011). La fluorescence émise de la cellule variera et pour cette raison, des phases de G₂ et de M souvent ne peuvent pas être discernées les unes des autres, car elles partagent la teneur assimilé d'ADN (Grunwald *et al.* , 2010).

▪ Protocole

Afin de démontrer l'effet de la berbérine sur le cycle cellulaire des cellules cancéreuses, les cellules traitées et non-traitées ont été analysées par Cytométrie de flux. Le protocole de la méthode est présenté dans la **figure 12** (Ming *et al.*, 2014).

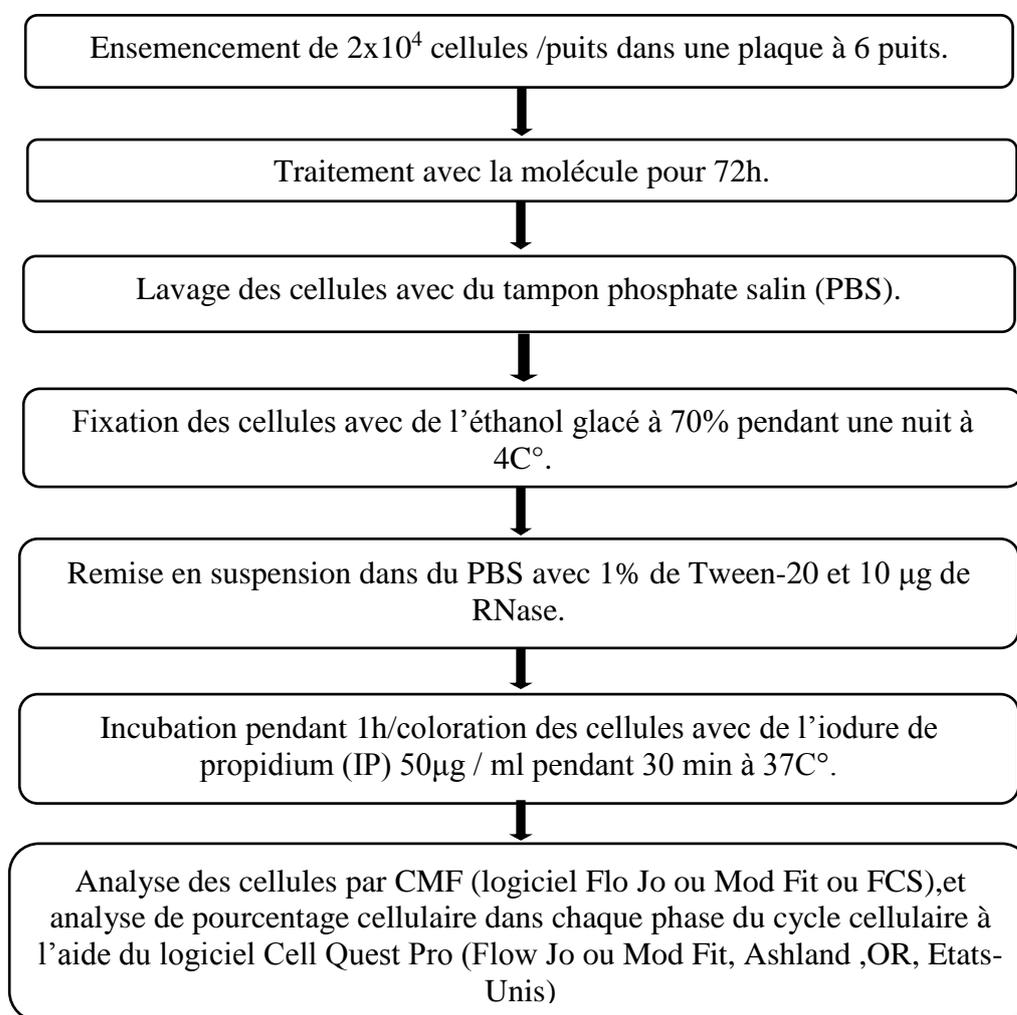


Figure 12 : Protocole d'analyse du cycle cellulaire par CMF (Ming *et al.*, 2014).

I.3. Analyse Western Blot

Afin de mieux étudier le mécanisme d'action de la BBR sur les lignées de cellules cancéreuses, **Ming et al. (2014)** avaient procédé à l'analyse des extraits protéiques totaux des cellules traitées par western blot. Le protocole de préparation des extraits protéiques totaux est résumé ci-dessous :

- Le tapis cellulaire est lavé au PBS et lysé avec 150 µl de tampon RIPA (Triton X-100 1 %, Na désoxycholate 1 %, NaCl 150 mM, PO₄Na₂/K pH 7,2 10 mM, EDTA 2 mM, Na Orthovanadate 5 mM, supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases) pour une boîte de diamètre 100 mm. Ce volume sera ajusté en fonction du taux de confluence des cellules et de la surface du support de culture pour favoriser une lyse complète des cellules.
- Après avoir laissé agir le tampon RIPA pendant 30 min sur glace, le tapis cellulaire lysé est récupéré avec un grattoir et centrifugé à 300 g pendant 10 min à 4°C.
- Le surnageant contenant les protéines est récupéré et les protéines sont dosées par méthode colorimétrique (DC protein assay, kit Bio rad) à l'aide d'une gamme étalon de BSA (**Kinoshita et al., 2009**).

Le western blot est une technique employée pour analyser une protéine dans un mélange protéique. La **figure 13** et le **tableau III** résument les étapes de réalisation du western blot.

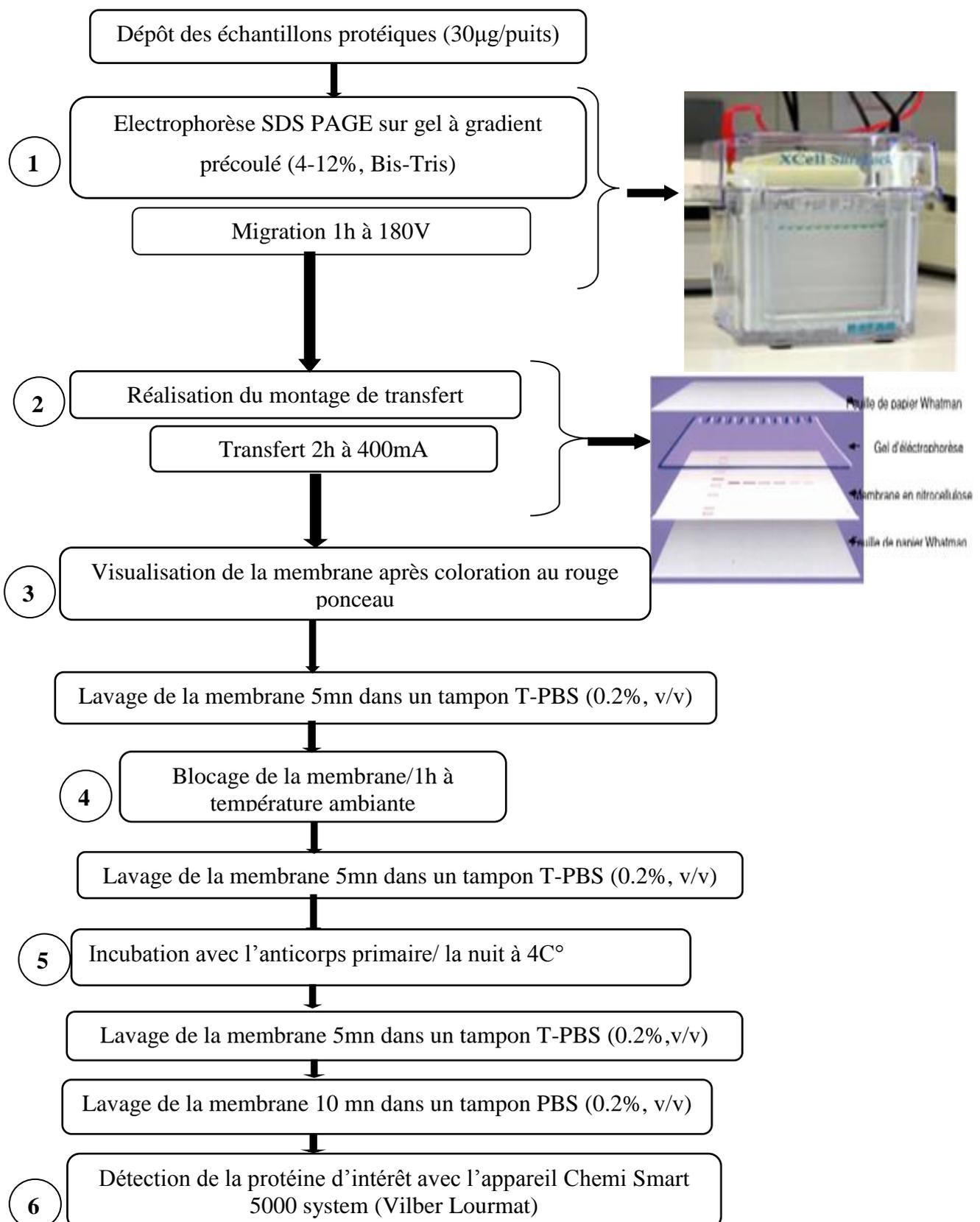


Figure 13 : Les étapes de réalisation du Western blot (Ming *et al.*, 2014)

Tableau III : Les détails des étapes du Western blot (**Kinoshita et al., 2009**).

Étapes	Protocoles
1.	Migration des protéines dans le tampon MOPS SDS running buffer (In vitrogen).500ml de tampon est utilisé par cuve.
2.	Chaque cuve de transfert doit être remplie avec 250ml de tampon.
3.	Le rouge ponceau est un colorant non spécifique des protéines. L'étape consiste à prolonger la membrane de western 2 à 3 mn dans la solution de rouge ponceau afin de vérifier l'homogénéité des échantillons de protéines. La préparation de la solution de rouge ponceau est donnée en dessous.
4.	La membrane est incubée dans du lait écrémé 10% (p/v) reconstitué du T-PBS (0.2%, v/v).
5.	La dilution avec l'anticorps primaire est réalisée avec le T-PBS (0.2%, v/v).
6.	La technique utilisée est l'ECL (Enhanced Chemi Luminescence, chimiluminescence amplifiée)

Les membranes peuvent être réutilisées pour plusieurs marquages, à condition d'éliminer l'anticorps secondaire. Cette étape, qui consiste à stripper la membrane, est effectuée selon les instructions du fournisseur comme suit :

- La membrane est lavée dans du T-PBS (0,2 %, v/v) (afin d'éliminer des réactifs de l'ECL) 3x 5 mn ;
- Mise de la membrane dans 10 ml de tampon Restore PLUS (du fournisseur) ;
- Incubation pendant 30 mn sous agitation à 37°C (80 rpm) ;
- Lavage de la membrane dans du T-PBS (0,2 %, v/v) 3x 10 mn (**Kinoshita et al., 2009**).

La membrane est ainsi prête à être mise dans le lait pour blocage avant d'être incubée avec un autre anticorps primaire. La composition des solutions et des tampons ainsi que le principe de la technique ECL sont données :

- **Composition du tampon de migration électro phorétique**

Nu Page MOPS SDS running buffer 20X: 50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7.

- **Composition du tampon de transfert**

- ✓ 25 ml de tampon 10X = 30g of Tris, 144g de glycine, eau milli Q, qsp 1 litre.
- ✓ 125 µl de SDS (20%).
- ✓ 50 ml de Me OH.
- ✓ 250 ml Eau.

- **Préparation de la solution de rouge ponceau**

Peser 1 g de poudre rouge ponceau, 5 ml d'acide acétique, 20 ml d'eau.

- **Détection de la protéine d'intérêt par la méthode ECL**

Principe

L'anticorps secondaire est lié à une enzyme : la peroxydase de raifort (HRP, Horse Radish Peroxidase). La catalyse de la réaction de peroxydation produit un agent luminescent, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéine. Cette technique est considérée comme l'une des méthodes de détection les plus sensibles pour l'analyse des westerns blots (**Veitch, 2004**).

Protocole

Le protocole est réalisé selon les instructions du fournisseur

- ✓ Mélanger extemporanément 250 µl de la solution A avec 250 µl de la solution B ;
- ✓ Déposer le mélange sur la membrane, en prenant soin de bien imbiber la totalité de la membrane avec le mélange ;
- ✓ Incuber 5 mn à l'abri de la lumière ;

- ✓ Détecter le signal avec l'appareil Chemi Smart 5000 system (Vilber Lourmat)

- **Marqueurs de poids moléculaire**

Le kit de marqueurs de poids moléculaires a été utilisé pour tous les westerns blots. 5 μ l de mélange sont déposés dans un des puits du gel d'électrophorèse. **La figure 14** présente les poids moléculaires estimés des protéines du kit.

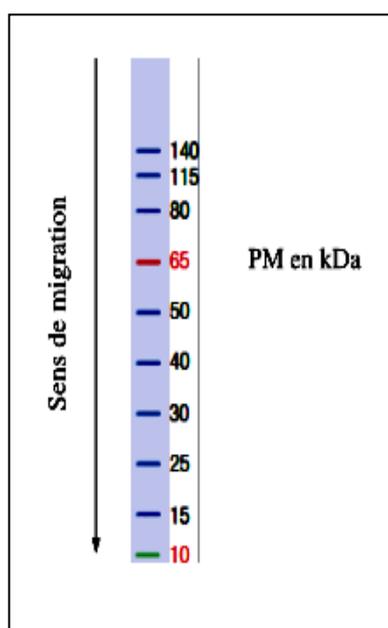


Figure 14 : Profil de migration des marqueurs de poids moléculaires dans un gel à gradient 4-12% (Kinoshita *et al.*, 2009).

I.4. Etude de la Mort Cellulaire Programmée par Double Marquage Annexine V /IP

- **Principe**

L'apoptose est la mort cellulaire qui s'accompagne par de nombreux changements morphologiques, et biochimiques de l'architecture cellulaire. Les cellules apoptotiques présentent un nombre de caractéristiques communs qui comprennent : le rétrécissement cellulaire, détachement cellulaire, la fragmentation de l'ADN, l'activation des Caspases...etc.

Au niveau des cellules vivantes, le phosphatidylsérine est localisé au niveau de la couche interne de la membrane cytoplasmique. À l'amorce de l'apoptose, le phosphatidylsérine est transloqué vers la couche externe de la membrane cytoplasmique, où il sert de molécule marqueur pour les macrophages. Les Annexines, sont des protéines homologues ubiquitaires qui fixent les phospholipides en présence de Ca^{2+} . Cette redistribution du phosphatidylsérine est utilisée comme indicateur d'apoptose. Ainsi, l'annexine V conjuguée à un fluorochrome (le FITC, Fluorescéine IsoThioCyanate par exemple) est utilisée pour détecter les cellules apoptotiques car elle interagit de manière spécifique et forte avec le phosphatidylsérine exposé (**Adolphe et al. 2003**) (**Fig 15**). Les cellules apoptotiques (fixant l'Annexine V) sont ensuite détectées par CMF.

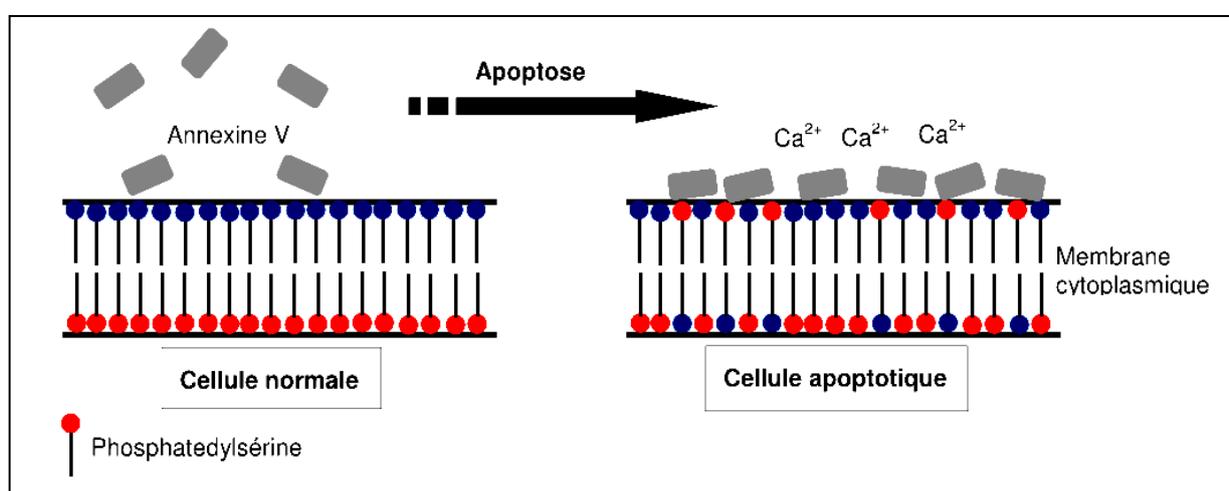


Figure 15 : Schéma illustrant le principe de détection des cellules apoptotiques par fixation à l'Annexine V (**Adolphe et al. 2003**).

- **Protocole**

Pour estimer le pourcentage des cellules apoptotiques, **Parc et ses collaborateurs (2015)** ont utilisé un kit de détection d'apoptose avec un double marquage Annexine V /IP, suivant le protocole illustré sur la **figure 16**.

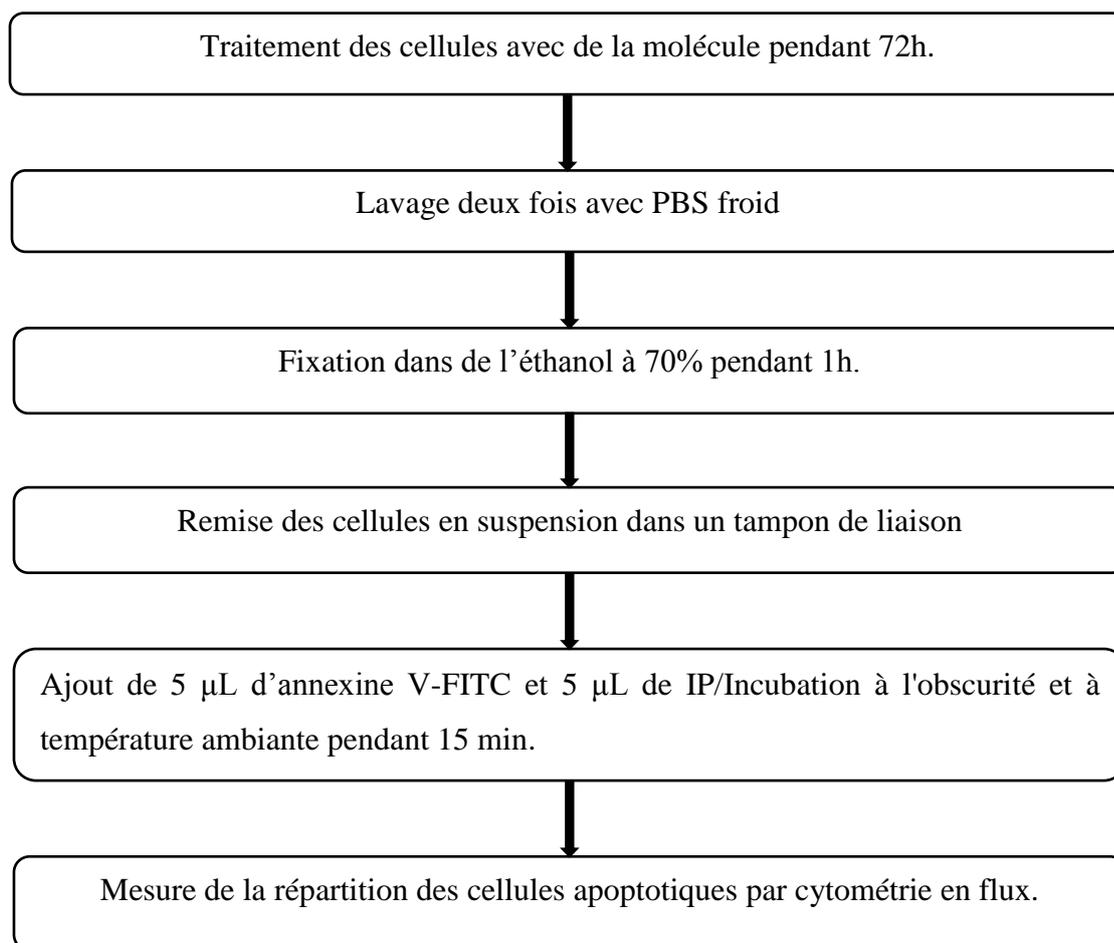


Figure 16 : Protocole du test de l'annexine V et analyse par CMF (Parc *et al.*, 2015).

I.5. Test de Mesure des Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)

▪ Principe

Les ROS ont beaucoup retenu l'attention de la communauté scientifique au cours des dernières années, ils ont été considérés comme des agents cytotoxiques en raison des dommages oxydatifs qu'ils causent à la cellule (Gardes et Bonnefont, 2003).

Ce test permet d'identifier des changements dans l'état oxydatif des cellules cancéreuses, afin d'évaluer le potentiel d'une substance à réduire les défenses antioxydantes des cellules cancéreuses qui présente un effet mortel pour ces dernières (Pelicano *et al.*, 2004). Un agent fluorescent DCFH-DA est utilisé dans le protocole ci-dessous (fig 17) pour quantifier le taux d'espèces intracellulaires réactives de l'oxygène (ROS), cet agent se transforme en DCF (dichlorofluorescéine) hautement fluorescent lors de l'oxydation par les ROS généré dans la cellule, cette fluorescence est proportionnelle à la quantité des ROS (Parc *et al.*, 2015).

- **Protocole**

Le niveau des ROS intracellulaires à été déterminé en mesurant la conversion oxydative de 2',7' DCFH-DA perméable par les cellules en DCF fluorescent. Le protocole est présenté ci-dessous :

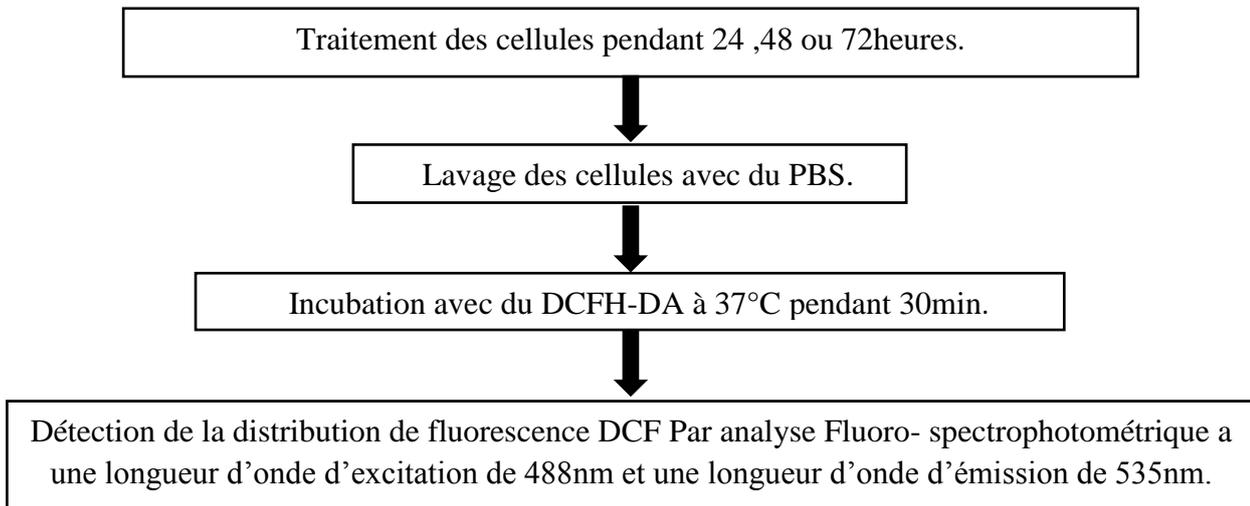


Figure 17 : Protocole de mesure des ROS avec le colorant DCFH-DA (**Parc et al., 2015**).

II. RESULTATS

L'activité anticancéreuse des alcaloïdes isoquinoléiques à savoir la berbérine, la sanguinarine vis-à-vis des lignées cancéreuses du pancréas a été déterminée par plusieurs chercheurs via les différents tests cités précédemment. Les résultats retrouvés expliquent l'aspect moléculaire de l'effet anticancéreux via l'induction de l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, ainsi que l'effet sur les différents facteurs protéiques intervenant dans la régulation.

II.1. Effet Cytotoxique

Taux de croissance après traitement

Pour mieux connaître l'effet que présentent les alcaloïdes isoquinoléiques sur les lignées cellulaires du cancer pancréatique, l'étude de l'effet cytotoxique via une méthode de coloration pourrait répondre à cette dernière.

Le Bleu de Trypan est utilisé comme colorant cellulaire toxique qui pénètre dans la cellule sous conditions. Son exclusion nécessite de l'énergie que seules les cellules vivantes aient capable d'apporter. Les cellules blanchâtres entourées d'un anneau bleu correspondent à la fraction vivante, tandis que celles colorées entièrement en bleu présentent la proportion morte (**Aroussia et al., 2015**).

Afin de déterminer l'effet de la berbérine sur la croissance cellulaire, PANC-1 et MIA-PaCa2 ont été traités avec 1-15 μM de berbérine pendant 72 heures. Comme le montrent les **figures 1 A et B**, le traitement à la berbérine a inhibé la croissance cellulaire de manière dose-dépendante dans les cellules PANC-1 et MIA-PaCa2 (**Parc et al., 2015**). Les IC_{50} ont été déterminés graphiquement :

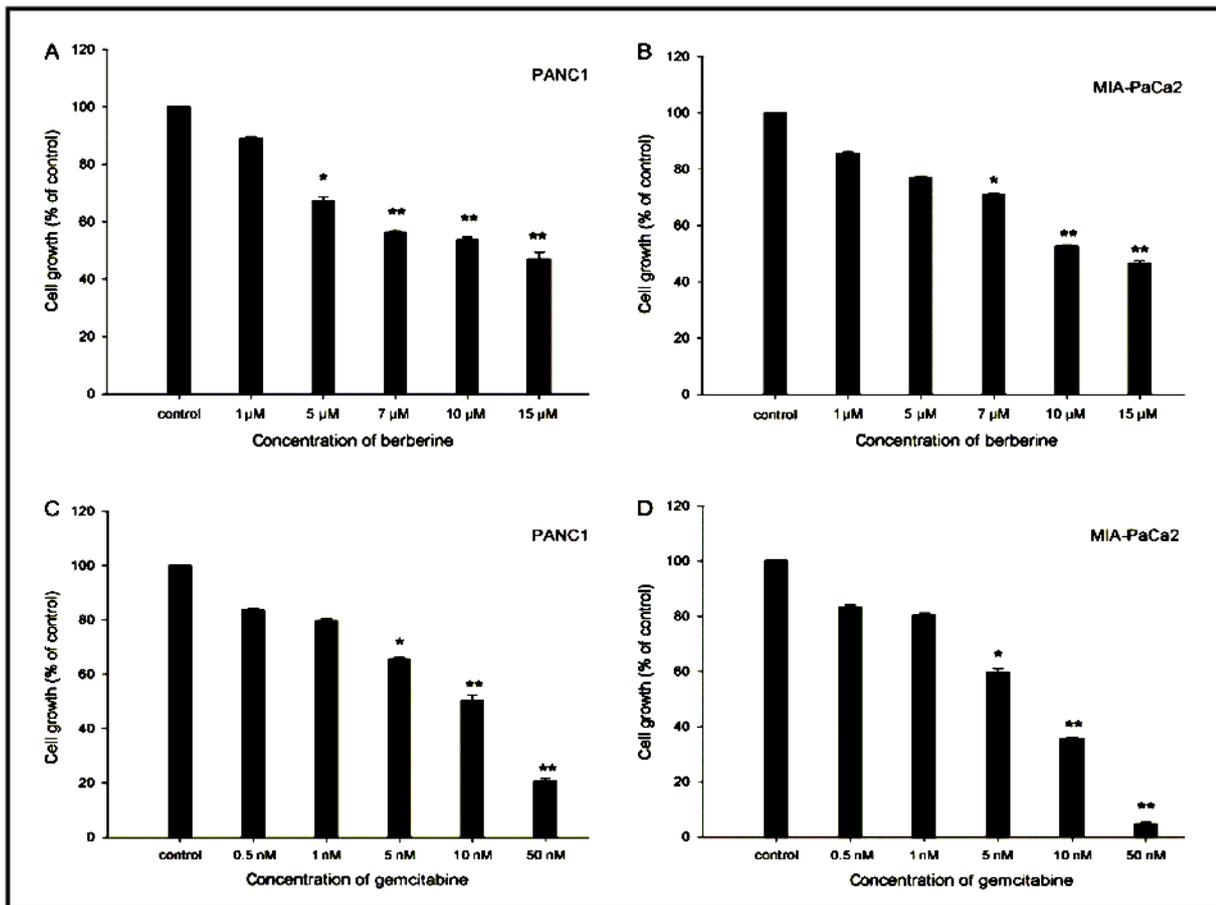


Figure 18 : Taux de croissance cellulaire après traitement de PANC-1(A et C) ou MIA-PaCa2 (B et D) des lignées cellulaire de cancer du pancréas avec de la BBR ou de la Gemcitabine. Les cellules témoins ont été traitées avec de l'eau distillée, de la BBR (A, B : 1, 5, 7,10 ou 15 μM) ou de la Gemcitabine (C, D : 0, 5, 1, 5,10 ou 50 nM) pendant 72h (**Parc et al., 2015**).

Comme indiqué sur **la figure 18**, la berbérine exerce un effet cytotoxique dose dépendant vis-à-vis les deux lignées cancéreuses PANC-1 et MIA-PaCa2.

Le taux de réduction est de 10 à 50% pour la lignée PANC-1 traitée par la gamme de concentration de BBR ; comparant à une réduction allant jusqu'à 80% pour la Gemcitabine. La lignée MIA-PaCa2 semble être plus sensible à la BBR que la lignée précédente. L'étude statistique a montré une significativité des résultats en comparant au contrôle ($*P < 0,05$, $**P < 0,01$) (**Parc et al., 2015**).

Les valeurs de l'IC₅₀ de la BBR étaient d'environ 15 μM et 10 μM pour PANC-1 et MIA-PaCa2 respectivement en comparaison aux IC₅₀ de la Gemcitabine sur les deux lignées PANC-1 et MIA-PaCa2 qui étaient respectivement de 10 nM et 7 nM (**Parc et al., 2015**).

La sanguinarine, un autre alcaloïde isoquinoléiques quaternaire, a également entraîné une diminution significative de la viabilité cellulaire dose-dépendante vis-à-vis les deux lignées cellulaires du cancer de pancréas AsPC1 et BxPC-3 avec les IC₅₀ respectifs de 10µM et 8µM (**Fig 19**) (**Haseeb et al., 2006**).

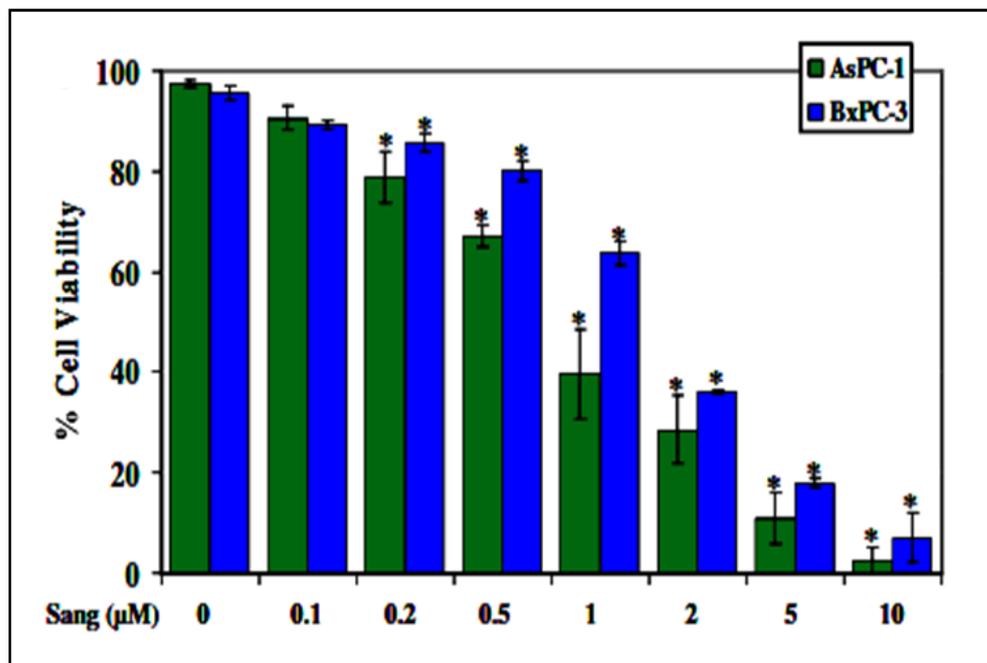


Figure 19: l'effet de la sanguinarine sur la viabilité cellulaire mesuré par l'analyse d'exclusion au bleu de Trypan sur les lignées AsPC-1 et BxPC-3 (**Haseeb et al., 2006**).

II.2. La Distribution des Cellules dans les Phases du Cycle Cellulaire Cytométrie en Flux (CMF)

Pour déterminer si la diminution du nombre de cellule était le résultat d'un arrêt du cycle cellulaire ou d'une apoptose, ou d'une combinaison des deux, **Ming et al. (2014)** ont analysé la teneur en ADN des cellules cancéreuses pancréatiques.

Comme représenté sur la **figure 20**, Les résultats montrent une augmentation de la proportion de cellules en phase G₀/G₁ pour la lignée PANC-1 d'environ 18% par rapport au contrôle (61±2%), parallèlement à cette accumulation nous observons une diminution progressive des cellules en phase S et G₂/M (**Fig 20**) (**Ming et al, 2014**).

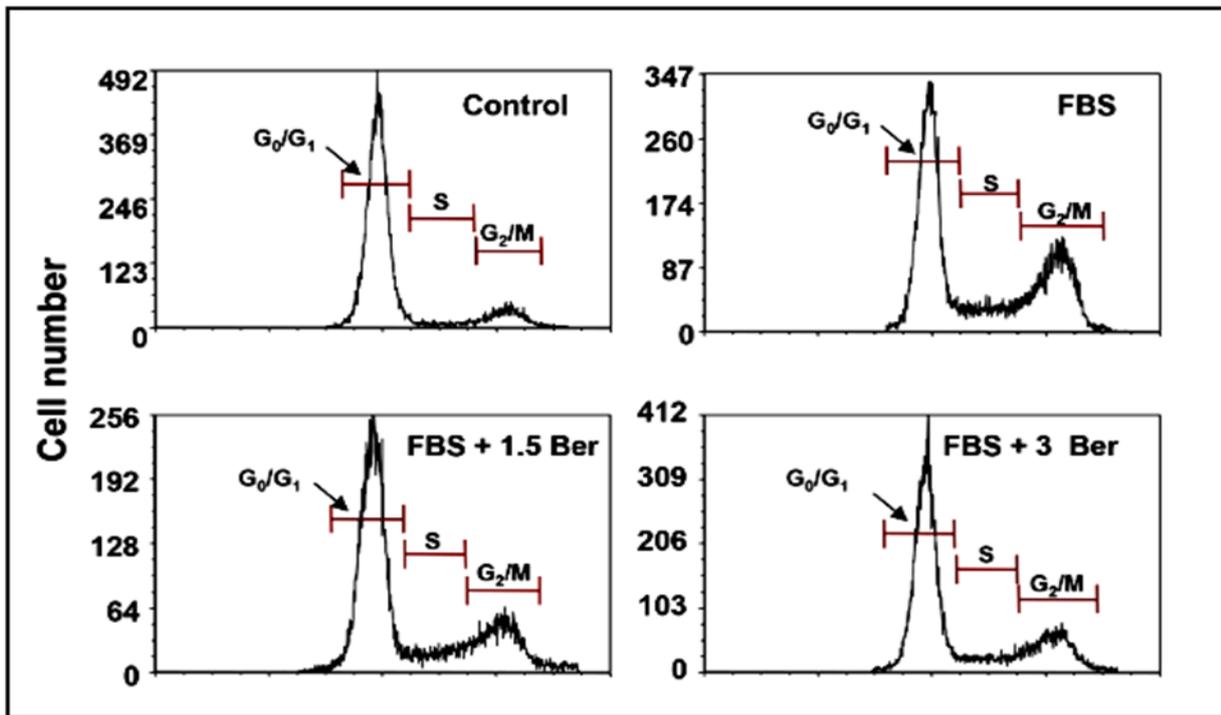


Figure 20 : Analyse du cycle cellulaire par CMF (Ming *et al*, 2014).

Ces données suggèrent que l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses du pancréas PANC-1 par la berbérine est associée à l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Ming *et al*, 2014).

II.3. Effet sur les Protéines Régulatrices du Cycle Cellulaires

Afin de mieux comprendre l'effet de l'arrêt du cycle cellulaire, d'autres études ont été réalisées sur les extraits protéiques des cellules cancéreuses précédentes

L'immunoblot a été analysé à l'aide d'anticorps qui détecte l'état phosphorylé de l'acétylCoA carboxylase (ACC) à Ser⁷⁹. Le traitement des cellules PANC-1 et MiaPaCa-2 avec la BBR a induit une augmentation marquée de la phosphorylation de l'ACC à Ser⁷⁹ de manière dose-dépendante (Ming *et al*, 2014).

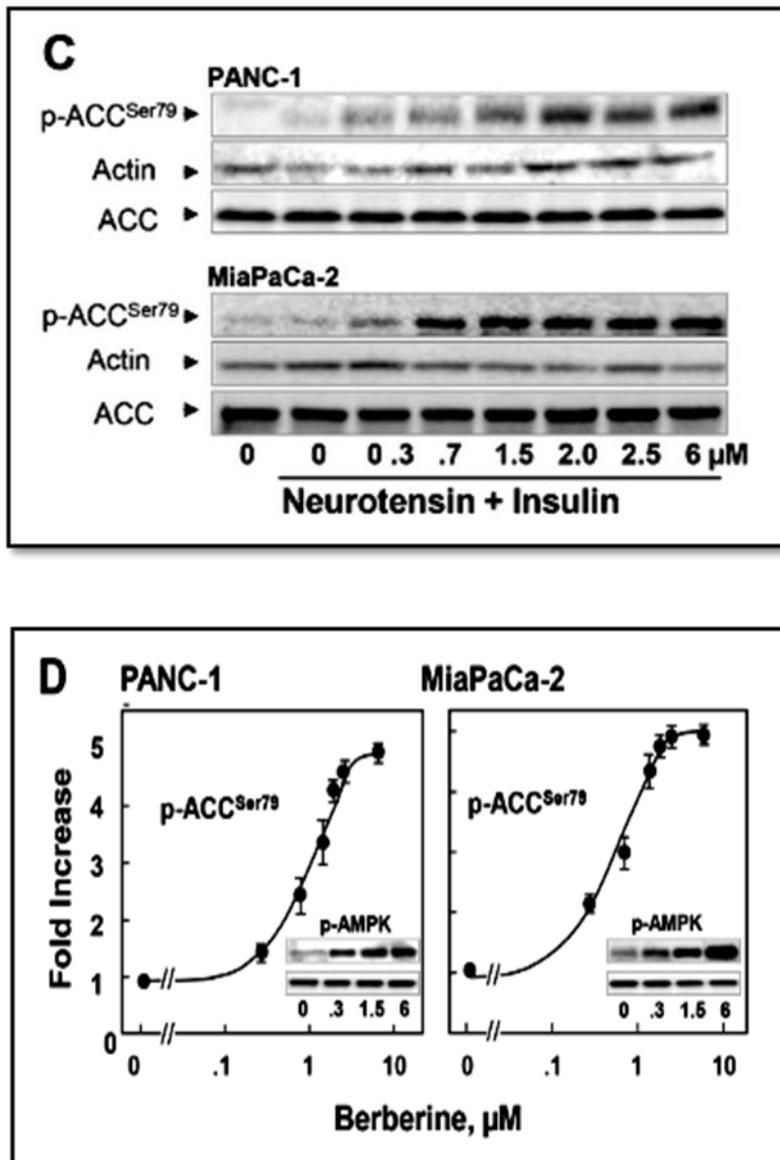


Figure 21 : Détection de l'état phosphorylé de l'ACC et l'AMPK par immunoblot respectivement sur Ser⁷⁹ (Ming *et al*, 2014).

II.4. Apoptose Cellulaire après Traitement (par Cytométrie de flux)

L'apoptose est une mort cellulaire programmée nécessaire à l'homéostasie tissulaire au cours de développement. Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité à échapper à l'apoptose. Restaurer la capacité des cellules tumorales à mourir est une stratégie thérapeutique qui permet de lutter contre le cancer.

Les résultats de ce test sont présentés en mode quadrants ou chaque quadrant caractérise le pourcentage des cellules mortes et vivantes en présence de BBR et en fonction de la concentration

tel qu'il est illustré dans la **figure 22** (Guohong Zhang, 1997). Les pourcentages déterminés sont obtenus à partir 10^4 cellules analysées.

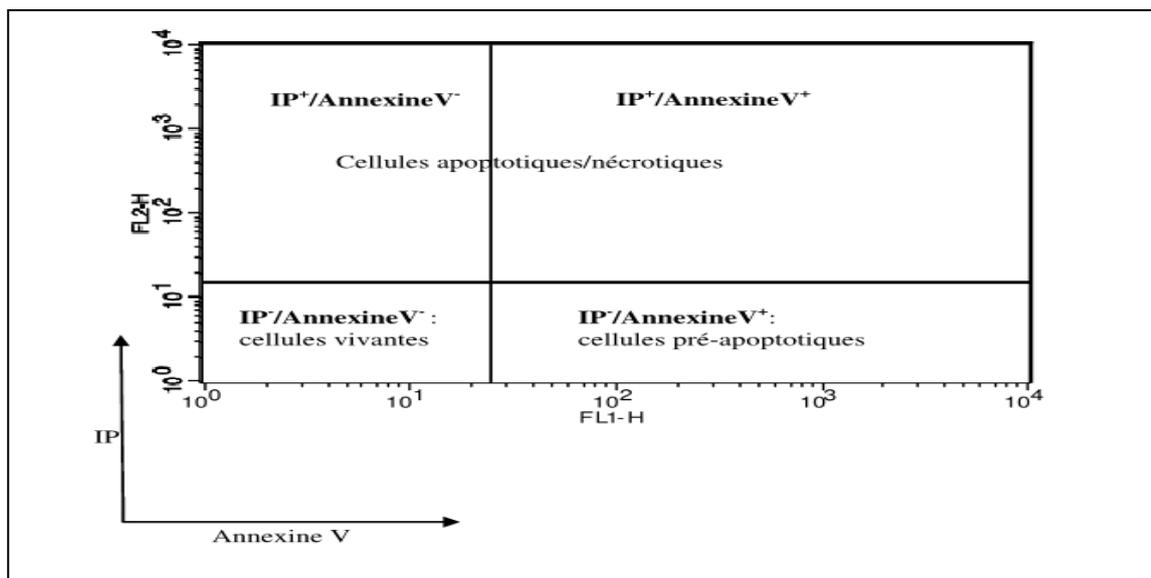


Figure 22 : Représentation en mode quadrant des pourcentages de cellules vivantes et mortes après double marquage IP/Annexine V (Guohong Zhang, 1997).

La **figure 23 A et B** représente le taux d'apoptose dans les deux types de lignées cellulaires PANC-1 et MIA-PaCa2 respectivement après un traitement à la BBR pendant 72h.

La Gemcitabine est utilisé dans les mêmes conditions pour les deux lignées cellulaires comme témoin de comparaisant de l'amplitude de l'effet positif (Parc *et al.*, 2015).

La **figure 23A**, montre une différence dans le comportement des cellules notamment la lignée PANC-1. En effet, les pourcentages suggèrent une diminution remarquable des cellules vivantes d'environ 15% par rapport au contrôle, induisant un déplacement vers les parties IP+ correspondant aux cellules apoptotiques/nécrotiques, avec une transition dominante par le quadrant IP- /Annexine V+ (cellules apoptotiques) (Parc *et al.*, 2015).

Dans le cas de lignée MIA-PaCa2, une diminution de 21% des cellules vivantes par rapport au contrôle (**Fig 23B**) avec un taux peu significatif des cellules apoptotiques ($5,7 \pm 0,3\%$ cellules apoptotiques par rapport a $2,8 \pm 1,1\%$ contrôle) (Parc *et al.*, 2015).

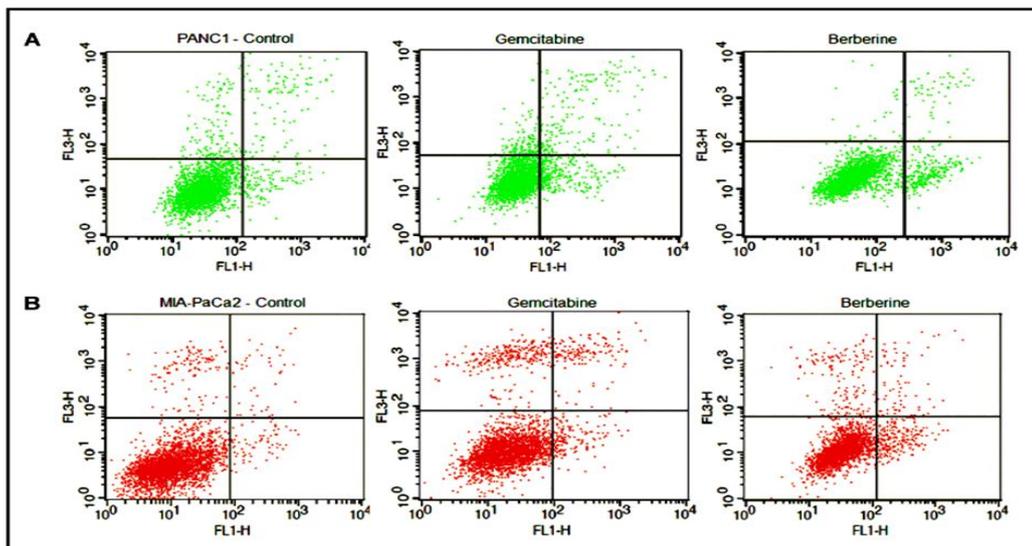


Figure 23 : Analyse de l'apoptose cellulaire par CMF (Parc *et al.*, 2015). **A** : les cellules PANC-1
B : les cellules MIA-PaCa2.

Les résultats en quadrants ont été interprétés sur la **figure 24** en représentation graphique en histogramme des proportions apoptotiques pour les deux lignées, traitées séparément par la BBR et la Gemcitabine. Sur la lignée cellulaire PANC-1 la BBR semble être plus efficace en déclenchant leur mort par apoptose que la molécule de référence la Gemcitabine (**Fig 24 C**), tandis qu'avec la lignée MIA-PaCa2, la molécule de référence reste meilleure (**Fig 24 D**) (Parc *et al.*, 2015).

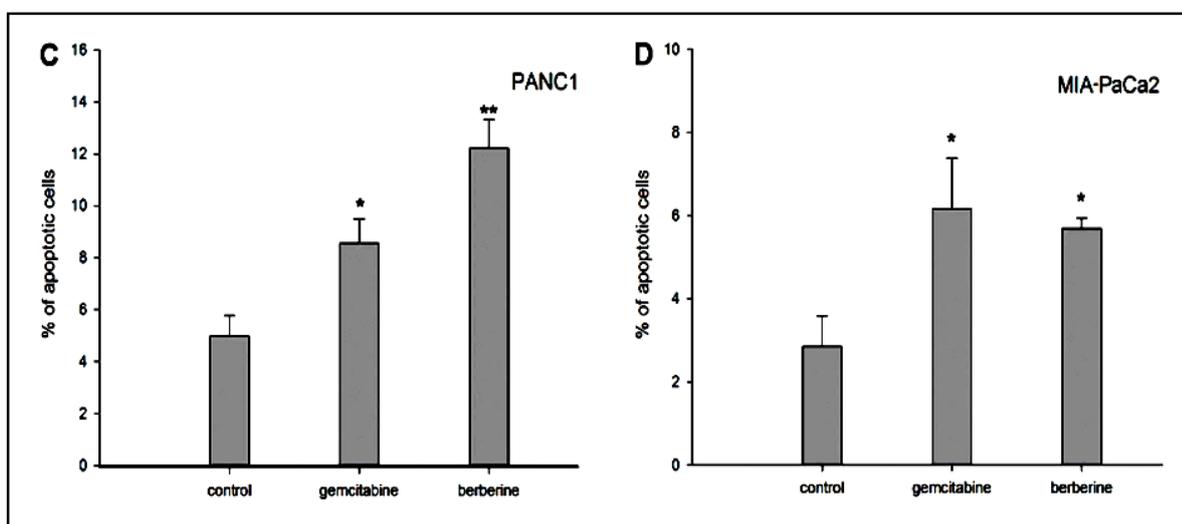


Figure 24 : Représentation graphique en histogramme de l'analyse de l'apoptose cellulaire par CMF. **C** : les cellules PANC-1. **D** : les cellules MIA-PaCa2 (Parc *et al.*, 2015).

Ces résultats ont montré que la BBR induisait la mort cellulaire par apoptose dans les deux lignées cellulaires cancéreuses du pancréas.

De même, un autre alcaloïde iso quinoléique quaternaire « **la sanguinarine** » a été évoqué ici par plusieurs auteurs pour son effet apoptotique vis-à-vis les lignées cellulaires cancéreuse AsPC-1 et BxPC-3(Haseeb *et al.*, 2006).

Haseeb et ces collaborateurs (2006) ont déterminé si la diminution observée de la viabilité cellulaire était méditée par une mort apoptotique des cellules AsPC-1 et BxPC-3.A en présence de la sanguinarine.

Comme le montre la **figure 25**, la sanguinarine a induit significativement l'apoptose des deux lignées cellulaires cancéreuses précédentes, de manière dose-dépendante. L'induction de l'apoptose était intéressante même à une faible concentration en sanguinarine (200nM) (**Haseeb et al.**, 2006).

La concentration la plus faible (100nM) n'avait aucun effet mesurable pour la viabilité cellulaire ou l'apoptose alors que la concentration la plus élevée (10µM) a tué environ 90% des cellules cancéreuses (**Haseeb et al.**, 2006).

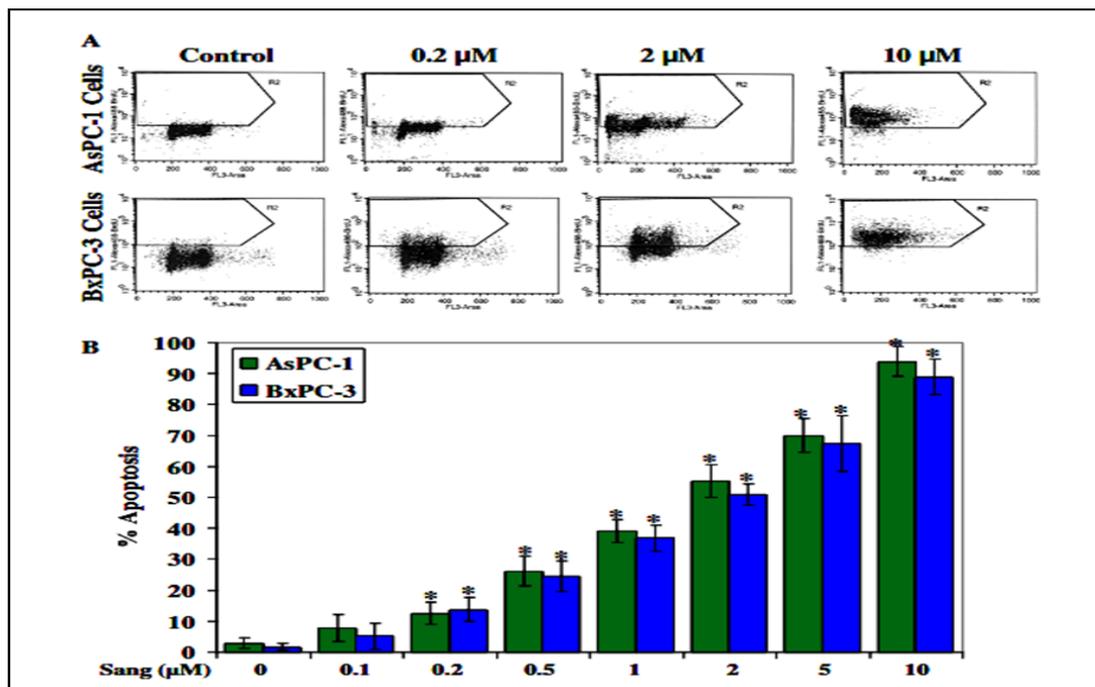


Figure 25 : Analyse de l'apoptose par CMF induit par la sanguinarine sur les deux lignées cellulaire AsPC-1 et BxPC-3 (**Haseeb et al.**, 2006).

Afin d'étudier les événements apoptotiques mitochondriaux impliqués dans l'apoptose induite par la sanguinarine, les niveaux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et des protéines pro-apoptotiques Bax ont été montrés sur la **figure 26** (**Haseeb et al.**, 2006).

La sanguinarine entraîne une réduction marquée, au niveau des lignées cellulaires AsPC-1 et BxPC-3 de l'expression de Bcl-2, cette baisse était concomitante avec l'augmentation des taux de Bax. Ces résultats suggèrent que la sanguinarine modifie les niveaux des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques d'une manière à contribuer à la sensibilité des cellules AsPC-1 et BxPC-3 vers l'apoptose (Haseeb *et al.*, 2006).

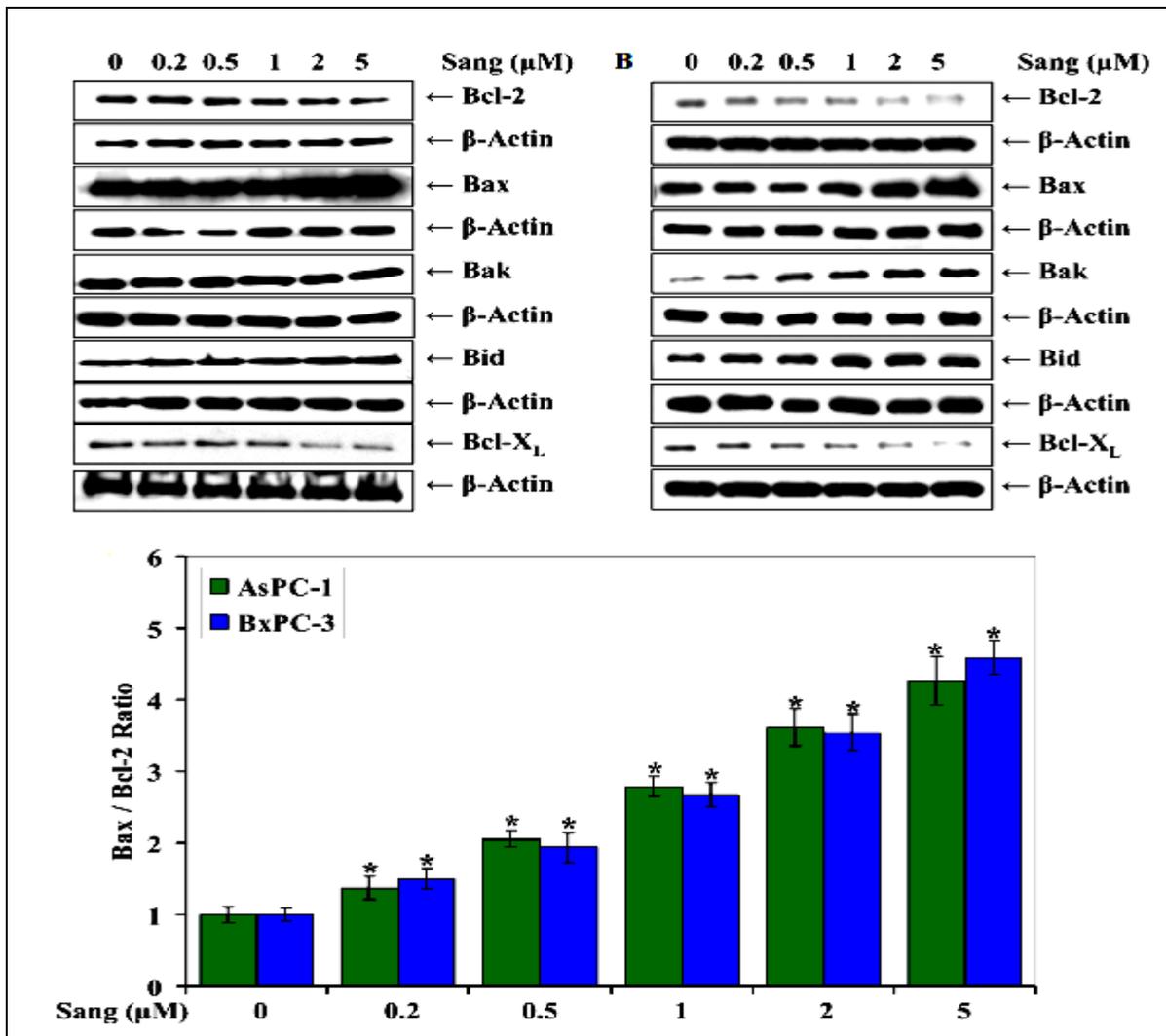


Figure 26 : Analyse par western blot des niveaux des protéines Bcl-2,Bax,Bak,Bid et Bcl-XL dans les cellules AsPC-1 et BxPC-3 après traitement a la sanguinarine (Haseeb *et al.*, 2006).

II.5. Niveaux de ROS Intracellulaires après le Traitement

Il est largement admis que les ROS jouent des rôles opposés dans la croissance tumorale, les métastases et l'apoptose en fonctions de leurs distributions et concentrations. Ces rôles à double tranchant dans la progression du cancer comprennent la transformation maligne des ROS et la mort cellulaire induite par le stress oxydatif.

Parc et ses collaborateurs (2015) ont déterminé l'effet de la génération des ROS induite par la berbérine ou la Gemcitabine dans les cellules PANC-1 et MIA-PaCa2.

Le traitement des cellules PANC-1 par 10nM de Gemcitabine ou 10µM de berbérine pendant 72heures, permet l'augmentation de la production des ROS comparant aux cellules non traitées (contrôle) (**Fig 27**) (**Parc et al.,2015**).

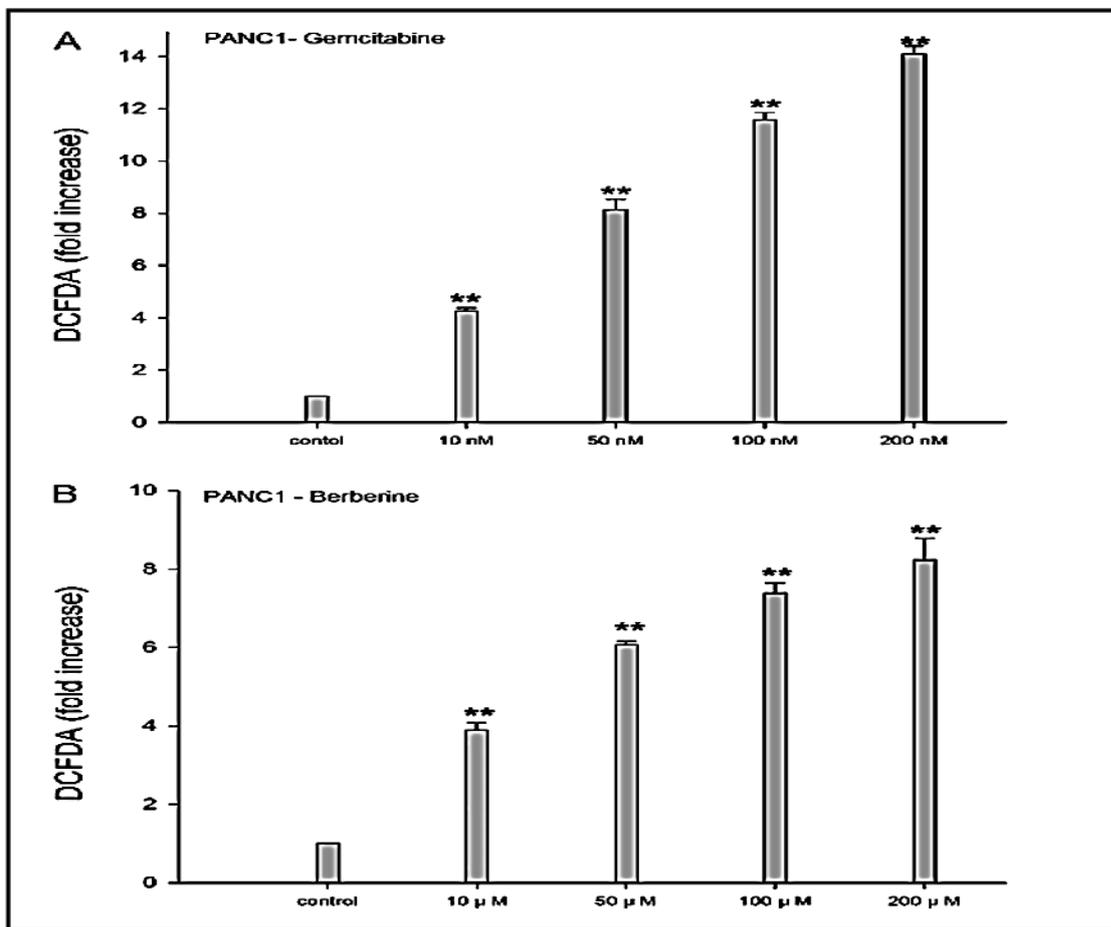


Figure 27 : Niveaux d'espèces réactives oxygénées intracellulaires (ROS) après 72h de traitement à la BBR (B) Et Gemcitabine (A), les données sont rapportées sous forme d'activités moyennes \pm SD ($n \geq 3$) par rapport au contrôle. DCFH-DA 2',7'-diacétate de dichlorofluorescéine. ** $P < 0,01$ par rapport au contrôle (test Student) (**Parc et al.,2015**).

Il est de même pour la lignée cellulaire cancéreuse MIA-PaCa2, la présence d'une concentration de 10 μ M et de 10 nM de BBR et Gemcitabine respectivement, 72h après permet une surproduction des ROS par rapport au contrôle (**Fig27**) (**Parc et al., 2015**). Cette augmentation reste inférieure dans le cas de cette lignée comparant aux cellules de la lignée PANC-1 ce qui laisse dire encore une fois, que la BBR est plus efficace sur la lignée PANC-1 par rapport à la lignée MIA-PaCa2 (**Parc et al., 2015**).

Il est important aussi de noter que la réponse est temps-dose dépendante dans les deux cas des lignées cellulaires étant en exposition avec la BBR comme la Gemcitabine (**Parc et al., 2015**).

III. DISCUSSION GENERALE

i) Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires ayant un pouvoir puissant en pharmacologie, et peuvent présenter un effet anticancéreux.

La Berbérine comme la Sanguinarine sont des alcaloïdes isoquinoléiques quaternaires produits par certain familles de plantes comme les Papaveraceae, Fumariaceae,... dotés de plusieurs activités biologiques comme pharmacologiques (**Paltinean et al., 2013**).

Le dépistage à grande échelle des effets des médicaments sur le destin des cellules en culture cellulaire est une première étape importante dans l'évaluation de leur efficacité potentielle dans l'application clinique (**Barlovatz-meimon et al., 2003**).

La cytotoxicité est une caractéristique clé prise en considération lors du développement des médicaments anticancéreux, son évaluation se repose sur plusieurs tests comme : test MTT, test d'exclusion par bleu de trypan...

Le test MTT constitue l'un des principaux tests permettant de déterminer le pouvoir cytotoxique d'une molécule ou d'un extrait contenant plusieurs molécules. Le MTT est un sel de tétrazolium qui est réduit en formazan, de couleur pourpre, essentiellement par la succinate-déshydrogénase mitochondriale. L'intensité de la couleur produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Cependant, certains composés phytochimiques peuvent moduler l'activité de la succinate-déshydrogénase ou interagissent directement avec le MTT et par conséquent peut sous-estimer le potentiel cytotoxique de ce composé. Aussi des cellules collées peuvent être considérées comme une intensité et par conséquent une seule cellule comparant à d'autres techniques moins rapides certes et plus fatiguant mais beaucoup plus fiables comme le test d'exclusion au BT qui permet à la fois d'estimer le taux de viabilité comme de mortalité (**Aroussia et al., 2015**).

Le Bleu de Trypan est un colorant d'exclusion utilisé pour colorer sélectivement les cellules mortes ayant perdu la sélectivité membranaire, ici employé par certains chercheurs pour évaluer l'effet antiprolifératif de la **Berbérine** et la **Sanguinarine**. Il est important de signaler que sont peu les études qui ont exploré l'effet anti-tumoral des alcaloïdes isoquinoléines *in-vitro*. Les deux alcaloïdes précédents ont fait l'objet d'une étude pour déterminer leur effet antiprolifératif vis-à-vis les lignées cellulaires du cancer pancréatique (PANC-1, MIA-PaCa2, ASPC-1 et BxPc-3) (**Casey et al., 2008**).

Le traitement des lignées cancéreuse PANC-1 et MIA-PaCa2 avec la berbérine a inhibé leur croissance cellulaire de manière dose-dépendante via la réduction de la viabilité cellulaire avec des IC_{50} respectifs de **15 μ M** et **10 μ M** (**Parc et al., 2015**).

Parallèlement la Gemcitabine, un anticancéreux de synthèse utilisé en chimiothérapie mais présentant une multitude d'effets secondaires, a également inhibé la croissance cellulaire de manière dose-dépendante des lignées PANC-1 et MIA-PaCa2e avec des IC_{50} de **10nM** et **7nM** respectivement (**Casey et al., 2008**).

La Sanguinarine en comparant avec les résultats de la Gemcitabine, a également entraîné une diminution significative du nombre de cellules viables dépendant de la concentration avec des IC_{50} respectives de **10 μ M**, **8 μ M** pour les lignées ASPC-1 et BxPc-3 (**Haseeb et al., 2006**).

Des résultats obtenus, on remarque une sélectivité de réponse d'une lignée à l'autre qui peut être due à la sensibilité de la lignée cellulaire vis-à-vis de la molécule (BBR et sanguinarine) ou à une réponse spécifique d'un tissu (**Bandana et al., 2012**).

De nombreuses études précédentes ont montré que des extraits provenant de solvants organiques tels que le chloroforme sont plus actifs que la fraction aqueuse (**Jin-Jan et al., 2012**). Ceci indique probablement que les principes actifs non-polaires, qui peuvent contenir des cycles aromatiques ou des groupes organiques, tels que l'azote, sont responsables de l'activité antiproliférative (**Rozenblum et al., 1997**).

En thérapeutique traditionnelle, l'utilisation de l'eau comme phase extractive des principes actifs est très récurrente. Cependant, cette pratique s'accompagne toujours de l'emploi d'une température élevée (infusion, distillation et décoction). Encore une fois on peut conclure que les substances à caractère alcalin comme la berbérine et la sanguinaire présentent une forte hydrophobicité par la présence de cet azote cyclique ce qui donne une meilleurs biodisponibilité qui résulte d'une bonne diffusion membranaire (**Lu et al., 2012**).

ii) Afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de la prolifération sur la répartition des cellules pancréatiques cancéreuses dans les différentes phases du cycle cellulaire, **Casey et al. (2008)** ont analysé le contenu d'ADN des cellules.

La cytométrie de flux (CMF) est définie comme l'étude de cellules isolées entraînées par un flux liquide (**Jacobberger et al., 2011**). La méthode est basée sur la capacité à diviser le cycle cellulaire en trois phases selon la teneur en ADN des cellules au cours de ces phases: G0/G1 (2n),

phase d'activation des cellules, S (2n à 4n), phase de synthèse de l'ADN, G2/M (4n) phase de mitose (Grunwald *et al.*, 2010).

Généralement, l'Iodure de Propidium (IP) est utilisé comme traceur (fluorochrome), cet agent intercalant se fixe à l'ADN et l'ARN double-brin, d'où la nécessité d'ajouter de la RNase avant analyse (Adolphe *et al.* 2003). Les cellules étant analysées individuellement, l'intensité de chaque fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans la cellule. Toutefois la CMF ne permet pas de distinction entre les phases G0 (phase quiescente) et G1 (phase de préparation à la synthèse d'ADN) ainsi qu'entre les phases G2 (préparation à la mitose) et M (mitose) (Grunwald *et al.*, 2010).

Ainsi, l'histogramme d'ADN pour une lignée cellulaire donnée est caractérisé par deux pics séparés par un espace (Fig 28). Le premier pic, qui est généralement plus important (en termes de surface), représente les cellules en phase G0/G1 (2n) et le second pic représente les cellules en phase G2/M (4n) car il possède une intensité de fluorescence deux fois supérieure à celle du premier pic. Les cellules entre les deux pics correspondent aux cellules en phase S (Meijer, 2006).

La méthode détecte également les cellules à quantité d'ADN inférieure à 2n (sous-G1), celles-ci correspondent à des cellules mortes (apoptotiques) ou à des débris cellulaires. Enfin, les cellules à contenu supérieur à 4n sont détectées en fin de diagramme (cellules polyploïdes). Généralement ce sont les cellules cancéreuses qui présentent ce type d'aberration génétique (Meijer, 2006).

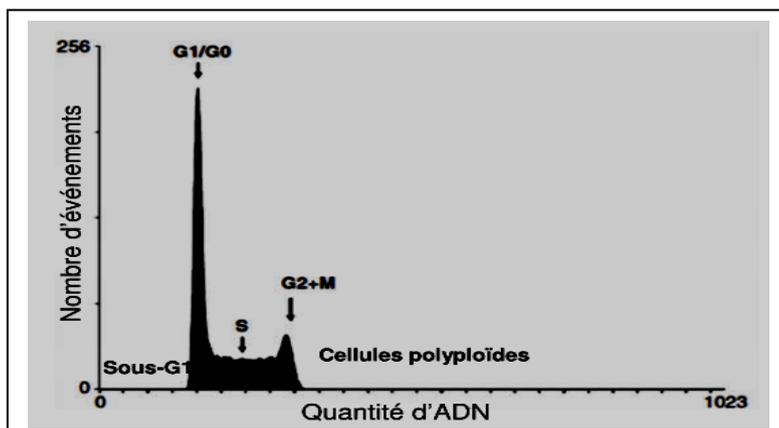


Figure 28 : Représentation de l'histogramme d'ADN après marquage à l'IP

L'axe des x : représente la quantité d'ADN et l'axe des y représente le nombre d'événements (cellules) (Krueger et Wilson, 2011).

La cycline D 1 appartient à une famille de protéines kinases qui ont été impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Des études sur la caractérisation de l'expression de la cycline D1 dans 6 lignées cellulaires de cancer du pancréas humain cultivées et dans des tissus pancréatiques

humains normaux et cancéreux ont montré qu'un transcrite d'ARNm de cycline D1 était présent dans toutes les lignées cellulaires et dans tous les tissus pancréatiques. Les niveaux d'ARNm de cycline D1 étaient 2,1 fois plus élevés dans les cancers du pancréas que dans les tissus pancréatiques normaux ($p < 0,0002$) (**Mantena et al.,2006**).Les patients cancéreux avec des niveaux de cycline D1 inférieurs ($n = 16$) avaient une survie médiane de 15,5 mois tandis que les patients avec des niveaux plus élevés ($n = 16$) avaient une survie médiane de 6,5 mois ($p < 0,007$). Ces données indiquent que l'expression de la cycline D1 peut servir de prédicateur de la survie postopératoire chez les patients atteints de cancer du pancréas, et soulèvent la possibilité que les modalités de traitement bloquant l'activité de la cycline D1 puissent avoir un rôle futur dans la thérapie de ces patients (**Guo et al., 2015**).

De nombreuses études ont montré l'effet inhibiteur des alcaloïdes isoquinoléiques parmi la Berbérine vis-à-vis l'expression de la Cycline D1 sur différents types de cancer (**Bougoffa-Sadaoui et al., 2016 ;Yon-Xian et al.,2016**). Selon les résultats ici cités, qui révèlent l'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses du pancréas par la berbérine via l'arrêt du cycle cellulaire en phase **G0/G1** semble être du à l'inhibition de la **cycline D1** qui engendre une inhibition de la cascade des réactions de phosphorylations via l'inhibition de transmission des signaux de division cellulaire(**Mantena et al.,2006**).

La formation des tumeurs pourrait être liée à une mutation de certains enzymes de type kinase ou à des défauts de signalisation dans les voies impliquant le complexe TSC /mTOR ou la protéine p53 qui sont connu pour être contrôlés par l'AMPK et que son activation exerce une fonction de point de contrôle métabolique qui permet l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses (**Gowans et al., 2013**).

Des études mécanistiques ont révélé que la berbérine induisait une puissante activation de l'AMPK, comme le montre la phosphorylation d'acétylCoA carboxylase à Ser⁷⁹(**Ming et al, 2014**).

Les cyclines D1 /D3 et CDK2/ 4/6, agissent comme des régulateurs clés du point de contrôle G1-S et ses régulateurs dépendent de PAK4, un type de sérine/thréonine kinase qui favorise la survie cellulaire et inhibe l'adhérence cellulaire, est considéré comme un régulateur dans la signalisation des cellules cancéreuses (**He et al.,2012**).

Selon ces différents résultats, la berbérine et la sanguinarine peuvent améliorer le pronostic des tumeurs cancéreuses du pancréas par inhibition de la cycline D1 et donc pourront être de futures anticancéreux (**Ming et al, 2014**).

iii) il est admis que les cellules cancéreuses montrent une résistance à l'apoptose. Réintroduire une signalisation cellulaire efficace pour induire l'apoptose offre une stratégie prometteuse pour une thérapie ciblée anticancéreuse. Plusieurs études montrent que l'inhibition de gènes anti-apoptotiques dans le cancer du pancréas ont été menées et ont montrées des résultats encourageants (**Redza-Dutordoir et Averill,2016**).

Les effets de la BBR et la sanguinarine sur l'induction de l'apoptose des cellules PANC-1, MIA-PaCa2, AsPC-1 et BxPC-3 ont été déterminées, et les résultats montrent une induction apoptotique (**Haseeb et al., 2006 et Parc et al., 2015**).

La mort cellulaire apoptotiques est déclenchée à travers les récepteurs de la mort (TNFR, Fas) ou la voie mitochondriale. Les deux voies entraîne l'activation des Caspases et le clivage des protéines intracellulaires (**Green et Llambi,2015**).

La production des ROS peut également induire la mort cellulaire comme l'apoptose en provoquant des dommages à l'ADN ou en régulant différentes voies de signalisation et différents facteurs de transcription qui sont impliqués dans ces processus, y' compris la phospho-inositide 3-kinase (PI3K)/Akt et le gène suppresseur de tumeur p53. Ainsi une variété d'agents est utile, tant qu'ils peuvent induire l'apoptose via des voies dépendantes ou indépendantes de la Caspase (**Redza-Dutordoir et Averill, 2016**).

La BBR à induit l'apoptose des cellules PANC-1 et MIA-PaCa2 via l'augmentation du niveau de production des ROS intracellulaires de manière dose dépendante (**Parc et al., 2015**). Cela peut s'expliquer par le fait que la surproduction des ROS provoque un stress oxydatif qui nuit aux structures cellulaires et peut activer des processus de mort cellulaire. L'induction des ROS par le GEM est considérée comme l'un des mécanismes de son activité anti tumorale (**Shen et al.,2016**). Notamment, les traitements par GEM ont augmenté le niveau des ROS intracellulaires dans les cellules pancréatiques MIA PaCa-2 et PANC-1(**Mercedes et al.,2021**).

Une augmentation des ROS intracellulaires observée dans les cellules MIA PaCa-2 et PANC-1 suggère que la BBR induit une cytotoxicité via un mécanisme médié par les ROS dans ces lignées cellulaires. D'autres études cliniques ont montré que la chimiothérapie prolongée réduit les ROS cellulaires globaux ce qui peut être un obstacle qui freine l'effet de la molécule (**Bhardwaj et al., 2020**). Pour ces raisons, afin d'éviter la chimiorésistance, l'utilisation de composés capables de surmonter les mécanismes antioxydants et de promouvoir des niveaux élevés de ROS représente une stratégie thérapeutique prometteuse pour induire la mort des cellules cancéreuses et inhiber la

progression du cancer (**Dong et al., 2013**). On peut dire que les alcaloïdes isoquinoléiques à savoir la berbérine ou la sanguinarine peuvent être utilisés comme agoniste en chimiothérapies.

D'autres résultats ont montré que la sanguinarine a induit la mort cellulaire par « apoptose », via l'augmentation d'expression des niveaux des protéines pro-apoptotiques Bax en même temps d'une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (**Haseeb et al., 2006**).

Des études ont montré que chaque type de cellule est protégé par au moins un membre de l'anti-apoptotique de type Bcl-2. Dans les cellules du carcinome pancréatique, Bcl-XL joue le rôle le plus important dans la protection contre de l'apoptose médiée par Fas et TRAIL et se trouve constitutivement surexprimée dans les lignées de cellules cancéreuses pancréatiques hautement résistantes à l'apoptose (**Kim et Joh, 2013**). Par conséquent, on pense donc que Bcl-XL peut être une cible idéale pour une thérapie contre le cancer du pancréas.

En effet, sous l'influence de différents stimuli intracellulaires, les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak s'oligomérisent, s'insèrent à la membrane mitochondriale pour former le pore de perméabilité transitoire (PTP). L'ouverture du PTP conduit à la libération dans le cytoplasme du cytochrome c qui active les voies apoptotiques (**Kroemer & Reed, 2000**).

Le cytochrome C libéré va s'associer avec la protéine Apaf-1 et la procaspase-9 pour former un complexe protéique appelé apoptosome au sein duquel la procaspase-9 va être activée par clivage protéolytique. La caspase-9 va ensuite à son tour activer par clivage les Caspases effectrices 3 et 7 qui sont à l'origine des dommages cellulaires conduisant à la mort par apoptose (**Riedl et Shi, 2004**).

L'un des déterminants moléculaires régulant la réponse des cellules cancéreuses du pancréas à la chimiothérapie et aux rayonnements ionisants est la protéine suppresseur de tumeur p53, qui sert de composante essentielle de la ou des voies de l'apoptose (**Y.Nio et al., 2001**).

Les lignées cellulaires PANC-1 et MIA-PaCa2 possèdent des mutations dans p53, nous émettons l'hypothèse que le traitement à la BBR entraînerait une diminution de p53 et une augmentation de sa phosphorylation à la sérine-15 dans les deux lignées cellulaires examinées (**Haseeb et al., 2006**).

Des études ont montré que le mutant p53 peut être phosphorylé sur différents sites *in-vitro* et *in-vivo* et la phosphorylation de la sérine-15 ou sérine-315 tend à restaurer la fonction de type sauvage de la protéine mutée. Ainsi, la régulation positive de la phosphorylation de la p53 suggère

que la BBR, en fait, peut être capable de restaurer la fonction de type sauvage de p53. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour établir cette suggestion (**L.F.Zerbini *et al.*,2005**).



Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

On désigne par cancer plus d'une centaine de maladie, la quasi-totalité des tissus de l'organisme pouvant être atteints. Chaque cancer présente des caractéristiques qui lui sont propre mais les mécanismes qui engendrent ces tumeurs sont communs. Il s'agit d'une maladie génétique acquise due à la prolifération anarchique, au sein d'un tissu, de cellules ignorant les signaux de mort cellulaire et n'obéissant qu'à leur programme de réplication.

Les alcaloïdes constituent un groupe à grande spécificité et efficacité dirigée contre plusieurs types de cancer métastatiques chimio-résistants, de ce fait l'action de ces derniers a été l'objet de notre étude bibliographique sur le cancer du pancréas, en particulier les lignées cellulaires épithéliales et mésenchymateuses « **PANC-1** » et « **Mia-PaCa2** », les plus utilisées pour l'étude du cancer pancréatique (**Base de données ATCC**).

Par ailleurs, la suite de l'étude sait focaliser sur deux alcaloïdes iso quinoléiques qui sont la « **Sanguinarine** » (**Haseeb et al., 2006**) et la « **Berbérine** ». Pour étudier leurs effets anticancéreux vis-à-vis des deux lignées cancéreuses précédentes (**Parc et al., 2015**).

A partir des résultats du chapitre précédent on conclue que, **la Berbérine** présente une cytotoxicité envers les cellules «**Mia-PaCa2**» plus importante comparé à l'effet cytotoxique observé vis-à-vis la lignée cancéreuse «**PANC-1**». Il est de même pour **la Sanguinarine** qui semblait être plus efficace sur la lignée «**BxPC-3** » que sur la lignée «**AsPC1** ».

La Gemcitabine, anticancéreux de référence, reste plus efficace sur le plan thérapeutique avec des IC_{50} plus faible que les deux alcaloïdes précédents vis-à-vis les mêmes lignées cancéreuses, sauf que son profile toxique est assez gênant (**Parc et al., 2015**).

L'analyse de ces cellules par Cytométrie en flux, a montré l'effet de ces molécules sur le cycle cellulaire, et cela par l'augmentation de la fraction de population en phase **G0/G1** ce qui a suggéré l'empêchement ou le ralentissement de la transition **G1/S** au niveau des lignées cellulaires citées précédemment (**Ming et al, 2014**).

L'analyse par western blot, de certains marqueurs du cycle a révélé, une réduction des taux de **cycline D1**, en présence des alcaloïdes isoquinilés. Cette réduction peut expliquer l'arrêt du cycle cellulaire en phase **G1**. De plus, il est connu que les cellules de cancer du pancréas, comme d'autres cancers, sur-expriment la **cycline D1**, leur conférant ainsi un mauvais pronostic. L'action

des alcaloïdes isoquinoléiques sur la **cycline D1** confirme ses effets prometteurs (**Bougoffa-sadaoui et al. ,2016**).

De plus, le suivi de la mort cellulaire induite éventuellement par ces molécules a été effectué par réalisation d'un double marquage à l'**IP** et **Annexine V**. les résultats ont démontré des comportements différents au niveau des deux lignées cancéreuses testées. Ainsi une population pré-apoptotique était présente dans le cas de la lignée « **PANC-1**» tandis qu'un taux peu significatif des cellules apoptotiques dans la lignée « **Mia-PaCa2**» a été observé (**Guohong Zhang, 1997**).

De tous les résultats collectés lors de notre recherche bibliographique, on peut dire que les alcaloïdes isoquinoléiques ici présenté par la **Berbérine** et la **Sanguinarine**, avec leur effet anticancéreux assez puissant à différents niveaux à savoir sur la viabilité ainsi que la mortalité des lignées cellulaires du cancer pancréatique, « **PANC-1, Mia-Paca2, BxPC-3** et **AsPC1** », sont des candidats anticancéreux assez intéressants

Néanmoins, l'obtention de la **AMM** (**A**utorisation de **M**ise sur **M**arché) nécessite encore de franchir d'autres étapes sur le plan préclinique avant de passer au clinique. Il est important aussi d'établir certains paramètres pharmacologiques à savoir les études pharmacocinétique, pharmaceutique et autres.



Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- **Adolphe M, Barlovatz-Meimon G, Guillouzo C, Ronot X.** Culture de cellules animales, Paris,INSERM ; 2003, 898.
- **Anatomie du pancréas** – By BruceBlaus. Blausencom staff. Via Wikimedia Commons. Unité hépatobiliaire et pancréatique de Strasbourg.
- **Aniszewski, T.** The biological basis of quinolizidine alkaloids. The science of legumes, an annual international scientific journal (Finland); 1994.
- **ANISZEWSKI, Tadeusz.** Alkaloids-Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological Significance, applications and ecological role. Elsevier; 2007:48-50.
- **ANNICOTTE Jean-Sébastien, AUWERK Johan.** Etude des fonctions pancréatiques du récepteur nucléaire orphelin Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) et du facteur de transcription.Thèse de doctorat: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie ; 2004,1 :115.
- **Aroussia H,Bechir B,Saloua S.**Evaluation de la qualité des huitres creuses *crassostrea gigas* au cours du stockage Réfrigéré, suivi de la viabilité cellulaire.Laboratoire de biodiversité et Biotechnologie Marins ; 2015,87-90.
- **Atelier thématique nano-environnement** .Dr Michel Prost - Laboratoires Spiral – 21560 Couternon Dr Michel Prost PDG Laboratoires Spiral Couternon, France ;2013.

B

- **B.Gudjonsson.** Cancer of the pancreas. 50 years of surgery, Cancer 60; 1987:2284-2303.
- **Bandana, C, Ranjani, M, Jawed, A S.** In vitro anti-breast cancer activity of ethanolic extract of *Wrightia tomentosa*: Role of pro-apoptotic effect of oleanolic acid and urosolic acid. Journal Ethnopharmacol;2012, 142: 72-79.

Références Bibliographiques

- **Barlovatz-Meimon G, Adolphe M, Guillouzo, C, not, X.** Culture de cellules animales, méthodologies, applications. Technique. Edition Maloine France;1988.
- **Beghoul S.** Les Inhibiteurs de topo isomérase I en cancérologie. Mise en évidence d'un nouveau mécanisme d'action pro-apoptotique de la camptothécine. Thèse doctorat; 2008 P: 19.
- **Bhardwaj, V, He, J.** Reactive Oxygen Species, Metabolic Plasticity, and Drug Resistance in Cancer. *International journal of molecular sciences*;2020, 21(10): 3412.
- **Bio marqueurs et Diagnostic ACOBIUM.**
- **Blanchard J-M,** « Des oncogènes aux régulateurs de la mitose : un changement de la perspective dans notre vision des processus cancéreux ». *Médecine/sciences* ; 2003, 19 :187.
- **Bold, R J, Termuhlen P M, McConkey D J.** Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncology*;1997, 6(3): 133–142.
- **BONFILI, Laura, CECARINI, Valentina, AMICI, Manila.** Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds. *The FEBS journal* ; 2008,275:5512-5526.
- **Bottin L.**Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire: cas de Santa lumaus trocaledonicumen Nouvelle-Calédonie, Montpellier. PhD Thèse, ENSAM –CIRAD, Montpellier, France ;2006.
- **Bougoffa-Sadaoui K.**Caractérisation des fractions alcaloïdiques de *fumaria agraria* et étude de leur pouvoir anticancéreux vis-à-vis de lignées cellulaires cancéreuses mammaires .Thèse doctorat. Université A. Mira Bejaia;2016,11:47-48.
- **Bray, F, Ferlay, J, Soerjomataram, I, Siegel, R L, Torre, L A, Jemal, A.** Global cancer statistics GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-Cancer Journal Clin*; 2018, 68: 394–424.
- **Bruneton J.**Pharmacognosie,Phytochimie et plantes médicinales. Edition Technique et Documentation ;1999,1120-1202.

Références Bibliographiques

- **Bruneton, J.** Alcaloïdes In pharmacognosie. Phytochimie plantes médicinales. Paris Technique et Documentaire Lavoisier ; 2009, 1067-1068.
- **Burgeiro, A.** Rapid human melanoma cell death induced by sanguinarine through oxidative stress. Eur Journal Pharmacol ;2013, 705 : 109–118.

C

- **C. Vavreckova, I Gawlik, K Muller.** Benzophenanthridine les alcaloïdes de *Chelidonium majus*; I. Inhibition de la 5- et 12lipoxygénase par un mécanisme non redox, Planta Med ;1996, 62 : 397–401.
- **Cancer du pancréas:** un guide pour les patients – Basé sur les recommandations de l'ESMO – v.2013.1
- **Canivet, C, Gourgou-Bourgade, S, Napoléon, B, Palazzo, L, Flori, N, Guibert, P, Piessen, G, Farges-Bancel, D, Seitz, J, Assenat, E.** A prospective clinical and biological database for pancreatic adenocarcinoma: the BACAP cohort. BMC Cancer; 2018, 18: 986.
- **Casey A, Herzog E, Lyng F M, Byrne H J, Chambers G, and Davoren M.** Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. Toxicology letters;2008, 179(2): 78-84.
- **Chey WY , Chang T.** Régulation hormonale neurale de la sécrétion pancréatique exocrine Pancréatologie ;2001,1:320–335.
- **Conradt, B.** Genetic control of programmed cell death during animal development. Annual review of genetics; 2009, 43:493-523.
- **Cragg, G.M, and Newman, D.J.** Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. Phytochemistry Reviews ;2009, 8:313-331.
- **Cycle cellulaire et cytométrie en flux D.** Grunwald, J.F. Mayol, X. Ronot (eds) Lavoisier, Mars 2010.

D

- **Das, A, Dhanjal, J K.** Medicinal plants, a gold mine of anticancer compounds. *Am. Int. Journal Res. Formal Appl. Nat. Sci*;2015,9: 14–23.
- **DeBono, A, Capuano, B.; Scammells, P.J.** Progress Toward the Development of Noscapine and Derivatives as Anticancer Agents. *J Med Chem* 2015; 58:5699–5727.
- **DELPU Y, HANOUN N, LULKA H.** Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis. *Current Genomics*; 2011, 4:15-24.
- **Dong, X Z, Zhang M, Wang K, Liu P, Guo, D H, Zheng X L, Ge X Y.** Sanguinarine inhibits vascular endothelial growthfactor release by generation of reactive oxygen species in MCF-7human mammary adenocarcinoma cells. *BioMed research international*;2013, 517-698.
- **Drouillard A.** Épidémiologie du cancer du pancréas. *Bull Cancer* ; 2017.
- **Dubois, R.N, Abramson, S.B, Crofford L, Gupta R.A, Simon, L.S, Van De Putte L.B, Lipsky P.E.** Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*;1998, 12 (12): 1063-1073.

E

- **Elmore, S.** Apoptosis. A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologicalpathology* ; 35(4) :495–516.
- **Evans B Wolff R.** “Preoperative Gemcitabine-Based Chemo radiation for Patients with Resectable adenocarcinoma of thepancreatic Head. *Journal of clinical oncology*;2008,26:3496-3502.
- **Evans T, Rosenthal E.T, Youngblom J, Distel D, Hunt T.** Cyclin a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*;1983, 33:389-96.
- **Ezzati M, Henley SJ, Lopez AD, Thun MJ.** Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *Int Journal Cancer* ; 2005, 116: 963-971.

G

- **Gardès-Albert, M, Bonnefont-Rousselot, D, Abedinzadeh, Z, Jore, D.** Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic. *Actuality Chimic*;2003, 91-96.
- **Gowans Graeme J, Hawley Simon A, Ross Fiona A, Hardie DG.** AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. *CellMetabol*;2013, 18: 556–566.
- **Green,DR,Llambi,F.** Cell death signaling .Cold Spring Harbor Perspectives in Biology;2015,12:1-24.
- **Guilbaud N,Kraus-Berthier L,Meyer-Losic F, MalivetV, Chacun C, Jan M, Tillequin F, Michel S, Koch M, Pfeiffer B, AtassiGh, Hickman J, Pierre A.** Marked anti tumor activity of new potent acronycine derivate in orthotopic models of humain solid tumors *Clin.Cancer Res*; 2001, 7: 2573-2580.
- **Guo B, Li X, Song S, Jing, Cheng M, Zhao D, Li F.** Design, synthesis and biological evaluation of 1-phenanthryl-tetrahydroisoquinoline derivatives as novel p21-activated kinase 4 (PAK4) inhibitors. *Organic & biomolecular chemistry*; 2015, 13(12):3803-3818.
- **Guohong Zhang, V G, Steven R Kain , Guochen Yan.** Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *BioTechniques*;1997, 23(3): 525-531.

H

- **H Lingani-Sawadog, G Thiombian, S A Traorp.** Effets du stockage sur la vitamine C, les caroténoïdes et le brunissement de la mangue (*mangifera indica I.*) Amélie séchée. *Sciences et médecine. Rev. CAMES - Série A* ; 2005, 03 : 63-67.
- **Hanahan, D.; Weinberg, R.A.** Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* ;2011,144:646–674.
- **Haseeb A,Shannon R,Jorien B,Nihal A.** Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins.*Cancer Letters*;2006,249:198-208.

Références Bibliographiques

- **He W, Wang B, Zhuang Y, Shao D, Sun K, Chen J.** La berbérine inhibe la croissance et induit l'arrêt G1 et l'apoptose dans les cellules du cholangiocarcinome humain QBC939. *Journal PharmacolSci*;2012 ,119 : 341-348.
- **HENRY GREY.** *Anatomy of the human body*, laboratories d'anatomie de la faculté de Paris V Cochin ;1985.

J

- **Jacobberger, JW, Sramkoski, .M, Stefan,T.** Multiparameter Cell Cycle Analysis. In *Flow Cytometry Protocols* (Edition Totowa, NJ, Humana Press, USA);2011.
- **JingjingL,Xialin L,Rui G,Wanghui J,Haitao L.** Cell Metabolomics Reveals Berberine-Inhibited Pancreatic Cancer Cell Viability and Metastasis by Regulating Citrate Metabolism. *Journal of Proteome research*;2020,19:3825-3836.
- **Jin-Jian, L, Jiao-Lin, B, Xiu-Ping, C.** Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* ID;2012, 485042: 12.
- **Jones S, Hruban RH, Kamiyama M.** Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science*; 2009, 5924(324).

K

- **Khorana AA.** Potentially Curable Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal Clin Oncol* ;2017,35: 2324-2328.
- **Kim, S J, Joh, H M, Chunga, T H.** Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells. *Applied physics letters*;2013, 103(5): 153705.
- **Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta, E Koike, T.** Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature Protocols*;2009, 10:1513–1521.
- **Koff, J, Ramachandiran, S, and Bernal-Mizrachi, L.** A time to kill Targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*; 2015, 16(2): 2942–2955.

Références Bibliographiques

- **Kroemer, G, Reed, J C.** Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*;2000, 6: 513-519.
- **Krueger,SA,Wilson,GD.**Flox cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. *Methods Mol Biol*;2011,731: 359-70.

L

- **LAFITTE Mari,MOREAU-GAUDRY François.**Adénocarcinome canalaire pancréatique: mécanisme moléculaire et approche thérapeutique. Thèse de doctorat: Sciences de la vie et de la santé. Bordeaux: Bordeaux ;2012: 220.
- **Les traitements du cancer du pancréas**, collection Guides patients Cancer info, INCa, décembre 2012.
- **Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM.** Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research*;2007, 67(3):1030-1037.
- **Liu, W, Li, X, Zhou, B, Fang, S, Ho, W, Chen, H, Liang, H, Ye, L, Tang, J.** Differential induction of apoptosis and autophagy by pyrrolizidine alkaloid clivorine in human hepatoma Huh-7.5 cells and its toxic implication. *PLoS One* ;2017, 12 : 179-379.
- **Lu, J J, Bao J L, Chen X P, Huang M, Wang, Y T.** Alkaloids isolated from natural herbs as the anticanceragents. *Evidence- Based complementary and alternative medicine*;2012.
- **Luo J, Inoue M, Iwasaki M.** Green tea and coffee intake and risk of pancreatic cancer in a large-scale, population-based cohort study in Japan (JPHC study). *European journal of cancer prevention*; 2007, 16:542-548.

M

- **Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine.** A natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* ; 2006, 5: 296-308.

- **Méga Guide Stages IFSI © 2015**, Elsevier Masson SAS.
- **Meijer, L.** Le cycle de division cellulaire et sa régulation. Bulletin du Cancer ; 2006, 93(4):41-53.
- **Ming M, Sinnott-Smith J, Wang J, Soares HP, Young SH, Guido Eibl, Enrique Rozengurt.** Dose-Dependent AMPK-Dependent and Independent Mechanisms of Berberine and Metformin Inhibition of mTORC1, ERK, DNA Synthesis and Proliferation in Pancreatic Cancer Cells, Richard Pearson. Peter MacCallum Cancer Centre, Australia; December 2014,1-24.
- **Monneret G, Venet F.** Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. Cytometry part B. Clinical Cytometry; 2016, 90(4): 376–386.
- **Morrisset J.** “Negative Control of Human Pancreatic Secretion: Physiological Mechanisms and Factors.” Pancreas37 ;2008,1: 1–12.

N

- **Nio Y, Dong M,Iguchi C,Yamasawa, K, Toga T,Itakura M,Tamura K.**Expression on Bcl-2 and p53 protein in resectable onvasive ductal carcinoma of the pancreas effects on clinical outcome and efficacy of adjuvant chemotherapy, journal of surgical oncology;2001, 76(3):188-196.
- **Nobili, S, Donatella, L, Ewa, W.** Natural compounds for cancer treatment and prevention. Pharmacological research; 2009, 59: 365–378.

O

- **Okada,H,Mak, T W.** Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumourcells,nature reviews cancer; 2004, 4(8): 592-603.

P

- **PALTINEAN R, TOIU A, WAUTERS J N,Frédérichm M, Angenotm L, Jean-Noël,Tamas M, Crisan G.**Identification and dertemination of alkakoides in *Fumaria*

Références Bibliographiques

- Species from romana*. Digest Journal of Nanomaterials&Biostructures (DJNB); 2013, 8(2): 817-824.
- **Pandeya, S.N, Tyagi, A.** Synthetic approaches for quinoline ans isoquinoline. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences;2001, 3: 53-61.
 - **PAPIN Julien, LANG Jochen.** Bases moléculaires des défauts sécrétoires des cellules β pancréatiques lors de la glucotoxicité. Thèse de doctorat: Sciences de la vie et de la santé ; 2009,192.
 - **Parc SH,Sung JH,KimE J,Chung N.**Berberine induces apoptosis via ROS generation PANC-1 and Mia-PaCa2 pancreatic cell lines.Brazilian Journal of Medical and BiologicalResearch; 2015, 48(2):111-119.
 - **Paris Michel, Hurabielle M.** Auteur Abrégé de matière médicale, pharmacognosie. Tome 1, Généralités – Monographies, Morphologie Ed Masson, Paris ;1981 : 256-266.
 - **Parkin DM, Boyd L, Walker LC. 16.** The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. Br Journal Cancer ; 2011,2: S77-S81.
 - **Pelicano, H, D. Carney P. Huang.**ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resistance Updates;2004, 7:97-110.
 - **PICOT, Joanna.** Human cell culture protocols. Springer Science & Business Media;2005.
 - **Piestras, K, Ostman, A.** Hallmarks of cancer, interactions with the tumor stroma. Experiemntal Cell Research; 2010, 316(8):1324-1331.
 - **Plutynski, A.**Explaining cancer: Finding Order in Disorder. New York: Oxford University Press; 2018.
 - **POCOCK Gillian, D.RICHARDS Christopher.**Fonction exocrine du pancréas. Physiologie humaine: les fondements de la médecine. Paris: Masson ; 2004, 422-426.
 - **Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee H-W, Cordon-Cardo C and DePinho RA.**The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. Cell; 1998, 92(6):713-723.

Références Bibliographiques

- **Pr Pascal Hammel**, service d'oncologie digestive et médicale à l'hôpital Beaujon (Clichy). HAS. Guide patient – ALD - La prise en charge du cancer du pancréas ; 2010.

R

- **Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, Hong SM, Koorstra JB, Rajeshkumar NV, He X, Goggins M, Iacobuzio-Donahue C, Berman DM, Laheru D, Jimeno A, Hidalgo M, Maitra A, Matsui W.** Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of the national cancer institute*;2010, 102(5): 340-351.
- **Redza-Dutordoir,M,Averill-Bates,D A.**(2016).Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species.*Biochimic et Biophysica Acta-Molecular cell Research*;2016, 1863:2977-2992.
- **Registre des tumeurs d'Alger, 2012.**
- **Riedl, S J, Shi Y.** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Review Molecular Cell Biology*; 2004, 5: 897-907.
- **RIVERA, Fernando, LÓPEZ-TARRUELLA, Sara, VEGA-VILLEGAS, Ma Eugenia.** Treatment of advanced pancreatic cancer from gemcitabine single agent to combinations and targeted therapy. *Cancer treatment reviews*; 2009, 35(4): 335-339.
- **Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE.** Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer research* ;1997 May 1, 57(9) :1731-4.

S

- **S F Sener, A Fremgen, H,R Menek, D P Winchester.** Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the Nationan Cancer Database,*J.Am.Coll.Surg*;1999,189:1-7.
- **Schwartz, G K, Shah, M A.** Targeting the cell cycle a new approach to cancer therapy. *Journal of clinical oncology*; 2005, 23: 9408–9421.

Références Bibliographiques

- **Segala G.** Cancer, les mécanismes biologiques. Futura Sciences; 2012, 1-21.
- **Shakil A.** Isolation and structural elucidation of chemical constituent from fumariaindica, Ferula oopoda and withania somnifer. Thèse de doctorat. International center for chemical research, University of Karachi;1998.
- **Shen P, Chen M, He, M, Chen L, Song Y, Xiao P, Wan X, Dai F, Pan T, Wang Q.**Inhibition of ER α /ERK/P62 cascadesinduced “autophagic switch” in the estrogen receptor-positivebreastcancercellsexposedtgemcitabine.Oncotarget;2016,7(30):48501–48516.

T

- **Taylor R, Cullen S, Martin S.** Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. Nature reviews molecular cell biology; 2008, 9: 231-241.

W

- **W E Fisher, D H Berger,**Angiogenesis and anti angiogenic strategies in pancreatic cancer, Int. J.Gastrointest. Cancer 33;2003, 79-88.
- **WACK S.**ETUDE DE MODALITES MULTITHERAPEUTIQUES ET DIAGNOSTIQUES APPLIQUEESAU CANCER DU PANCREAS; Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I; 08 novembre 2005.
- **WROBEL, J T.** Nuphar alkaloids. In The Alkaloids: Chemistry and Physiology. Academic Press; 1967, 441-465.

Y

- **Yon-Xian, G, Xiao-Huan, L, Fan Z, Guo-Fang T.** Gemcitabine inhibits proliferation and induced apoptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells. Journal of cancer research and therapeutics; 2016, 12(5): 1–4.
- **Yunis AA.** Carcinome pancréatique humain (MIA PaCa-2) en culture continue : sensibilité à l'asparaginase. Int. Journal. Cancer; 1977, 19: 128-135.

Z

- **Zerbini, L F, Wang Y, Correa, R G, Cho J Y, Libermann T A.** Blockage of NF-kappa B induces serine 15 phosphorylation of mutant p53 by JNK kinase in prostate cancer cells, *Cell Cycle*;2005,4(9): 1247-1254.
- **Zhang A, Zhang Y, Branfman AR, Baldessarini RJ, Neumeyer JL** .Advances in development of dopaminergic aporphinoids. *Journal Med Chem*;2007, 50:171–181.
- **Zhang, Yulin, Liang, Yeer, H.** Anticancer activities and mechanisms of heat clearing and detoxicating traditional Chinese herbal medicine. *Chin. Med*;2017,12.

Glossaire médicale

Cellule pré-néoplasique : Les lésions pré néoplasiques signifient avant la nouvelle croissance. Elles apparaissent avant le néoplasme (terme médical pour tumeur), où les **cellules** prolifèrent. Les lésions néoplasiques sont donc des marqueurs d'un possible développement cancéreux.

Espace rétro-péritonéal : espace situé dans l'abdomen, en arrière du péritoine dont il est séparé par une membrane graisseuse.

Canal pancréatique : il constitue le conduit pancréatique principal, il permet de drainer la majeure partie de la glande.

Sens antéro-postérieur : relatif à un axe allant de l'avant à l'arrière.

Vaisseaux mésentérique : elles ont pour fonction d'apporter du sang oxygéné aux organes de l'abdomen.

Hile hépatique : Le lobe carré et le lobe caudé sont séparés par un sillon appelé le hile du foie. C'est au niveau du hile que la veine porte et l'artère hépatique pénètrent dans le foie, et que passent des canaux biliaires majeurs.

Carcinome : c'est un type de cancer qui commence dans les cellules qui composent la peau ou les tissus qui tapissent les organes.

Glucagon : hormone produite par le pancréas dont la fonction est d'augmenter la glycémie

Insuline : est une hormone naturellement produite par le pancréas, plus précisément par des cellules spécialisées situées dans les îlots de Langerhans. Elle permet au glucose (sucre) d'entrer dans les cellules du corps.

IRM : Imagerie par résonance magnétique est l'une des techniques d'imagerie médicale les plus récentes. Elle permet de visualiser avec une grande précision les organes et tissus mous, dans différents plans de l'espace. Il est ainsi possible de déterminer la position exacte de lésions autrement invisibles.

TDM : La tomodensitométrie est un examen d'imagerie lors duquel on utilise un ordinateur pour assembler une série de clichés radiographiques afin de créer des images détaillées à 3D d'organes, de tissus, d'os et de vaisseaux sanguins du corps.

Carcinogénèse : est l'ensemble de phénomènes transformant une cellule normale en cellule cancéreuse.

Cellule acineuse : Les cellules acineuses pancréatiques ont pour fonction de synthétiser les enzymes digestives ainsi qu'un fluide primaire riche en NaCl qui permet le maintien en solution et facilite le transport des enzymes qu'elles sécrètent.

Stade métastatique : Un cancer métastatique se traduit par la migration de cellules cancéreuses d'un cancer primitif, appelées métastases, vers d'autres organes (foie, cerveau, poumons, os, péritoine) ou des ganglions lymphatiques.

Facteur angiogéniques : L'angiogenèse est un processus cellulaire induisant la formation de vaisseaux sanguins dans une tumeur. Elle favorise le développement de métastases. Certains facteurs induisent cette néoformation de vaisseaux.

Anorexie : trouble du comportement alimentaire se manifestant par une perte de poids intentionnelle.

Résection tumoral : Une résection est un retrait chirurgical d'une partie d'organe ou d'un tissu pathologique comme une tumeur. On peut aussi parler d'ablation

Pancréatite chronique : La pancréatite chronique est une inflammation chronique du pancréas qui entraîne des lésions permanentes structurelles associées à une sclérose et des sténoses canalaire, suivie d'une atteinte des fonctions exocrine et endocrine (insuffisance pancréatique).

Oncologie digestive : L'oncologue digestif joue un rôle pivot de coordination entre ces différentes spécialités afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique du patient atteint d'un cancer digestif. Il est également responsable et expert dans la prescription et le suivi de chimiothérapie.

Cholestase : est définie par la diminution de la formation de la bile (ou cholérèse), une fonction hépatique non directement mesurable en pratique.

Suc pancréatique : le suc pancréatique est un liquide biologique sécrété par le pancréas exocrine dans la lumière digestive. C'est le suc le plus complet. Il est composé de deux constituants principaux : des bicarbonates et sels.

Toxicité : La toxicité est la mesure de la capacité d'une substance chimique, radionucléide, molécule organique, etc. à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé ou la survie chez toute forme de vie, qu'il s'agisse de la vitalité de l'entité ou d'une de ses parties

Non résécable : Terme qui désigne une maladie qui ne peut pas être traitée ou une tumeur qui ne peut pas être enlevée (réséquée) au moyen de la chirurgie

Cœlioscopie : est une technique chirurgicale qui permet d'opérer à l'intérieur du ventre en ne faisant que des petites incisions. Cette technique est la voie d'abord privilégiée de la chirurgie à l'intérieur de l'abdomen.

Biopsie : consiste à prélever un fragment de tissu ou d'organe (peau, foie, poumon, paroi du colon, glande, ganglion, etc.), afin de l'analyser au microscope.

Nab-paclitaxel : Le paclitaxel lié à une nanoparticule d'albumine est un médicament antimétabolique utilisé dans le traitement du cancer du sein, le cancer du poumon et le cancer du pancréas. Dans cette chimiothérapie, l'albumine sérique transporte le paclitaxel. Il est parfois appelé nab-paclitaxel.

5- Fluoro-uracile : est un médicament utilisé dans le traitement de certains cancers. Il appartient à la classe des médicaments anti métabolites.

L'oxaliplatine : L'oxaliplatine est un médicament, administré en intraveineux, anti-cancéreux de synthèse du groupe des agents dérivés de platine

L'irinotécan : est un médicament anticancéreux utilisé dans le traitement des cancers colorectaux. L'irinotécan est un pro-médicament dont le métabolite actif inhibe la topo isomérase 1 induisant des cassures de l'ADN préférentiellement dans les cellules cancéreuses.

Mésenchymateuses : Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules souches multipotentes que l'on trouve dans la moelle osseuse et qui sont importantes pour produire et réparer les tissus squelettiques tels que le cartilage, les os et les graisses.

Tumorigenèse : peut être considérée l'accumulation de mutations génétiques dans les cellules qui affectent les gènes suppresseurs de tumeur ainsi que les oncogènes.

المخلص

بسبب ارتفاع معدل الوفيات أصبح سرطان البنكرياس مصدر قلق كبير للصحة العمومية. يتم تحديد الإمكانيات العلاجية لقلويدات ايزوكينوليين (بربرين و سنغينارين) فيما يتعلق بسلاسل خلايا سرطان البنكرياس، (PANC-1 MiaPaCa2 , AsPC-1, BxPC3) من خلال مجموعة من الاختبارات. يتم تحديد التأثير المضاد للسرطان لبربرين من خلال مقارنة استخدام جمسيطابين وهو معيار العلاج الكيميائي. تحليل دورة الخلية بواسطة قياس الخلايا للكشف عن ان بربرين يثبط نمو الخلايا بطريقة تعتمد على الجرعة عن طريق تحفيز إيقاف دورة الخلية في المرحلة G1 بينما يمارس جمسيطابين تأثيره المضاد للتكاثر عن طريق إيقاف الطور S. أظهرت البربرين تأثيرًا محددًا سامًا للخلايا لكلا السلالات PANC-1 , MiaPaCa2 . بالإضافة الى ذلك اظهر تحليل ان موت خلية البربرين يؤدي الى موت الخلايا المبرمج لخلايا PANC-1 MIA-PaCa2 بواسطة الية تتضمن انتاج روس. تسبب سنغينارين بدوره بشكل كبير في موت الخلايا المبرمج لسلاسل AsPC-1 et BxPC3 عن طريق خفض مستوى البروتينات المضادة للاستماتة Bcl-2 و زيادة مستوى البروتينات المؤيدة لموت الخلايا المبرمج Bax و بالتالي تعزيز موت الخلايا المبرمج .

الكلمات المفتاحية: قلويدات الإيزوكينوليك ، سرطان البنكرياس ، سلالات الخلايا ، علاج السرطان ، دورة الخلية .

..

RESUME

En raison de sa mortalité élevée, le cancer du pancréas est devenu un important souci de santé publique. Le potentiel thérapeutique des alcaloïdes isoquinoléiques (**BBR** et **sanguinarine**) est déterminée vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses du pancréas à savoir **PANC-1**, **MIA-PaCa2**, **AsPC-1** et **BxPC-3** à travers un ensemble de tests. L'effet anticancéreux de la **BBR** est déterminé en comparant son utilisation avec celle de la **Gemcitabine** étant le standard de traitement par chimiothérapie. L'analyse du cycle cellulaire par **CMF** à révéler que la **BBR** inhibe la croissance cellulaire de manière dose-dépendante en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase **G1** tandis que la **Gemcitabine** exerce son effet anti-prolifération par l'arrêt de la phase **S**. La **BBR** a démontré également un effet cytotoxique dose-dépendant spécifique vis-à-vis des deux lignées **MIA-PaCa2** et **PANC-1**. En outre, l'analyse de la mort cellulaire a démontré que la **BBR** déclenche l'apoptose des cellules **PANC-1** et **MIA-PaCa2** par un mécanisme qui impliquait la production de **ROS**. La **sanguinarine** a déclenché à son tour de manière significative l'apoptose des lignées **AsPC-1** et **BxPC-3** en diminuant le niveau des protéines anti-apoptotiques **Bcl-2** et en augmentant le taux des protéines pro-apoptotiques **Bax** favorisant ainsi la mort cellulaire programmée par apoptose.

Mots clés : Alcaloïdes isoquinoléiques, Cancer pancréatique, Lignées cellulaires, Thérapie anticancéreuse, cycle cellulaire.

ABSTRACT

Due to its high percentage of mortality, pancreatic cancer is becoming an important public health issue. The therapeutic potential of Isoquinoleic Alkaloids (the **berberine** and **sanguinarine**) is determined via pancreatic cancer cell lines specifically **PANC-1**, **MIA-PaCa2**, **AsPc-1** and **BxPC-3** through a series of tests. The anti-cancer effects of the **BBR** is bitter mind by comparing its usage along with the **gemcitabine** which has been the standard treatment by the chemotherapy the analysis of the cell cycle by **CMF** revealed that **BBR** inhibits cell growth in a dose-dependent manner by inducing cell cycle stopping it in **G1** phase while **gemcitabine** exerts its anti-proliferation effect by stopping it in the **S** phase. **BBR** also demonstrated a dose-dependent specific cytotoxic effect against both **MIA-PaCa2** and **PANC-1** cell lines. In addition, cell death analysis showed that **BBR** triggered apoptosis of **PANC-1** and **MIA-PaCa2** cells by a mechanism that involved **ROS** production. The **sanguinarine** in turn significantly triggered apoptosis in **AsPC-1** and **BxPC-3** cell lines by decreasing the level of anti-apoptotic **Bcl-2** proteins and increasing the level of pro-apoptotic **Bax** proteins thereby promoting programmed cell death by apoptosis.

Keywords: Isoquinoleic Alkaloids, Pancreatic Cancer, Cell lines, Cancer therapy, Cell cycle.