

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة بوقرة بومرداس
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA BOUMERDES



Faculté des Sciences
Département de biologie

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de
MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Physiologie cellulaire et physiopathologie

Thème :

**Effet anti-tumoral et radio-sensibilisateur d'une
molécule bioactive : pectine d'orange (*Citrus sinensis*)**

Présenté par :

M^{me} HAMAI-AMARA Hadjira

Soutenu le 30/06/2019 devant le jury:

M^{me} NEMIRI N.

MAA (UMBB)

Présidente

M^{me} ZEGGAI S.

MCB (UMBB)

Examinatrice

M^{me} DJEFAL-KERRAR A.

MRA (CRNA)

Promotrice

M^r BENMOULOUD A.

MCB (UMBB)

Co-promoteur

Promotion 2018- 2019

*« C'est impossible, dit la Fierté
C'est risqué, dit l'Expérience
C'est sans issue, dit la Raison
Essayons, murmure le Cœur »*

William Arthur Ward

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À la mémoire de mon cher Père. Qu'il soit parmi les préférés du Grand Dieu Le Miséricordieux.

À ma maman chérie. Tes prières et ta bénédiction m'ont toujours guidé vers ce qu'il y a de meilleur et incité à ne jamais te décevoir. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

À mes beaux-parents que je ne cesse de remercier. Qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien, appuis et encouragements.

À mes frères, mes beaux-frères, mes sœurs et belles-sœurs, avec toute mon affection.

À tous mes neveux et à toutes mes nièces. Que dieu vous garde.

À toutes mes amies plus particulièrement Samah, Assia, Lila, Meriem, Malika, Khalida, Soumia et à tous ceux qui me sont chers. En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous passons ensemble.

Enfin, Une spéciale dédicace du fond du cœur, à cette personne qui compte énormément pour moi, et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect, à mon cher époux « Rafik » qui est toujours à mes côtés, qui m'a aidé, m'a encouragé et m'a soutenu surtout dans les moments les plus difficiles.

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour que j'éprouve pour vous, un grand merci, plein d'affection, pour mes trois anges « Houssam, Amira et Doudja ». Que Dieu vous protège.

Remerciements

Ce mémoire est le fruit d'un travail qui a été effectué au laboratoire de radiobiologie du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) sous l'encadrement de Docteur DJEFAL-KERRAR, que je ne cesse de remercier pour sa disponibilité, son encouragement et ses conseils éclairés.

Ma profonde reconnaissance va à mon Co-promoteur, Docteur Benmouloud pour son soutien, sa confiance, sa modestie scientifique et ses qualités humaines.

Je tiens à remercier infiniment M^{me} Nemiri d'avoir accepté de présider le jury de mon mémoire, et Docteur Zeggai qui m'a honoré pour avoir accepté d'examiner mon travail.

J'adresse un remerciement particulier à Mme Nacer-khoudja du CRNA pour son efficacité et aide précieuse, qu'elle trouve ici mes sincères remerciements et toute mon estime.

Mes remerciements les plus chaleureux et respectueux son dédiés à tous les éléments de la division des Applications Nucléaires du CRNA, en particulier l'équipe de Radiobiologie surtout Mme Abdoun, Aberkane, Benamer et Gais, peu importe l'ordre, vous êtes tout simplement géniales ! Un énorme merci pour vos conseils, votre aide et votre soutien.

Merci à vous tous.

Liste des abréviations

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
Akt :	Protéine kinase Bisolée à partir duretrovirus AKT
AO :	Acridine Orange
APAF1:	ApoptoticProteasesActivating Factor 1.
ARN :	Acide RiboNucléique
ATM :	AtaxiaTelangectasiaMutated
BAK :	BCL-2-Antagonist/Killer.
BAX:	Bcl-2-Associated X Protein.
Bel-2 :	B-CellLymphomaProtein.
BER :	Base Excision Repair
CD4,CD8 :	Cluster de Différenciation 4,8
CDB :	Cassures Double Brin
CDK :	CyclinDependant Kinase
Chk1:	Check point kinase1
CRD:	Carbohyrate Reconnaissance Domain
CR :	Capacité Radiosensibilisante
CSB :	Cassures Simple Brin
DE:	Degré d'Esterification
DMEM:	Duldecco'sModifiedEagle Medium
DMSO:	DiMethylSulfOxide
DNA-PK:	DNA-dependentProteinKinase
DO:	Densité Optique
eV:	electronVolts
FTIR:	Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier
FAO :	Food and Agriculture <i>Organization</i>
Gal-3:	Galectin-3
Gal-A:	GalacturonicAcid
GSK3β :	GlycogenSynthaseKinase 3 beta
Gy :	Gray
HEp-2:	HumanEpithelioma type 2
HE :	Huile Essentielle
HM:	High Methoxyl
IARC :	International Agency for Research on Cancer
IC50:	InhibitoryConcentration
KBr:	Potassium Bromide
KRas:	Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog
LM:	LowMethoxyl
MCP:	Modified Citrus Pectin
PM	Modified Pectin
NCCD :	Nomenclature Commitee on Cell Death
NER :	Nucleotide Excision Repair
NHEJ :	Non-Homologous End Joining
NLS :	Nuclear Localisation Signal

OMIP:	Orange Modified and Irradiated Pectin
OMP:	Orange Modified Pectin
OMS :	Organisation Mondiale de Santé
ONP :	Orange Native Pectin
ORL:	Oto-Rhino-Laryngologie
P53 :	Protéine cellulaire 53
PARP :	Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCa:	Prostate Cancer cells
PE :	Plating Efficiency
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-Kinase
RG-I, II:	Rhamnogalacturonanes I et II
ROS :	Reactive Oxygen Species
SF:	Survival Fraction
SRB:	SulfoRhodamine B
Sv:	Sievert
SVF:	Sérum de Veau Fœtal
TCA :	TriChloroAcetic Acid
TCF	Transcription Factor
TLE:	Transfert Linéique d'Énergie
VADS :	Voies Aéro-Digestive Supérieures
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VERO:	VerdaReno

Liste des figures

Figure 1	Topographie du larynx (Medrare, 2011)	3
Figure 2	Conséquences cellulaires des rayonnements ionisants (Hall, 1994): a) Effets directs et indirects sur l'ADN; b) Etapes du cycle cellulaire impacté après irradiation	7
Figure 3	Lésions radio-induites de l'ADN (Téoule et Duplaa, 1987)	7
Figure4	Modèle simplifié des mécanismes cellulaires de réparation des lésions radioinduites de l'ADN (Dumont <i>et al.</i> , 2009)	8
Figure5	Représentation schématique de la paroi d'une cellule végétale montrant la localisation de la pectine (Pérez et Mazeau, 2005)	11
Figure 6	Structure chimique de la molécule de pectine (Walstra, 2003)	12
Figure 7	Diagramme représentatif des différents composants de la molécule de pectine (Vincken <i>et al.</i> , 2003) et la préparation de la pectine modifiée (MCP) (Pienta <i>et al.</i> , 1995).	14
Figure 8	Représentation schématique des activités anti-cancéreuses des différentes formes de pectine (Leclere <i>et al.</i> , 2013)	15
Figure 9	Classification des galectines (Yang <i>et al.</i> , 2008)	16
Figure 10	Mécanismes de liaison de la Galectine-3 (Farhad <i>et al.</i> , 2018)	16
Figure 11	Impact de la Gal-3 sur l'immunosuppression au sein d'une tumeur (Farhad <i>et al.</i> , 2018)	17
Figure 12	Voies de signalisation associées aux voies intra et extracellulaires de Galectine3 (Maxwell, 2014).	18
Figure 13	Caractéristiques morphologiques d'une orange (Hartati <i>et al.</i> , 2011)	19
Figure14	Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005)	20
Figure 15	Principales étapes d'extraction de la pectine	20
Figure 16	Précipitation de la pectine dé-esterifiée	21
Figure 17	Irradiateur pilot au Cobalt 60	21

Figure 18	Unité de Cobalt 60 d'ELDORADO78	23
Figure 19	Photo du microscope inversé (BRESSER)	25
Figure 20	Photo du microscope à fluorescence (Leica DM6000B)	26
Figure 21	Phases obtenues après délipidation de l'albedo d'orange	27
Figure 22	Aspect de la poudre d'albedo d'orange délipidée après séchage	27
Figure 23	Photos des différentes poudres de pectine	28
Figure 24	Représentation spectrale IR de l'ONP (a), OMP (b) et OMIP (c)	29
Figure25	Activité anti-proliférative de l'ONP (a), OMP (b) et OMIP (c) sur les HEp-2 et OMIP sur les VERO (d) après 24h, 48h et 72h de mise en contact.	31
Figure 26	Effet antiproliférative de l'irradiation sur les HEp-2 révélé par le test SRB. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type, n=6, P<0,001 en comparaison avec le témoin non irradié	33
Figure 27	Courbe de survie cellulaire des cellules HEp-2 de en fonction de la doserévélé par le test clonogénique	34
Figure 28	Histogramme représentant les taux de viabilité des HEp-2 en présence des différentes concentrations en OMIP en fonction de dose d'irradiation (n=6, **P<0,01, ***P<0,001)	35
Figure 29	Courbe de survie des HEp-2 en présence desdifférentes concentrations en OMIP en fonction des doses d'irradiation.	36
Figure 30	Représentation des changements morphologiques des HEp-2 après 48h de culture. (a) culture des HEp-2 sans traitement, (b, c, d, e et f) HEp-2 en présence d'OMIP à 1, 2, 3, 4, et 5mg/ml respectivement, observées au microscope inversé Gx100.	37
Figure31	Aspect morphologique des cellules cancéreuses HEp-2 marquées à l'acridine orange. Cellules cancéreuses témoins (a), traitées par 3mg/ml(b) et 5mg/ml(c) d'OMIP, microscopie à fluorescence Gx100.	38

Liste des tableaux

Tableau I	Principales sources de pectines d'intérêt industriel (Paquot <i>et al.</i> , 2010)	12
Tableau II	Rendements d'extraction et de modification de la pectine	27
Tableau III	La solubilité d'ONP, OMP et OMIP dans l'eau	29
Tableau IV	Valeurs de l'IC ₅₀ de l'ONP, OMP et OMIP sur les HEp-2 à différents temps de contact.	31
Tableau V	Valeurs de l'IC ₅₀ de l'OMIP sur les HEp-2 et les VERO à différents temps de contact	33
Tableau VI	Capacité radiosensibilisatrice d'OMIP sur les HEp-2 à différentes doses d'irradiation	36

Sommaire

Synthèse Bibliographique

Introduction	1
I. Le cancer	3
I.1- Définition	3
I.2- Le cancer du larynx	3
I.3- Prise en charge thérapeutique du cancer du larynx	4
II. Effets biologiques des rayonnements ionisants	5
II.1- Définition d'un rayonnement ionisant	5
II.2- Classification des rayonnements ionisants	5
II.3- Caractéristiques d'une irradiation	6
II.4- Mécanisme d'action	6
II.5- Mécanismes de réparation des lésions radio-induites	7
II.6- Morts cellulaires radio induites	8
II.7- Radiorésistance et radiosensibilité	10
II.8- Les traitements concomitants	11
III. La pectine	11
III.1- Localisation et principales sources de pectines	12
III.2- Structure chimique des pectines	12
III.3- Propriétés physico-chimique de la pectine	13
III.4- Procédés de modification de la pectine	13
IV. Action de la pectine	15
IV.1- Pectine et Cancer	15
IV.2- Les galectines-3	15

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	19
I.1-Matériel biologique	19
I.2-Réactifs et milieux	19
I.3-Equipements	19
II. Méthodes	19
II.1-Obtention du matériel d'étude	19
II.2-Traitements de la pectine native	21
II.3-Caractérisation des différentes pectines	21
II.4-Activité cytotoxique	22
II.5-Evaluation de l'activité cytotoxique	23
II.6-Mise en évidence de la mort cellulaire	25
II.7-Analyse statistique	26

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Extraction de la pectine native	27
II. Rendement en pectine	27
III. Caractérisation des différentes pectines.....	28
III.1-Degré d'estérification	28
III.2-Détermination de la solubilité dans l'eau	29
IV. Activité cytotoxique	30
IV.1-Effets des différentes pectines sur la prolifération cellulaire.....	30
IV.2-Effets des rayonnements gamma	33
IV.3-Effets des traitements concomitants.....	35
V. Mise en évidence de la mort cellulaire	37
Conclusion et perspectives	39
Références bibliographiques.....	40
Annexe.....	51
Résumés	

Introduction

Introduction

Le cancer est l'une des maladies qui représente un problème majeur de santé publique dans la société actuelle. Il est considéré comme étant un fléau au niveau mondial (**Pierron, 2007**), avec 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès en 2018 (**IARC, 2018**).

A l'horizon 2030, le nombre de personnes qui développeront un cancer chaque année peut dépasser les 21 millions (**Ferlay et al., 2013**), particulièrement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (**OMS, 2013**). Plus de 60% des nouveaux cas de cancer surviennent en Afrique, Asie, Amérique centrale et Amérique latine.

L'Algérie ne fait pas exception à cette pandémie, l'incidence du cancer est en nette augmentation. On comptabilise actuellement environ 45 000 nouveaux cas par an, avec 24 000 décès dont 22% sont dus au tabagisme (**Plan national, 2014**).

Le taux d'incidence du cancer de larynx en Algérie est de 4,4% et est plus élevé que celui enregistré en Europe de l'ordre de 3%. Le cancer de larynx occupe la 7^{ème} position dans la classification des différents cancers en Algérie (**Hocine, 2019**).

Plusieurs thérapies sont utilisées pour lutter contre cette maladie, mais ne sont pas toujours efficaces et peuvent souvent induire des effets secondaires importants.

Le cancer du larynx est généralement traité par radiothérapie parallèlement à la chirurgie et/ou chimiothérapie (**Ehrlich, 2002**). Cependant, une radiorésistance peut survenir au cours de la radiothérapie (**Weber et al., 2005; Kaup et al., 2006**), qui peut être la cause majeure de l'inefficacité du traitement (**Hematulin et al., 2012**).

A cet effet, les scientifiques recherchent constamment de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourront renforcer et améliorer l'efficacité des traitements.

Un nombre important de molécules d'intérêt pour le développement de nouveaux traitements anti cancéreux proviennent du monde végétal (**Graham et al., 2000; Liu, 2004**). Parmi ces molécules, la pectine, polysaccharide naturel, que l'on retrouve dans la paroi primaire des plantes supérieures (**Alkorta et al., 1998**). Son utilisation dans le développement d'oligosaccharides à effets prébiotiques et pharmaceutiques constitue un domaine en plein essor.

En plus de son potentiel inhibiteur immense contre une large variété de cancers humains notamment le cancer de la prostate (**Yan et Katz, 2010**), du colon (**Olano-Martin et al., 2003; Glinisky et Raz, 2009**), du foie (**Liu et al., 2008**) et de la peau (**Platt et Raz, 1992**), la pectine semblerait posséder une capacité à augmenter la radio-sensibilité des cancers les plus agressifs tel que le cancer de la prostate en l'utilisant en concomitance avec le rayonnement ionisant (**Conti et al., 2018**).

De part cet intérêt dans le domaine pharmaceutique, différents procédés de transformation de la pectine native ont été mis au point, afin d'accroître la biodisponibilité des oligosaccharides pectiques et d'augmenter leur efficacité (**El-Batal et al., 2013**).

La pectine ainsi modifiée, riche en galactose posséderait une capacité apparente de liaison et d'inhibition d'une protéine qui semblerait freiner l'agrégation, l'adhésion et la métastatisation

des cellules cancéreuses (**Bresalier *et al.*, 1997; Krzeslak et Lipinska, 2004; Domic *et al.*, 2006**).

Pour notre part, nous nous intéresserons particulièrement à la valorisation d'un sous-produit agricole plus précisément d'un fruit très répandu en Algérie, l'écorce d'orange, pour extraire la pectine et étudier son effet concomitant avec le traitement par irradiation des cellules cancéreuses de larynx humain.

Ce travail a été effectué au laboratoire de radiobiologie du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) et concernera principalement :

L'extraction de la pectine à partir des épiluchures

La mise au point d'un protocole de traitement de la pectine (hydrodistillation, chimique et physique au rayonnement gamma).

La caractérisation physico-chimique des pectines obtenues.

La mise en évidence '*in vitro*' du double effet, antiprolifératif et radio-sensibilisateur de la pectine sur les cellules cancéreuses par un test de cytotoxicité révélé par la technique spectrométrique et par le test de clonogénéité.

La révélation du type de mort induite par des techniques de marquage fluorescent sélectif des acides nucléiques.

Synthèse Bibliographique

I. Le cancer

I.1- Définition

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu de l'organisme initialement normal (Chang *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2006). Les nouvelles cellules résultantes peuvent former une tumeur maligne (un néoplasme) conduisant à l'envahissement des tissus voisins par une croissance illimitée qui se propage à travers le corps et forme des métastases (Moreau, 2006).

Pour qu'un cancer se développe, la cellule doit accumuler plusieurs mutations dans son génome (Macdonald *et al.*, 2003). Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors de la division cellulaire. Le cancer se développe à partir d'une seule cellule saine en un ensemble de cellules cancéreuses qui se disséminent finalement par voie sanguine ou lymphatique pour gagner les organes distants (Macdonald *et al.*, 2003; Mareel et Leroy, 2003).

La compréhension du fonctionnement des cancers permet ainsi de concevoir des stratégies thérapeutiques plus efficaces et de définir des cibles plus précises pour les thérapies anticancéreuses. Malgré l'existence de plusieurs traitements utilisés depuis longtemps, certains cancers n'y répondent pas.

I.2- Le cancer du larynx

Le cancer du larynx fait partie des cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieures (VADS), appelés aussi cancers ORL (Lefebvre *et al.*, 1993). Le cancer du larynx peut se produire au niveau de la glotte (le site de la plupart des cancers du larynx), dans la région supra-glottique (la partie au-dessus des cordes vocales qui comprend l'épiglotte) ou à la région sous-glottique (la partie où le larynx rencontre la trachée).

I.2-1-Anatomie du larynx

Le larynx, conduit fibro-cartilagineux, est à l'origine un organe sphinctérien ayant chez l'homme un rôle fondamental dans la physiologie de la déglutition, de la respiration et de la phonation, renfermant les cordes vocales (*glotte*), qui vibrent au passage de l'air (figure 1) (Thompson, 2006).

Le larynx est constitué d'un ensemble de cartilages, de ligaments et de muscles recouverts d'une muqueuse. Ces structures anatomiques expliquent les voies d'extension du cancer du larynx.

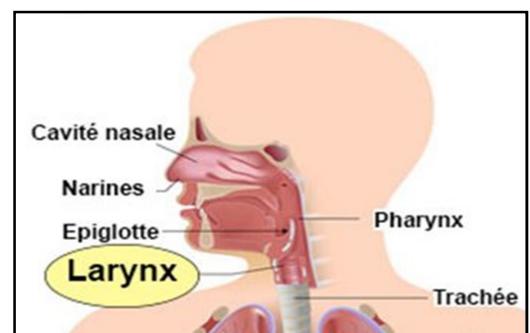


Figure 1: Topographie du larynx (Medrare, 2011)

I.2-2-Les principaux facteurs de risque

La majorité des cancers VADS sont dus à une consommation excessive d'alcool et au tabagisme. Le cumul des deux est encore plus délétère. 10 % des cancers, toutes localisations confondues, seraient liés à une consommation régulière d'alcool. Cette proportion monte à 50 % pour le cancer du larynx (Chevalier *et al.*, 2010).

Le tabac : Le tabac est le plus connu et le plus important des facteurs de risque de cancer. Il contient de la nicotine, mais aussi des agents de saveur et de texture. Chaque cigarette est faite de plusieurs milliers de composés chimiques qui en se consumant dégagent dans la fumée une multitude de substances. L'acétone, l'acide cyanhydrique et l'ammoniac, notamment, irritent les voies respiratoires et favorisent la pénétration d'autres substances nocives, parmi elles, les goudrons (acétaldéhyde, acrylonitrile, benzène, formaldéhyde, nitrosamines) qui sont des produits de combustion particulièrement cancérogènes. Le tabac contient aussi des métaux lourds (arsenic, cadmium, chrome, plomb, nickel) également cancérogènes (**IARC, 2004**).

L'alcool : La molécule d'alcool présente dans les boissons est l'éthanol, qui agit à plusieurs niveaux. Elle est transformée par l'organisme en acétaldéhyde et réagit fortement avec l'ADN en provoquant des mutations et libération de radicaux libres qui attaquent les cellules. Il diminue les performances du système immunitaire, et irrite sur son passage les muqueuses, dans la bouche, la gorge, l'œsophage, qui deviennent perméables à d'autres cancérogènes, notamment ceux liés au tabac (**Castellsague et al., 2004**).

I.2-3- Epidémiologie du cancer du larynx

Les cancers des VADS sont fréquents, plus de 600 000 nouveaux cas surviennent tous les ans à travers le monde avec un taux de décès de 54 %, ce qui en fait le cinquième cancer en incidence (**Belarb, 2010**).

Cette maladie est fréquente chez les hommes âgés entre 55 et 65 ans, bien que son incidence chez les sujets jeunes et les femmes soit en hausse à cause du nombre croissant de fumeuses et le tabagisme passif (**Medrare, 2011**).

I.3- Prise en charge thérapeutique du cancer du larynx

Les traitements des cancers se basent sur une stratégie thérapeutique qui nécessite une **association multidisciplinaire** en fonction des cas, la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. **Le choix du traitement dépend essentiellement** de la taille, la localisation, le degré d'envahissement des tissus environnants; la présence éventuelle de métastases, l'âge et l'état général du patient.

Généralement, le cancer du larynx est traité par radiothérapie conjointement avec chirurgie et/ou chimiothérapie, mais les cellules tumorales peuvent acquérir une radiorésistance au cours des séances de radiothérapie clinique (**Kaup et al., 2006; Weber et al., 2015**).

I.3-1- Chirurgie

La chirurgie est généralement le premier traitement auquel les oncologues ont recours lorsque la tumeur est localisée à un endroit précis du corps, elle consiste à enlever la quasi-totalité des cellules cancéreuses pour permettre de soulager les symptômes et de réduire les risques de propagation chez le patient (**Auckland, 2008; Lefferts et al., 2008**). Dans le but d'améliorer son efficacité et s'assurer que la tumeur soit entièrement éliminée, l'intervention est souvent associée à un autre traitement, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie. Parmi ses inconvénients, la douleur, non appropriée pour les cas invasifs (cellules cancéreuses diffuses) et risque d'infection élevé chez des patients à système immunitaire fragile (**Givel et al., 2007**). En effet, le procédé chirurgical localisé ne permet pas la suppression des cellules cancéreuses qui auraient accédé à d'autres organes sous la forme de métastases (**Descôteaux, 2013**).

I.3-2- Chimiothérapie

La chimiothérapie tient une place importante dans le traitement des cancers, elle utilise des substances chimiques, qualifiées de cytotoxiques, pour tuer les cellules cancéreuses ou bloquer leur multiplication (**Huber-Habart *et al.*, 1987**). Elle est également utilisée pour réduire la taille de la tumeur trop volumineuse et faciliter ainsi son traitement par la chirurgie (**Chabner et Roberts, 2005**).

Un grand nombre d'antinéoplasiques sont actuellement disponibles d'origines naturelles ou synthétiques très variées. Cependant leur mode d'action peut affecter les cellules saines du corps, provoquant ainsi des effets secondaires indésirables chez les patients.

I.3-3- Radiothérapie

La radiothérapie est une des thérapies curatrices essentielles en oncologie et qui concerne pratiquement près d'un patient sur deux (**Andrieu, 1987**). Elle consiste à utiliser les propriétés des rayonnements ionisants pour induire la mort des cellules cancéreuses tout en préservant, autant que possible, les tissus sains et les organes avoisinants.

La radiothérapie agit en ionisant les acides nucléiques (ADN et ARN) des cellules. Elle s'applique à la fois sur la tumeur primitive et sur les territoires ganglionnaires (**Meyer *et al.*, 2007**). Comme la chimiothérapie et la chirurgie, la radiothérapie peut être dangereuse en cas de complications. Les effets secondaires dépendent souvent de la zone irradiée et de la dose appliquée.

II. Effets biologiques des rayonnements ionisants

II.1- Définition d'un rayonnement ionisant

Le rayonnement ionisant est tout rayonnement avec suffisamment d'énergie susceptible d'arracher des électrons aux atomes constituant la matière qu'il traverse. Cette énergie émise caractérise les radioéléments, elle s'exprime en électron volts (eV) à l'échelle des particules élémentaires (**Blanc, 1990**).

II.2- Classification des rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants, suivant leur nature, sont classés en deux catégories (**Tubiana *et al.*, 2008**) :

- **Les rayonnements directement ionisants** : ce sont des rayonnements formés de particules chargées (électrons, particules α et β , proton...) entourées d'un champ électrique qui permet de donner naissance à des ions et à des atomes excités répartis d'une façon plus ou moins dense le long de la trajectoire de la particule incidente lors des chocs avec la matière.

- **Les rayonnements indirectement ionisants** : ils sont électriquement neutre et susceptibles de transférer une importante fraction ou la totalité de leur énergie en une seule interaction à des particules chargées ; les rayonnements électromagnétiques (X et gamma) et les neutrons rentrent dans cette catégorie.

Comparés à d'autres types de rayonnements comme les ultraviolets, les rayonnements ionisants déposent relativement une grande quantité d'énergie dans un petit volume de

matière. Leurs interactions avec la matière induisent une perte progressive d'énergie par le biais de deux processus ; l'excitation et l'ionisation.

L'excitation : lorsque l'interaction est insuffisante pour créer une ionisation, il y a seulement excitation : l'électron change d'état quantique, l'excitation le fait passer d'un état initial à un état final moins lié. Pour les cibles radiobiologiques ce processus est peu probable.

L'ionisation : lorsque l'interaction est assez intense, le transfert d'énergie peut être suffisant pour arracher un électron de l'atome cible, et par conséquent il y a création d'une paire d'ions (ion positif et électron) dans le milieu.

II.3- Caractéristiques d'une irradiation

L'irradiation est caractérisé par des grandeurs et unités dosimétriques (**Gremy et Perrin, 1977**) tels que:

- **Dose absorbée** : exprime la quantité d'énergie moyenne déposée en un point par le rayonnement. Depuis 1975 l'unité légale de mesure est le **Gray** (Gy) remplaçant le rad (Radiation absorbed dose) $1\text{Gy}=1\text{J/kg}=100\text{ rads}$

-**Débit de dose** : correspond à la dose délivrée par unité de temps (Gy/min), exprimé en (Gy /min ou rad /min) (**ICRP, 1991**)

- **Equivalent de dose** : C'est la dose absorbée en moyenne par tout un tissu ou organe (par opposition à la dose absorbée en un point) et pondérée en fonction du facteur de qualité du rayonnement considéré. L'équivalent de dose est exprimé en joules par kilogramme (J kg^{-1}), l'unité spécifique étant le sievert (Sv).

- **Transfert linéique d'énergie (TLE)**: C'est l'énergie qu'une particule chargée transmet à la matière qu'elle traverse par unité de longueur de la trajectoire suivie, il s'exprime en joules par mètre (J m^{-1}).

II.4-Mécanismes d'action

Les rayonnements ionisants induisent, de façon dose-dépendante, jusqu'à un certain seuil, la mort cellulaire, des dommages d'ADN, des perturbations de la physiologie et de la différenciation cellulaire, et peuvent provoquer la sénescence ou initier une préneoplasie.

La formation et l'accumulation de molécules ionisées instables dans la matière vivante favorisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la décomposition de molécules d'eau au cours d'un processus appelé la radiolyse de l'eau. L'augmentation considérable de ces radicaux libres instables de type $\text{O}_2^{\cdot-}$, H^{\cdot} , HO^{\cdot} au sein du tissu irradié induit d'importants dommages moléculaires et cellulaires. Au niveau membranaire les ROS vont engendrer des changements structurels et conformationnels des composants cellulaires majeurs dont les protéines et les lipides (peroxydation lipidique) (**Poli et al. 1997 ; Dumont et al., 2009**).

En fonction de la dose, le rayonnement induit directement ou indirectement des dommages à l'ADN (figure 2a) (**Hall, 1994**). Ces dommages dépendent de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule au moment de l'irradiation. Les cassures induisent un arrêt temporaire du cycle en phase G1, S ou G2 au niveau de points de contrôle (figure 2b).

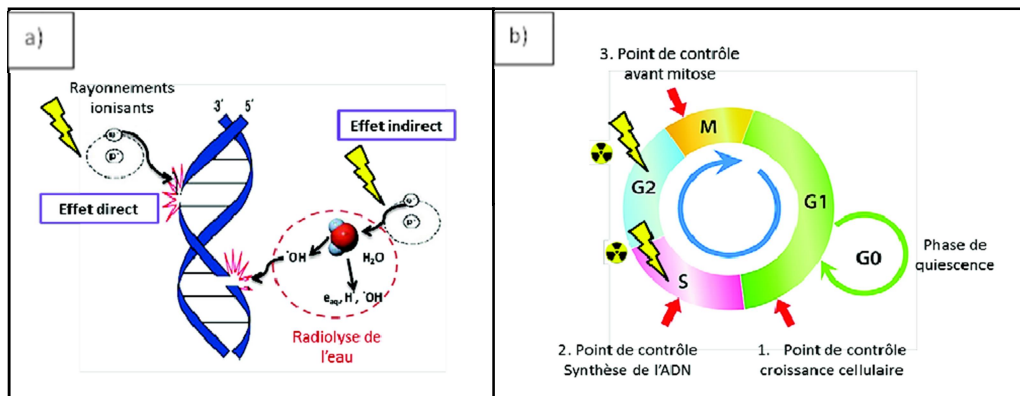


Figure 2: Conséquences cellulaires des rayonnements ionisants (Hall, 1994): a) Effets directs et indirects sur l'ADN; b) Etapes du cycle cellulaire impactées après irradiation.

Ces lésions, que ce soit des dégradations, disparitions de bases, cassures de l'un ou des deux brins de la chaîne d'ADN, ou encore des pontages entre cette molécule et certaines protéines perturberont la conservation du patrimoine génétique (Figure 3).

Les ruptures des brins sont les lésions les mieux connues et les plus fréquentes in-vitro, qui apparaissent principalement par l'intermédiaire de l'effet indirect des rayonnements.

Parmi les lésions d'ADN, les cassures double-brin se sont révélées être les déterminants majeurs de la mort cellulaire radioinduite.

Les destructions des sucres sont des altérations beaucoup moins connues et moins fréquentes que les lésions précédentes. Cependant, les sucres peuvent être oxydés puis hydrolysés. Ces réactions s'accompagnent de la libération de la base et éventuellement d'une rupture de la liaison phosphodiester qui lie deux nucléotides entre eux.

Les pontages peuvent avoir lieu dans l'hélice. Ils sont de deux types, les pontages intra-brins et inter-brins. La réponse cellulaire immédiate est la stimulation de la machinerie de réparation de l'ADN et l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire (checkpoint). Ceci bloque de façon temporaire le cycle cellulaire lors des transitions entre les phases G1, S et/ou G2/M afin de permettre la réparation des dommages (Turesson *et al.* 2003). En fonction de l'efficacité de réparation, la cellule reprend son fonctionnement normal ou enclenchera des processus d'apoptose, de différenciation ou de sénescence (Hamdi, 2016).

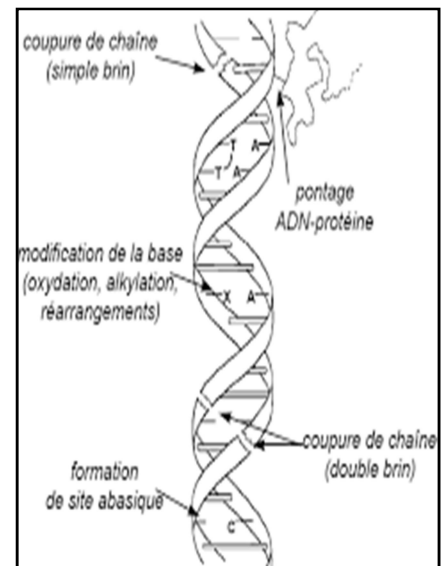


Figure 3: Lésions radio-induites de l'ADN (Téoule et Duplaa, 1987)

II.5- Mécanismes de réparation des lésions radio-induites

Différents mécanismes de réparation des lésions radio-induites sont activés en fonction de la nature de la lésion. Les cassures doubles brin (CDB) très létales ainsi que les cassures simples

brin (CSB) moins dangereuses doivent être réparés pour maintenir l'intégrité génomique et prévenir la mort cellulaire (figure 4).

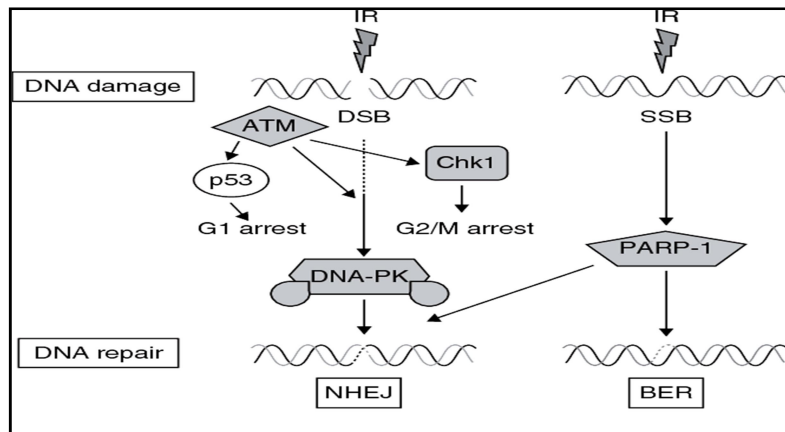


Figure 4: Modèle simplifié des mécanismes cellulaires de réparation des lésions radioinduites de l'ADN (Dumont *et al.*, 2009).

Les CDB sont détectés par la ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) Kinase (Savitsky *et al.*, 1995), qui phosphoryle une série d'effecteurs en aval dans une cascade de signalisation qui coordonne l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Dans les cellules exprimant la protéine suppressive de tumeur p53 fonctionnelle, le cycle cellulaire est interrompu en G1. Par contre dans les cellules où la p53 est dysfonctionnel, l'ATM agit via Checkpoint kinase (Chk1) pour induire un arrêt du cycle en G2-M.

La réparation des CDB radio-induites se produit principalement par le processus de recombinaison non homologue (NHEJ) médié par la sous-unité catalytique de la DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) (Wu *et al.*, 2008).

La réparation des CSB se fait principalement par le processus de réparation par excision de base (BER) réalisé par PARP-1, une enzyme qui contribue également à la réparation des CDB par le biais d'un mécanisme de sauvegarde NHEJ (Dumont *et al.*, 2009).

Notez que les CDB peuvent également être réparé d'une manière dépendante de l'ATM par le processus de recombinaison homologue.

L'inefficacité de ces mécanismes de réparation conduit en général à la mort cellulaire (Jeggio *et Lavin*, 2009). En revanche, la tolérance des lésions secondaires à une irradiation peut mener à une instabilité génomique faisant le lit des mécanismes d'oncogenèse et donc de tumeurs radio-induites.

II-6- Mort cellulaire radio induite

Les différents types de mort cellulaire peuvent être classés en fonction de leurs aspects morphologiques (apoptotique, nécrotique, autophagique ou associé à la mitose) ou leurs aspects fonctionnels (mort programmée ou accidentelle, physiologique ou pathologique) (Melino *et al.*, 2001 ; Kroemer *et al.*, 2009).

En l'absence d'événements biochimiques clairement identifiés comme des points de non retour, le NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) considère une cellule comme étant morte dès lors qu'elle présente l'un des critères moléculaires ou morphologiques suivants :

- 1) Perte de l'intégrité de la membrane plasmique,
- 2) Fragmentation complète en corps apoptotiques de la cellule et même de son noyau.
- 3) Ingestion par des cellules adjacentes in vivo de la cellule ou de ces fragments.

L'apoptose est le mode principal de mort en réponse à une irradiation chez les cellules naturellement sujettes à l'apoptose, telles que les cellules hématopoïétiques et les cellules tumorales qui en dérivent (**Jonathan et al., 1999**).

On constate fréquemment, pour les cellules issues de tumeurs solides, une perte du potentiel apoptotique par différents mécanismes tels qu'une mutation du gène P53 (**Hollstein et al., 1997**) et même en l'absence de mutation P53, d'autres altérations des mécanismes de l'apoptose empêchent son déroulement normal telles que l'hyperexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, survivine) ou encore l'inactivation de gènes pro-apoptotiques tels que BAX, BAK ou APAF1 (**Igney et Krammer, 2002**).

Outre l'apoptose radio-induite, deux autres modes de mort cellulaire radio-induite ont été décrits: principalement la mort mitotique (**Ianzini et Mackey, 1998**), et dans une moindre mesure, la sénescence radio-induite (**Jones et al., 2005**). La susceptibilité d'induction des différents types de mort cellulaire radio-induite dépend fortement de l'irradiation, du type cellulaire et du contexte (environnement, modèle expérimental, etc. . .) (**Mutter et al., 2000**).

II.6-1-Implication de l'apoptose au cours d'une irradiation

Le facteur de transcription « protéine p53 » contrôle des gènes cibles impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la sénescence (**Efeyan et Serrano, 2007**). L'activation de p53 à la suite d'une irradiation, conduit à un arrêt de la croissance de la cellule et une réparation de l'ADN. Cependant, la protéine p53 peut également déclencher la mort de la cellule par apoptose ou sénescence en fonction de l'étendue des dommages cellulaires en particulier de l'ADN et des capacités de réparation de la cellule (**Helton et Chen, 2007**).

En plus de la p53, de nombreux cofacteurs régulent des gènes cibles influençant la réponse cellulaire à l'irradiation, en particulier une sérine/thréonine kinase ATM dont l'activité est augmentée après irradiation et cassures double-brin de l'ADN (**Komatsu et al., 1990**), et induit la phosphorylation de la p53. Ainsi l'ATM régule en partie l'apoptose radio-induite via la protéine p53 (**Bakkenist et Kastan, 2003**).

II.6-2- La mort mitotique radio-induite

La catastrophe mitotique est un des types de mort cellulaire les plus fréquemment rencontré dans les tumeurs solides en réponse à une irradiation (**Jonathan et al., 1999**).

C'est l'entrée prématurée ou inadaptée de la cellule en mitose suite à des dommages radio-induits de l'ADN (**Vitale et al., 2011**). Elle est caractéristique de nombreuses tumeurs mutées pour p53. Elle se caractérise par l'absence de blocage radio-induit à la transition G1/S, l'absence d'apoptose interphasique au niveau de cette transition, puis un retard dans l'induction du blocage à la transition G2/M qui provoque une succession de mitoses aberrantes et la mort mitotique proprement dite (**Richards et al., 2002**). Des données récentes démontrent que la mort mitotique s'accompagne du déclenchement de processus apoptotiques, et suggèrent que la mort mitotique ne serait en fait qu'un type d'apoptose radio-induite (**Diehn et al., 2003**).

II.6-3- La sénescence radio-induite

La sénescence correspond à un arrêt permanent du cycle cellulaire. Elle est observée in vitro et in vivo dans des tumeurs traitées par des agents induisant des lésions de l'ADN (**Chang et al., 1999; Mirzayans et al., 2005**).

L'arrêt du cycle cellulaire permet la réparation de ces lésions. Si celle-ci ne peut pas s'effectuer, la cellule meurt par apoptose (mécanismes dépendant de p53) ou meurt par catastrophe mitotique (mécanismes indépendant de p53) ou active un signal de dommage de l'ADN persistant et chronique conduisant à la sénescence (**Rodier et al., 2009**).

II.7- Radiorésistance et radiosensibilité

Du fait de la résistance de certaines tumeurs aux radiations, nécessitant des doses délivrées intolérables aux tissus sains environnants, de nombreux développements sont en cours pour limiter la dose délivrée et augmenter la sensibilité aux traitements.

La radiosensibilité cellulaire se définit comme la probabilité de perte de la capacité de prolifération par unité de dose d'une cellule soumise à un rayonnement. Certains médicaments de chimiothérapie peuvent être donnés en même temps qu'une radiothérapie, pour rendre les cellules cancéreuses plus sensibles aux rayons et augmentent ainsi leur efficacité (**Conti et al., 2018**). On parle alors de radiosensibilisation ou de médicaments radiosensibilisateurs. L'association, qu'on appelle radio-chimio-thérapie concomitante, est particulièrement utilisée dans le traitement des cancers bronchiques localement avancés, cancers ORL, du canal anal, de l'œsophage ou encore du col de l'utérus.

II.7-1- Facteurs de radiosensibilité des tumeurs humaines

Une tumeur est considérée cliniquement comme peu sensible aux rayonnements ionisants, s'il survient une récurrence dans le volume irradié après qu'il y a eu régression de la tumeur ou lorsque l'irradiation n'a pu permettre la régression de cette tumeur. Différents travaux ont relié la modulation de la radiosensibilité clinique à certaines caractéristiques liées à la tumeur :

Le nombre de cellules clonogéniques: cellule capable d'établir un nouveau clone de cellules tumorales et régénérer la tumeur. Plus la tumeur contient de cellules clonogéniques et moins elle est radio curable.

Le facteur oxygène: le manque d'oxygène (hypoxie) est un facteur témoin de la diminution de la radiosensibilité. Une tumeur est d'autant moins radiocurable qu'elle contient plus de cellules hypoxiques (**Nordmark et al., 2005**).

La cinétique de prolifération: la cinétique de prolifération des cellules tumorales influe sur la survie après irradiation. Les tumeurs présentant un pourcentage élevé de cellules en prolifération et un taux de perte cellulaire important sont celles qui sont les plus radiosensibles et les plus radio curables (**Kim et Tannock, 2005**).

La radiosensibilité intrinsèque: la radiosensibilité intrinsèque correspond à la mise en place de mécanismes moléculaires qui permettent à la cellule de résister aux rayonnements (**Milia, 2005**). Le concept de radiosensibilité intrinsèque introduit par Fertil et Malaise (**Fertil et Malaise, 1985**), peut être étudié par l'établissement de courbes de survie en fonction de la dose unique délivrée (**West et al., 1993**).

D'autres facteurs identifiés plus récemment contribueraient également à la radiorésistance, tels que la vascularisation tumorale (micro-environnement) (**Kioi et al., 2010**), des facteurs dépendants de l'hôte (cellules inflammatoires intra-tumorales) (**Ahn, 2010**) et probablement l'hétérogénéité tumorale. Moduler chacun des facteurs biologiques pourrait ainsi augmenter la radiosensibilité des tumeurs, d'où l'intérêt des traitements combinés.

II.8- Les traitements concomitants

La médecine intégrative démontre que le meilleur moyen de gagner la bataille contre le cancer consiste à attaquer sous des angles multiples en utilisant des thérapies et des traitements anti-cancer synergiques.

Le traitement de certaines tumeurs reste parfois très limité en raison de leur faible sensibilité aux radiations ionisantes ou de leur localisation critique.

Néanmoins, la concomitance des protocoles de chimio-radiothérapie a fait preuve d'une grande efficacité dans la prise en charge des tumeurs solides radiorésistantes.

De nombreuses molécules radiosensibilisatrices sont étudiées afin d'améliorer la radiosensibilité de certaines tumeurs ou encore lever leur radiorésistance et par conséquent améliorer l'efficacité de la radiothérapie clinique. .

L'astaxanthine s'est révélée efficace pour augmenter la radiosensibilité du carcinome épidermoïde œsophagien en provoquant l'apoptose et l'arrêt du cycle en G2/M par l'inhibition de Bcl-2, Cyclin B1, Cdc2, et l'expression Bax (**Qian et al., 2017**).

Il a été constaté que la pectine de citrus modifiée (MCP) sensibilisait les cellules PCa du cancer de la prostate à la doxorubicine et les cellules cancéreuses ovariennes au paclitaxel (**Hossein et al., 2013**).

Les composés naturels de plantes fournissent une importante source de nouveaux agents radiosensibilisants avec peu ou pas de toxicité, ce qui constitue une avancée dans le domaine de la radio-oncologie.

III. La pectine

Plusieurs études ont montré que le monde végétal est très riche en molécules bioactives. Parmi elles, les pectines qui sont des polysaccharides entrant dans la composition des parois cellulaires (figure 5) de la plupart des plantes supérieures (**Alkorta et al, 1998**). Elles se trouvent principalement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des plantes supérieures (**Paquot et al., 2007**).

La demande en pectine sur le marché mondial est au-dessus de 30.000 tonnes annuellement et se développe d'environ 4-5%/an (**Yeoh et al., 2008**). L'Algérie compte parmi les importateurs de pectines, la quantité importée atteint 10 tonnes/an (**Benchabane, 1984**); malgré qu'elle dispose des ressources fruitières importantes, offrant des possibilités de

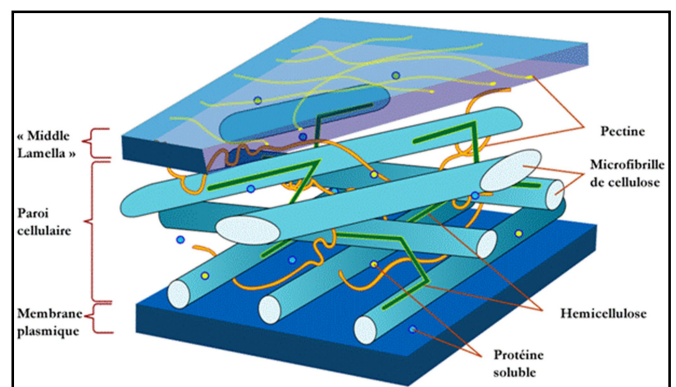


Figure 5: Représentation schématique de la paroi d'une cellule végétale montrant la localisation de la pectine (**Pérez et Mazeau, 2005**)

transformation très larges aux industries (517 milles tonnes d'agrumes produites en Algérie, occupant la 18^{ème} place mondiale (FAO, 2013). Grâce à cette richesse et au développement de l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, un intérêt scientifique considérable est porté pour l'extraction de la pectine à partir des agrumes.

III.1- Localisation et principales sources de pectines

Parmi les fruits les plus riches en cette molécule prometteuse de grade thérapeutique, on trouve les pépins et les zestes de groseilles, les pommes, les coings et les **pêches** (Sundari, 2015). C'est dans la **pelure des agrumes** qu'on en trouve proportionnellement le plus, par rapport au poids du fruit (Tableau I). Cependant, la quantité de substances pectiques dans le végétal varie fortement en fonction de son origine botanique et de son stade de maturité (Michel, 2002).

Tableau I-Principales sources de pectines d'intérêt industriel (Paquot *et al.*, 2010)

Fruit	Teneur en substances pectiques (%)
Zeste d'orange	3,5-5,5
Pulpe de citron	2,5-4,0
Pomme	0,5-1,6
Banane	0,7-1,2
Pêche	0,1-0,9
Fraise	0,6-0,7
Tomate	0,2-0,6
Carotte	0,2-0,5
fruit de passion	0,5
Mangue	0,26-0,42
Ananas	0,04-0,13

III.2- Structure chimique des pectines

Ces polysaccharides complexes participent à la cohésion de la cellule, et au maintien des parois par le biais d'interactions mécaniques et chimiques avec les autres constituants de la paroi (Donato, 2004).

Les pectines sont des hétéro-polysaccharides caractérisés par une forte teneur en acide galacturonique (GalA), monomères liés entre eux par des liaisons α -(1-4) et partiellement acétylés ou estérifiés par des groupements méthyles (figure 6). Elles sont composées de différents polysaccharides associés : les homogalacturonanes, les xylogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes, les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes. Cette association permet de décrire les pectines comme étant constituées essentiellement de trois domaines distincts, à savoir l'homogalacturonane et les rhamnogalacturonanes I et II (RG-I et RG-II) (Zhang *et al.*, 2015).

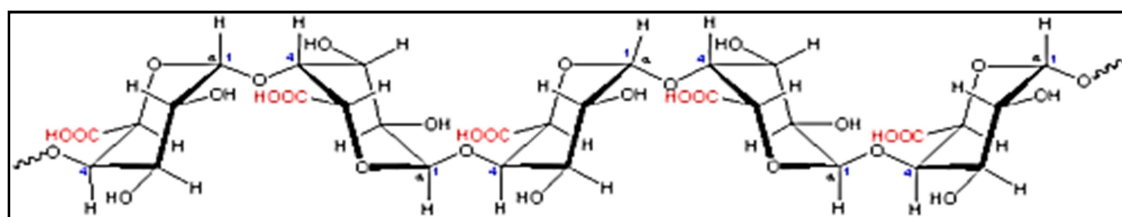


Figure 6: Structure chimique de la molécule de pectine (Walstra, 2003)

Le long de la chaîne principale, est présente toute une série de substitutions qui en font rarement une structure homogalacturonique simple. Les fonctions acides carboxyliques sont plus ou moins estérifiées par du méthanol (Fishman *et al.*, 1986).

III.3- Propriétés physico-chimique de la pectine

Les pectines présentent des propriétés physico-chimiques spécifiques du fait de leur caractère poly-électrolyte.

Le Degré d'Estérification (DE) des pectines: est le nombre de fonctions carboxyliques méthylées pour cent motifs d'acide galacturonique de la chaîne principale, qui peut varier selon la source, le stade de développement et de la méthode d'extraction utilisée (Levigne *et al.*, 2002 a).

Ainsi, en fonction du DE, on distingue :

- les pectines hautement méthylées (HM) : leurs degré d'estérification est supérieur à 50 % ;
- les pectines faiblement méthylées (LM) : leurs degré d'estérification est inférieur à 50 %.

C'est un paramètre important qui influe sur le processus et le mécanisme d'association des pectines dans la formation des gels. Les pectines HM forment des gels en présence de sucres neutres ou en milieu acide, alors que les LM forment des gels en présence de calcium.

Ces propriétés font que les pectines sont d'une importance considérable pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et biotechnologiques (Willats *et al.*, 2006 ; Fang *et al.*, 2008).

La solubilité des pectines : est aussi conditionnée par un certain nombre de facteurs liés essentiellement à leurs structures et notamment leur masse moléculaire, l'importance de leur taux de ramification, la valeur de leur degré de méthyl-estérification ainsi que la répartition des groupements méthyl-ester le long de la chaîne pectique. Ainsi, il est admis qu'une pectine sera d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible, que sa structure est fortement ramifiée et que ces fonctions carboxyliques sont engagées dans une estérification avec le méthanol (Thakuret *et al.*, 1997).

La masse moléculaire : les propriétés physiques des pectines dépendent fortement de sa masse moléculaire (Guillot *et al.*, 2007). Sa détermination est un problème difficile en raison de l'hétérogénéité de la plupart des échantillons et de la présence assez générale d'agrégats. La masse moléculaire des pectines dépend non seulement de la méthode utilisée pour la déterminer, mais aussi du type de matière première utilisée et des conditions d'extractions choisies.

III.4- Procédés de modification de la pectine

III.4-1- Extraction

Comme il a été déjà souligné, les propriétés physiques de la pectine dépendent fortement des conditions de son extraction (Levigne *et al.*, 2002 b), d'où l'importance du choix de ces dernières qui doivent être soigneusement contrôlé pour atteindre le résultat final souhaité.

Dans l'industrie alimentaire, les procédures d'extraction des pectines sont généralement optimisées pour améliorer non seulement le rendement mais également conserver une teneur

élevée en esters méthyliques, ce qui génère une propriété fonctionnelle gélifiante caractéristique des pectines.

Les écorces de citron et les pulpes de pomme sont généralement utilisées en tant que matières premières pour l'extraction de pectine en adoptant des méthodes physiques, chimiques ou enzymatiques. Les méthodes physiques, telles que l'extrusion-cuisson ou l'extraction assistée par micro-onde, peuvent être employées (Panouillé *et al.*, 2006).

Les méthodes industrielles impliquent généralement le traitement acide (pH 1,5-3) à température élevée (70 à 90 °C), en utilisant l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique ou, dans certains cas, l'acide sulfurique (Lopes da Silva et Rao, 2006).

L'extrait de pectine est alors séparé des résidus de l'écorce ou de pulpe par des procédés de filtration ou de centrifugation. La pectine est alors séparée de l'extrait purifié par précipitation avec de l'alcool (isopropanol, éthanol, ou méthanol) ou par la précipitation avec des sels insolubles, par l'addition d'un cation polyvalent, habituellement l'aluminium (Lopes da Silva et Rao, 2006). Le précipité obtenu est lavé avec de l'alcool et filtré pour enlever les impuretés solubles, et finalement séché et broyé en poudre.

III.4-2- Modification physico-chimique de la pectine

La structure polysaccharidique ramifiée de la pectine native peut être changée pour produire une pectine modifiée (figure 7), faiblement méthylée, de poids moléculaire inférieur, riche en galactose, qui a des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques importantes, principalement dans la prévention du cancer.

Les structure plus petites et plus courtes de ces molécules leurs permettent d'accéder et se lier étroitement aux galectines retrouvées à la surface des cellules cancéreuses.

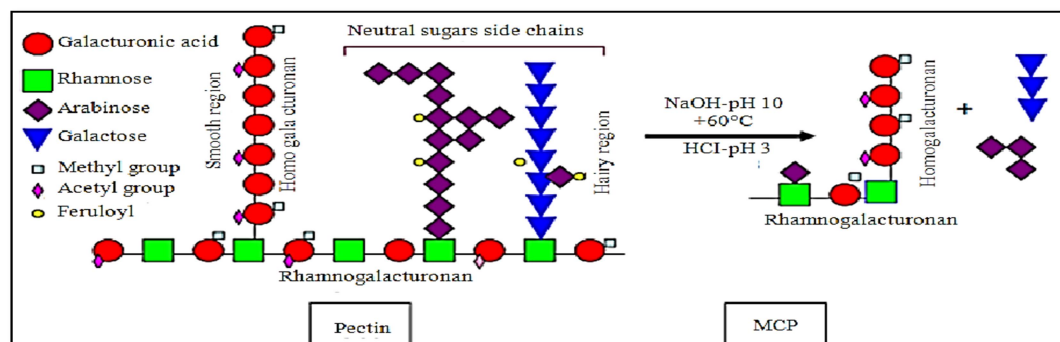


Figure 7: Diagramme représentatif des différents composants de la molécule de pectine (Vincken *et al.*, 2003) et la préparation de la pectine modifiée (MCP) (Pienta *et al.*, 1995).

En laboratoire, différents procédés de transformation des pectines ont été mis au point pour augmenter leurs potentialités en tant que molécules bioactives (figure 8).

Il peut s'agir d'un traitement chimique utilisant des acides dilués ou concentrés, un pH acide ou alcalin chauffés entre 40 et 90°C (Cardoso *et al.*, 2003). Certains traitements physiques peuvent également être utilisés : thermique, micro-ondes, irradiation γ et ultra-sonication (Barreteau *et al.*, 2006 ; Courtois, 2009). L'irradiation Gamma induit principalement la formation de radicaux hydroxyles libres qui catalysent la dépolymérisation du polysaccharide (Courtois, 2009).

Il est indiqué que la pectine la plus efficace pour lier les molécules de galectine-3 est une pectine à faible DE (ayant un degré d'estérification inférieur à 50%). Le degré d'estérification est une mesure qui dicte sa capacité à se lier efficacement aux galectines. En termes simples, une estérification à 10% signifie que dix molécules de galactose sur cent sont liées (ou méthylées) et que les 90 autres sont libres donc disponibles pour se lier aux galectines et induire leur inhibition (Hartati et Kurniasari, 2011; Hartati *et al.*, 2011).

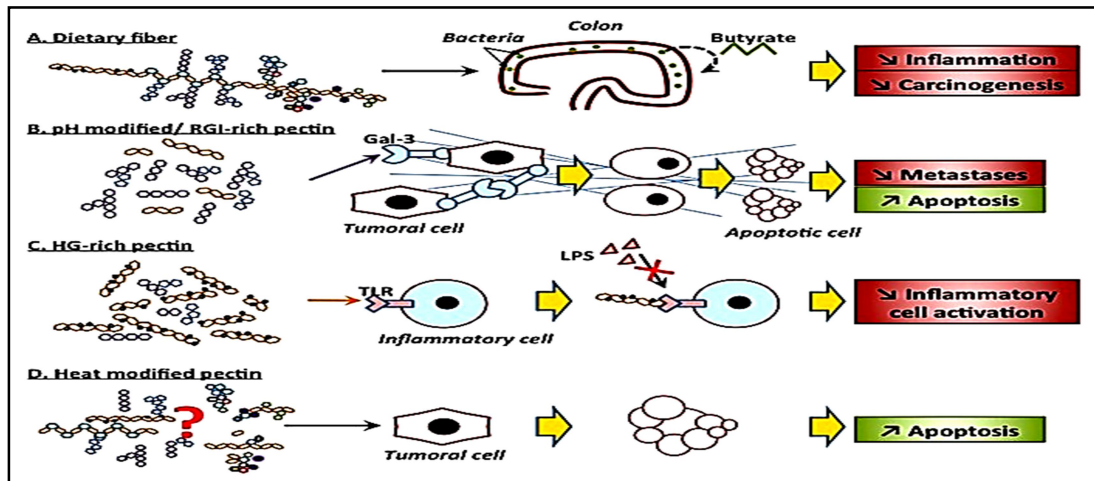


Figure 8: Représentation schématique des activités anti-cancéreuses des différentes formes de pectine (Leclere *et al.*, 2013)

Pour produire une pectine à faible DE, une hydrolyse acide est couramment appliquée durant l'extraction pour éliminer certains groupements esters. Un traitement alcalin peut également être utilisée à cette même fin, mais à basse température (<10 ° C). Lorsque l'ammoniac est utilisé pour l'hydrolyse alcaline, une partie des groupements ester est remplacée par un amide et des pectines amidées sont obtenues (Hartati et Kurniasari, 2011).

IV. Action de la pectine

IV.1- Pectine et Cancer

Certains polysaccharides tels que les glucanes, glycanes, galactomannanes, pectines, et autres de plantes et de champignons ont longtemps été utilisés dans le monde entier pour leurs vertus médicinales et diététiques. Des études récentes ont montré les effets anticancéreux de certains polysaccharides (Mao *et al.*, 2011; Joseph *et al.*, 2013), notamment du cancer de la prostate, du colon (Olano-Martin *et al.*, 2003 ; Glinisky and Raz, 2009) et de la peau (Platt et Raz, 1992). De plus, il a été démontré que la pectine modifiée du citron sensibilisait les cellules PCa du cancer de la prostate aux rayonnements ionisants en réduisant la régulation anti-apoptotique de la galectine-3, en modulant les voies de réparation de l'ADN et en augmentant la production des ROS (Conti *et al.*, 2018).

La majeure partie des études portant sur l'effet anticancéreux de la pectine se concentrent sur sa capacité apparente à se lier à la galectine-3.

IV.2- Les galectines-3

IV.2-1- Définition

La galectine-3 (Gal-3) est un membre de la famille des galectines, sa présence avait été suggérée dès 1981 par la découverte d'une activité lectine à la surface des cellules tumorales. C'est une protéine d'un poids moléculaire se situant entre 29 et 35 kDa, ayant une affinité pour les β -galactosides via un site spécifique qui est le domaine de reconnaissance des glucides (CRD) (Barondes *et al.*, 1994 a et b). Séparées en trois sous-familles (figure 9), les galectines sont similaires par le haut niveau de conservation d'environ 130 acides aminés, à partir de leur extrémité C-terminale. Cette séquence forme une poche, le CRD, responsable de l'attachement d'un sucre ou, de façon plus physiologique, d'une protéine glycosylée.

La Gal-3 dite chimérique ne possède qu'un CRD et détient une elongation peptidique non-lectine en N-terminal qui lui permet de s'oligomériser et former des pentamères (Yang *et al.*, 2008).

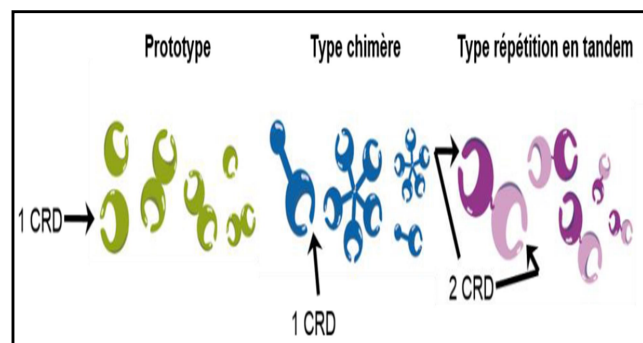


Figure 9: Classification des galectines (Yang *et al.*, 2008)

IV.2-2- Distribution et rôle physiologique des galectines-3

Des études ont démontré que la présence de la Gal-3 et de son ligand induit l'agrégation cellulaire (Inohara *et al.*, 1996). Leur liaison est CRD-dépendante et se produit à la surface des cellules par différents mécanismes (Figure 10), selon leur emplacement cellulaire :

a) Dans l'espace extracellulaire : historiquement, les galectines sont surtout connues pour leurs fonctions extracellulaires via leur attachement aux chaînes de sucres situées sur les récepteurs membranaires, ce qui a pour fonction l'adhésion intercellulaire, que ce soit homo ou hétérotypique. La liaison de Gal-3 à ces substrats peut induire des interactions protéiques de surface, des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire, qui peuvent toutes mener à l'initiation de la signalisation en aval (Vasta *et al.*, 2012).

b) Au niveau intracellulaire : Gal-3 se lie à ses substrats par des interactions protéines-protéines directes entre Gal-3 et le substrat. Ce qui explique le rôle de la Gal-3 dans la suppression de la tumeur.

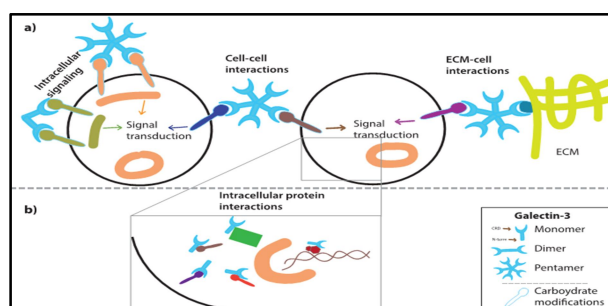


Figure 10: Mécanismes de liaison de la Galectine-3 (Farhad *et al.*, 2018)

IV.2-3- Rôle de la Gal-3 dans la progression tumorale

La communication cellulaire via les galectines permet aux cellules de se relayer les messages. Ce processus est parfaitement sain dans les cellules normales, où le nombre de galectines de surface est relativement faible.

Les cellules cancéreuses, quant à elles, portent un nombre disproportionné de ces galectines spécifiquement la Gal-3 qui favorise la progression du cancer de trois manières reliées (Maxwell, 2014), en permettant aux :

- cellules cancéreuses de s'attacher les unes aux autres, formant des groupes capables de survivre dans l'organisme.
- cellules cancéreuses qui ont formés la tumeur principale de s'attacher à de nouveaux sites et former des tumeurs secondaires
- vaisseaux sanguins néoformés de se développer et ainsi d'activer le processus d'angiogenèse afin de nourrir les cellules cancéreuses.

L'inhibition du Gal-3 dans les tumeurs solides en association avec des lymphocytes T ou de leurs agonistes permet d'augmenter la capacité de l'immunité anti-tumorale et ainsi améliorer la régression tumorale (Maxwell, 2014).

La figure 11 montre l'influence de Gal-3 extracellulaire sur les cellules immunitaires. La Gal-3 sécrétée par les cellules tumorales polarise les macrophages M1 (anti-tumoraux) en macrophages M2 (pro-tumoraux), supprime les lymphocytes T CD4 et/ou CD8.

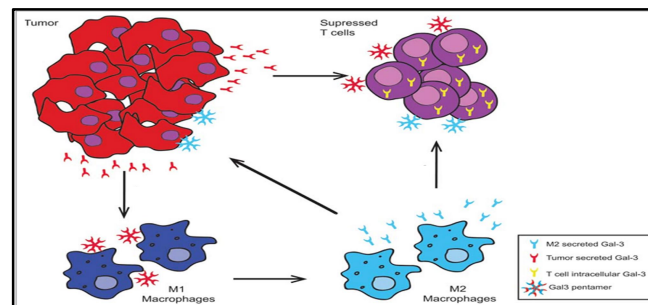


Figure 11 : Impact de la Gal-3 sur l'immunosuppression au sein d'une tumeur (Farhad *et al.*, 2018)

IV.2-4- Le processus apoptotique et la galectine-3

La Gal-3 fait partie des protéines ayant la propriété d'inhiber la mort cellulaire et sont régulées à la hausse ou localisées selon leurs actions intracellulaires, en particulier en cas d'apoptose, ou la cellule cancéreuse doit contrer les traitements chimiothérapeutiques et de radiothérapie (Nakahara *et al.*, 2005). La structure des Gal-3 comporte des éléments ayant une similitude indéniable à certains membres de la famille Bcl-2 et ainsi lui confère l'activité antiapoptotique caractéristique de ce groupe de protéines (Yin *et al.*, 1994).

La Gal-3 peut également agir sur la voie PI3K/Akt (figure 12). Song et ses collaborateurs ont démontré que la dérégulation de Gal-3 dans les cellules cancéreuses du côlon a entraîné une réduction de la phosphorylation de l'Akt, une augmentation de l'activité de la GSK3 β (Shimura *et al.*, 2005) et par conséquent, de la phosphorylation de la β -caténine et de ses protéines de dégradation entraînant une réduction de la prolifération cellulaire (Song *et al.*, 2007).

Un autre ligand associé à Gal-3 est KRas, une protéine cruciale dans la régulation d'une multitude d'effecteurs, dont Raf et PI3K, acteurs essentiels de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de la survie et de la mort (Shalom-Feuerstein *et al.*, 2008).

De plus, l'équipe de Hyeong-Reh Choi Kim a observé une accumulation de la protéine à la membrane mitochondriale (organelle indispensable au processus de la mort cellulaire programmée) (Yu *et al.*, 2002). Cette accumulation de la Gal-3 prévient les dommages aux mitochondries et la relâche du cytochrome c, qui induirait l'apoptose.

Un modèle de régulation des voies de signalisation intrinsèques et extrinsèques par la Gal-3 est représenté dans la figure 12.

IV.2-5- Potentiel thérapeutique de l'inhibition des galectines-3

Le développement de thérapies contre l'activité des galectines a été fortement encouragé après la constatation qu'un organisme est viable et ne présente que quelques anomalies en l'absence d'un membre de la famille de lectines (Gal-3) (Advedissian *et al.*, 2015). Ce qui rend les Gal-3 une cible thérapeutique de choix dans le monde moderne.

En effet, Sur la base des modèles pré-cliniques actuels, le développement d'inhibiteurs pharmacologiques ou de modulateurs efficaces de galectines spécifiques jouera un rôle crucial dans le traitement du cancer.

En outre, Gal-3 s'est révélé capable de contrôler la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie grâce à la régulation des réponses apoptotiques aux médicaments cytotoxiques (Nakahara *et al.*, 2006 ; Fukumori *et al.*, 2006).

Parmi ces inhibiteurs, la pectine, sa forte teneur en β -galactose serait responsable de son effet thérapeutique inhibiteur de la Gal-3. En effet, la structure moléculaire de la pectine en fait une arme essentielle dans ce processus inhibiteur en liant la Gal-3, cela peut empêcher la capacité d'adhésion, d'agrégation et de métastatisation des cellules transformées (Wang, 2002; Sharma *et al.*, 2008).

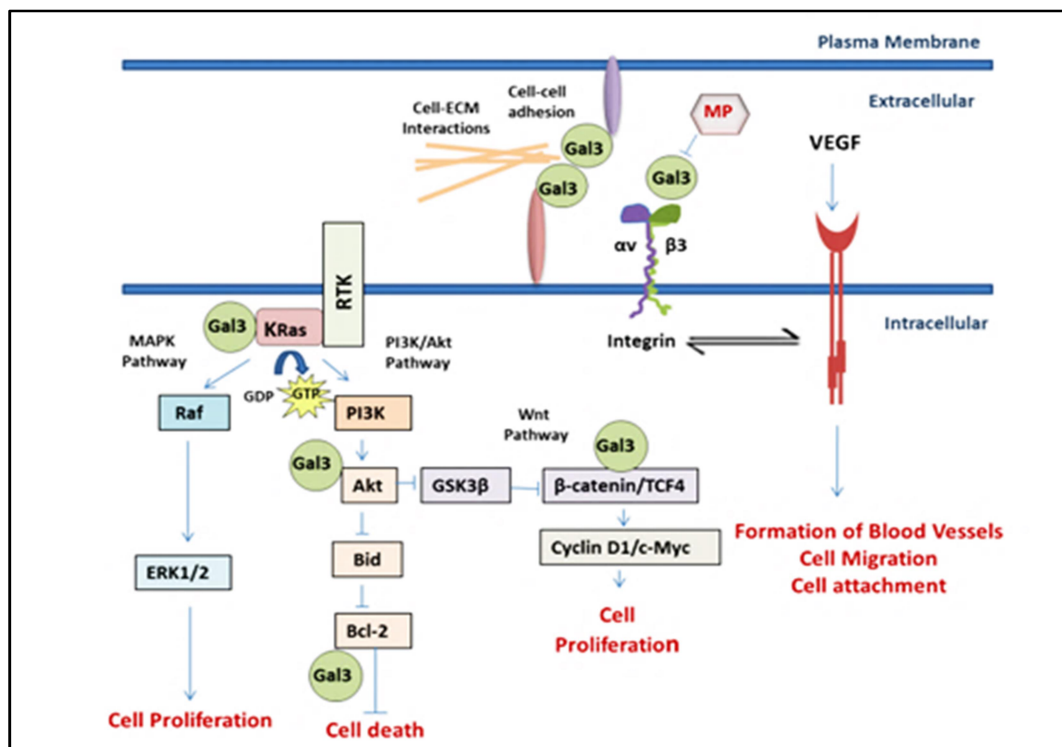


Figure 12 : Voies de signalisation associées aux voies intra- et extracellulaires de Galectin-3 (Maxwell, 2014)

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1-Matériel biologique

- **Matériel végétal** : La pectine est extraite à partir de l'écorce d'orange (*Citrus sinensis*) des espèces Navel et Thomson.

- **Lignées cellulaires** : Deux lignées cellulaires obtenues gracieusement de l'institut Pasteur d'Alger ont été utilisées dans cette étude.

La lignée de cellules cancéreuses du Larynx Humain HEp-2 (Human Epithelioma type 2), établie en 1952 par Moore *et al.* à partir de tumeur produite sur des rats après injection de tissu tumoral de larynx d'un homme de 56 ans.

La lignée de cellules saines VERO, isolées à partir de cellules épithéliales de rein extraites d'un singe vert africain.

I.2-Réactifs et milieux

Les milieux de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), sérum de veau fœtal(SVF), antibiotiques (pénicilline/streptomycine/amphotericine), bleu de trypan, acridine orange (AO) et le dimethylsulfoxyde (DMSO) sont obtenus de Sigma-Aldrich (USA). La trypsine est obtenue de Biochem.

Les solutions: tampon phosphate salin (PBS), bleu de trypan, sulforhodamine B (SRB), acide acétique, acide trichloracétique (TCA) et le Tris sont préparées selon les protocoles cités dans l'annexe I.

I.3-Equipements

Les équipements utilisés sont présentés en annexe II.

II. Méthodes

II.1-Obtention du matériel d'étude

a- Collecte et traitement des écorces d'orange

D'un point de vue botanique les agrumes sont des fruits charnus avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées comme illustré sur la figure 13: l'épicarpe (Flavedo), mésocarpe (Albédo) et l'endocarpe (pulpe).

Les oranges sont pelées manuellement et l'écorce est récupérée après élimination de la couche externe (flavedo). La couche interne (albédo) est récupérée, lavée puis broyée uniformément en petits morceaux d'environ 0,5 cm² et conservée fraîche à 4°C.

b- Extraction de la pectine native

➤ Élimination des huiles essentielles

La principale huile essentielle de l'écorce d'orange est le d-limonène, qui représente au moins 90% des huiles essentielles totales (Qilong, 2013; Lopresto, 2014). Leur élimination a été

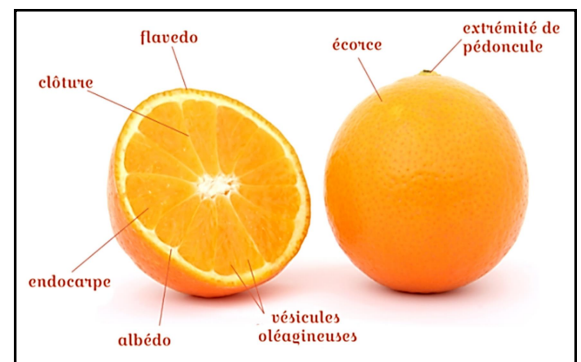


Figure 13 : Caractéristiques morphologiques d'une orange (Hartati *et al.*, 2011).

effectuée par hydrodistillation selon un protocole légèrement modifié de (Tiwari *et al.*, 2017). 250g d'albedo d'orange sont broyées et introduits dans un ballon contenant 1 L d'eau distillée. Le tout est porté à ébullition (figure 14).

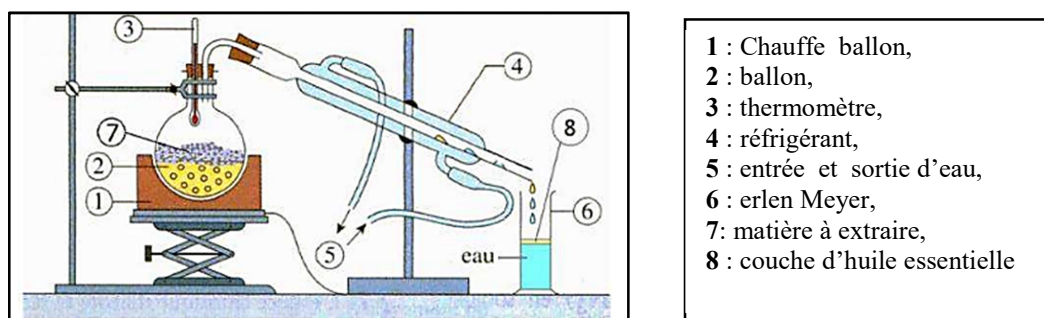


Figure 14 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005)

Sous l'effet de la chaleur, la vapeur entraîne les huiles essentielles (HE) contenues dans l'écorce et les condense à l'aide d'un réfrigérant. Ainsi, l'eau recueillie dans l'erlenmeyer entraîne les huiles essentielles à éliminer. L'écorce d'orange est ensuite récupérée, séchée dans une étuve à 50°C et conservée dans un dessiccateur.

➤ Extraction de la pectine

Le protocole d'extraction que nous avons adopté, en modifiant quelques paramètres est celui de Khule *et al.*, (2012). 40g d'albedo d'orange délipidés et séchés ont été additionnés à 800 ml d'eau distillée acidifiée jusqu'à pH 2 avec de l'acide citrique à 40%. Le mélange est laissé pendant une heure dans un bain marie à 65°C sous agitation. Après chauffage, le mélange est refroidi à température ambiante puis filtré à l'aide d'un morceau de tissu. La pectine native est récupérée par précipitation à l'éthanol à 95% qui est ajouté à raison d'un volume pour un volume de notre solution (v/v). Le précipité est filtré et séché dans une étuve à 50°C. La pectine est ensuite réduite en poudre fine à l'aide d'un mortier et conservée dans un dessiccateur. La figure15 résume les différentes étapes effectuées en photos.

Le rendement de la poudre de pectine extraite est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Rendement de la pectine (\%)} = (m_0/m) \times 100$$

Où, m_0 (g) est le poids de la pectine sèche et m (g) est le poids de la matière première.

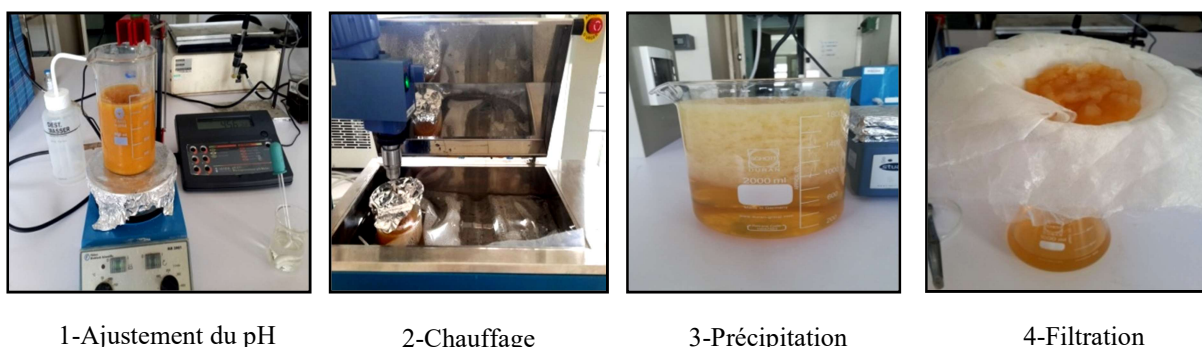


Figure 15 : Principales étapes d'extraction de la pectine

II.2-Traitements de la pectine native

a- Traitement chimique par modification du pH

Une réaction de saponification par hydrolyse alcaline a été réalisée afin de dé-estérifier la pectine extraite, en traitant les molécules de pectine avec des pH et des températures différents (Wang *et al.*, 2007). Les protocoles de Crystal *et al.*, 2007 et de Yordan *et al.*, 2012, ont été suivis en modifiant quelques paramètres.

500 mg de pectine native est solubilisée dans 500 ml d'eau distillée stérile, le pH de la solution est ajusté à 12 avec du NaOH froid à 0,1 M. Après 1 heure à 4°C, le pH de la solution est réajusté à 5,2 avec de l'acide citrique à 40%. La pectine dé-estérifiée est ensuite précipitée à l'éthanol (Figure 16). Elle est finalement filtrée, et séchée dans une étuve à 50°C.

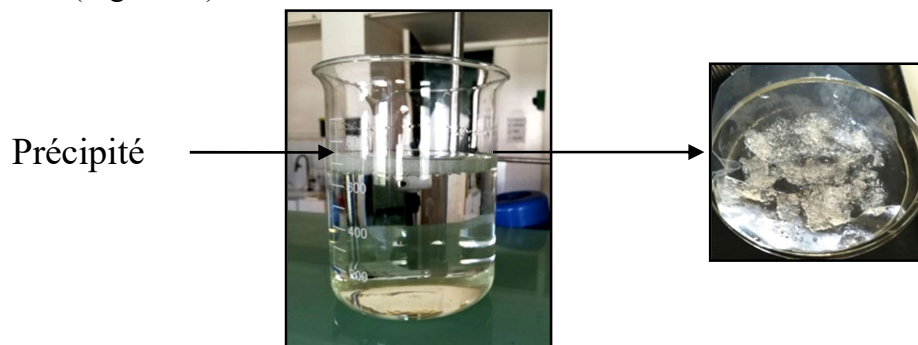


Figure 16: Précipitation de la pectine dé-estérifiée

b- Traitement physique par irradiation gamma

Afin de réduire au maximum son poids moléculaire, la pectine a été irradiée en solution à une concentration de 4mg/ml, à la dose de 25 kGy à l'aide des rayonnements ionisants gamma émis par une source de cobalt-60 de l'irradiateur du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) (figure 17).



Figure 17 : Irradiateur pilote au Cobalt 60

II.3-Caractérisation des différentes pectines

a- Détermination du degré d'estérification par méthode spectroscopique (FTIR)

Les échantillons de poudre de pectine Native (ONP), Modifiée chimiquement (OMP) et Irradiée (OMIP) ont été caractérisés par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Les pastilles sont préparées en mélangeant 1mg de pectine séchée réduite en poudre à 100 mg de Bromure de Potassium (KBr). Le mélange est comprimé à l'aide d'une presse hydraulique pour former une pastille translucide à travers laquelle le faisceau infrarouge peut passer.

Les pastilles ainsi obtenues sont analysées à l'aide d'un spectromètre de type NICOLET 380 avec une résolution de 4 cm⁻¹ et 64 balayages dans la gamme des nombres d'onde comprise entre 4000 et 400cm⁻¹ (Park *et al.*, 2006). Les spectres sont traités par le logiciel OMNIC.

Les spectres FTIR Obtenus sont analysés et les pics entre 1600-1630 cm^{-1} et entre 1730-1760 cm^{-1} sont utilisés pour calculer le degré d'estérification par la formule suivante, (Gnanasambandam et Proctor, 2000 ; Monsoor *et al.*, 2001; Faravash et Ashtiani, 2008).

$$\text{DE (\%)} = 100 * (\text{A1730-1760}) / (\text{A1730-1760} + \text{A1600-1630})$$

b- Détermination de la solubilité dans l'eau

La solubilité des différentes poudres de pectine (ONP, OMP, OMIP) a été réalisée en introduisant 0,25 g de poudre de pectine dans 45 ml d'eau déminéralisée bouillante. La suspension est portée à ébullition pendant 5 min sous agitation magnétique (Sila *et al.*, 2006). Après refroidissement, le mélange est filtré à l'aide de papier filtre séché et prépesé. Le filtrat obtenu (contenant la pectine soluble dans l'eau) est ajustée à 50 ml avec de l'eau déminéralisée pour des utilisations ultérieures. Le filtre est ainsi séché et repesé après séchage jusqu'au poids constant et le pourcentage de solubilité a été calculé.

II.4-Activité cytotoxique

a- Mise en œuvre des effets des différentes pectines sur la prolifération cellulaire

Mise en culture: Les cellules (HEp-2 et VERO) sont cultivées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO_2 , dans du DMEM supplémenté de 10% de SVF et de 1% d'antibiotiques (pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 mg/ml).

Entretien de la culture: Le suivi des cultures se fait par des observations quotidiennes au microscope inversé (OLYMPUS CK2) afin de contrôler leur confluence et leur viabilité et de s'assurer de l'absence de contamination. Le détachement des cellules de leur support de culture se fait au moyen de la trypsine et lavage du tapis cellulaire par le PBS.

Les cellules dissociées sont centrifugées puis remises en solution dans du milieu frais dans des flacons de culture stériles à la concentration désirée.

Dénombrement des cellules : La détermination du nombre de cellules par unité de volume de la suspension cellulaire est réalisée après coloration au bleu de trypan 0,4 % afin de distinguer les cellules vivantes apparaissant claires entourées d'un halo bleu des cellules mortes totalement colorées en bleu.

Les cellules sont ensuite comptées à l'aide de chambres d'hémocytomètre et d'un microscope à phase inverse.

Le nombre de cellules est déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Concentration cellulaire (ml)} = \text{nombre de cellules par carré} \times \text{facteur de dilution} \times 100 \times 10^3$$

Mise en contact : Des concentrations croissantes des différentes pectines ONP, OMP, OMIP (1, 2, 3, 4 et 5 mg/ml) sont ajoutées aux cellules saines et cancéreuses ensemencées à la concentration initiale de 10^5 cellules/ml en phase de croissance exponentielle (24 heures d'incubation) dans des microplaques à 6 et 96 puits, à raison de 3 à 6 répétitions par concentration. Elles sont ensuite incubées pendant différents temps de contact (24, 48, ou 72h).

La poursuite des étapes de travail se fait au dépend du meilleur effet cytotoxique obtenu en présence de l'une des trois substances testées.

b- Mise en œuvre des effets des rayonnements gamma

Dans des microplaques à 6 et 96 puits sontensemencées les cellules cancéreuses HEP-2 à raison de 500 cellules/ml et 10^5 cellule/ml respectivement puis incubées pendant 24h.

En phase exponentielle de croissance, les cellules sont exposées aux rayonnements gamma de la source de cobalt-60, de l'irradiateur de type ELDORADO-78ACEL du CRNA, illustré sur la figure 18.

Les doses délivrées sont comprises entre 1 et 6 Gy à un débit de dose proche de celui utilisé en radiothérapie humaine (24,68 cGy/min) dans les conditions suivantes :

Irradiation verticale

Distance (source cible) : 60cm

Taille du champ d'irradiation : 20x20cm

Température moyenne : 20°C



Figure 18 : Unité de Cobalt 60 ELDORADO78

c- Mise en œuvre des deux traitements concomitants

Les cellules cancéreusesensemencées comme décrit précédemment, sont traitées avec les différentes concentrations d'OMIP (1, 2, 3, 4 et 5 mg/ml). Après 1h d'incubation à 37°C, elles sont irradiées aux doses de 1, 2, 4 et 6 Gy dans les conditions citées ci-dessus.

II.5-Evaluation de l'activité cytotoxique

L'effet de l'OMIP à différentes concentrations, seul ou en association avec le rayonnement ionisant à différentes doses sur la survie cellulaire a été évaluée par deux tests différents :

- le test colorimétrique à la sulforhodamine B basé sur le contenu en protéines représentatif de la prolifération cellulaire; à partir duquel la concentration inhibitrice de 50% de croissance cellulaire (IC_{50}) est déterminée.
- le test de clonogénicité basé sur la capacité des cellules tumorales à proliférer et donner naissance à un clone de plus de 50 cellules après traitement. Il permet de déterminer le coefficient de clonage et d'établir la courbe de survie des cellules cancéreuses exposées au rayonnement.

a- Test de Sulforhodamine B (SRB)

Ce test est basé sur la liaison électrostatique du colorant anionique aux acides aminés basiques des protéines cellulaires. Une évaluation colorimétrique permet d'estimer la masse des protéines totales qui est liée au nombre de cellules. Le colorant sulforhodamine B (SRB) permet donc l'évaluation des activités cytotoxiques et cytostatiques de nouvelles drogues anti-tumorales. Le protocole utilisé est le suivant :

- Au temps T (72h) après irradiation des cellules, déposer 50 μ l d'acide trichloracétique TCA à 50% froid (concentration finale 10%) dans chaque puits (plaque de 96 puits) et laisser une heure à 4°C ;
- Laver 4 fois à l'eau du robinet et laisser sécher à l'air libre ;

- Ajouter 100 µl/puits de SRB (0,4%) diluée dans de l'acide acétique 1% ;
- Laisser 30 minutes à température ambiante ;
- Rincer rapidement 4 fois avec de l'acide acétique 1% ;
- Laisser sécher, puis mettre 200 µl/puits de tris 10mM (pH 10.5) ;
- Agiter 10-20 minutes, puis déterminer la densité optique de la solution à l'aide d'un lecteur de plaque spectrophotomètre (BioTek) à 540 nm.

$$\% \text{ de survie cellulaire} = \text{DO échantillon} / \text{DO control} \times 100$$

La préparation des solutions est donnée en annexe II.

➤ Détermination de l'inhibition de croissance (IC₅₀)

La cytotoxicité des cellules suite aux différents traitements (différentes pectines et rayonnements ionisants) est évaluée par la détermination de la concentration inhibitrice de 50% de croissance cellulaire (IC₅₀). Le calcul de l'IC₅₀ se fait par la régression linéaire.

b- Test de clonogénicité

Les HEp-2 sontensemencées à une concentration de 500 cellules/ml dans des plaques 6 puits. Les cellules sont irradiées une heure après traitement par OMIP à différentes concentrations (0, 1, 2, 3, 4 et 5 mg/ml). Après 10 à 14 jours d'incubation jusqu'à ce que les cellules survivantes donnent naissance à des colonies macroscopiques visibles (contenant 50 cellules et plus) qui peuvent être comptées facilement. Les colonies sont fixées à l'éthanol pendant 10 minutes puis colorées au Giemsa.

➤ Détermination du coefficient de clonage

Le coefficient de clonage ou plating efficiency (PE) représente le pourcentage de cellulesensemencées qui ont donné naissance à un clone viable, c'est-à-dire qui s'est développé au-delà de la cinquième génération.

Ce coefficient de clonage est déterminé par le comptage des colonies dans l'échantillon témoin non irradié suivant la formule suivante :

$$PE = \frac{\text{nombre de colonies dénombrées}}{\text{nombre de cellulesensemencées}} \times 100$$

➤ Détermination de la fraction de survie :

La fraction de survie ou survival fraction (SF) représente le pourcentage de cellulesensemencées qui ont données naissance à un clone viable, c'est-à-dire qui se développe au-delà de la cinquième génération. Cette valeur est calculée en divisant le nombre de colonies décomptées après une à deux semaines dans l'échantillon par le nombre de cellulesensemencées corrigé par le coefficient de clonage.

$$SF = \frac{\text{nombre de colonies dénombrées}}{\text{nombre de cellulesensemencées} \times \left(\frac{PE}{100}\right)}$$

Une courbe de survie qui représente la réponse dose-effet des rayonnements ionisants sur les HEp-2 est tracée à partir des valeurs des fractions de survie obtenues.

La radiosensibilité intrinsèque a été quantifiée en calculant la fraction de survie à 2 Gy (SF2), 2Gy étant la dose journalière reçue par le patient en radiothérapie conventionnelle. Selon **Bjork-Eriksson *et al.*, (2010)**.

- Si $SF2 \geq 0,4$, la lignée étudiée est radiorésistante.
- Si $SF2 \leq 0,4$, la lignée est considérée comme étant radiosensible.

➤ La capacité radiosensibilisante

La capacité radiosensibilisante (CR) de l'OMIP est déterminée par le calcul du ratio suivant :

$$CR = \frac{(\text{Survie des cellules irradiées traitées avec OMIP}/\text{survie des cellules non irradiées traitées avec OMIP})}{(\text{Survie des cellules irradiées non traitées}/\text{survie cellules non - irradiées et non traitées})}$$

Un ratio d'une valeur inférieure à 1 révèle un effet radiosensibilisateur.

Un ratio égal à 1 indique que l'effet est additif; c'est-à-dire que l'effet toxique des radiations s'additionne à celui induit par la OMIP.

Finalement, un ratio supérieur à 1 indique que la toxicité cellulaire mesurée en combinant les OMIP aux radiations est inférieure à la somme des toxicités obtenues individuellement par ces deux modalités.

II.6-Mise en évidence de la mort cellulaire

Les changements dans la morphologie des cellules tumorales sont recherchés après prolifération de 24h en phase exponentielle de croissance suite à la mise en contact de l'OMIP aux concentrations croissantes de 1 à 5 mg/ml. Les observations réalisées au moyen d'un microscope inversé (BRESSER) sont représentées sur des photos prises après 48h d'incubation (figure 19).



Figure 19 : Photo du microscope inversé (BRESSER)

Dans le but de mettre en évidence le type de mort, les cellules en culture sont colorées à l'acridine orange (AO), un fluorochrome qui se fixe aux acides nucléiques et marque différemment l'ADN en vert et l'ARN en rouge.

Après 24h de mise en culture des cellules cancéreuses sur des lamelles à raison de 10^5 cellules/lamelle, placées dans des microplaques 6 puits, les cellules sont traitées à des concentrations de 3 et 5 mg/ml d'OMIP en plus du témoin négatif.

La coloration à l'acridine orange à raison de (100µg/ml) dans du PBS, est réalisée après 72h d'incubation des cellules.

La mise en évidence du type de mort se fait par observation au microscope à fluorescence (Leica DM6000B) sous lumière bleue (figure 20). Chaque lecture est réalisée en triplicata.

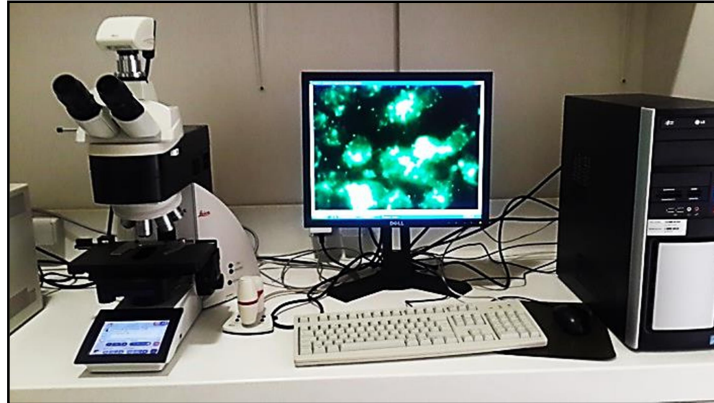


Figure 20 : Photo du microscope à fluorescence (Leica DM6000B).

II.7-Analyse statistique

Les résultats de notre étude expérimentale sont traités statistiquement. Le calcul des moyennes et des écarts types sont réalisés à partir des résultats de deux à trois essais et trois à six réplifications par essai avec Microsoft Excel 2010.

- **Moyenne arithmétique (\bar{X}) des valeurs individuelles**

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$\sum x_i$: somme des valeurs individuelles
n : nombres des valeurs

- **Erreur standard à la moyenne (ESM)**

$$ESM = \frac{\sigma}{n}$$

avec σ (écart type) = $\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}$

x_i : Valeurs individuelles n : Nombre d'échantillon

Tous les résultats sont exprimés en Moyenne \pm Ecart type (\pm SD) et les graphes sont tracés à l'aide du logiciel Origin 2016. Les IC₅₀ sont calculées par la méthode de la régression linéaire.

D'autre part, une analyse de la variance (one-way ANOVA) suivie par le post-test de Tukey pour la comparaison de plusieurs échantillons est appliquée à l'aide des logiciels (Excel 2010 et MiniTAB). Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées comme significatives. Ainsi, le degré de signification est comme suit :

- Si $p > 0,05$: la différence n'est pas significative
- Si $p < 0,05$: la différence est significative (*)
- Si $p < 0,01$: la différence est très significative (**)
- Si $p < 0,001$: la différence est hautement significative (***)

Résultats et discussion

I. Extraction de la pectine native

La particularité de notre étude est de travailler sur l'extraction d'une pectine à partir de l'écorce de deux variétés d'orange Algériennes sur lesquelles peu de recherches ont été effectuées, alors que beaucoup de travaux ont porté sur l'extraction des pectines de différentes sources végétales, en particulier pomme, citron et betterave (**Kalpathy et Practon, 2001 ; Levigne *et al.*, 2002 ; Centeri *et al.*, 2005; Faravash et Ashtiani, 2008**).

- Elimination des huiles essentielles

Après hydrodistillation de l'albedo d'orange, nous avons obtenus deux phases (figure 21). En dessus, il s'agit de l'huile essentielle d'orange (sous forme de gouttelettes) et au-dessous de l'eau d'orange. La figure 22 montre l'aspect de l'écorce d'orange après élimination des huiles essentielles et séchage.

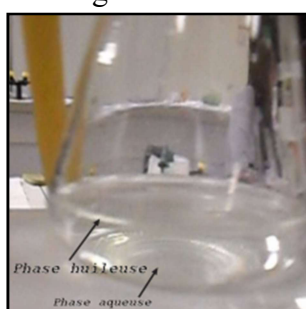


Figure 21: phases obtenues après délipidation de l'albedo d'orange.



Figure 22: Aspect de la poudre d'albedo d'orange délipidée après séchage.

II. Rendement en pectine :

Les rendements d'extraction (exprimés en pourcentage) de la poudre de pectine native (ONP) et des pectines modifiées (OMP, OMIP) à partir du poids initial de la matière sèche ont été calculés et représentés dans le tableau II.

Tableau II: Rendements d'extraction et de modification de la pectine.

	ONP	OMP	OMIP
Rendement d'extraction (%)	19,65±2,68	9,13±0,9*	7,67±0,43*

(n=3), *P< 0.05 en comparaison avec le groupe contrôle (ONP).

En général, le rendement d'extraction de pectine de différentes sources peut varier en fonction des paramètres de traitement et des caractéristiques de l'échantillon.

L'optimisation des conditions d'extraction et de modification de la pectine a été réalisée dans une étude préliminaire, en ciblant certains paramètres (pH, températures et temps d'extraction) afin d'atteindre le plus bas degré d'estérification pour un meilleur rendement.

L'élimination initiale des huiles essentielles par hydro-distillation avant l'extraction de la pectine, a permis d'avoir un bon rendement en pectine comme il a été recommandé par (**Pandharipande et Makode, 2012 ; Sayah *et al.*, 2016**).

Les conditions opératoires mises au point nous ont permis d'obtenir un rendement en pectine native de $19,65 \pm 2,68\%$ à partir de la matière première sèche, taux similaire à celui rapporté par (Khule *et al.*, 2012 ; Sulieman *et al.*, 2013).

Le rendement en pectine modifiée par le traitement chimique (OMP) à partir de la matière première sèche est inférieur à celui de l'ONP de moitié environ de 9% à partir de la matière première sèche. Cette différence peut être expliquée par le fait que l'OMP est préparée en modifiant l'ONP, donc la fraction non soluble, en plus des pertes qui sont soustraites de la masse initiale d'ONP.

L'OMIP ayant reçu les deux traitements (changement du pH et irradiation gamma), a donné un rendement légèrement inférieur à celui de l'OMP ($7,67 \pm 0,43\%$), à partir de laquelle elle a été préparée.

Les poudres de trois différentes pectines sont représentées sur la figure 23.

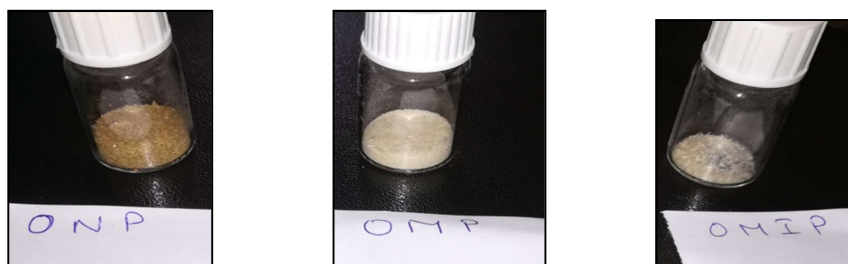


Figure 23: photos des différentes poudres de pectine

III. Caractérisation des différentes pectines

III.1- Degré d'estérification

Les spectres infrarouges des pectines (ONP, OMP, OMIP) sont représentés dans la figure 24. Ce spectre nous permet de confirmer l'identité de la pectine extraite à partir de l'écorce d'orange et de distinguer les modifications apportées par les différents traitements.

La plupart des groupements fonctionnels de la pectine sont situés dans la région entre 1000 et 2000 cm^{-1} du spectre FTIR (Kalapathy *et al.*, 2001). Le groupement carbonyle entre 1630 et 1650 cm^{-1} et la région située entre 1740 et 1760 cm^{-1} indique les groupements carboxyles libres et estérifiés (Gnanasambandam *et al.*, 1999).

Les données représentées sur la figure 23(a) confirment l'identité fonctionnelle de la pectine native extraite à partir de l'écorce d'orange, représenté avec une absorbance de 1742 cm^{-1} indiquant les groupements carboxyles, et une absorbance de 1650 cm^{-1} indiquant les groupements carbonyles (Fertonani *et al.*, 2006).

Le degré d'estérification calculé à partir de ces deux pics est de $59,64\%$. Cette valeur est proche de 63% obtenue par Sayah *et al.* (2016).

Selon son degré d'estérification, l'ONP extraite peut être classée en tant que pectines HM (Hautement Méthylées) avec un $DE > 50\%$ (Levigne *et al.*, 2002).

Sur les spectres infrarouges de l'OMP et l'OMIP nous remarquons une absence du pic caractéristique des groupements carboxyles ($1730-1760 \text{ cm}^{-1}$) et celui indiquant les groupements carbonyles est représenté par une absorbance de 1609 cm^{-1} . Ainsi, les traitements apportés à l'ONP ont permis de réduire son degré d'estérification à 0% et ainsi l'OMP

et l'OMIP sont considérées comme des pectines faiblement méthylées (LM) (Levigne *et al.*, 2002).

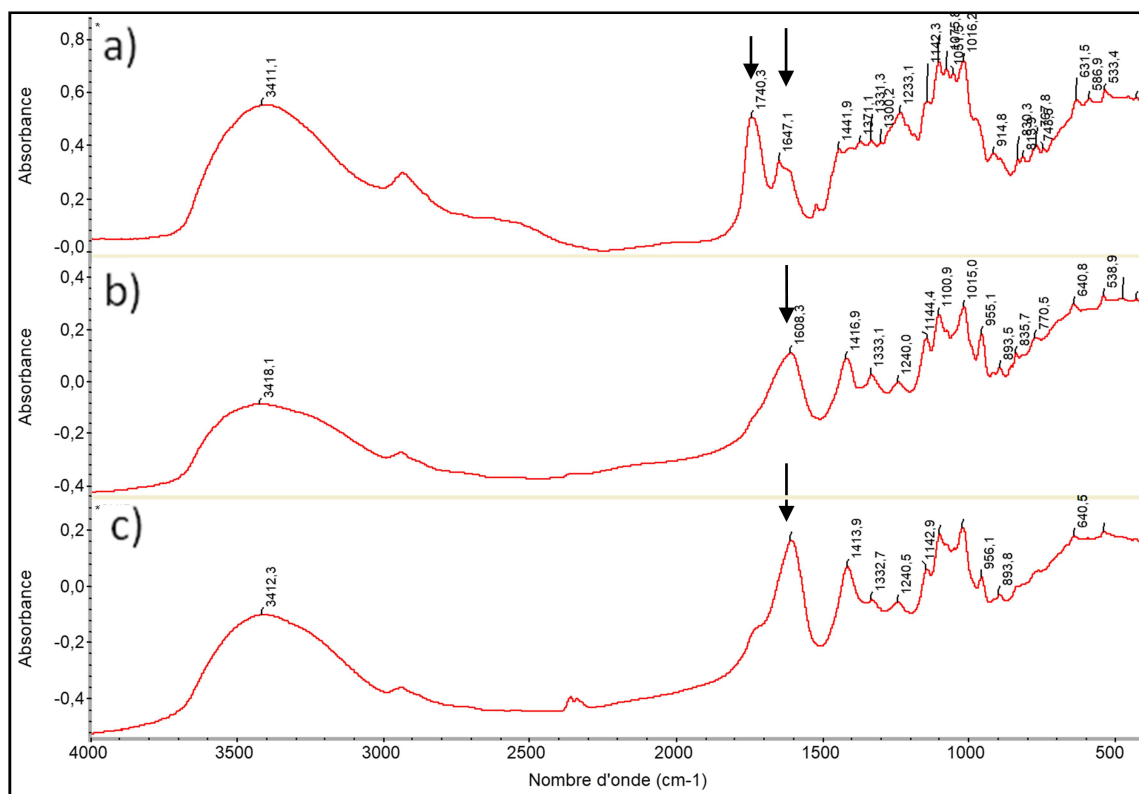


Figure 24: Représentation spectrale IR de l'ONP (a), OMP (b) et OMIP (c)

Comme rapporté par Leclere *et al.* (2013) la modification chimique de la pectine par le pH cause une β -élimination qui induit une dépolymérisation du polysaccharide et sa déstérification.

Par ailleurs, Dangowski *et al.* (2002) rapporte que l'irradiation induit une réduction du poids moléculaire et du DE ainsi qu'une diminution de la viscosité.

III.2- Détermination de la solubilité dans l'eau

Le tableau III montre le pourcentage de solubilité des différentes pectines (ONP, OMP, OMIP) dans l'eau.

Les résultats obtenus indiquent un pourcentage de solubilité d'OMIP de (78,6±0,62%), supérieur à celui des ONP et OMP d'environ 69%.

Le traitement par irradiation gamma apporté à l'OMP a entraîné la dégradation des molécules du polymère (Kang *et al.*, 2006), ce qui a permis de réduire la longueur des chaînes polysaccharidiques et de produire des oligosaccharides pectiques ayant une solubilité plus élevée dans l'eau, et ainsi une meilleure assimilation par les cellules. C'est un résultat similaire à celui obtenu par El-Batal *et al.* (2012).

Tableau III: La solubilité d'ONP, OMP et OMIP dans l'eau.

ONP	OMP	OMIP
-----	-----	------

Solubilité (%)	69,12±1,81	69,44±0,45	78,6±0,62**
-----------------------	------------	------------	-------------

n=3, ** P<0,01 en comparaison avec le groupe contrôle (ONP).

IV. Activité cytotoxique

IV.1- Effets des différentes pectines sur la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire représentée par le taux de viabilité décelée par le test SRB a été déterminée pour les deux lignées cellulaires, cancéreuse (HEp-2) et saine (VERO), après trois temps de contact 24h, 48 et 72h.

La figure 24 représente les pourcentages de la viabilité cellulaire en fonction des concentrations des différentes pectines (ONP, OMP, OMIP). Les résultats obtenus révèlent l'effet antiprolifératif proportionnel à la concentration et au temps de contact des différentes pectines sur les cellules tumorales.

L'ONP et l'OMP ont montré des taux de viabilité des HEp-2 rapprochés après un temps de contact de 72h, et qui est à son minimum à la concentration de 5mg/ml, atteignant 42,22±8,5 et 46,7±4,96% de viabilité respectivement (figure 25 a, b).

Cependant l'OMIP a montré son effet propice sur la viabilité des HEp-2, à partir de la concentration de 2 mg/ml.

En effet, plus la concentration en OMIP est importante et le temps de contact plus long, plus la viabilité cellulaire diminue (figure 25 c). La concentration de 5 mg/ml et le temps de contact de 72 h ont donné le taux de viabilité des HEp-2 le plus faible (5,43±1,16%).

Ainsi, la modification de la pectine par dé-estérification et irradiation a contribué à une augmentation des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses, potentialisant l'activité antitumorale.

Sur la figure 25 d, le taux de survie des VERO a diminué de 30 % contre 60% de mort des HEp-2 après 24 et 48h de culture. Après 72h de culture les VERO atteignent le minimum de leur viabilité qui a diminuée de 41% contre 95% de mort des HEp-2. Ce qui indique que les VERO n'ont pas été affectées par l'OMIP autant que les HEp-2.

Ces résultats, dévoilant une faible sensibilité des cellules saines (VERO) au traitement pectique (OMIP), sont confirmés par ceux obtenus par **Almeida et al., (2015)** qui ont comparé l'effet d'un dérivé pectique sur des cellules cancéreuses du colon (Caco-2) et sur les VERO.

Nous pouvons affirmer que la pectine a un effet cytotoxique significatif sur les cellules cancéreuses (HEp-2) qui est, particulièrement, dix (10) fois plus important chez l'OMIP que l'ONP et l'OMP. De plus, cet effet est sélectif et préférentiel sur les cellules cancéreuses que sur les saines.

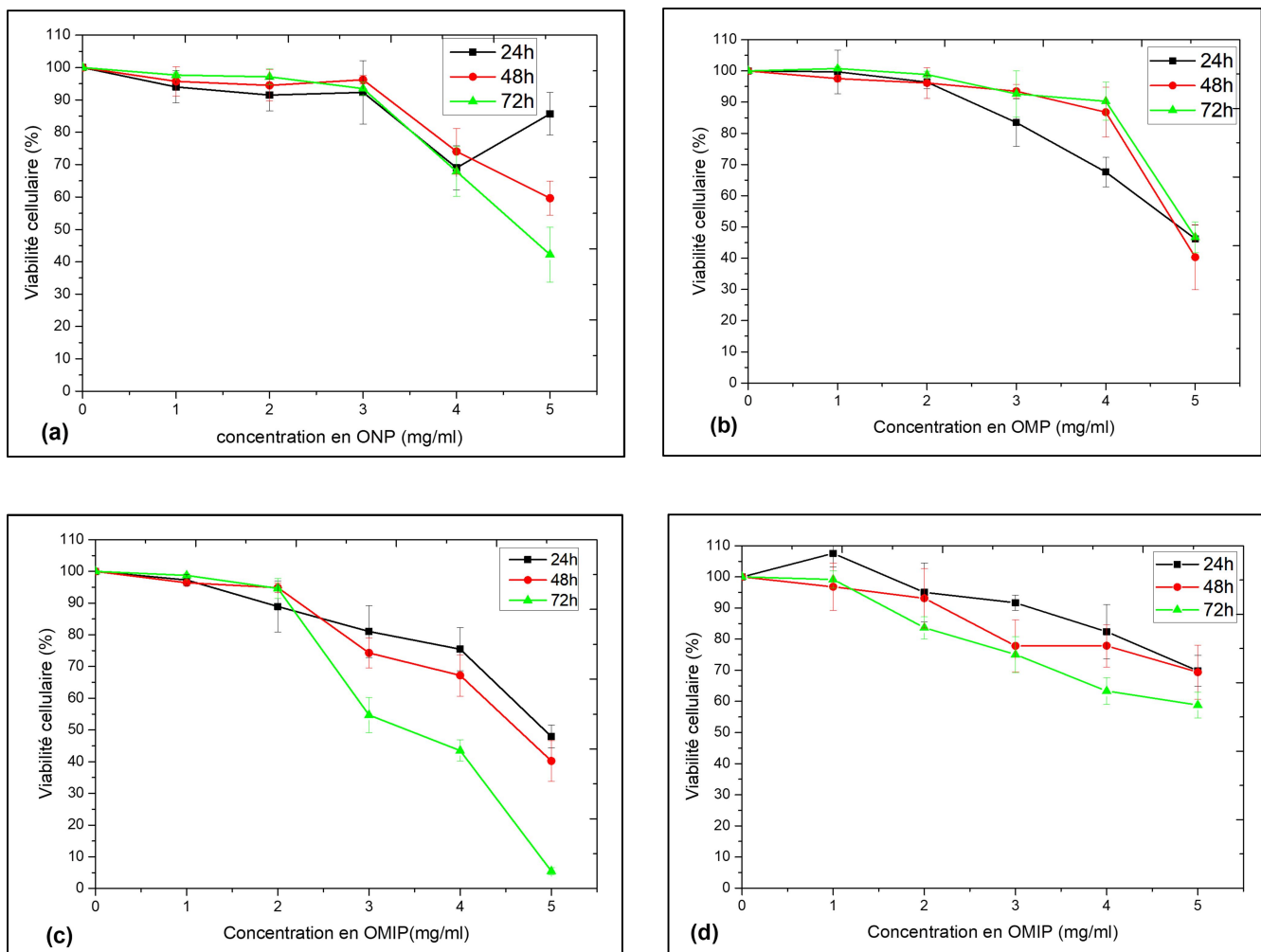


Figure 25: Activité anti-proliférative de l'ONP (a), OMP (b) et OMIP (c) sur les HEP-2 et OMIP sur les VERO (d) après 24h, 48h et 72h de mise en contact.

➤ **Détermination de l'inhibition de croissance (IC₅₀)**

• **Inhibition de croissance (IC₅₀) des différentes pectines sur les HEP-2**

Les concentrations d'ONP, OMP et OMIP qui inhibent 50% des HEP-2 (IC₅₀) après les différents temps de culture sont représentées dans le tableau IV. La meilleure activité antiproliférative est attribuée à l'échantillon ayant la plus faible valeur d'IC₅₀.

Tableau IV : Valeurs de l'IC₅₀ de l'ONP, OMP et OMIP sur les HEP-2 à différents temps de contact.

Les pectines	Valeurs d'IC ₅₀ (mg/ml)		
	24h	48h	72h
ONP	36,34±0,35**	10,22±0,50**	6,04±0,51*
OMP	5,35±0,29**	7,45±0,57*	5,62±0,43
OMIP	6,17±0,20***	5,16±0,36**	3,18±0,56*

n=5, * P<0,05, **P<0,01, *** P<0,001, comparaison entre les échantillons.

D'après les résultats illustrés dans tableau IV, nous remarquons que les valeurs d'IC₅₀ varient entre 10 et 3 mg/ml pour les différentes formes de pectine, sauf pour l'échantillon d'ONP qui a montré une IC₅₀ élevée (36,34±0,35 mg/ml) après un temps d'incubation de 24h.

De plus, nous constatons que l'inhibition de la prolifération de 50% des HEp-2 nécessite une concentration de 6,04±0,51mg/ml d'ONP, 5.62±0,43mg/ml d'OMP et seulement 3.18±0,56mg/ml d'OMIP après un temps de contact de 72h. 95% d'inhibition (IC₉₅) est obtenue avec OMIP à une concentration de 5 mg/ml.

L'utilisation de l'OMIP sur les HEp-2 a montré une efficacité anticancéreuse importante avec un taux de mortalité de 94% et une IC₅₀ de 3 mg/ml. Ces résultats sont confirmés par ceux d'**El-Batal et al. (2012)**, qui montrent l'effet antitumoral de la pectine d'agrumes modifiée sur des cellules du carcinome ascitique. Il semblerait que la pectine à faible degré d'estérification (inférieur à 50%) est plus efficace du fait qu'elle est capable de lier les molécules de la **protéine** anti-apoptotique impliquée dans la progression des cancers, la galectine-3, ceci a été proposé par **Hartati et Kurniasari, (2011)**. Ainsi liée, la capacité des cellules à adhérer les unes aux autres est bloquée, ce qui prévient l'agrégation des cellules tumorales in vitro (**Raz et al.,1987; Niture et Refai, 2013; Conti et al., 2018**) (figure 8 de la partie bibliographique). On peut supposer donc que l'OMIP a induit des perturbations du réseau Gal-3 du domaine extracellulaire par des liaisons concurrentielles au domaine de la reconnaissance des glucides (voir figure 10 de la partie bibliographique). L'étude récente de **Fang et al. (2018)** a montré que le MCP aussi a inhibé la croissance des tumeurs de la vessie par une régulation à la baisse de Gal-3.

• Inhibition de croissance d'OMIP sur les HEp-2 et les VERO

Les concentrations d'OMIP qui inhibent 50% de viabilité des HEp-2 et des VERO sont représentées dans le tableau V.

L'IC₅₀ a été calculé pour les deux lignées cellulaires après les trois temps d'incubation à partir des taux de viabilité cellulaire après traitement à différentes concentrations d'OMIP. Il a été vérifié que l'OMIP agit de manière plus destructive contre les cellules cancéreuses du larynx (HEp-2), mais moins contre les cellules saines (VERO).

Le tableau IV montre que plus le temps de contact augmente, plus les valeurs de l'IC₅₀ sont réduites, sauf pour les VERO qui leur IC₅₀ est passée de 8,29±0,15 mg/ml à 9,22±0,14 après un temps de 48h.

Comme c'est montré précédemment par le test de cytotoxicité (SRB) l'OMIP présentait des effets cytotoxiques élevés sur les cellules HEp-2, et ce depuis l'IC₅₀ de 6,16±0,20 mg/ml après 24h, contre une IC₅₀ plus élevée (8,29±0,15 mg/ml) sur les VERO.

Après 48 et 72h de culture, l'IC₅₀ de l'OMIP sur les VERO était presque deux fois supérieure à l'IC₅₀ des HEp-2, pour atteindre la valeur de 3,18±0,56 mg/ml d'OMIP qui inhibe la prolifération de 50% des HEp-2 contre 25% des VERO.

Tableau V: Valeurs de l'IC₅₀ de l'OMIP sur les HEp-2 et les VERO à différents temps de contact.

Lignées cellulaire	Valeurs d'IC ₅₀ (mg/ml)		
	24h	48h	72h
VERO	8,29±0,15**	9,22±0,14***	5,29±0,19***

HEp-2	6,17±0.2***	5,16±0,36**	3,18±0,56*
--------------	--------------------	--------------------	-------------------

n=5, *P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001, comparaison entre les échantillons

Donc, l'OMIP était deux fois plus cytotoxique contre les cellules cancéreuses (HEp-2) que les cellules saines (VERO).

La détermination des IC₅₀ a confirmé les effets déjà observés, ceci a également été rapporté par Almeida *et al.* (2015) dans une étude comparative de l'effet cytotoxique du pec-Ma sur des cellules cancéreuses du colon (Caco-2) et les cellules saines (VERO) ou la différence dans les valeurs d'IC₅₀ est encore plus importante.

IV.2- Effets des rayonnements gamma

L'effet antiprolifératif des rayonnements gamma seul sur les HEp-2 a été démontré par le test de cytotoxicité à la sulforhodamine B (SRB) et le test de clonogénicité.

➤ La viabilité cellulaire

Les taux des cellules viables aux doses croissantes d'irradiation mis en évidence par le test SRB sont représentés sur la figure 26.

L'irradiation des HEp-2 a montré un effet radiorésistant de ces cellules exposées aux doses (1,2 et 4Gy). Pour la dose de 6 Gy les HEp-2 étaient plus radiosensibles.

Le maximum de mort cellulaire (26,83±6,36%) est obtenu après exposition des cellules cancéreuses à la dose d'irradiation de 6 Gy après un temps d'incubation de 48h.

Donc une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire induite par l'exposition aux rayonnements gamma a été révélée, même résultat obtenu lors d'une étude menée sur trois lignées cancéreuses de la prostate irradiées à différentes doses (Conti *et al.*, 2018).

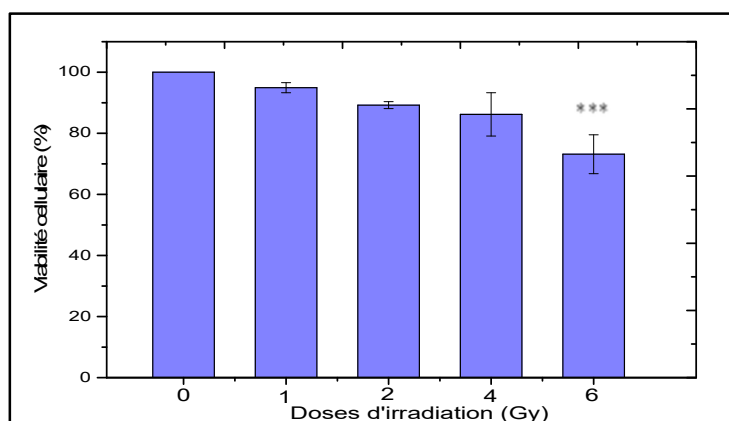


Figure 26: Effet antiproliférative de l'irradiation sur les HEp-2 révélé par le test SRB.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n=6, ***P<0,001 en comparaison avec le témoin non irradié

➤ La radiosurvie cellulaire

La quantification de la survie des cellules HEp-2 exposées aux rayonnements gamma est déterminée par le test de clonogénicité, qui permet de dénombrer uniquement les cellules survivantes à l'irradiation dont la capacité à former un clone n'a pas été altérée. Leur

proportions diminue lorsque les doses augmentent suivant un modèle mathématique décrit par des courbes exponentielles telles que représenté en figure 27. Elles représentent une réponse dose-effet à l'irradiation et servira à déterminer le niveau de radiosensibilité de la lignée cellulaire HEP-2.

Les fractions de survie sont calculées en divisant le nombre de colonies décomptées après 9 jours d'incubation par le nombre de cellulesensemencées, corrigé par le coefficient de clonage (échantillon témoin non irradié). Le coefficient de clonage (PE) est déterminé après 5 générations cellulaires.

PE= Nombre de colonies de plus de 50 cellules/Nombre de cellulesensemencées

Pour l'échantillon témoin non irradié, le PE est de l'ordre de **9,85%**, ce qui correspond à une survie corrigée de 100%. On compare ensuite cette survie corrigée après irradiation à différentes doses.

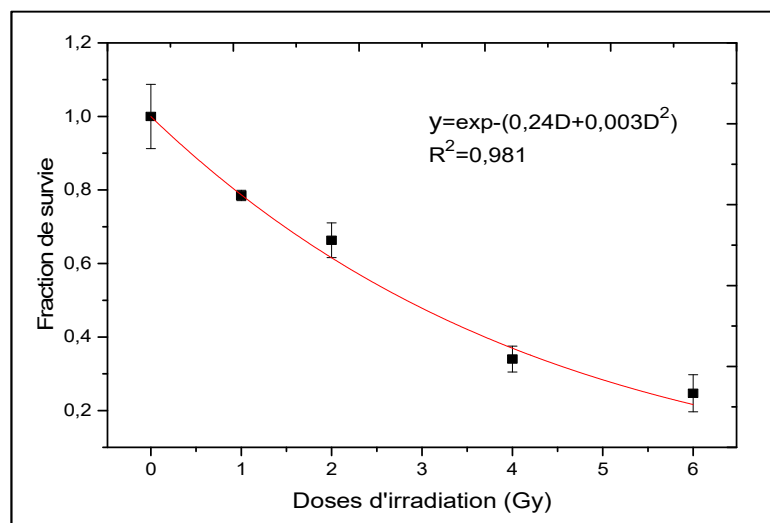


Figure 27: Courbe de survie cellulaire des cellules HEP-2 de en fonction de la dose révélé par le test clonogénique.

La figure 27 montre une décroissance de la survie cellulaire lorsque la dose d'irradiation augmente. Ces résultats s'accordent avec ceux obtenus par (**Hematulin *et al.*, 2012 ; Kim *et al.*, 2014**).

La fraction de survie déterminée à 2 Gy (SF₂) est de **0,611**, calculée à partir des points expérimentaux de l'équation : **S= exp(-0,24D+0,003D²)**.

Etant supérieure à 0,4, la lignée HEP-2 est considérée **radiorésistante** (**Bjork-Eriksson *et al.*, 2010**).

IV.3- Effets des traitements concomitants

Afin de démontrer que l'OMIP peut agir en tant que radiosensibilisateur des cellules cancéreuses radiorésistantes, son effet en concomitance avec l'irradiation a été recherché et révélé par le test de cytotoxicité à la sulforhodamine B (SRB) après 48h de culture.

Les taux de viabilité cellulaire en fonction des doses administrés sont représentés par des histogrammes sur la figure 28, à partir de laquelle nous remarquons la diminution de la viabilité cellulaire en fonction de la dose d'irradiation à partir de la plus faible concentration d'OMIP. Le minimum de viabilité ($18,47 \pm 3,28$ %) est enregistré pour les cellules traitées avec 5 mg/ml est irradiées à la dose de 4 Gy.

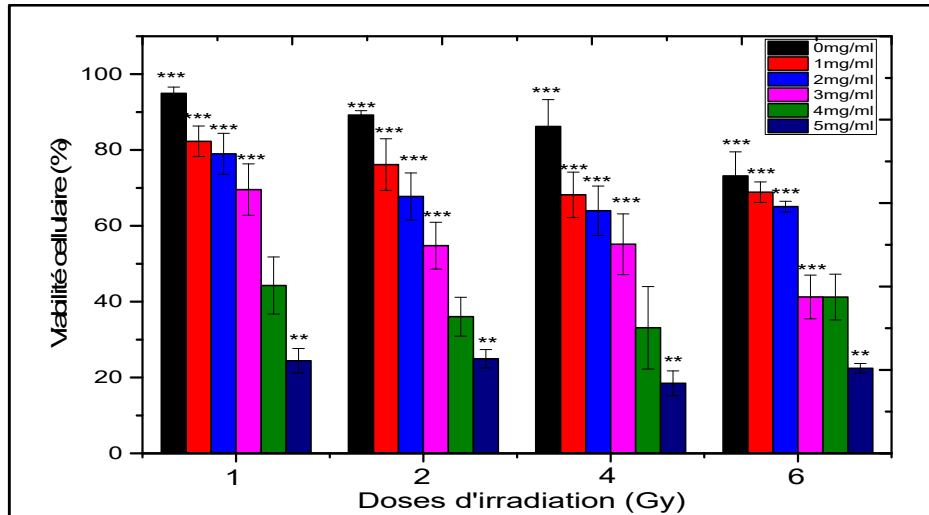


Figure 28: Histogramme représentant les taux de viabilité des HEP-2 en présence des différentes concentrations en OMIP en fonction de dose d'irradiation (n=6, **P<0,01, ***P<0,001)

La capacité des cellules à se reproduire après irradiation est révélée par le test de clonogénéicité après 9 jours incubation. Les fractions de survie en fonction des doses d'irradiation sont illustrées sur la figure 29. Nous remarquons que la survie des HEP-2 a considérablement diminuée en présence de l'OMIP à 1 et 2 mg/ml pour toutes les doses d'irradiation et elle était nulle (absence de colonies) pour les concentrations en OMIP de 3, 4 et 5mg/ml.

Ces résultats montrent un effet inhibiteur de l'irradiation seul ou en association avec l'OMIP plus significatif. Les doses de 4 et 6 Gy ont montré un effet inhibiteur très important. La fraction de survie enregistré pour la concentration de 2 mg/ml d'OMIP et à la dose de 6 Gy était de $0,024 \pm 0,01$.

Il apparaît qu'une dose de 2 Gy associée à 2 mg/ml d'OMIP donne la même fraction de survie (0,2) qu'à la dose de 6 Gy seule. Ceci confirme, l'effet radiosensibilisateur de l'OMIP.

L'OMIP a abouti à renforcer l'inhibition de la survie effectuée par le rayonnement.

Nos résultats sont confortés par d'autres travaux montrant l'effet de l'OMIP sur la radiosensibilité des cellules (Nabi *et al.*, 2015 ; Conti *et al.*, 2018).

Cet effet a été expliqué par une production transitoire de ROS qui provoque des dommages à l'ADN et ainsi l'activation de la transduction cellulaire des voies menant à la mort cellulaire par apoptose (Leach *et al.*, 2001; Mikkelsen et Wardman, 2003).

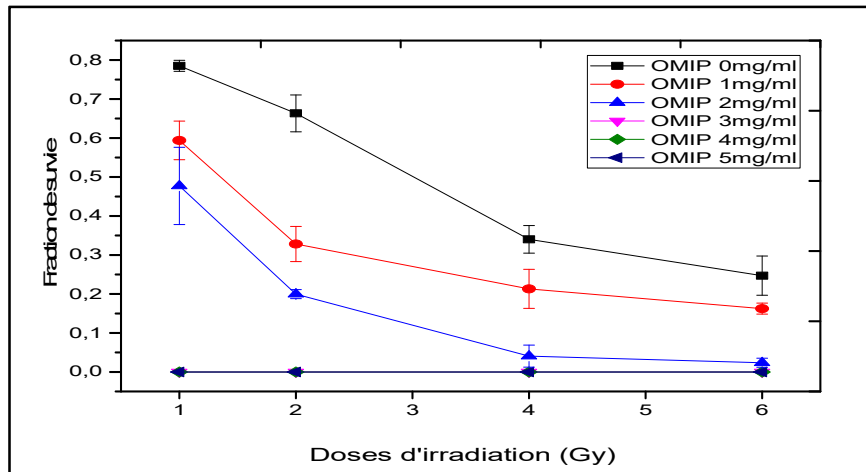


Figure 29: Courbe de survie des HEP-2 en présence des différentes concentrations en OMIP en fonction des doses d'irradiation.

D'autres indiquent que l'OMIP régule à la baisse l'expression d'un composant clé de la machinerie de réparation de l'ADN: PARP, et des preuves de l'efficacité des inhibiteurs des voies de réparation de l'ADN peuvent fonctionner en tant que traitement ciblé de certains cancers (Helleday *et al.*, 2008 ; Conti *et al.*, 2018). Par conséquent, la suppression des voies spécifiques de réparation de l'ADN utilisée en combinaison avec l'irradiation endommageant l'ADN pourrait s'avérer cliniquement significative.

Le constat d'une régulation à la baisse des processus de réparation (PARP) par l'OMIP et l'augmentation de la sensibilité cellulaire aux rayonnements ionisants est très encourageant.

➤ La capacité radiosensibilisante

La capacité radiosensibilisante a été calculée à partir du nombre de colonies formées et dénombrées, et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.

La capacité radiosensibilisante représentée par un ratio (inférieur à 1) indique que l'OMIP sensibilisait les cellules aux radiations et démontre un effet synergique entre l'OMIP et l'irradiation. Plus le ratio est petit plus la capacité radiosensibilisatrice est élevée (Drouin *et al.*, 2004).

Tableau VI: Capacité radiosensibilisatrice d'OMIP sur les HEP-2 à différentes doses d'irradiation

OMIP (mg/ml)	Doses d'irradiation (Gy)			
	1	2	4	6
1	0,78±0,05	0,51±0,045	0,65±0,05	0,68±0,014
2	0,64±0,1	0,32±0,01	0,13±0,03	0,10±0,01

L'effet radiosensibilisant le plus prononcé a été obtenu avec la concentration en OMIP de 2 mg/ml avec laquelle un ratio de 0,1 a été calculé.

Un ratio de 0 obtenu à des concentrations supérieures à 2 mg/ml d'OMIP (3, 4 et 5mg/ml) a été causé par une survie nulle des cellules HEP-2 traitées puis irradiées. Par conséquent,

l'ampleur de la radiosensibilité de l'OMIP à ces concentrations n'a pu être déterminée. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Drouin *et al.*, (2004)**, lors de l'étude de l'effet radiosensibilisateur de l'acide linoléique conjugué chez les cellules cancéreuses du sein.

V. Mise en évidence de la mort cellulaire

La figure 30 montre les changements morphologiques des HEp-2 en culture traitées avec les différentes concentrations d'OMIP et observées directement au microscope optique.

Après 48 heures de culture en absence d'OMIP, la morphologie des cellules est normale, présentant une forme allongée typique des HEp-2 vivantes. Elles s'étalent en monocouche sur le support de culture avec une répartition homogène.

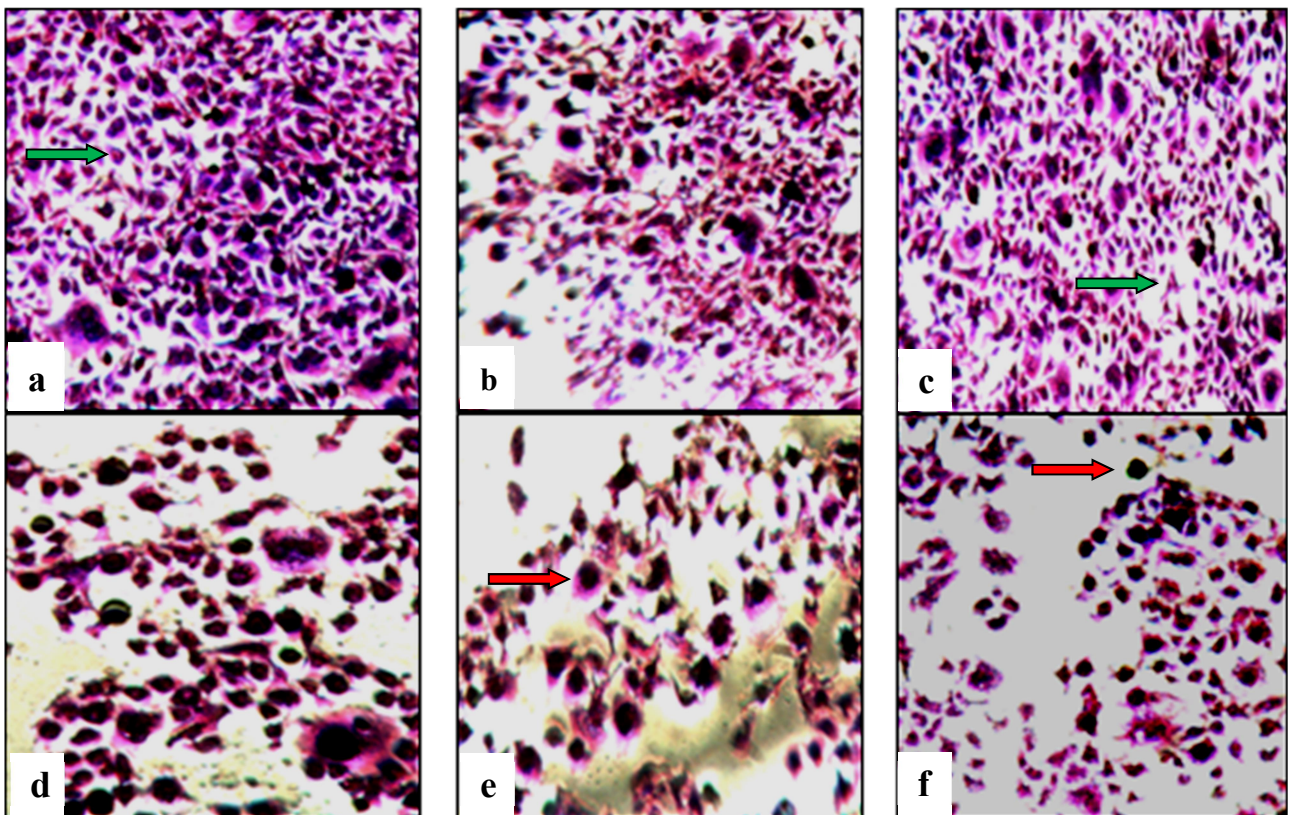


Figure 30: Représentation des changements morphologiques des HEp-2 après 48h de culture. (a) culture des HEp-2 sans traitement, (b, c, d, e, et f) HEp-2 en présence d'OMIP à 1, 2, 3, 4, et 5mg/ml respectivement, observées au microscope inversé Gx100. (flèche verte : cellule vivante, flèche rouge : cellule morte).

En revanche, les cellules cultivées en présence d'OMIP ne présentent pas la même morphologie et celle-ci dépend de la concentration en pectine.

Aux concentrations 1 et 2 mg/ml, deux types de populations cellulaires sont observés : une partie des cellules adhère au support et s'étale sur le fond des puits (flèches vertes) et les autres présentent une forme sphérique (flèches rouges), très faiblement voire non adhérentes au support. A la concentration de 5 mg/ml, le nombre de cellules attachées est réduit et toutes les cellules adoptent une forme arrondie et se regroupent en amas. Les mêmes changements

morphologiques sont constatés par **Delphi et al. (2015)** lors de l'étude de la viabilité des cellules du cancer de sein (MDA-MB-231) en présence d'un acide pectique.

Afin de mettre en évidence le type de mort cellulaire induite par l'OMIP, les changements morphologiques sont analysés après le marquage fluorescent à l'acridine orange.

Grâce au marquage fluorescent, l'allure normale des HEp-2 non traitées à l'OMIP a été révélée (figure 31 a). Contrairement aux HEp-2 traitées avec 3mg/ml et 5mg/ml d'OMIP (figure 31 respectivement b et c), chez lesquelles des modifications morphologiques ont été observé.

En effet, les cellules ont perdu leur allure originale et montrent pour certaines, un bourgeonnement cellulaire (flèche orange) et pour d'autres une condensation du noyau (flèche blanche), en plus d'une destruction organisée en corps apoptotiques (flèches rouges) facilement identifiables. On différencie clairement des petites vésicules contenant du matériel génétique marquées en vert caractéristiques de la mort cellulaire par apoptose. Ces structures sont absentes pour le témoin (figure 31 a).

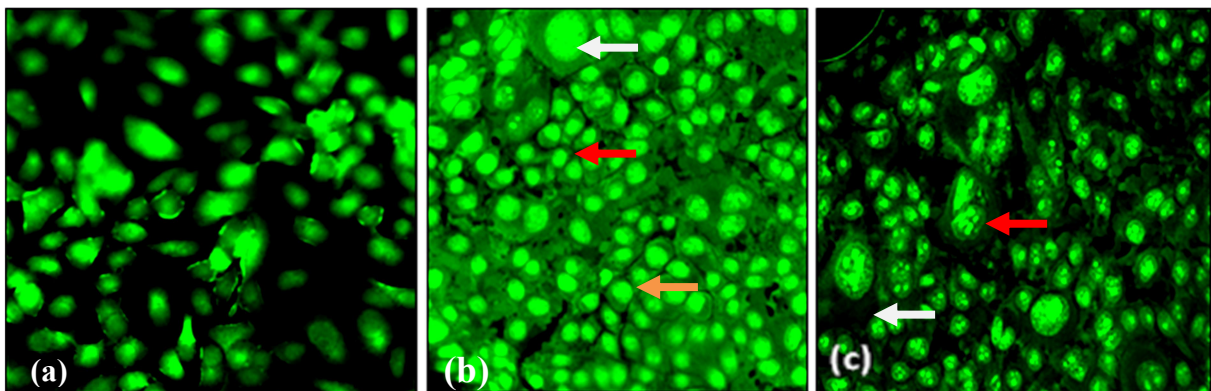


Figure 31 : Aspect morphologique des cellules cancéreuses HEp-2 marquées à l'acridine orange. Cellules cancéreuses témoins (a), traitées par 3mg/ml(b) et 5mg/ml(c) d'OMIP sous microscopie à fluorescence, Gx100. (flèche orange : bourgeonnement cellulaire, flèche blanche : condensation du noyau, flèche rouge corps apoptotiques)

Ces observations mettent largement en évidence le type de mort induite par la pectine qui est l'apoptose. Ces résultats sont corrélés par d'autres études (**Attari et al., 2009; Hossein et al., 2013; Delphi et al., 2015**).

En effet, Il a été récemment suggéré que l'effet inhibiteur de la pectine modifiée semblerait être dû à l'induction de l'apoptose qui se fait par le clivage de la forme précurseur d'une protéine pro-apoptotique (caspase-3) et par l'augmentation de l'expression d'une autre protéine pro-apoptotique aussi (Bax) (**Conti et al., 2018**).

Conclusion

Conclusion:

Notre présente étude a concerné principalement l'extraction de la pectine à partir des écorces d'orange, la mise au point d'un traitement de sa modification (chimique et physique au rayonnement gamma), la caractérisation physico-chimique des pectines obtenues. Par ailleurs, nous avons mis en évidence '*in vitro*' le double effet, antiprolifératif et radio-sensibilisateur de la pectine sur les cellules cancéreuses par un test de cytotoxicité (SRB), révélé par une technique spectrométrique et un test de clonogénéité. De plus le type de mort induite a été révélé par une technique de marquage fluorescent sélectif des acides nucléiques.

Ce travail a permis de mettre en évidence les résultats suivants :

- Parmi les pectines traitées, celle modifiée chimiquement et irradiée (OMIP) a montré l'effet antiprolifératif le plus élevé avec un taux de mortalité des cellules cancéreuses de larynx humain HEp-2 de 95% et une IC_{50} de 3.18 mg/ml. Cet effet est par ailleurs sélectif n'ayant provoqué que 41% de VERO pour une IC_{50} de 5.29 mg/ml.
- Le meilleur potentiel de sensibilisation des HEp-2 aux rayonnements ionisants a été décelé être à la concentration de 2 mg/ml d'OMIP pour un indice de combinaison inférieur à 1, ce qui indique une capacité de radiosensibilisation significative de l'OMIP et illustre l'effet synergique entre l'OMIP et le rayonnement.
- L'OMIP semble induire la mort des HEp-2 par apoptose.

En conclusion, nos résultats indiquent un double effet antiprolifératif sélectif et radiosensibilisateur de la pectine d'orange, particulièrement remarquable après sa modification physicochimique spécialement adaptée sur une lignée cellulaire cancéreuse.

L'OMIP est un candidat potentiel pour les nouvelles thérapies anticancéreuses.

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Advedissian T, Deshayes F, Poirier F, Grandjean C, Viguier M. (2015). Galectins, a class of unconventional lectins. *Medecine sciences*; **31**(5): 499-505.

Ahn GO. (2010). Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Process.National Academy of Sciences*; 107: 8363-8368.

Alkorta I, Garbisu C, Liama MJ, Serra J L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process.Biochemistry* ;**33** (1) : 21-28.

Almeida E, Facchib SP, Martinsa AF, Nocchic S, Schuquela ITA, Nakamura, CV, Rubiraa, AF, Muniza EC. (2015). Synthesis and characterization of pectin derivative with antitumor property against Caco-2 colon cancer cells. *Carbohydrate polymers*; 115: 139-145.

Andrieu L M. (1987). Traitements actuels des cancers. Medsi, Paris, France ; 555 pp.

Attari F, Sepehri H, Delphi L, Goliaei B. (2009). Apoptotic and Necrotic Effects of Pectic Acid on Rat Pituitary GH3/B6 Tumor Cells. *Iranian Biomedical Journal*; **13** (4): 163-170.

Auckland A. (2008).Surgery + adjuvant therapy beneficial for cervical cancer. *Inpharma weekly*; 3: 1623.

B

Bakkenist CJ, Kastan MB. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*; 421:499-506.

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K. (1994a). Galectins: a family of animal betagalactoside-binding lectins. *Cell*; **76**(4):597-598.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. (1994b). Galectins.Structure and function of a large family of animal lectins.The Journal of biological chemistry; **26**(33): 20807-20810.

Barreteau H, Dellatre C, Michaud P. (2006). Production of polysaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology Biotechnology*; **44**(3): 323-333.

Belarb M K. (2010). Faculté de Médecine, Université Abou BekrBelkaid, Tlemcen. Algérie. 154 pp.

Benchabane A. (1984). Extraction et appréciation des substances pectiques à partir des résidus de fabrication des jus d'oranges et de pomélo. Thèse de magister de l'Institut national Agronomique.

Bjork-Eriksson T, West C, Karlsson E, Mercke C. (2010). Tumor radiosensitivity (SF 2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*; **46**(1): 13-19.

Blanc D. (1990). Le rayonnement ionisant: détection, Dosimétrie ed. : Masson (Paris); 3-11.

Bresalier R S, Yan P S, Byrd J C, Lotan R, Raz A. (1997). Expression of the endogenous galactosebinding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. *Cancer*; 80: 776-787.

C

Cardoso SM, Coimbra MA, Lopes da Silva JA. (2003). Calcium mediated gelation of an olive pomacepectic extract. *Carbohydrate Polymers*; 52(2): 125-133.

Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX. (2004). The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International Journal of Cancer*; 108 (5): 741-749.

Chabner B A, Roberts T G. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews of Cancer*; 5: 65-72.

Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y. (1999). A senescencelike phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Research*; 59:3761-3767.

Chang CC, Chen WC, Ho TF, Wu HS, Wei YH. (2011). Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 111: 501-511.

Chevalier D, Dubrulle F, Vilette B. (2010). Anatomie descriptive, endoscopique et radiologique du larynx. EMC ORL; 20-630.

Conti S, Vexler A, Hagoel L, Kalich-Philosoph L, Corn BW, Honig N, Shtraus N, Meir Y, Ron I, Eliaz I, Lev-Ari S. (2018). Modified Citrus Pectin as a Potential Sensitizer for Radiotherapy in Prostate Cancer. *Cancer Therapies*; 17(4), 1225 -1234.

Courtois J. (2009). Oligosaccharides from land plants and algae: production and application in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*; 12: 261-273.

D

Delphi L, Sepehri H, Khorramizadeh M R, Mansoori F (2015). Pectic-Oligosaccharides from Apples Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest in MDA-MB-231 Cells, a Model of Human Breast Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention* ; 16 (13), 5265-5271.

Descôteaux C. (2013). Développement de nouveaux composés anticancéreux pour le traitement des cancers féminins. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire, Université du Québec ; pp 196.

Diehn M, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Matese J C, Hernandez-Boussard T, Rees CA, Cherry JM, Botstein D, Brown PO, Alizadeh AA. (2003). SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. *Nucleic Acids Research*; 31(1): 219-23.

Donato L. (2004). Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques. Thèse de Doctorat. Université de Limoges, France.

Dongowski G, Lorenz A, Proll J. (2002). The Degree of Methylation Influences the Degradation of Pectin in the Intestinal Tract of Rats and In Vitro. *Nutrition Journal*; 132 : 1935-1944

Drouin G, Douiellette A, Lacasse P, Paquette B. (2004). Effet radiosensibilisateur de l'acide linoléique conjugué chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* ; 82 : 94-102.

Dumic J, Dabelic S, Flogel M. (2006). Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica Biophysica Acta*; 1760: 616-635.

Dumont F, Altmeyer A, Bischoff P. (2009). Review, Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: novel molecularly targeted approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*; 19(6):1-25.

E

Ehrlich M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*; 21:5400-13.

Efeyan A, Serrano M. (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*; 6:1006-1010.

El-Batal AI, Omayma AR, EmanNoaman, Effat SI. (2012). In vivo and in vitro antitumor activity of modified citrus pectin in combination with selenium nanoparticles against Ehrlich carcinoma cells. *pharmascien and health care Journal*; 2 (6): 2249- 5738.

F

Fang Y, Al-Assaf S, Phillips GO, Nishinari K. (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*; 72, 334-341.

Fang T, Liu D, Ning H, Sun JY, Huang XJ, Dong Y, Geng M, Yun SF, Yan J, Huang R. (2018). Modified citrus pectin inhibited bladder tumor growth through down regulation of galectin-3. *Acta Pharmacologica Sinica* ; 39(12):1885-1893.

Faravash RS, Ashtiani FZ. (2008). The influence of acid volume, ethanol-to extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace. *Food Hydrocolloids*; 22: 196-202.

Farhad M, Rolig A S, Redmond WL. (2018). The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment, *OncolImmunology*; 7:6.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C. (2013). GLOBOCAN, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Fertil B, Malaise E P. (1985). Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *International Journal of Radiation Oncology, Biology , Physics*; 11: 1699-707.

Fishman ML, Pepper L, Damert WC, Baford RA. (1986). Chemistry and function of pectins. ACS symposium series; ISSN 0097-6156; 310.

Fukumori T, Oka N, Takenaka Y, Nangia-Makker P, Elsamman E, Kasai T, Shono M, Kanayama HO, Ellerhorst J, Lotan R. (2006). Galectin-3 regulates mitochondrial stability and

antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. *Cancer Research*; 66 : 3114-3119.

G

Givel J C, Langer I, Demartines N. (2007). Surgery. *Revue Médicale Suisse* ; 17 : 116-118.

Glinsky V, Raz A. (2009). Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate Research*; 344: 1788-1791.

Gnanasambandam R, Proctor A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*; **68** (3): 327-332.

Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. (2000). Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology* ; 73: 347- 377.

Gremy F, Perrin J. (1977). Elements de biophysique tome 2. Edition Flammarion, Paris.

Guillot SE, Van Loey A, Boulenguer P, Schols HA, Voragen, AG. (2007). Rapid HPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl-esterification and amidation. *Food Hydrocolloids*; 21: 85-91.

H

Hamdi D. (2016). Analyse des effets directs de rayonnements ionisants à différents TELs dans un modèle expérimental in vitro de cartilage humain sain et pathologique. Université Paris-Saclay.

Hall EJ. (1994). Radiobiology for the radiologist, 4th Edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia; 478 pp.

Hartati I, Kurniasari L. (2011). Enzymatic extraction of low methoxyl pectin as a potential anti-cancer agent from green cincau (*Premna Oblongifolia* Merr.) Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi ke-2 Tahun ; 33-38.

Hartati I , Riwayati I , Kurniasari L. (2011). Low methoxyl pectin as an anti cancer agent from citrus peel pectin through enzyme demethylation by papaya pectinesterase. *Technology*; **12** (1): 1410-8607.

Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*; 8:193-204.

Helton ES, Chen X. (2007). P53 modulation of the DNA damage response. *Journal of Cellular Biochemistry* ; 100:883-896.

Hematulin A, Ingkaninan K, Meethang S, Limpeanchob N, Sagan D. (2012). Derris Scandens Benth Extract Potentiates Radioresistance of Hep-2 Laryngeal Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*; **13**(4):1289-95.

Houcine M. (2019). Le cancer du Larynx en débat. 10es journées médicochirurgicales du CHU de Beni-messous.

Hollstein M, Bartsch H, Wesch H, Kure EH, Mustonen R, Mühlbauer KR. (1997). p53 gene mutation analysis in tumors of patients exposed to alpha-particles. *Carcinogenesis*; 18:511-516.

Hosseini G, Keshavarz M, Ahmadi S, Naderi N. (2013). Synergistic effects of PectaSol-C modified citrus pectin an inhibitor of galectin-3 and paclitaxel on apoptosis of human SKOV-3 ovarian cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*; 14:7561-7568.

Hubert-Habart M, Kokel B, Menechi G. (1987). Réflexions sur la chimiothérapie des cancers. *L'actualité chimique*; 105-113.

I

Ianzini F, Mackey MA. (1998). Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells. *Mutagenesis*; 13:337-344.

Igney FH, Krammer PH. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*; 2:277-288.

Inohara H, Akahani S, Kohts K, Raz A. (1996). Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion, *Cancer Research*, 56: 4530-4534.

International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans.(2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon, IARC Press 2004.

International Agency for Research on Cancer. IARC Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. (2018). Press release n° 263.

International commission on Radiological Protection.(1991).Recommendation, I.C.R.P. Report N° 60, Pergamon Press, New York; 201 pp.

J

Jeggo P, Lavin M F. (2009). Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it ? *International Journal of Radiation Biology*; 85:1061-1081.

Jonathan EC, Bernhard EJ, McKenna WG. (1999). How does radiation kill cells? *Current Opinion in Chemical Biology* ; 3:77-83.

Jones KR, Elmore LW, Jackson-Cook C, Demasters G, Povirk LF, Holt SE. (2005). p53 Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *International Journal of Radiation Biology* ; 81:445-458.

Joseph MM, Aravind SR. (2013). A galactomannan polysaccharide from *Punicagranatum* imparts in vitro and in vivo anticancer activity. *Carbohydrate Polymers*; 98(2): 1466-1475.

K

Kalpathy U, Proctor A. (2001). Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. *Food Chemistry*; 73: 393-396.

Kaup S, Grandjean V, Mukherjee R, Kapoor A, Keyes E, Seymour CB, Mothersill CE, Schofield PN. (2006). Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes. *Mutation Research*; 597:87-97.

Khule NR, Mahale NB, Shelar DS, Rokade MM, Chaudhari SR. (2012). Extraction of pectin from citrus fruit peel and use as natural binder in paracetamol tablet. *Pharmacia Lettre*; 4 (2): 558-564

Kim J J, Tannock I F. (2005). Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nature Review Cancer*; 5: 516-525.

Kim YH, Yoo KC, Cui YH, Uddin N, Lim EJ, Kim MJ, Nam SY, Kim IG, Suh Y, Lee SJ. (2014). Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1alpha stabilization. *Cancer Lettre*; **354** (1): 132-41.

Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. (2010). Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *Journal of Clinical Investigation*; 120: 694-705.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B and Melino G. (2009). Classification of cell death. *Cell Death and Differentiation*; 16: 3-11.

Komatsu K, Kodama S, Okumura Y, Koi M, Oshimura M. (1990). Restoration of radiation resistance in ataxia telangiectasia cells by the introduction of normal human chromosome. *Mutation Research*; 235:59-63.

Krzyszak A and Lipinska A. (2004). Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Biology . Lettre*; 9: 305-328.

L

Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB. (2001). Ionizing radiation-induced, mitochondria dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Research*; 61: 3894-3901.

Leclere L, Fransolet M, Cote F, Cambier P, Arnould T, Van Cutsem P, Michiels C. (2015). Heat-Modified Citrus Pectin Induces Apoptosis-Like Cell Death and Autophagy in HepG2 and A549 Cancer Cells. *PLoS ONE Journal* ; **10**(3) : e0115831.

Lefebvre J L, Pignat J C, Chevalier D. (1993). Cancer du larynx. *Oto-Rhino-Laryngologie*; 20-710.

Lefferts J A, Bartels C L, Tsongalis G J. (2008). Molecular oncology: current trends in diagnostics. *Future Oncology*; 4: 61-70.

Levigne S. (2002 a). Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectin using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids*; 16: 547-550.

Levigne S., Ralet MC, Thibault JF. (2002 b). Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, **49**(2): 145-153.

Link A, Balaguer F, Goel A. (2010). Cancer Chemoprevention by Dietary Polyphenols: Promising Role for Epigenetics. *Biochemical pharmacology*; **80** (12): 1771-92

Liu RH. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*; 134: 3479-3485.

Liu HY, Huang ZL, Yang GH, Lu WQ, Yu NR. (2008). Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World Journal Gastroenterol*; 14: 7386-7391.

Lopes Da Silva JA, Rao MA. (2006). Pectins: Structure, Functionality, and Uses. In *Food Polysaccharides and Their Applications, Second Edition*. Edition : Stephen, CRC Press Taylor and Francis Group; 11 : 353-412.

Lopresto CG. (2014). A non-conventional method to extract d-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional soxhlet extraction. *Separation and Purification Technology*; 137: 13-20.

Lucchesi ME. (2005). Extraction sans solvant assisté par micro-onde conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en science, discipline : Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologie. antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*; 84: 407-412.

M

Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. (2003). *Molecular biology of cancer*. BIOS Scientific Publishers (Oxford); 277 pp.

Mao F, Xiao B, Jiang Z, Zhao J, Huang X, Guo J. (2011). Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Medical Oncology*; 28(1): 121-126.

Mareel M, Leroy A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiological Reviews*; 83: 337-376.

Maxwell E G. (2014). Effects of modified bioactive pectins on colon cancer cells in vitro. *University of East Anglia*; 47-66.

Medrare L. (2011). Le cancer du larynx (A propos de 34 cas). Thèse N°006/ 11 ; FES. 132 pp.

Melino G: The sirens' song. *Nature*; 412: 23.

Meyer JL, Verhey J, Xia P, Wong J. (2007). New technologies in the radiotherapy clinic. *Frontiers in Radiation Oncology* ; 40: 1-17.

Mikkelsen RB, Wardman P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*; 22:5734-5754.

Milia J. (2005). Implication de RHOB dans les mécanismes cellulaires de réponse aux rayonnements ionisants. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse.

Mirzayans R, Scott A, Cameron M, Murray D. (2005). Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type tp53. *Radiation Research*; 163:53-56.

Michel B. (2002). Conservation par les sucres : confitures, gelées, fruits sur sucre. In : *Technologies de transformation des fruits. Technique et documentation-Lavoisier (Edt)*. Paris, 421-425.

Monsoor MA, Kalapathy U, Proctor A. (2001). Improved method for determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *Journal Agricultural and Food Chemistry*; **49** (6): 2756-2760.

Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW.(1955). Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Research* ; 15: 598-602.

Moreau D. (2006). Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse de doctorat. Université de Nantes.

Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C. (2000). Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**(6): 2334-8.

N

Nabi IR, Shankar J, Dennis JW. (2015). The galectin lattice at a glance. *Journal Cell Science*; 128: 2213-2219.

Nakahara S, Oka N, Raz A. (2005). On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*; **10**(2):267-275.

Nakahara S, Oka N, Wang Y, Hogan V, Inohara H, Raz A. (2006). Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. *Cancer Research*; 66: 9995-10006.

Niture S K, Refai L. (2013). Plant pectin: A potential source for cancer suppression. *Pharmacology Toxicology*; **8** (1): 9-19.

Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J.(2005). Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multicenter study. *Radiotherapy and Oncology*; 77: 18-24.

O

Olano-Martin E, Rimbach G H, Gibson G R, Rastall R A. (2003). Pectin and Pecticologosaccharides induce apoptosis in vitro human colonic adenocarcinoma cell. *Anticancer Research*; 23:341-346.

Organisation mondiale de santé OMS (2018), Cancer Aide-mémoire N°297.

P

Pandharipande S, Makode H. (2012). Separation of oil and pectin from orange peel and study of effect of pH of extracting medium on the yield of pectin. *Journal of Advanced Engineering Research and Studies*; **3** (2): 06-09.

Panouillé M, Thibault JF, Bonnin E. (2006). Cellulase and Protease Preparations Can Extract Pectins from Various Plant Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54: 8926-8935.

Paquot M, Aguedo M, Combo AM M. (2007). Analyse structurale des carraghénanes par hydrolyse enzymatique. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, France.

Park J, Khan T, Jung J. (2006). Structural studies of the glucuronic acid oligomers produced by *Gluconacetobacter hansenii* strain. *Carbohydrate Polymers*; **63**(4): 482-486.

Pérez S, Mazeau K. (2005). Conformation, Structures, and Morphologies of Celluloses. In Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. New York: CRC; 2 ed., 41-68.

Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, Yamazaki K, Replogle TS.(1995). Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*; 87: 348-353.

Pierron JP. (2007). Cancer and the symbolism of evil: disease, misfortune and evil? *PsychoOncologie*; 1(1): 31-40.

Plan national Cancer 2015-2019. (2014). Nouvelle vision stratégique centre sur le malade.

Platt D, RazA. (1992). Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*; 84: 438-442.

Poli G, Parola M. (1997). Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*; 22(1-2): 287-305.

Q

Qian X, Tan C, Yang B, Wang F, Ge Y, Guan Z, Cai J. (2017). Astaxanthin increases radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma through inducing apoptosis and G2/M arrest. *Diseases of the Esophagus*; 30:1-7.

Qilong R. (2013), Recent Advances in Separation of Bioactive Natural Products. *Chinese Journal of Chemical Engineering*; 21: 937-952.

R

Raz A, Loton R. (1987). Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Review*; 6:433-452.

Richards JS , Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. (2002). Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization . *Recent Progesterone Hormone Research*; 57: 195-220.

Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*; 11:973-979.

S

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI3 kinase. *Science*; 268:1749-53.

Sayah M Y, Chabir R, Benyahia H, Kandri Y R, Chahdi F O, Touzani H, Errachidi F. (2016). Yield, Esterification Degree and Molecular Weight Evaluation of Pectins Isolated from Orange and Grapefruit Peels under Different Conditions. *PLoS ONE*; 11(9): e0161751.

Sharma U, Rhaleb NE, Pokharel S, Harding P, Rasoul S, Peng H, Carretero OA. (2008). Novel anti-inflammatory mechanisms of N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in hypertension-induced target organ damage. *American Journal of Physiology*; 294: 1226-1232.

Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, Kikuchi A, Kuwano H, Raz A.(2005). Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Research*; **65**(9): 3535-7.

Sila DN, Smout C, Elliot F, Van Loey A, Hendrickx M. (2006). Non-enzymatic depolymerisation of carrot pectin: Towards a better understanding of carrot texture during thermal processing. *Journal of Food science*; 1-9.

Song, S, Mazurek N, Liu C, Sun Y, Ding QQ, Liu K, Hung MC, Bresalier RS. (2007). Galectin-3 mediates nuclear beta-catenin accumulation and wnt signaling in human colon cancer cells through regulation of gsk-3 beta activity. *Gastroenterology*; **132**(4): A129-A129.

Sulieman AM, Khodari KMY, Salih ZA. (2013). Extraction of Pectin from Lemon and Orange Fruits Peels and Its Utilization in Jam Making. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*; **3**(5): 81-84

Sundari N. (2015). Extrication of pectin from Waste peels: A review. *Pharmacology, biology and Chemistry sciences Journal*; 0975-8585.

T

Takahashi H, Aoyagi K, Nakanishi Y, Sasaki H, Yoshida T, Honda H.(2006). Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal cancer from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory. *Journal of Bioscience and Bioengineering* ; 102 : 46-52.

Téoule R, Duplaa AM. (1987). Gamma-irradiation of homodeoxyoligonucleotides 32 Plabelled at one end: computer simulation of the chain length distribution of the radioactive fragments. *International Journal of Radiation Biology*; 51: 429-439.

Thakur BR, Singh RK, Handa AK. (1997). Chemistry and uses of pectin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; **37**(1): 47-73.

Thompson LDR. (2006). Head and Neck Pathology. *A Churchill Livingstone*; 1-640.

Tiwari AK, Saha S N, Yadav VP, Upadhyay UK, Katiyar D, Mishra T. (2017). Extraction and Characterization of Pectin from Orange Peels. *Biotechnology and Biochemistry*; **1** (13): 39-47.

Tubiana M, Averbeck D, Bourguignon M, Bourhis J, Cassiman JJ, Cosset JM, Favaudon V, Gardès-Albert M, Girinski T, Gourmelon P. (2008). Radiobiologie, radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales (Hermann/Médecine). Chapitre II : Chimie sous rayonnement, 41-70.

Tureson I, CarlssonJ,BrahmeA, GlimeliusB, Zackrisson B,Stenerlow B. (2003). Biological response to radiation therapy. *Acta Oncology*; **42**(2): 92-106.

V

Vasta GR, Ahmed H, Bianchet MA, Fernández-Robledo JA, Amzel LM. (2012). Diversity in recognition of glycans by F-type lectins and galectins: molecular, structural, and biophysical aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1253:14-26.

Vincken JP, Schols HA, Oomen RJ, McCann MC, Ulvskov P. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*; 132: 1781-1789.

Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 12:385-392.

Vladislav V, Raz A. (2009). Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate Research*; 28, **344** (14): 1788-1791.

W

Walstra P. (2003). *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker; Inc. (Edt). NY. 788 p.

Wang L, Friess H, Zhu Z, Frigeri L, Zimmermann A, Korc M, Berberat PO, Büchler MW. (2000). Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Laboratory Investigation*; 80:1223-1241.

Wang S, Chen F, Wu J, Wang Z, Liao X, Hu X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of food research and technology*; **78** (2): 693-700.

Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*; 37:853-62.

West CM, Davidson SE, Roberts SA, Hunter RD. (1993). Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. *British Journal of Cancer*; 68: 819-823.

Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*; 17: 97-104.

Wu W, Wang M, Wu W, Singh SK, Mussfeldt T, Iliakis G. (2008). Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair*; 7:329-38.

Y

Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine*; 10:e17.

Yeoh S, Shi J, Langrish TAG. (2008). Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*; **218** (1-3): 229-237.

Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*; **369** (6478): 321-3.

Yu F, Finley RL, Jr, Raz A, Kim HR. (2002). Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *The Journal of biological chemistry*; **277**(18):15819-15827.

Z

Zhang L, Zhang X, Liu D, Ding T, Ye X. (2015). Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin. *LWT-Food Science and Technology*; 61: 630-637.

Annexes

ANNEXE I

Solutions de travail :

1- Tampon phosphate

Pour préparer un litre du tampon phosphate salin, abrégé PBS, de l'anglais phosphate buffer saline, il faut :

NaCl (137 mM)	8,0 g	<ul style="list-style-type: none">• Apporter le volume à 1 litre par l'eau distillée.• Ajustement du pH à 7,4.• Stérilisation par ultrafiltration sous l'hôte (membrane de porosité 0,45 ou 0,22 μm) ou par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.• Répartition de la solution en aliquotes dans des tubes de 15 ml.• Bien visser les bouchons et les entourer par du parafilm, puis les conserver à 4°C.
KCl (2,7 mM)	0,2 g	
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (10 mM)	1,44 g	
KH ₂ PO ₄ (1,76 mM)	0,2 g	

2- Solutions du test SRB :

- **Acide acétique à 1%** : 1ml d'acide acétique à 98% dans 100 ml d'eau distillée (T° ambiante).
- **SRB 0.4%** : 0,4 g de SRB dans 100 ml d'acide acétique à 1% (Flacon ambré, T° ambiante).
- **TCA à 50%** : 50 g de TCA dans 100 ml d' H₂O distillée (Flacon ambré, 4°C).
- **Tris 10 mM pH 10.5** : 0,242 g de tris bas dans 200 ml H₂O distillée, ajuster le pH à 10,5 avec HCl (T° ambiante).

ANNEXE II

Equipements :

- Hotte à flux laminaire (Safe FAST)
- Incubateur thermostaté à CO₂ (Sigma)
- Congélateur à -20°C (ENIEM)
- Congélateur à -80°C (Thermo Scientific)
- Cryoconservateur à azote liquide (ARPEGE 40)
- Centrifugeuse réfrigérée (Sigma)
- Microscope photonique traditionnel (Leica wild)
- Microscope photonique inversé (Olympus)
- Microscope à fluorescence (Leica DM6000B)
- Spectrophotomètre lecteur de microplaques (BioTek)
- Balance de précision (Sartorius)
- Hémocytomètre (cellule de Malassez).
- Vortex (Bioblock)
- Agitateurs
- pH mètre
- Autoclave
- Un irradiateur pilot gamma au Cobalt 60
- Unité de Cobalt 60 d'ELDORADO78 (AECL).