Impact des polyphénols du vin sur le système immunitaire et la réponse inflammatoire comme acteurs majeurs de prévention nutritionnelle

Pauline Chalons

▶ **To cite this version:**

Pauline Chalons. Impact des polyphénols du vin sur le système immunitaire et la réponse inflammatoire comme acteurs majeurs de prévention nutritionnelle. Cancer. 2017. hal-01695629

HAL Id: hal-01695629
https://ephe.hal.science/hal-01695629

Submitted on 29 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté par

Pauline CHALONS

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Impact des polyphénols du vin sur le système immunitaire et la réponse inflammatoire comme acteurs majeurs de prévention nutritionnelle

soutenu le 22 septembre 2017 devant le jury suivant :

Madame Thi-My-Anh NEILDEZ-NGUYEN– Présidente du jury
Monsieur Dominique DELMAS – Tuteur scientifique
Madame Catherine PAUL – Tutrice pédagogique
Madame Valérie SCHINI-KERTH – Rapportrice
Madame Anne VEJUX – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

M. Dominique DELMAS
Laboratoire de Lipides, Nutrition, Cancer, Unité 1231
Equipe Chimiothérapie, métabolisme des lipides et réponse immunitaire anti-tumorale
UFR des Sciences de Santé , 7Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 DIJON Directeur : Laurent LAGROST

et de

Mme Catherine PAUL
Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des cancers
Equipe EA7269 EPHE/uB
UFR des Sciences de Santé , 7Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 DIJON Directeur : Ali BETTAIEB

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté par

Pauline CHALONS

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Impact des polyphénols du vin sur le système immunitaire et la réponse inflammatoire comme acteurs majeurs de prévention nutritionnelle

soutenu le 22 septembre 2017 devant le jury suivant :

Madame Thi-My-Anh NEILDEZ-NGUYEN– Présidente du jury
Monsieur Dominique DELMAS – Tuteur scientifique
Madame Catherine PAUL – Tutrice pédagogique
Madame Valérie SCHINI-KERTH – Rapportrice
Madame Anne VEJUX – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

M. Dominique DELMAS
Laboratoire de Lipides, Nutrition, Cancer, Unité 1231
Equipe Chimiothérapie, métabolisme des lipides et réponse immunitaire anti-tumorale
UFR des Sciences de Santé , 7Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 DIJON Directeur : Laurent LAGROST

et de

Mme Catherine PAUL
Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des cancers
Equipe EA7269 EPHE/uB
UFR des Sciences de Santé , 7Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 DIJON Directeur : Ali BETTAIEB

Remerciements

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail de Diplôme de l'EPHE. Merci à **Thi-My-Anh NEILDEZ-NGUYEN** d'avoir accepté de présider le jury ; à **Valérie SCHINI-KERTH** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de Diplôme de l'EPHE en qualité de rapportice mais également à **Anne VEJUX** en tant qu'examinatrice de mon mémoire.

Dominique DELMAS. Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser mon Diplôme SVT au sein de votre groupe de recherche et d'avoir accepté d'être mon tuteur scientifique. Je vous remercie également de m'avoir permis de terminer mes travaux durant ces 5 derniers mois. Enfin, Merci pour votre pédagogie et vos conseils.

Catherine Paul. Je te remercie tout d'abord, d'avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique durant ces trois années. Merci d'avoir su me faire garder le cap quand je pensais ne pas avoir suffisamment de résultats pour soutenir, merci pour ta disponibilité et tes conseils. Je te remercie également d'avoir pris le temps de corriger mon manuscrit, malgré le timing plutôt serré !

François GHIRINGHELLI. Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce projet au sein de votre équipe durant ces 3 années. Je tiens également à remercier tous **les membres de cette équipe** que j'ai côtoyé de près ou de loin durant mes 3 années au labo. Ce fut un plaisir de travailler avec vous. Mais également toutes **les personnes des deuxièmes et troisièmes étages** avec qui j'ai aimé travaillé et discuté, merci pour vos conseils.

A la DD Team, Virginie, Alexia, Maxime, Dylan. Merci de m'avoir transmis vos connaissances scientifiques, votre rigueur et votre détermination durant ces trois années au labo. Je vous remercie également pour votre disponibilité, vos précieux conseils ainsi que votre aide pour les manips. Enfin, merci à tous pour votre gentillesse et votre bonne humeur ; elles m'auront été d'une aide précieuse durant les moments de doutes.

Flavie. Toi, que je ne connaissais encore pas quand Dominique t'a proposé le premier contrat d'une longue série, on me disait déjà grand bien de toi. Il ne nous aura pas fallu longtemps pour apprendre à se connaitre et mettre en route notre binôme de CHOC. Tu es devenue au cours du temps bien plus qu'un simple collègue, une amie avec qui j'ai pu partager mes hauts et mes bas, tu as toujours su me faire remonter la pente et je ne saurais comment t'en remercier. Je te remercie également pour ton aide précieuse lors des manips ; toi du matin, moi plutôt du soir, je te remercie pour les manips que tu as commencé de bonne heure, ou pour les moments où tu m'as aidé à finir à temps pour que je puisse aller au sport ! Notre binôme de choc manquera certainement à la science !!!! Je regrette beaucoup de ne plus travailler avec toi, mais nous n'abandonnerons jamais les soirées UNO avec nos hommes et Lulu. Je te souhaite beaucoup de courage pour la fin de ta thèse, beaucoup de réussite professionnelle

et personnelle mais surtout beaucoup de bonheur avec ta famille, car oui depuis aujourd'hui tu es une maman qui déchire ! Milles bisous.

Lucile, Lulu, la deuxième petite révélation de mes trois années au labo. Tu n'es pas seulement une camarade de Diplôme de l'EPHE ni une simple collègue mais véritablement une amie. Mon fier exemple en matière de rédaction de mémoire et de préparation de soutenance, tu as été un véritable pilier durant mes derniers mois au labo. Je te remercie pour les moments où tu as su me remotiver dans les phases de doutes et pour les moments où tu m'as aidé pour les manips. Sans oublier les longues discutions autour d'un thé, les supers moments à la salle de sport ou au badminton, pour les nombreuses séances shopping ou encore les super soirées passées ensemble, MERCI. Sache que même si je quitte le labo avec plus ou moins de regrets, je ne serais pas loin et nous partagerons toujours autant de merveilleux moments. Je te souhaite plein de bonne choses pour la suite, si bien personnellement que professionnellement où tu as su te faire une nouvelle place. Milles bisous.

Lucie, Angel, Fanny, Cédric, Harmonie, Aurélie. Merci pour ces supers moments autour d'un thé ou d'un café, pour les nombreux et précieux conseils que vous avez pu me fournir, pour tous les produits que je vous aie emprunté. Pour l'ensemble des bons moments passés ensemble, au labo, au sport pour certains ou en soirées pour d'autres, MERCI.

A mes amis avec qui je partage un bout de chemin depuis les petites classes ou le lycée. Je vous remercie pour votre soutien, soyez tous fier du chemin que vous avez parcouru jusqu'à aujourd'hui. Restez comme vous êtes !

A mes parents et ma sœur. Papa, maman, je ne saurais comment vous remercier de m'avoir permis de faire ces études au prix de quelques petits sacrifices. Merci de m'avoir transmis les belles valeurs que vous portez au quotidien ; votre travail, votre générosité et votre gentillesse. Vous avez toujours su me porter afin que je puisse m'épanouir tant professionnellement que personnellement et je vous en suis éternellement reconnaissante. Un immense merci à vous trois de croire en moi, j'espère vous rendre fière par ce que j'aimerais devenir. Je vous aime.

Pour finir j'aimerais remercier ***mon compagnon, mon chéri***. Par ta détermination professionnelle, tu m'as encouragée à suivre ma voie et je t'en suis extrêmement reconnaissante. Merci à toi d'être là dans les bons comme dans les mauvais moments, de m'avoir porté vers l'avant durant mes périodes de doutes. Merci d'être mon pilier par ta force de caractère, mon bol d'air par ton humour (même si je n'approuve pas toujours !!)… Je suis fière de l'homme que tu es devenu au cours de ces 8 premières années passées à tes côtés. Un immense MERCI à toi sans oublier nos deux boules de poils. Je t'aime mon chat.

Table des matières

Liste des figures 8
Liste des tableaux 10
INTRODUCTION 11
I. De la vigne au vin 12
1. Vin et santé : une grande controverse 12
a) French Paradox et effets positifs de la consommation de vin 12
b) Les effets néfastes d'une consommation excessive de vin 14
2. La vinification 16
1. Composition du vin rouge 19
II. Le cancer 24
1. Cancer colorectal (CCR) 25
a) Epidémiologie 25
b) Anatomopathologie du CCR 26
c) Prise en charge médicale 27
2. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse 27
3. Immunosurveillance et immunoediting 28
III. Inflammation et système immunitaire 31
1. Activation de l'inflammation par les signaux de dangers 32
2. Etapes de la réaction inflammatoire 32
3. De l'inflammation chronique au cancer 34
a) Les médiateurs de l'inflammation dans de cancer 35
b) PRR et inflammasome NLRP3 38
i. Les NLR 39
ii. Structure de l'inflammasome NLRP3 40
iii. Activateurs et mécanismes d'activations de l'inflammasome NLRP3 41
iv. Mécanismes de régulation de l'inflammasome NLRP3 43
c) De l'IL-17 au Th17 pro-inflammatoire 45
Objectifs 49
MATERIEL ET METHODES 51

I. Culture cellulaire et modèles murins 52
1. Lignées cellulaires 52
a) Origine des lignées 52
b) Entretien des lignées 52
2. Modèles murins et modèles de tumeurs coliques associés 53
a) Le modèle Balb/c 53
b) Le modèle C57BL/6 54
3. Culture primaire de lymphocyte T helper 17 (Th17) 54
a) Purification des lymphocytes T Naïfs 54
b) Différenciation des lymphocytes T Naïfs en lymphocytes Th17 55
4. Traitement des cellules 55
II. Préparation de l'extrait polyphénolique de vin rouge (RWE) 56
1. Le vin 56
2. L'extraction de polyphénols 56
a) Préparation de la colonne 56
b) Séparation des composés 56
c) Elution des composés 56
d) Désalcoolisation et déshydratation de la fraction d'intérêt 57
3. Description qualitative et quantitative de l'extrait de vin 57
III. Test de cytotoxicité au crystal violet 58
IV. Western Blotting 58
1. Préparation de l'extrait protéique 58
2. Dosage des protéines 58
3. Préparation des échantillons 59
4. Préparation des gels d'acrylamide, migration et transfert 59
5. Révélation 60
V. Analyses par cytométrie en flux 62
1. Marquage Annexine V / 7AAD 62
VI. Microscopie 62
1. Marquage au Hoechst 33342 62
2. Immunofluorescence 63

VII. Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction : RT-qPCR 63
1. Lyse cellulaire et extraction d'Acide RiboNucléique totaux (ARN) 63
2. Transcription inverse 64
3. Réaction par polymérisation en chaîne quantitative: qPCR 64
VIII. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* : ELISA 65
i. Tests statistiques 66
RESULTATS 67
I. Activité biologique de l'extrait polyphénolique de vin rouge *in vitro et in vivo* 68
1. Effet cytotoxique de l'extrait polyphénolique de vin rouge *in vitro* 68
a) Evaluation de l'effet antiprolifératif de l'extrait polyphénolique de vin rouge 68
b) Induction de la mort cellulaire par l'extrait polyphénolique de vin rouge 70
c) Mise en évidence de la mort cellulaire par apoptose 73
2. Evaluation de l'activité anti-tumorale de l'extrait polyphénolique de vin rouge *in vivo* 75
II. Etude de la modulation de la différenciation du lymphocyte Th17 par l'extrait polyphénolique de vin rouge 77
1. Mise en évidence de la diminution de la production d'IL-17 par le Th17 *in vitro* après un traitement par l'extrait polyphénolique de vin rouge 77
2. Mise en évidence de la diminution de l'expression génique de l'*il-17A* et l'*il-17F in vitro* après un traitement à l'extrait polyphénolique de vin rouge 78
3. Mise en évidence de la modulation du taux protéique de STAT3, P-STAT3 et Rorγt *in vitro* après un traitement à l'extrait polyphénolique de vin 80
III. Etude de l'activité de l'extrait polyphénolique de vin rouge sur le «priming » ou l'activation de l'inflammasome NLRP3 81
2. Mise en évidence du « Priming » et de l'activation de l'inflammasome de NLRP3 par le LPS dans les Raw264.7 83
3. Mise en évidence d'un effet de l'extrait polyphénolique de vin sur le « priming » de NLRP3 et l'activation et l'assemblage de l'inflammasome 83
a) Mise en évidence d'un effet de RWE sur le « priming » de NLRP3 sur les Raw264.7 84
i. Utilisation de l'ATP comme inducteur de l'inflammasome 85
ii. Utilisation de la Nigéricine (Nig) comme inducteur de l'inflammasome 87
b) Mise en évidence d'un effet de RWE sur l'activation de NLRP3 dans les Raw264.7 89
i. Utilisation de l'ATP comme inducteur de l'inflammasome 89

ii. Utilisation de la Nigéricine (Nig) comme inducteur de l'inflammasome 92

c) Mise en évidence d'un effet de RWE sur le « priming » de NLRP3 dans les J774A.1 95

d) Mise en évidence d'un effet de RWE sur l'activation et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 dans les J774A.1 98

CONCLUSIONS, DISCUSSION, PERSPECTIVES 101

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 110

ANNEXES 118

Annexe 1 119

Annexe 2 120

Liste des abréviations

7AAD : 7-aminoactinomycine D

A.U. : Unités arbitraires

ADN : Acide Désoxy-riboNucléique

ADNc : Acide DésoxiriboNucléique complémentaire

AIM2 : A*bsent In Melanoma 2*

AOC : Appellations d'Origine Contrôlées

APS : *Ammonium Persulfate*

ARN : Acide RiboNucléique

ASC : *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*

ATCC : *American Type Culture Collection*

ATP : Adenosine Tri-Phosphate

BIR : *Baculovirus Inhibitor Repeat*

BIVB: Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne

BSA : *Bovin Serum Albumin*

CARD : *Caspase Activation and Recruitment Domain*

CCR: Cancer colorectal

CLR : *C-type Lectin Receptors*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CTIVV : Centre Technique Interprofessionnel de la Vigne et du Vin

DAMP : *Damage-Associated Molecular Pattern*

DC : *Dendritic Cell*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's*

dNTP : desoxyribonucléotide triphosphate

DTT : Dithiothréitol

ECACC: *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

HEPES : *4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid*

HMGB1 : *High Mobility Group Box 1*

HRP : *Horse Radish Peroxidase*

HSP : *Heat Shock Protein*

IFN-γ : InterFéroN gamma

IL : Interleukine

IL-23 R : *Interleukin-23 Receptor*

iNOS : *inducible Nitric Oxide Synthase*

IPAF : *Ice Protease-Activating Factor*

JAK : *JAnus Kinase*

LPS : LipoPolySaccharide

LRR : *Leucine Rich Repeat*

MACS : *Magnetic-Activated Cell Separation*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MDSC : *Myeloid Derived Suppressor Cell*

MEM NEAA : *Minimal Essential Medium Non-Essential Amino Acid*

NAIP : *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*

NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B*

NK : *Natural Killer*

NLR : *Nod Like Receptor*

NLRP3: *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

PBS : *Phosphate-buffered saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PFA : Paraformaldéhyde

PPAR-γ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

PYD : *PYrin Domain*

q.s.p. : quantité suffisante pour

qPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

RLR : *RIG-I-Like receptors*

Ror-γ t : *Retinoid-Related Orphan Receptor gamma T*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RPMI 1640 : *Roswell Park Memorial Institute 1640*

RT : *Reverse Transcription*

RWE : *Red Wine Extract*

SDS : *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate-PloyAcrylamid Gel Electrophoresis*

SOCS : *Suppressor of cytokine signaling*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TBS : *Tris-buffered saline*

TCR : *T-Cell Receptor*

TEMED : *N,N,N',N'-Tétraméthylène diamide*

TGF : *Tumor Growth Factor*

Th : lymphocyte T helper

TIR : *Toll/IL-1 Receptor*

TLR : *Toll Like Receptor*

TMB : Tétraméthylbenzidine

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

Liste des figures

Figure 1. Schéma des différentes étapes de la vinification des vins rouges de Bourgogne 18

Figure 2. Incidence et mortalité du cancer colorectal selon les zones géographiques 25

Figure 3. Les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses..... 28

Figure 4. La théorie de l'immunoediting 30

Figure 5. La réaction inflammatoire 34

Figure 6. Structure des NLR humains 39

Figure 7. Composition de l'inflammasome NLRP3 41

Figure 8. Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 43

Figure 9. Mécanismes d'activation et voies transcriptionnelles du lymphocyte T helper 17 . 47

Figure 10. Modèles murins utilisés 54

Figure 11. Evaluation de la viabilité cellulaire sur quatre lignées cellulaires de cancer colorectal murines et humaines..... 69

Figure 12. Caractérisation de la mort cellulaire induite par l'extrait de vin rouge..... 72

Figure 13. Mise en évidence de la mort cellulaire par apoptose induite par l'extrait de vin rouge 74

Figure 14. Effet anti-tumoral de l'extrait de vin rouge *in vivo* 76

Figure 15. Diminution de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-17 78

Figure 16. Diminution de l'expression génique de l'*il-17A* et de l'*il-17-F* des Th17 79

Figure 17. Mise en évidence du taux de protéines régulant la différenciation du Th17 après traitement par l'extrait polyphénolique de vin rouge 80

Figure 18. Evaluation de la viabilité cellulaire sur les macrophages murins Raw264.7 après un traitement à l'extrait de vin 82

Figure 19. Mise en évidences du « Priming » et de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par le LPS..... 83

Figure 20. Chronologie des deux cinétiques de traitements utilisés lors des expérimentations 84

Figure 21. Activité du RWE et du RSV sur le « priming » de NLRP3 par les Raw264.7 suite à une activation par ATP 85

Figure 22. Activité du RWE et du RSV sur le « priming » de NLRP3 par les Raw264.7 suite à une activation par la Nigéricine..... 87

Figure 23. Effet de RWE et du RSV l'expression génique de *NLRP3, IL-1β, caspase-1* et *ASC* par les Raw264.7 après leur « priming » par le LPS et activation par la Nigéricine..... 88

Figure 24. Activité du RWE et du RSV sur l'activation de NLRP3 dans les Raw264.7 suite à une activation par l'ATP. 90

Figure 25. Effet de RWE sur l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 suite à une activation par l'ATP..... 91

Figure 26. Activité du RWE et du RSV sur l'activation de NLRP3 dans les Raw264.7 suite à une activation par la Nigéricine. 92

Figure 27. Effet de RWE et du resvératrol sur l'expression génique de NLRP3, IL-1β, caspase-1 et ASC par les Raw264.7 après leur « priming » par le LPS et activation par la Nigéricine 94

Figure 28. Niveau d'expression protéique basal de ASC et NLRP3 dans les Raw264.7 et J774A.1.. 95

Figure 29. Activité du RWE et du RSV sur le « priming » de NLRP3 dans les J774A.1 suite à une activation par la Nigéricine. 96

Figure 30. Evaluation de l'effet de RWE et du resvératrol sur le « priming » de NLRP3 dans les J774A.1 *via* l'expression génique de *NLRP3, IL-1β, caspase-1 et ASC*..... 97

Figure 31. Evaluation de l'effet de RWE et du resvératrol sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les J774A.1 *via* l'expression génique de *NLRP3, IL-1β, caspase-1 et ASC* 98

Figure 32. Effet de RWE sur l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 par une activation à la Nigéricine..... 100

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique du vin 20

Tableau 2 : Description qualitative et quantitative de l'extrait de vin 57

Tableau 3 : Composition des gels SDS-PAGE 59

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires 61

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires 61

Tableau 6 : Séquence des amorces 65

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des valeurs d'IC50 de la figure 11 70

INTRODUCTION

I. De la vigne au vin

1. Vin et santé : une grande controverse

Tantôt décrié pour les méfaits de son alcool, tantôt adulé par les bienfaits des molécules naturelles qu'il contient, le vin et ses relations avec la santé sont contradictoires et font souvent débat.

a) French Paradox et effets positifs de la consommation de vin

En dépit de la confusion qui règne autour d'une consommation modérée de vin, il apparait en France, principalement dans le Sud-ouest, un constat intriguant. Malgré une alimentation riche en graisse et une consommation modérée de vin, les Français présentent un taux d'infarctus plus faible que les habitants d'autres pays du Nord de l'Europe ou des Etats-Unis, ayant un développement économique et une consommation de graisse analogue ; ce phénomène fut pour la première fois nommé « French Paradox » ou Paradoxe Français en 1998. Celui-ci a été expliqué par les effets protecteurs de certains aliments consommés par cette population où le vin semblerait un candidat protecteur intéressant (Renaud & Gueguen, 1998).

Des études épidémiologiques mondiales telles que le projet WHO-MONICA (World Health Organisation - MONitoring trends and determinants In CArdiovascular disease) (Tunstall-Pedoe, Kuulasmaa et al., 1994) ont permis de montrer que la survenue d'infarctus du myocarde en France, s'inscrit dans un gradient décroissant Nord-Sud au niveau Européen qui remet en cause le paradoxe français (Lang, Ducimetière et al., 1998). Néanmoins, ce phénomène pourrait s'expliquer par une alimentation qui tend à ressembler au régime « méditerranéen » ou « régime crétois ». Ce dernier est composé d'une abondance de fruits, de légumes, de céréales et d'huile d'olive, d'une consommation modérée de vin et de poissons et d'une consommation limitée en produits laitiers, œufs et viande. Ce régime est pratiqué dans les pays du bassin méditerranéen et semble diminuer l'incidence de la mortalité et prévenir des maladies cardiovasculaires et du cancer (Sofi, Macchi et al., 2014).

Concernant le vin seul, des études ont pu mettre en évidence qu'une consommation régulière et modérée présente des « effets santé » protecteurs et permettrait ainsi d'augmenter la longévité comparativement à l'abstinence ou à l'excès (Grønbaek, Becker et al., 2001). L'un

des bienfaits les plus décrit concerne les maladies cardiovasculaires. La consommation d'un à trois verres de vin par jour, soit une consommation modérée, semble diminuer le risque de maladies cardiovasculaires, plus particulièrement le risque d'athérosclérose (German & Walzem, 2000).

Dès 1996, Goldberg et son équipe ont étudié le risque d'athérosclérose sur des volontaires sains ayant consommé du resvératrol à partir soit de vin blanc (concentration de resvératrol non détectable), soit de vin rouge (4 mg/ml de resvératrol) ou de jus de raisin avec ou sans resvératrol (Pace-Asciak, Rounova et al., 1996). Après 4 semaines de consommation, le resvératrol semblerait empêcher l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine. Néanmoins, il faut rester prudent face à cette étude car elle ne tient pas compte des autres polyphénols du vin qui pourraient interférer avec les processus ou de l'alcool que contient le vin. Les principales molécules auxquelles sont attribués ces bienfaits sont les flavonoïdes. Cette grande famille de polyphénols est présente dans une grande partie des fruits et légumes. Ces molécules, en plus de leurs activités anti-thrombiques, se sont révélées être des anti-cancéreux en modulant les voies de signalisation connues pour être impliquées dans la cancérogénèse (Fernandes, Pérez-Gregorio et al., 2017, Pierini, Gee et al., 2008). De plus, quelques études épidémiologiques rétrospectives vont en ce sens. Crockett et coll. ont pu montrer une relation inverse entre une consommation modérée de vin (inférieur à 14 grammes d'alcool par jour, soit 1 à 2 verre par jour) et le développement d'un carcinome de la partie distal du colon et du rectum (Crockett, Long et al., 2011).

Dans ce cadre, F. Mazué et coll. ont pu mettre en évidence une diminution de la prolifération de cellules tumorales de cancer colique *in vitro* en présence d'un extrait de vin désalcoolisé (Mazué, Delmas et al., 2014). De même, He et coll. ont montré un effet préventif de l'extrait de vin contre le cancer du sein. En effet, les polyphénols contenus dans cet extrait seraient capable d'inhiber l'aromatase, une enzyme surexprimée par les cellules de la tumeur mammaire (He, Sun et al., 2008). Certaines études présentent également une réduction du risque de cancer colorectal uniquement en association avec un régime alimentaire de type méditerranéen. Dans ce cas, le mode de vie aurait plus d'impact sur la survenue de la maladie que la prise des polyphénols du vin (Klarich, Brasser et al., 2015). Parmis les polyphénols du vin, le resvératrol et ses métabolites ont montré leur efficacité par une diminution de 5 % de

la prolifération tumorale chez des patients atteint d'un cancer colorectal lors d'un essai clinique de phase I/II (Patel, Brown et al., 2010).

Néanmoins, les résultats concernant les effets des polyphénols dans le cancer sont très variés. Chao et coll. ne révèlent pas de réduction du risque de survenue d'un cancer colorectal lors d'une consommation modérée de vin (Chao, Haque et al., 2010).

Une étude a montré qu'en association, les polyphénols avaient des activités différentes (Mazué et al., 2014). En effet, la combinaison resvératrol/quercétine montre un fort effet synergique, comparativement aux molécules seules, sur la prolifération de cellules tumorales de cancer colique et sur leur blocage en phase S. De manière intéressante, la catéchine, un flavanol, produirait un simple effet additif sur la prolifération lorsqu'il est en combinaison avec le resvératrol et la quercétine. Ces données illustrent la grande variabilité des résultats sur les études « vin et santé » et ceci pourrait s'expliquer par la différence de composition des différents vins.

Par ailleurs, au sein de notre équipe, nous avons pu démontrer qu'en plus de l'effet anti-cancéreux observé, certains polyphénols dont quelques flavonoïdes pouvaient jouer un rôle important dans la modulation du système immunitaire et notamment dans la réponse immune adaptative ou innée. Les conséquences importantes de cette modulation sont la diminution de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et de substances responsables d'une inflammation chronique telles que des cytokines et des interleukines (Delmas & Xiao, 2012, Ghiringhelli, Rebe et al., 2012)

b) Les effets néfastes d'une consommation excessive de vin

Il est couramment admis qu'une consommation non modérée ou excessive de vin peut avoir des effets néfastes importants, de par sa teneur en alcool, surtout si elle est accompagnée d'autres boissons alcoolisées. L'effet négatif le plus visible du vin est son effet enivrant. L'éthanol pris à forte dose agit défavorablement sur le système nerveux central pendant plusieurs heures, pouvant causer des dommages irréversibles sur le cerveau comme la perte de connexion neuronale ou la destruction de neurones. Outre la sensation d'euphorie, la plupart des fonctions cérébrales sont altérées provoquant une augmentation de la prise de risque et une déficience des fonctions motrices et d'équilibre. Ces phénomènes augmentent considérablement la survenue d'incident telle que l'insécurité routière ou les comportements

violents (Arvers, Batel et al., 2003). De plus l'alcool est une drogue facilement accessible qui est responsable d'une forte accoutumance. En effet, l'alcoolisme se caractérise par l'absence du sentiment de satiété lors de la prise d'éthanol.

Il est également important de noter que la consommation d'alcool, même occasionnelle, pendant la grossesse peut engendrer de graves conséquences sur le développement du fœtus et le comportement du jeune enfant. La prise d'alcool peut entrainer une naissance prématurée, un retard de croissance du jeune enfant ou dans les cas les plus graves, l'enfant peut souffrir du syndrome d'alcoolisation fœtal à la naissance provoquant des malformations comme la microcéphalie et des déficiences intellectuelles (Wilhoit, Scott et al., 2017).

De plus, l'éthanol contenu dans une boisson alcoolisée fait parti des cancérigènes de catégorie 1 selon l'Agence Internationale de recherche contre le cancer (IARC). C'est alors à ce titre que la consommation d'alcool pourrait favoriser le développement de certains cancers (Secretan, 2009) comme les cancers de la cavité buccale, du pharynx, du larynx et de l'œsophage mais également le cancer du sein (Narod, 2011, Nowosielska-Grygiel, Owczarek et al., 2017). Néanmoins, il ne faut pas négliger le rôle de l'acétaldéhyde, cancérigène de catégorie 1 selon l'IARC, qui est directement présent dans les aliments ou les boissons ou qui peut être produit à partir de l'éthanol. Ce composé pourrait induire des dommages à l'ADN, altérer l'expression génique et ainsi augmenter le risque de cancérogénèse colique et gastrique (Na & Lee, 2017).

Enfin, le foie est le plus souvent touché par une consommation excessive d'alcool car il est le principal organe assurant la transformation de l'éthanol. Les cellules hépatiques, qui permettent la transformation de l'éthanol en acétaldéhyde, se trouvent lésées par ce dernier pouvant ainsi provoquer l'apparition d'une stéatose puis d'une cirrhose et enfin d'un carcinome hépatique (Balogh, Victor et al., 2016).

De manière générale, la plupart des études ne distinguent pas consommation de vin (modérée ou excessive) et la prise d'éthanol, oubliant ainsi de prendre en compte les autres constituants du vin.

Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par la grande variabilité de composition qualitative et quantitative du vin. Effectivement, lors de la fabrication de celui-ci, les procédés diffèrent en fonction de la région de production, du vigneron, du matériel utilisé. Les variations peuvent également être dues au cépage de vigne utilisé. En effet les baies d'un Pinot Noir

contiendront plus de polyphénols que les baies d'un Chardonnay ou d'un Riesling. De plus le temps de macération des parties solides dans le moût peut varier et ainsi influer sur la quantité et les variétés de polyphénols retrouvés dans le vin (Mazué et al., 2014).

2. La vinification

La production de boissons fermentées, plus vieil ancêtre du vin, remonte probablement au Mésolithique lors de la Préhistoire. Néanmoins, la mise en culture de la vigne aurait débuté il y a six mille ans, dans le sud du Caucase. Les premiers vins fabriqués étaient aromatisés avec des fruits, des herbes ou des épices et enrichis de miel ou de sel pour une meilleure conservation.

En Bourgogne, l'origine du vin est datée de l'Antiquité, où la culture de la vigne a été apportée par les Romains lors de la conquête de la Gaule. C'est au Moyen Âge que cette culture s'intensifie grâce aux deux ordres monastiques Cîteaux et Cluny.

De nos jours, la Bourgogne produit 3 % de la production française et 0,5 % de la production mondiale mais n'en est pas moins une région viticole majeure réputée pour la qualité de ses vins. La situation géographique, les facteurs météorologiques, la composition de ses sols et les nombreux cépages renommés sont autant d'atouts que compte la Bourgogne pour sa vigne et son vin et lui permettent de donner naissance à 100 Appellations d'Origine Contrôlées (AOC). Aujourd'hui, même si la consommation de vin ne cesse de diminuer, elle reste importante dans les pays du bassin méditerranéen en restant un élément central de notre culture et de notre alimentation.

La fabrication du vin est basée sur la fermentation d'un jus de fruit, le raisin, issu de la vigne, *Vitis vinifera.* Ces baies sont riches en sucres (monosaccharides, polysaccharides et hétérosides) qui, en association avec les levures et bactéries lactiques, permettent la fermentation malolactique. Les seconds constituants du raisin sont les acides organiques qui donnent le caractère acide au vin. Arrivent ensuite les composés phénoliques qui ont une forte influence sur les propriétés organoleptiques du vin. Cette grande famille de molécules comprend : les acides phénols, les stilbènes, les flavonoïdes et les anthocyanes. Pour finir, les tanins, qui sont des macromolécules phénoliques, composent les baies.

La vinification, qui permet la transformation du raisin en vin, est une suite de processus complexes qui nécessite l'intervention de levures et de bactéries. Ces microorganismes sont naturellement présents sur la peau du raisin, dans les cuves et les fûts mais aussi dans l'ensemble des équipements utilisés lors de la vinification. Néanmoins, les méthodes de vinification varient en fonction des régions et du vigneron. Ce processus est décrit ci-dessous en reprenant les treize étapes utilisées dans l'élaboration des vins rouges de Bourgogne (Figure 1) :

1. Egrappage ou éraflage et foulage : séparation des baies de raisin de la rafle et éclatement de celles-ci afin d'en libérer le jus.
2. Encuvage: processus de macération dans des cuves d'acier.

3. Pigeage et remontage : les parties solides (chapeau de marc) qui se trouvent à la surface de la cuve sont enfoncées dans le moût puis ce dernier est pompé et réintroduit par le haut de la cuve en arrosant le chapeau de marc, afin d'en extraire les tanins et la couleur. C'est lors de cette étape que les polyphénols passent de la pellicule et des pépins au moût.

4. Fermentation alcoolique : transformation des sucres du moût en alcool par les levures, qui libèrent de nombreux arômes ; le moût devient vin.

5. Ecoulage et décuvage : le vin est écoulé dans une autre cuve ou dans des fûts en bois. Il est appelé « vin de goutte » et s'oppose au « vin de presse » récupéré du marc lors du pressurage (6).

7. Assemblage et débourbage : le vin de goutte et le vin de presse qui sont des vins troubles, sont assemblés avant l'élevage. Les particules les plus lourdes sédimentent et forment des bourbes qui sont éliminées. Le vin clair est alors mis en fût.

8. Fermentation malolactique : Des bactéries lactiques, principalement de l'espèce *O. oeni*, transforment l'acide malique en acide lactique diminuant l'acidité du vin et le stabilisant.

9. Soutirage et sulfitage : le vin clair est soutiré (changé de contenant) dans une cuve ou un fût et les grosses lies sont éliminées. Afin de le protéger des micro-organismes et de l'oxydation, le vin se voit ajouter du soufre (SO_2).

10. Elevage : le vin est conservé en fût pendant plusieurs mois durant lesquels des échanges se font avec le bois. C'est à cette étape que le vin subit une évolution structurelle et aromatique.

11. Soutirage, assemblage : le vin soutiré de différents fûts est assemblé en cuve afin d'homogénéiser son bouquet aromatique.

12. Collage : le vin est clarifié par une colle protéique, minérale ou synthétique qui précipite les particules en suspension. Ainsi clarifié et stabilisé, le vin peut être filtré et mis en bouteille (13).

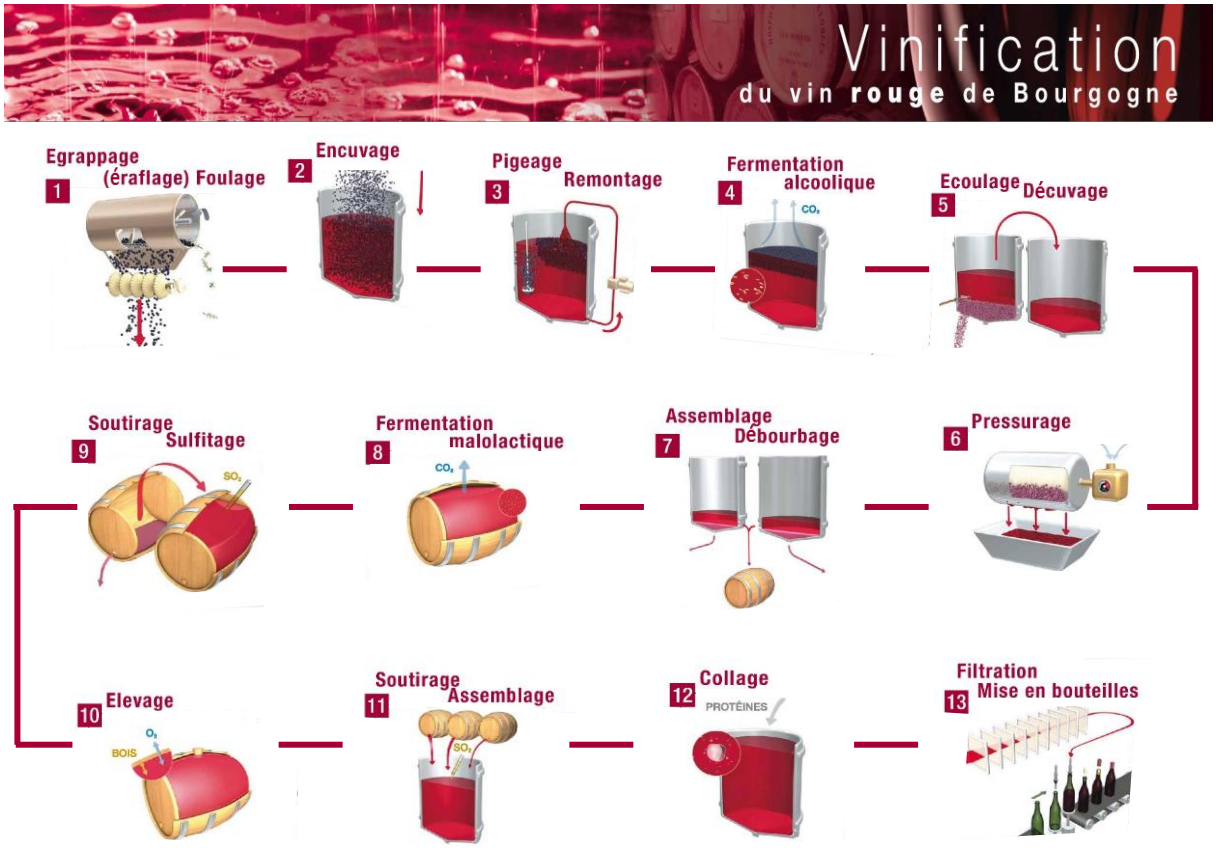


Figure 1. Schéma des différentes étapes de la vinification des vins rouges de Bourgogne. D'après les illustrations du BIVB

En ce qui concerne la vinification des vins blancs, les étapes varient légèrement du fait que les parties solides du raisin ne macèrent pas avec le moût. Après récolte, les baies sont pressées puis le moût est mis en cuve. Les particules les plus lourdes du moût sédimentent dans le fond de la cuve pour donner naissance à un jus « clair ». Ensuite les sucres du moût se transforment en alcool sous l'action des levures fermentaires. Le vin est ensuite mis en fût où a lieu la fermentation malolactique puis de nouveau soutiré et sulfité. Après l'élevage du vin en fût, celui-ci est assemblé, purifié puis mis en bouteilles.

1. Composition du vin rouge

Le vin rouge est une boisson très étudiée et décrite, néanmoins sa composition est extrêmement complexe de par les différents facteurs qui peuvent la faire varier. Le cépage, le climat, le terroir et l'année en sont quelques exemples. En effet, même si la majorité des constituants du vin est déjà décrite (tableau 1), cette diversité de composition rend les études sur le vin complexes à généraliser.

Tableau 1. Composition chimique du vin. Les valeurs minimales et maximales sont présentées à titre indicatif et proviennent d'un panel de treize publications. D'après (German & Walzem, 2000).

Composés		Concentration en g/L Min	Max
Eau		800	900
Ethanol		80	150
Autres alcools		3	1.9
Glycérol		3	14
Aldéhydes		0.01	0.5
Carbohydrates	Glucose	0.5	1
	Fructuose	0.5	1
	Pentose : Arabisone, rhamnose, xylose	0.8	2
	Pectine	0	traces
	Inositol	0.3	0.5
	Fucose	0	0.005
Composés minéraux : K+, Mg2+, CO2, phosphate, Ca2+, Cl-, SiO2, F, Al, Mn, Na+, Fe2+ Br, I, Cu2+		1.5	4
Acides organiques : Acide tartarique, lactique, succinique, acétique, malique, citrique, fumarique		3	11
Composés azotés		0.1	0.9
Composés phénoliques (concentrations en **mg/L)**		900	2500
NON FLAVONOÏDES			
Acides hydroxybenzoïques	Acide para-hydroxybenzoïque	20	20
	Acide gallique	26	320
	Gallates	30	59
	Acide salicylique	N/D	N/D
	Acide syringique	4.2	5.9
	Acide protocatéchurique	88	88
Acides hydroxycinnamiques	Acide *cis/trans*-coutarique	16	24
	Acide *cis/trans*-caftarique	11	47
	Acide caféique	3	18
	Acide coumarique	7.5	22
	Acide férulique	19	19
Stilbènes	*Trans*-resvératrol	0.1	2.3
	Picéide	N/D	N/D
FLAVONOÏDES			
Flavonols	Quercétine	5	53
	Myricétine	2	45
	Kamempférol	18	18
	Rutine	0.5	10.8
Flavanols	Catéchine	27	191
	Epicatéchine	21.4	128
	Procyanidines	29	333
Anthocyanines	Delphinidine 3-monoglucoside	22	22
	Cyanidine 3-monoglucoside	2.8	38
	Pétunidine 3-monoglucoside	18	18
	Péonidine 3-monoglucoside	32	32
	Malvidin 3-monoglucoside	24	170

L’eau est le constituant majeur du vin représentant 80 à 90 % de son volume total.

Les alcools sont les seconds composants du vin et sont produits par les levures à partir des sucres du raisin. On peut retrouver entre 8 % et 16 % d’éthanol dans le vin qui peut faire varier sa qualité, sa conservation et sa valeur commerciale. La proportion d'alcool est directement lié à l'état de maturité du raisin, car plus la baie est mûre plus elle contient de sucres. Néanmoins au-delà de 16 % d’alcool, les levures deviennent inactives et limitent ainsi le degré alcoolique maximal des vins naturels. On retrouve également du glycérol, un polyol, à hauteur de 4 à 9 %. Ce dernier est produit au début de la fermentation alcoolique et contribue à la qualité du vin en lui apportant du moelleux et de la rondeur. Le vin contient également de l’inositol, un facteur de croissance important pour les bactéries, et une faible quantité de méthanol.

Viennent ensuite les sucres. Leur teneur dans les vins est extrêmement variable. Le jus de raisin est très riche en hexose (glucose et fructose) mais ces molécules sont converties en éthanol lors de la fermentation malolactique. Certains vins comme les vins blanc doux et liquoreux, en conservent néanmoins une teneur résiduelle. De petites quantités de pentoses (*L-arabinose, D-xylose, D-ribose*, *L-rhamnose)* se retrouvent également dans le vin à des concentrations de 0,3 à 2 g/L. Ces molécules sont plus abondantes dans les vins rouges que blanc du fait de leur localisation dans les parties solides du raisin mais influencent peu la saveur sucrée du vin.

Les minéraux ; anions, cations et métaux ; font également partie de la composition du vin. Néanmoins leurs teneurs dans les vins sont très variables mais restent faibles. Ces particules sont dissoutes dans le moût lors de la macération des parties solides dans ce dernier. Ceci peut expliquer les différences de concentrations de ces composants. Parmi les éléments minéraux, on peut retrouver les ions chlore (Cl^-), souffre (SO_4^{2-}), phosphore (PO_4^{3-}), sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}), magnésium (Mg^{2+}). On trouve aussi l’iode (I), le fluor (F), le brome (Br), et l’oxyde de silice (SiO_2). Le vin contient également des métaux tels que le cuivre (Cu^{2+}), le fer ferreux (Fe^{2+}), l’aluminium (Al), le chrome (Cr), le nickel (Ni), l’argent (Ag) et le manganèse (Mn).

D’autres constituants importants sont les acides organiques qui donnent le caractère acide au vin. L'acide tartrique est l'acide spécifique du raisin et du vin et influe beaucoup sur le pH de celui-ci de par sa forte dissociation. L'acide malique est très répandu dans le règne végétal et

joue sur la perception de verdeur d'un vin dont la maturation du raisin n'a pas été optimale lors d'un été froid ; ou encore sur le caractère sévère des vins jeunes. L'acide citrique est présent chez tous les cépages mais ce dernier est concentré dans le moût par la pourriture ou le passerillage des raisins. Beaucoup de vins rouges en sont dépourvus car les bactéries lactiques peuvent le transformer en acide acétique.

On retrouve également dans le vin des substances azotées. Outre la forme ionique NH_4^+, on retrouve l'azote dans plusieurs composés biochimiques : acides aminés, hexosamines, bases puriques, polypeptides. Parmi les polypeptides, on trouve des protéines qui peuvent être précipité artificiellement dans le vin blanc pour limiter les dépôts ou qui sont éliminées par réaction avec les tanins dans les vins rouges.

Arrivent enfin les composés phénoliques qui ont une forte influence sur les propriétés organoleptiques du vin (saveur, astringence, dureté), qui exercent un effet bactéricide ou encore qui interviennent dans le vieillissement du vin. Cette grande famille de molécules est basée sur la présence dans leur composition, d'au moins un cycle aromatique (benzène) associé à d'autres fonctions : alcool, carboxylique… Il existe quatre principales familles de composés phénoliques : les acides phénols, les flavones, les anthocyanes, les tanins.

Les acides phénols sont les composés phénoliques dont la forme est la plus simple. Ils sont présents dans le vin sous la forme de dérivés de l'acide benzoïque (acide salicylique, gallique, catéchique et vanillique) ou dérivés de l'acide cinnamique (acide coumarique, caféique et férulique).

Les anthocyanes sont des glycosides dans lesquels une ou deux molécules de sucres sont fixées à des noyaux phénoliques. Ils représentent les pigments rouges du raisin et du vin.

Les flavones sont une grande famille de polyphénols ayant de nombreuses sous-classes et possèdent deux cycles benzéniques reliés par une chaîne à 3 carbones. Ils représentent les pigments jaunes du raisin et du vin blanc.

Enfin, les tanins sont des macromolécules phénoliques qui proviennent de deux sources. Les tanins catéchiques se trouvent dans la pellicule, dans les pépins et dans la rafle des baies tandis que les tanins ellagiques ou gallotanins proviennent du bois de chêne lors de l'élevage en fût. Ils forment des combinaisons avec des protéines et d'autres polymères tels que les polysaccharides pour moduler les propriétés organoleptiques du vin.

Pour terminer, une petite famille de polyphénol non flavonoïque se distingue, les stilbènes. Ce sont les structures polyphénoliques les moins complexes présentes dans le vin (deux cycles benzéniques reliés par une chaine carbonée) et sont principalement représentées par le resvératrol (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene). Ce dernier s'est révélé être un antioxydant puissant chez l'Homme.

Au travers des composés polyphénoliques qui le composent, le vin rouge, un extrait desalcoolisé de celui-ci ou encore les molécules les plus intéressantes pourraient-ils jouer un rôle dans le cadre d'une prévention primaire de l'inflammation et du cancer ? En d'autres termes le vin pourrait-il jouer un rôle dans la diminution de l'incidence du cancer dans la population et participer, dans le cadre d'un régime méditerranéen à réduire les risques d'apparition de nouveaux cas.

Pour répondre à cette question notre équipe s'est tout d'abord concentrée sur l'étude d'un polyphénol de la famille des stilbènes, le resvératrol. Cette phytoalexine est produit par la vigne, plus particulièrement au niveau de la pellicule du raisin, en réponse à un stress afin de se protéger des agressions extérieures. Chez l'homme, le resvératrol permettrait de protéger les parois vasculaire de l'oxydation, de diminuer l'inflammation et de limiter l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus (Delmas, Jannin et al., 2005). Il a également montré des effets *in vitro* sur des cellules de cancer colorectal en diminuant leur prolifération par le blocage de leur cycle cellulaire (Delmas, Passilly-Degrace et al., 2002) et en stimulant des voies apoptotiques de mort cellulaire (Delmas, Rébé et al., 2003). En association avec des chimiothérapies, le resvératrol potentialise l'effet anti-tumoral de ces molécules par une augmentation des dommages à l'ADN et de l'apoptose (Aires, Limagne et al., 2013).

De plus, notre équipe a pu montrer que le resvératrol jouait un rôle sur le système immunitaire et la réponse anti tumorale. En effet le resvératrol a la capacité de diminuer la synthèse et la production d'une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-17, ainsi que de bloquer la translocation nucléaire de *Rorc*, un facteur de transcription clé dans le processus de différenciation Th17. Ceci a pour conséquence d'empêcher la différenciation *in vitro* du lymphocyte T helper 17 murin ou humain et ainsi d'affaiblir la composante pro-inflammatoire du microenvironnement tumoral. De plus, le resvératrol a la capacité de réduire la croissance tumorale chez la souris par un blocage de la différenciation Th17 comparativement aux souris contrôles (Limagne, Thibaudin et al., 2017).

C'est sur cette ligne conductrice que nous nous sommes intéressés au rôle du vin dans le cadre d'une prévention primaire de l'inflammation. L'inflammation chronique est un facteur de risque majeur pour de nombreuses maladies en particulier les pathologies cardiovasculaires, auto-immunes et le développement des cancers. Cette inflammation chronique est en lien direct avec le fonctionnement du système immunitaire. Ainsi, une modulation des processus inflammatoires et du système immunitaire serait une cible de première importance en particulier par les composés polyphénoliques du vin dans le but de prévenir le phénomène de carcinogénèse.

II. Le cancer

Avec 14,1 millions de nouveaux cas dans le monde en 2012 (Ferlay, Soerjomataram et al., 2015), le cancer est un problème majeur de santé publique dans les pays développés. Il représente aujourd'hui en France la première cause de mortalité devant les maladies cardiovasculaires et ce, malgré la diminution globale du taux d'incidence et du taux de mortalité. En 2015, selon l'Institut National des Cancers (INCa) le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine est estimé à 385 000 et le nombre de décès liés à ce dernier est estimé à 149 500.

En France, le cancer de la prostate est le plus fréquent chez l'homme avec 56 841 nouveaux cas en 2012 et 8 676 décès ; tandis que 48 763 nouveaux cas de cancer du sein dont 11 886 décès ont été recensés en 2012 et font du cancer mammaire, le cancer le plus fréquent chez la femme. Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent tout sexe confondu, avec 42 152 nouveaux cas et 17 722 décès. Avec environ 69 495 nouveaux cas par an et 29 949 décès en 2012, le cancer du poumon est le quatrième cancer le plus incident mais celui dont le taux de mortalité est le plus élevé chez l'homme.

Cette observation à l'échelle nationale suit une tendance mondiale comme l'indiquent les derniers chiffres du rapport de l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer, sur les bases de données GLOBOCAN 2012 sous l'égide de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). En effet, dans le monde, les carcinomes mammaires et coliques représentent respectivement 1,7 millions et 1,4 millions de nouveaux cas recensés en 2012, les positionnant juste derrière les cancers du poumon avec 1,9 millions de nouveaux cas en 2012.

1. Cancer colorectal (CCR)

a) Epidémiologie

Selon l'OMS, le cancer colorectal est le 2ème cancer le plus incident chez la femme après le cancer mammaire et le 3ème chez l'homme après le cancer de la prostate et du poumon. En France, en 2012, 42 152 nouveaux cas (23 226 hommes et 18 926 femmes) et 17 722 décès (9 275 hommes et 8 447 femmes) sont imputables à celui-ci.

On peut remarquer une incidence plus forte de ce cancer dans les pays industrialisés comparativement aux pays pauvres (Figure 2). C'est pourquoi, les facteurs environnementaux pourraient être des facteurs de risques majeurs dans la survenue de ce cancer (Bishehsari, Mahdavinia et al., 2014).

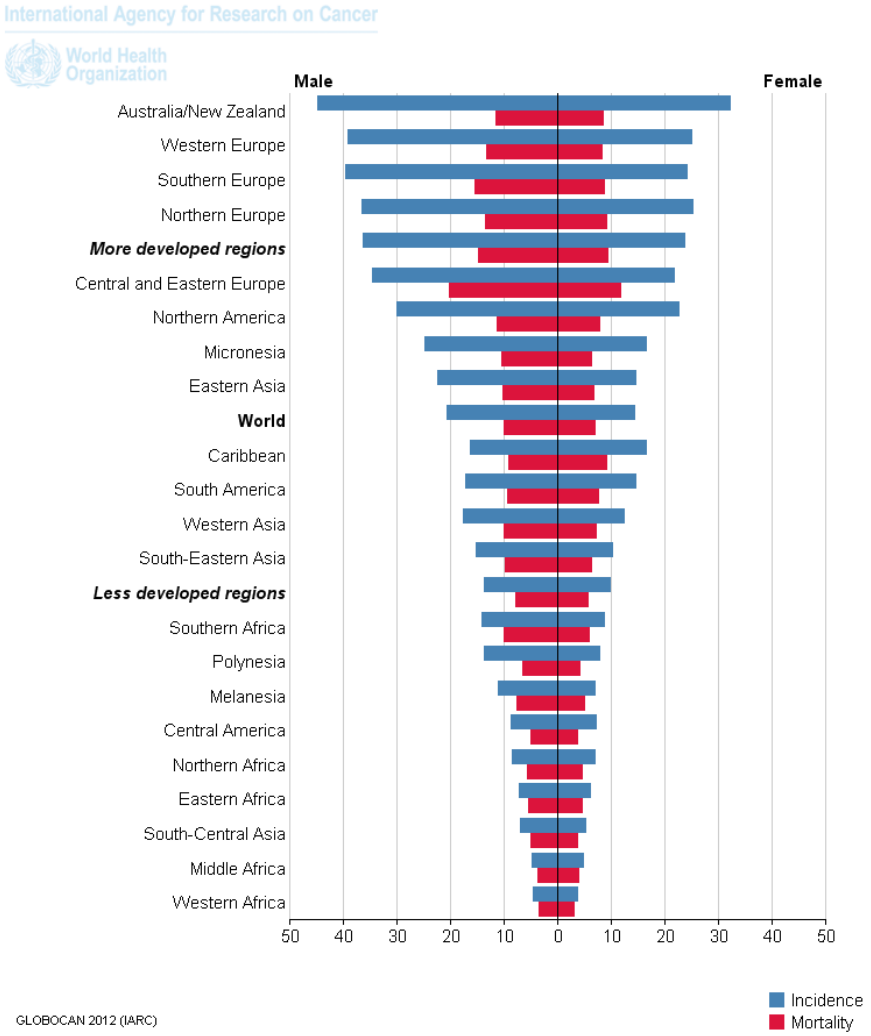


Figure 2. Incidence et mortalité du cancer colorectal selon les zones géographiques. D'après Cancer Today de l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer, sous l'égide de l'OMS.

En effet, dans nos sociétés modernes, nos modes de vie et de consommation ont considérablement changé ; notre activité physique a été réduite favorisant une vie plus sédentaire, la durée de vie s'est allongée. La consommation de tabac est restée stable, l'urbanisation et l'industrialisation favorisent les contacts avec divers polluants chimiques et perturbateurs endocriniens. De plus nos habitudes alimentaires ont été modifiées pour une alimentation plus industrialisée, plus riche en sucres et en graisses, augmentant l'incidence du surpoids et de l'obésité. Ces deux derniers paramètres sont des facteurs de risques majeurs dans la survenue des cancers et plus particulièrement dans les cancers des voies digestives tel que le CCR (Matsuo, Mizoue et al., 2012).

La composante génétique accompagne les facteurs environnementaux comme autre facteur de risque majeur. Une personne ayant une prédisposition génétique pour le cancer colorectal, a un risque plus élevé de le développer. Néanmoins une minorité de CCR est dûe à une forme héréditaire telle que la polypose adénomateuse familiale ou le syndrome de Lynch. Le diabète ou les maladies inflammatoires de l'intestin telles que la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn sont d'autres pathologies impactant positivement le développement d'un CCR (Dyson & Rutter, 2012).

b) Anatomopathologie du CCR

Le processus de formation d'une tumeur colorectale est un processus lent qui prend plusieurs années. Il peut toucher à la fois le côlon ; qui se divise en 4 parties selon sa position dans l'abdomen ; ou le rectum qui rejoint le colon sigmoïde au niveau de la jonction recto-sigmoïdienne. Le processus débute généralement par une prolifération abusive de l'épithélium de la muqueuse colorectale. Cette forte prolifération cellulaire conduit à la formation de polypes adénomateux bénins, qui en grossissant, deviennent des lésions précancéreuses formant des dysplasies. Ces lésions précancéreuses sont à surveiller autant que possible après dépistage car elles ont un fort risque de se transformer en lésions cancéreuses et provoquer la survenue d'un adénocarcinome colorectal couramment nommé, cancer colorectal.

c) Prise en charge médicale

Le CCR touche dans 90 % des cas, des personnes âgées de plus de 50 ans et peut être très bien pris en charge lorsqu'il est détecté précocement (taux de survie à 5 ans de 90 %). De plus, les symptômes de cette pathologie sont souvent discrets lors des stades précoces. Avec l'évolution de la pathologie, on peut observer du sang dans les selles ou un changement de fréquence de celles-ci, des maux de ventre intenses, une perte de poids, ou encore des vomissements. C'est pourquoi, il est nécessaire de procéder à un dépistage systématique dès l'âge de 50 ans malgré une absence de symptômes. Lorsque le test est positif, une coloscopie est proposée au patient et un diagnostic médical est posé.

Les traitements proposés dépendent de différents paramètres tels que l'emplacement et l'étendue de la tumeur, son stade de développement et ses caractéristiques génétiques ou encore l'état général de santé du patient. En fonction de ces paramètres, le traitement le plus adapté lui sera proposé. La chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie et la vaccination sont les traitements les plus couramment utilisés.

2. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse

Suite à une accumulation de mutations altérant son génome, une cellule saine du « soi » se voit transformée en une cellule cancéreuse et acquiert de nouvelles fonctions nécessaires à sa transformation. Le processus oncogénique durant lequel une cellule devient cancéreuse a été décrit dans les années 2000 par Robert Weinberg et Douglas Hanahan. Ils établissent dans un premier temps les six caractéristiques que doit acquérir une cellule afin de devenir cancéreuse. Celle-ci est capable de proliférer en ignorant les signaux anti-prolifératifs et en produisant elle-même ses propres signaux de croissance. Par ailleurs, cette cellule est capable d'échapper à la mort cellulaire et ainsi se répliquer de façon illimitée, on parle alors d'immortalisation. Elle peut également provoquer la néoangiogenèse permettant le développement de la tumeur et la formation de métastases en dégradant la matrice extracellulaire (Hanahan & Weinberg, 2000).

En 2011, ces même auteurs ont proposés quatre nouvelles caractéristiques augmentant, au nombre de dix, les « hallmarks » du cancer (Hanahan & Weinberg, 2011). Les cellules cancéreuses ont une forte instabilité génomique et voient leurs métabolismes énergétiques modifiés. Elles peuvent alors s'adapter facilement aux variations de leur environnement. Ces

cellules transformées et détectées comme du « non-soi » par le système immunitaire sont alors reconnues et éliminées par ce dernier. Néanmoins, une réponse immunitaire prolongée *via* l'activation des cellules de l'immunité innée peut être responsable d'une inflammation chronique induisant ainsi une immunosuppression locale. L'ensemble de ces caractéristiques est résumé dans la figure 3.

Cependant, pour proliférer et former une tumeur cliniquement détectable, les cellules cancéreuses doivent échapper à la surveillance du système immunitaire. Cette dernière caractéristique correspond à l'échappement des cellules tumorales.

Figure 3. Les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses. Représentation des dix caractéristiques qui permettent l'oncogenèse. D'après (Hanahan & Weinberg, 2011).

3. Immunosurveillance et immunoediting

Au XXème siècle, Paul Ehrlich fut le premier à émettre l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire serait capable de reconnaitre et d'éliminer les cellules cancéreuses dès leur création : on parle alors d'immunosurveillance.

Cependant, même chez un sujet immunocompétent, les cellules tumorales peuvent se développer malgré la surveillance permanente du système immunitaire. Le système immunitaire joue donc un double jeu en protégeant l'hôte mais en contrepartie, il exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales qui les oblige à trouver un moyen de lui échapper. Le système immunitaire module donc l'immunogénicité des cellules tumorales lors du processus de cancérogénèse, on parle alors de la théorie de l' « immunoediting ». (Dunn, Bruce et al., 2002).

La théorie de l'immunoediting se décompose en trois phases qui se succèdent et qui demandent l'activation de mécanismes immunitaires innés et adaptatifs : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Schreiber, Old and Smyth 2011) (Figure 4).

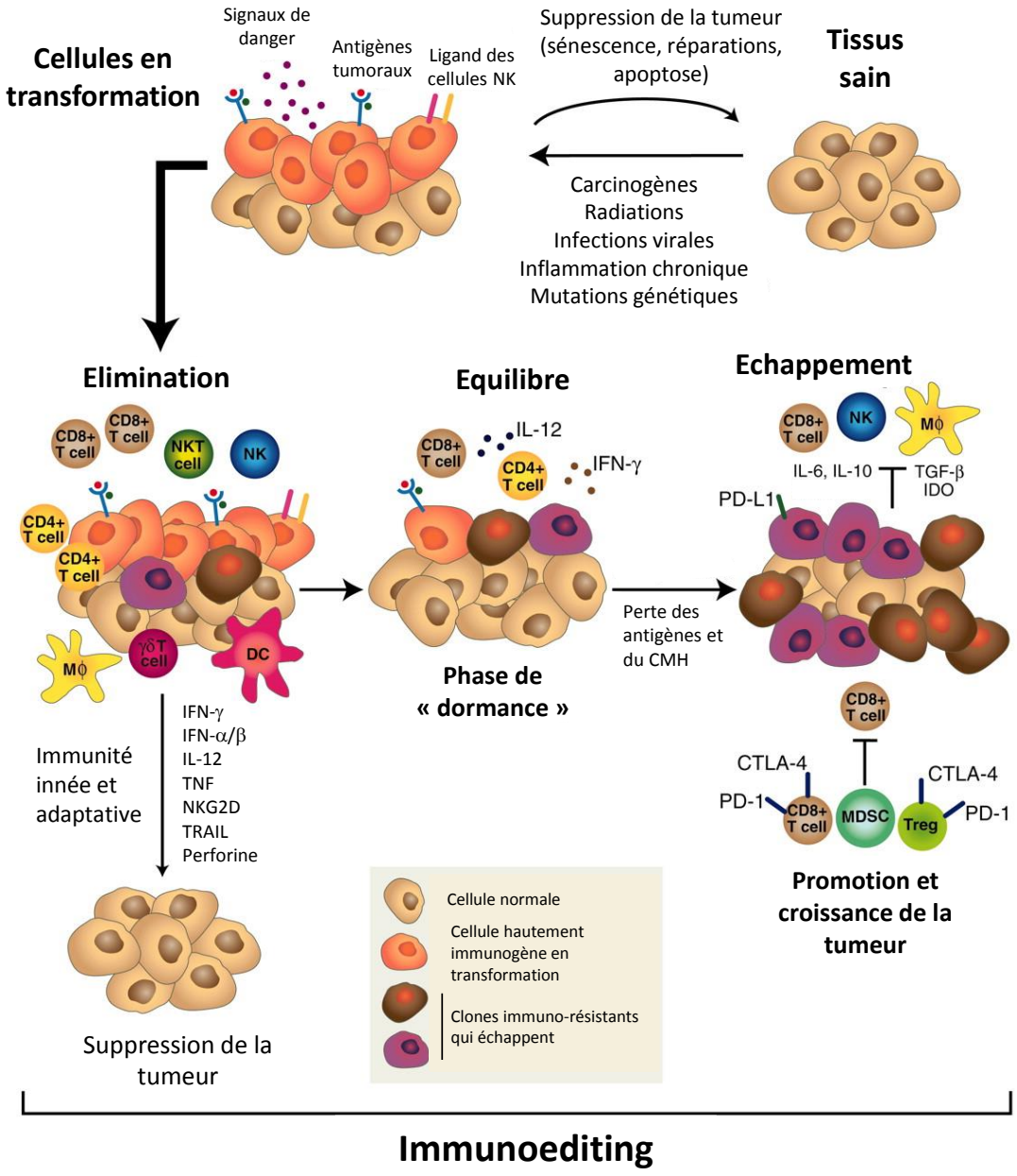


Figure 4. La théorie de l'immunoediting. D'après (Schreiber, Old et al., 2011)

Lors de la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses par les agents mutagènes, ces dernières peuvent exprimer ou émettre des molécules qui altèrent ou activent le système immunitaire. Les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, macrophages et NK (*Natural Killer*)) et de l'immunité adaptative (lymphocyte T CD8, CD4 et B) sont alors activées par sécrétion des signaux de danger dans le milieu extracellulaire par les cellules cancéreuses (cytokines inflammatoires, chimiokines, ATP (Adénosine Tri Phosphate), HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*). Les cellules immunitaires sont également activées par l'expression à la surface des cellules cancéreuses, de ligands activateurs des NK ou par l'expression des

antigènes tumoraux *via* le CMH-I qui seront reconnus par les lymphocytes T CD8. Les mécanismes mis en place lors de cette première phase permettent l'élimination des cellules tumorales immunogènes. Les cellules tumorales qui parviennent à survivre à la première phase entrent ensuite dans la phase d'équilibre.

Lors de cette longue phase, l'immunogénicité des cellules tumorales est modifiée. En effet, des clones résistants, les cellules tumorales les moins immunogènes ou les cellules tumorales ayant subi des mutations génétiques aléatoires, ne sont plus reconnues par les cellules de l'immunité adaptative et deviennent alors insensibles à la réponse immunitaire. Ce phénomène explique pourquoi des tumeurs arrivent à se développer chez un individu immunocompétent (Kim, Emi et al., 2007, Schreiber et al., 2011).

Une fois les clones immuno-résistants sélectionnés, ces derniers peuvent entrer dans la dernière phase de l'immunoediting ; l'échappement. Le microenvironnement tumoral de la tumeur devient immunosuppressif avec une forte activité des lymphocytes T régulateurs (T Reg) et des cellules myéloïdes immunosupressives (MDSC *Myéloïde Derived Supressive Cell*). La croissance des cellules tumorales n'est plus contenue : c'est à ce stade que la maladie devient cliniquement détectable. (Mittal, Gubin et al., 2014)

Toutefois, l'un des acteurs clé dans le développement du cancer est l'inflammation et plus précisément pour ce cas l'inflammation chronique.

III. Inflammation et système immunitaire

L'inflammation est un ensemble de réactions physiologiques de défense mis en place par l'organisme et plus particulièrement par les cellules de l'immunité innée. Ces cellules interviennent en première ligne de défense suite à divers traumas causés par des agents infectieux, des substances chimiques (irritants, toxines, venins), des agents physiques (coups, chaleur, froid) ou encore des lésions tissulaires post-traumatiques.

Déjà dans l'Antiquité, Aulus Cornelius Celsus décrit les quatre symptômes cardinaux de l'inflammation « Rubor et tumor cum calore et dolore » et Claude Galienon en ajouta un cinquième, le « functio laesa ». Rougeur et gonflement associés à de la chaleur et de la douleur puis à une perte de fonction sont les premières caractéristiques décrites de l'inflammation. Ces symptômes correspondent à une augmentation de la vasodilatation et de la perméabilité des vaisseaux facilitant la diapédèse des cellules immunitaires circulantes.

1. Activation de l'inflammation par les signaux de dangers

L'activation de l'inflammation se fait par l'intermédiaire de signaux de danger endogènes, les DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*) ou des signaux de danger exogènes, les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*).

Les DAMP sont des signaux provenant de cellules endommagées ou stressées de l'hôte et peuvent être divisées en deux groupes. D'abord les molécules qui ont des fonctions non inflammatoires dans les cellules vivantes et qui acquièrent des propriétés immunomodulatoires suite à un stress ou une lésion de la cellule. Dans ce cas les molécules telles que HMGB1 (*High Mobility Group Box*), les HSP (*Heat Shock Protein*) ou l'ATP (Adenosine Tri-Phosphate) sont libérées, modifiées, secrétées ou exposées et induisent l'inflammation (Kono & Rock, 2008). Dans le second groupe se trouvent les molécules qui possèdent des fonctions de cytokines ou qui peuvent être stockées dans la cellule et libérées dans le milieu extracellulaire, après la lyse de celle-ci, où elles contribueront à la réponse inflammatoire (Oppenheim & Yang, 2005). L'IL-1α et l'acide urique en sont quelques exemples.

Les PAMP sont des motifs moléculaires exprimés par des bactéries, des virus, des champignons ou encore des parasites. Le LPS (LipoPolySaccharide), présent à la surface des bactéries gram négatives, est l'un des PAMP les plus connus et étudiés.

Ces signaux sont reconnus par les récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptor*) tels que les TLR (*Toll Like Receptor*), les RLR (*RIG-I-Like Receptors*), les CLR (*C-type Lectin Receptors*) et les NLR (*Nod Like Receptor*) présents sur les cellules de l'immunité innée et acquise (Takeuchi & Akira, 2010). L'ensemble de ces récepteurs seront décrit dans la section III.3.b.

2. Etapes de la réaction inflammatoire

La réponse à une agression ou processus inflammatoire peut se décomposer en différentes étapes successives. La première étape ou phase d'initiation consiste en une réaction locale se déclenchant immédiatement après la lésion tissulaire. Le tissu lésé libère trois types de signaux. Le premier correspond à la sécrétion de peptides bioactifs par les neurones en réponse à la douleur. Le second signal vient de la libération, par les cellules endommagées dans le milieu extracellulaire, de composants intracellulaires tels que les protéines de choc thermique ou le facteur de transcription HMGB1 qui vont déclencher la production de

cytokines pro-inflammatoires. Le dernier signal provient des bactéries dont certains composants ou produits sont détectés par les TLR. De par leur statut de cellules résidantes dans les tissus, les mastocytes et les macrophages vont répondre à ces signaux rapidement. Les mastocytes sont responsables de la vasodilatation (causant rougeur et chaleur) et de l'extravasation de fluides (responsable du gonflement). Ils facilitent également, avec les macrophages, la diapédèse des leucocytes et le recrutement et l'activation des neutrophiles lors de la phase d'amplification *via* le relargage de TNF-α (*Tumor Necrosis Factor*) et de TGF-β (*Tumor Growth Factor*) (Frenzel & Hermine, 2013).

Dans un second temps se déroule le recrutement des cellules inflammatoires lors de la phase d'amplification. Un gradient chimiotactique est mis en place par la dégranulation des neutrophiles pendant la phase d'initiation. Ce gradient permet de guider les monocytes et les macrophages des vaisseaux jusqu'au site de la lésion. Les cellules dendritiques sont recrutées au site de l'infection tout comme les lymphocytes. Après avoir été activés par les cellules dendritiques et les macrophages, les lymphocytes vont secréter des cytokines, comme le TNF-α ou l'IFN-γ (Interféron gamma) qui vont renforcer l'activation des macrophages. Une réponse immunitaire complète et efficace est alors en place au site de la lésion (Coussens & Werb, 2002) (Figure 5).

Lorsque l'infection est maitrisée, la phase de résolution peut être mise en place. Les neutrophiles vont mourir par apoptose pour être ensuite phagocytés par les macrophages. Les lymphocytes vont ensuite permettre le blocage des macrophages par leur production d'IFN-γ. Enfin le TGF-β va avoir des effets positifs sur la réparation des tissus endommagés (Coussens & Werb, 2002). Dans ce processus inflammatoire, les molécules comme le TGF-β ou l'IFN-γ peuvent avoir un rôle pro- ou anti- inflammatoire en fonction du contexte et de la cinétique.

Cependant la persistance du processus inflammatoire ou la mise en place d'une inflammation non contrôlée peut engendrer des effets délétères sur la santé. En effet, elle peut s'étendre à d'autres parties de l'organisme *via* la circulation sanguine, être responsable de lésions locales ou généralisées et mener à un choc septique. Une réaction inflammatoire non maitrisée peut également devenir chronique causant différentes maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la maladie de Crohn ou la colite ulcérative (Coussens & Werb, 2002).

Des données cliniques et expérimentales ont montré que l'inflammation et plus particulièrement l'inflammation chronique favorise les mutations génétiques et épigénétiques qui mènent à la transformation de la cellule et à l'initiation du cancer (Hussain & Harris, 2007). L'inflammation permet également la mise en place d'un microenvironnement favorable au développement de la tumeur et des métastases et aide à établir des mécanismes immunosuppressifs qui limitent la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur.

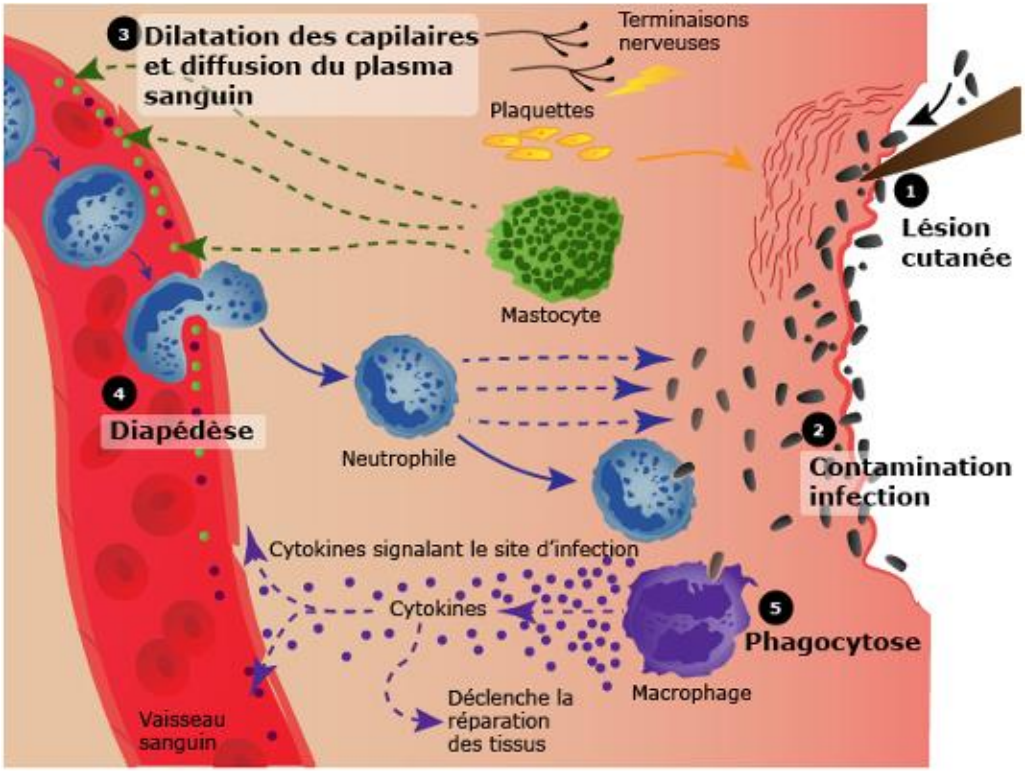


Figure 5. La réaction inflammatoire. Après lésion du tissu (1) ou infection (2), les mastocytes induisent la vasodilatation (3), l'extravasation de fluides et facilitent la diapédèse de neutrophiles (4). Ces derniers mettent en place un gradient de cytokines et de chimiokines qui permettent le recrutement des macrophages et des cellules dendritiques (5). D'après Source internet**.**

3. De l'inflammation chronique au cancer

Aujourd'hui, un quart des cancers à travers le monde est associé à des processus inflammatoires (Hussain & Harris, 2007). De nombreuses constatations cliniques renforcent en effet le lien de cause à effet pouvant exister entre l'inflammation chronique et le risque accru de développer une tumeur maligne (Coussens & Werb, 2002).

Lors du développement précoce de la tumeur, une réponse immunitaire inflammatoire a lieu afin de promouvoir l'éradication des cellules tumorales. Cette réponse inflammatoire peut se

caractériser par la libération excessive et prolongée de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα (*Tumor Necrosis Factor* α), l'IL-1, l'IL-6, de chimiokines telles que CCL2, CCL5, CCL20, CXCL8 et d'autres médiateurs de l'inflammation tels que les eicosanoïdes. Le gradient chimiotactique induit par ces cellules cancéreuses et les effecteurs de l'immunité, induisent le « homing » de cellules impliquées dans l'inflammation, notamment des macrophages. Ceci a pour conséquence d'entretenir l'inflammation ; ainsi sa chronicité devient favorable au développement tumoral. La tumeur peut ainsi être reconnue comme une plaie en échec de cicatrisation et les mécanismes mis en œuvre jouent en la faveur de sa progression et de son invasion (Dvorak, 1986).

Afin de mieux comprendre le lien entre inflammation et cancer, il est nécessaire d'étudier les rôles spécifiques des principales molécules de régulation impliquées dans ce processus.

a) Les médiateurs de l'inflammation dans de cancer

L'inflammation permet la mise en place d'un microenvironnement favorable au développement de la tumeur en aidant à établir des mécanismes immunosuppressifs qui limitent la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. Plusieurs familles de molécules entrent en jeu dans ce phénomène pro-tumoral (Lu, Ouyang et al., 2006).

- Les cytokines

Cette famille, qui inclue les interleukines (IL), le TNFα, des facteurs de croissance et de différenciation, joue un rôle important dans la croissance, la différenciation et l'activation des cellules du système immunitaire. Les cytokines promeuvent la croissance tumorale au site de la tumeur en jouant sur deux paramètres : l'activation de la croissance et la différenciation cellulaire mais aussi l'inhibition de l'apoptose des cellules endommagées.

L'IL-1β est principalement produite par les macrophages et les cellules dendritiques. Elle est clivée dans sa forme active par la caspase-1, elle-même activée principalement lors de la formation de l'inflammasome. La fixation de l'IL-1β sur son récepteur active les voies de signalisation MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et NF-κB. L'activation de ces voies conduit à la production de molécules inflammatoires comme l'IL-1β elle-même, l'IL-6, la PGE2 (prostaglandineE2) ou le TNF-α, des chimiokines telle que CXCL8 et augmente l'expression d'iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*). L'activité de l'IL-1β sur le système immunitaire va dépendre de son taux d'expression. Lors d'une inflammation aigue durant laquelle de grandes

quantités d'IL-1β sont produites durant une durée limitée, l'IL1 β augmente la production d'IFNγ par les lymphocytes T CD8 et favorise donc une immunité anti-tumorale (Ghiringhelli, Apetoh et al., 2009). Néanmoins, lorsque la production d'IL-1β est continue et modérée, comme dans le cadre d'une inflammation chronique, l'IL-1β va induire le développement et la multiplication des lymphocytes Th17, favorisant ainsi le développement de populations immunosuppressives et la croissance tumorale (Bruchard, Mignot et al., 2013).

Le TNFα est essentiellement produit par les macrophages mais aussi par les cellules tumorales. Ces derniers le renferment dans leurs granules où un stock de TNFα est préformé. Le TNFα joue un rôle essentiel dans le remodelage des tissus en jouant sur la réparation des dommages tissulaires. Il permet, par le recrutement de diverses cellules immunitaires au site de la tumeur, d'activer de nombreuses voies de signalisation et de réguler un large réseau de chimiokines. Il peut avoir une activité pro ou anti-tumorale en fonction de son taux d'expression. Une forte administration de TNFα peut avoir un effet nécrotique sur la tumeur en détruisant les structures vasculaires. Au contraire, l'activation de son récepteur permet de déclencher la translocation de NF-κB dans le noyau et ainsi induire une activité anti-apoptotique. De plus le TNFα peut induire des dommages à l'ADN ou inhiber la réparation de ce dernier ou encore être un facteur de croissance pour les cellules tumorales (Lu et al., 2006)

L'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire principalement produite par les macrophages et les cellules dendritiques sous la forme active mais également sous la forme de précurseur inactif (pro-IL-18) par les cellules épithéliales (Dinarello, 2006). De la superfamille de l'IL-1, l'IL-18 est reconnu comme un régulateur des réponses immunitaires innées et acquises. Du fait que cette cytokine induise la production d'IFN-γ, elle module l'activation des lymphocytes T et permet entre autre la différenciation des lymphocytes Th1 (Gracie, Robertson et al., 2003). L'IL-18 est exprimée au site de l'inflammation chronique de diverses maladies auto-immunes, dans certains cancers et dans le contexte de nombreuses maladies infectieuses.

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire produite par les monocytes, les macrophages ou parfois par les cellules tumorales et joue un rôle essentiel dans le développement tumoral. L'IL-6 favorise la prolifération des cellules tumorales et inhibe l'apoptose par l'activation de gp130 qui va permettre l'activation des voies des JAK (*janus kinase*) puis la phosphorylation de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). Dans le cadre du cancer colorectal, il a été montré qu'à un stade avancé, une forte concentration tumorale d' IL-6 est

associée à un mauvais pronostique concernant la survie du patient (Waldner, Foersch et al., 2012)

En ce qui concerne le lymphocyte Th17, l'IL-6 est essentiel à sa différenciation. Il va permettre, par la phosphorylation activatrice de STAT3, l'activation de son facteur de transcription clé *Rorc* puis la production, entre autre, de l'IL-17A. L'IL-6 produite à la suite de cette cascade, va permettre d'entretenir le microenvironnement pro-tumoral et le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires. Dans ce contexte, il a été montré que l'IL-17 permet le recrutement des MDSC afin d'affaiblir l'immunité anti-tumorale (Chang, Mirabolfathinejad et al., 2014). De plus STAT3 permettrait l'activation de la voie NFκ-B (Chen & Zhou, 2015). Concernant le cancer colorectal, il semblerait que l'IL-17 favorise l'angiogénèse *via* une augmentation de la production de VEGF (Liu, Duan et al., 2011). Il a également été démontré que l'IL-17 induit une résistance à certain traitement, notamment à la thérapie anti-VEGF par le recrutement de MDSC (Maniati & Hagemann, 2013).

- Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines impliquées dans la migration cellulaire. Elles permettent l'invasion tumorale, la formation de métastases et par la formation d'un gradien chimiotactique, elles permettent la migration des leucocytes au site de l'inflammation (Coussens & Werb, 2002).

- Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques de l'inflammation et comprennent les prostaglandines et les leucotriènes. Ils sont activés suite à un stress par la phospholipase A2. Ces composés sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les macrophages, et induisent la dilatation des vaisseaux et leur perméabilité, facilitant la diapédèse des leucocytes au site de l'inflammation.

Nous venons de montrer que l'inflammation et plus particulièrement les cytokines pro-inflammatoires, jouent un rôle clé dans le processus de tumorigénèse. Elles peuvent contribuer à l'apparition de mutations oncogéniques, à la promotion de la tumeur ou encore à l'angiogenèse. L'inflammation pro-tumorale est dirigée par différents médiateurs incluant l'IL-1β et l'IL-18. L'une des sources majeures de la sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires passe par l'activation de l'inflammasome. Ici, nous nous intéresserons plus

particulièrement à NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) et son complexe macromoléculaire.

b) PRR et inflammasome NLRP3

Une étape clé de l'immunité innée et de la réponse inflammatoire est la reconnaissance des PAMP ou des DAMP par les récepteurs de l'immunité innée : les *Pattern recognition receptors* (PRR). Ces récepteurs sont classés selon leur localisation, les *NOD-like receptors* (NLR) sont intracytoplasmiques alors que les *Toll-like receptors* (TLR) seront transmembranaires.

La famille des TLR est la première des PRR à avoir été identifiée et c'est aujourd'hui l'une des mieux caractérisée. Ces récepteurs membranaires comprennent un domaine LRR (*Leucine Rich Repeat*) extracellulaire qui permet la reconnaissance des PAMP, un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique *Toll-IL-1 receptor* (TIR) qui permet la transduction d'un signal pour les voies de signalisation sous-jacentes. Les TLR sont principalement situés dans les cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires ou les lymphocytes mais également dans les cellules en contact avec le milieu extérieur comme les cellules pulmonaires ou les cellules épithéliales. Les TLR, au nombre de 10 chez l'homme et 12 chez la souris, sont capables de détecter des signaux de danger extracellulaires mais aussi intracellulaires au sein des endosomes et des lysosomes tels que les PAMP de bactéries, virus, parasites ou champignons. Cependant chaque TLR possède ses propres ligands (Kawai & Akira, 2011). L'un des PAMP le mieux connu à ce jour est le lipopolysaccharide (LPS). Cette endotoxine de la paroi des bactéries Gram négative, préférentiellement reconnue par le TLR4, permet la stimulation des réponses inflammatoires de l'organisme.

La famille des CLR permet principalement la reconnaissance des sucres provenant essentiellement de pathogènes fongiques (Hardison & Brown, 2012). L'activation des CLR peut déclencher la production de cytokines pro-inflammatoires ou moduler la réponse immunitaire mise en place par les TLR (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009). Certains CLR sont également capables d'influencer la différenciation lymphocytaire T CD4 vers les sous types Th1 ou Th17 en induisant ou refreinant la production de cytokines (IL-1β, IL6, IL23 et TNFα) par les cellules dendritiques (Zenaro, Donini et al., 2009).

La famille des RLR est induite lors d'une infection virale ou d'une stimulation de la cellule. Ils détectent spécifiquement l'ARN viral produit durant la réplication du virus dans la cellule hôte et produisent de l'IFN de type 1, des cytokines et activent les caspases 8 et 10.

La famille des NLR sera décrite dans la section suivante.

i. Les NLR

Cette famille est composée de 23 protéines chez l'homme et 34 protéines chez la souris (Chen & Sun, 2013). Les NLR sont des récepteurs cytoplasmiques qui ne possèdent pas de domaine TIR par opposition aux TLR. Ces récepteurs, qui peuvent être subdivisés en 5 catégories, possèdent tous un domaine central NACHT, un domaine LRR du côté C-terminal, à l'exception de NLRP10, et un domaine N-terminal différent permettant ainsi leur classification ; NLRA (domaine N-terminal de transactivation acide) , NLRB (domaine N-terminal de BIR), NLRC (un domaine N-terminal CARD supplémentaire) et NLRP (un domaine PYD en N-terminal) (Saxena & Yeretssian, 2014) (Figure 6)

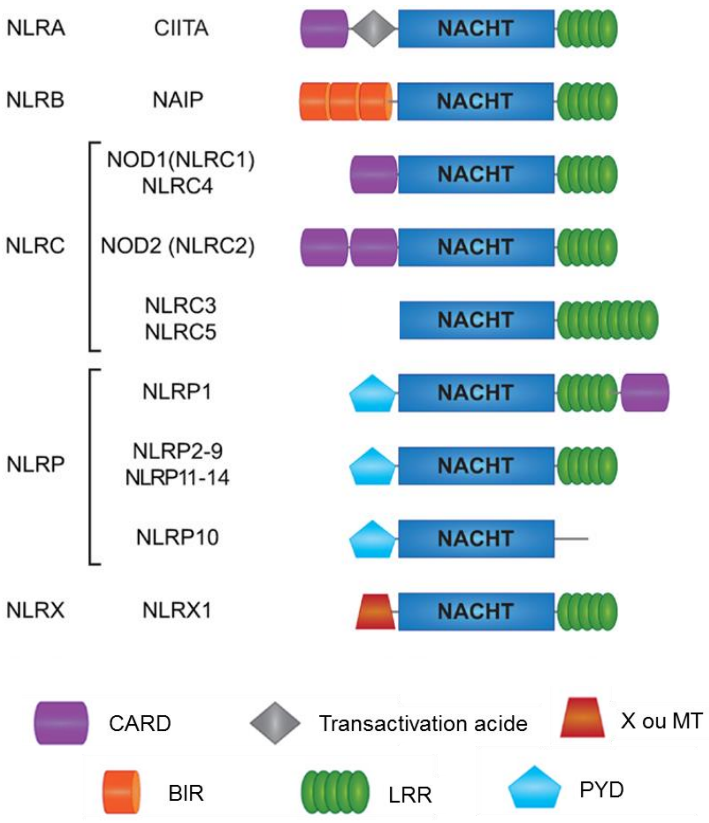


Figure 6. Structure des NLR humains. D'après (Saxena & Yeretssian, 2014)

La famille de NLR la plus étudiée est celle des NLRP (NLRP1-14). En effet, après des perturbations cytosoliques, certains membres de cette famille peuvent former des complexes oligomériques appelé inflammasome (Schroder & Tschopp, 2010). Ces complexes protéiques intracellulaires de l'immunité innée sont constitués d'un NLR ou d'un ALR (AIM2-like receptor), d'une protéine adaptatrice et d'une cystéine protéase (Jamilloux & Henry, 2013).

ii. Structure de l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome est décrit comme une plate-forme intra-cytoplasmique de haut poids moléculaire permettant la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β (Martinon, Burns et al., 2002). L'inflammasome NLRP3 est le mieux connu à ce jour. Il est constitué du récepteur NLRP3, de la protéine adaptatrice ASC et de la caspase 1.

Le récepteur NLRP3 est composé d'un domaine central NACHT qui permet la liaison avec les nucléotides et l'oligodimérisation de la protéine ; d'un domaine LRR en C-terminal ; et d'un domaine PYD en N-terminal. Ce domaine est responsable de la transduction du signal et de l'interaction protéine-protéine avec la protéine adaptatrice ASC. ASC permet *via* son domaine CARD l'interaction avec la pro-caspase 1. Cette interaction la clive et l'active en caspase-1. Ce complexe protéique va alors permettre le clivage de la pro-IL-1β et de la pro-IL-18 en IL-1β et IL-18 matures (Schroder & Tschopp, 2010) (Figure 7).

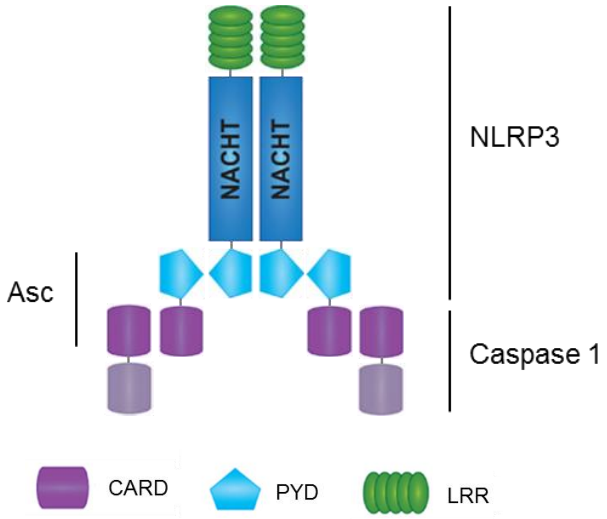


Figure 7. Composition de l'inflammasome NLRP3. L'inflammasome NLRP3 est un complexe tri-protéique constitué de la protéine NLRP3, de la protéine adaptatrice ASC, et la caspase 1. Lors de la formation de l'inflammasome, NLRP3 va présenter son domaine Pyrin (PYD) au domaine Pyrin de ASC. Asc interagit avec la pro-caspase 1 *via* leurs domaines CARD. La caspase-1 est synthétisée sous la forme inactive de pro-caspase-1. Elle nécessite une activation par un inflammasome pour pouvoir cliver la pro-IL-1β en IL-1β active et la pro-IL-18 en IL-18 active. Inspiré de (Saxena & Yeretssian, 2014)

Cet inflammasome est essentiellement exprimé dans les cellules myéloïdes telles que les monocytes ou les macrophages. En effet dans ces cellules immunitaires, l'expression de NLRP3 est fortement inductible par les voies de signalisation faisant intervenir MyD88 et TRIF (Guarda, Zenger et al., 2011).

iii. Activateurs et mécanismes d'activations de l'inflammasome NLRP3

Dans une cellule, l'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite de recevoir deux signaux.

Le premier signal, le « priming », sert à l'augmentation de la synthèse des protéines NLRP3 et pro-IL-1β. Ce premier signal a lieu *via* l'activation de TLR par une multitude de ligands microbiens ou *via* l'activation du récepteur au TNF-α. Ces activations vont déclencher la translocation de NF-κB dans le noyau et ainsi augmenter la transcription de NLRP3 et de la pro-IL-1β. Cette voie peut notamment être activée par la fixation du LPS sur TLR4.

Après avoir augmenté l'expression puis la synthèse de NLRP3 et de la pro-IL-1 β le second signal sert à activer NLRP3. A ce stade, NLRP3 est désubiquitiné par BRCC3 (Py, Kim et al., 2013) tandis que la protéine adaptatrice ASC sera phosphorylée et ubiquitinée. Il est décrit

dans la littérature différents mécanismes d'activation de NLRP3. NLRP3 peut être activé par l'efflux de potassium (K+) provoqué par la fixation de l'ATP (Adénosine Triphosphate) sur son récepteur purinergique P2X7 (Gicquel, Victoni et al., 2014) ou par la perméabilisation des membranes par des toxines telles que la Nigéricine (Pétrilli, Papin et al., 2007). Enfin, l'activation de NLRP3 peut avoir lieu grâce à de grosses molécules telles que l'alun, la silice ou les cristaux d'acide urique. Ces cristaux devant être phagocytés, ceci provoque une déstabilisation des lysosomes et induit le relargage de cathepsine B. Il semble que cette protéine lysosomale activerait NLRP3, soit en le clivant en une forme active, soit en interagissant avec lui (Boya & Kroemer, 2008).

Une régulation négative de NLRP3 et son inflammasome est alors indispensable à la résolution de l'inflammation. Ainsi, plusieurs mécanismes concourent à l'inhibition de celui-ci (Chen & Sun, 2013).

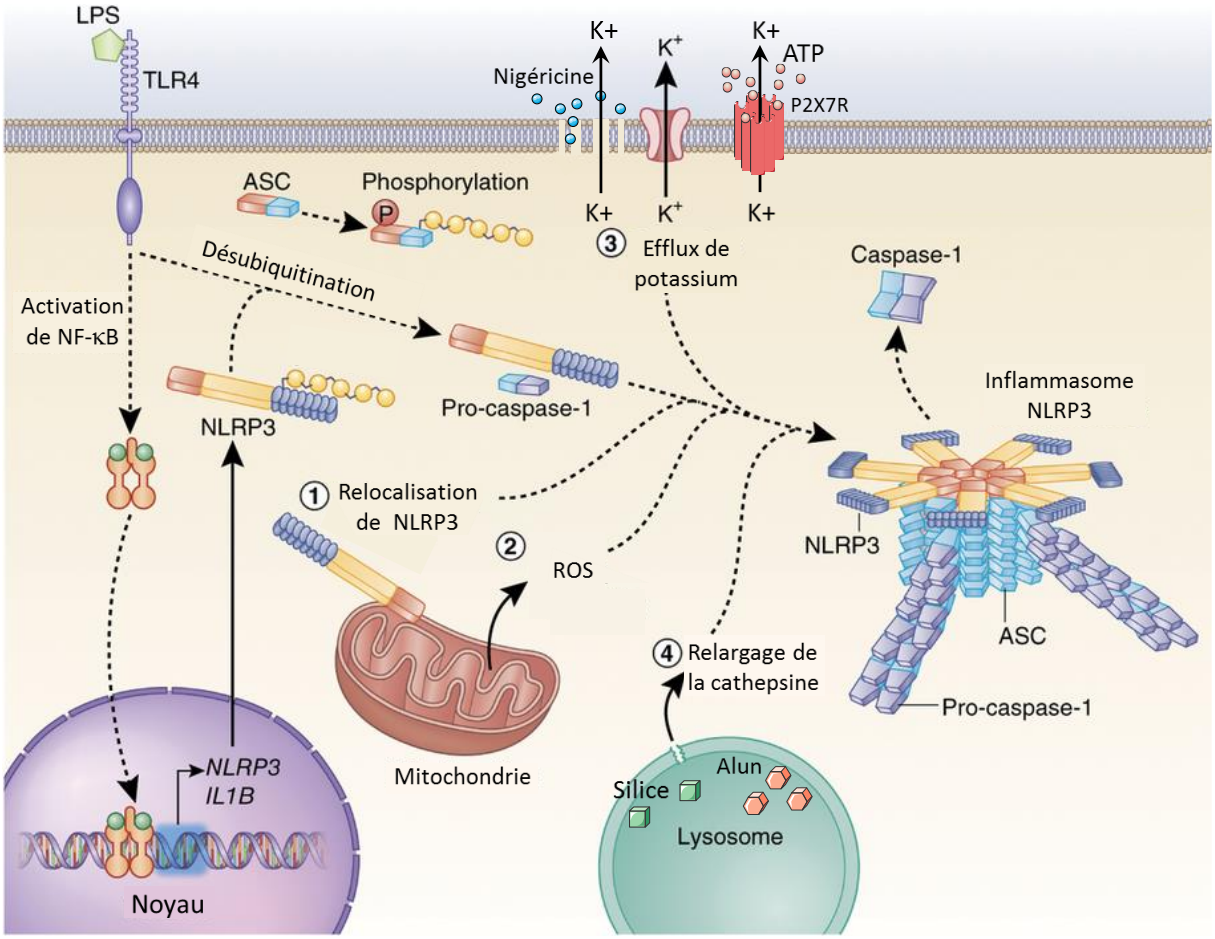


Figure 8. Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3. NLRP3 doit être activé en deux temps. D'abord *via* l'activation de NF-κB par la fixation du LPS sur TLR4 qui va induire une augmentation de l'expression de NLRP3 et de l'IL-1β. NLRP3 sera ensuite désubiquitiné tandis que la protéine adaptatrice ASC sera phosphorylée et ubiquitinée. Dans un second temps l'efflux de potassium induit par l'ATP ou la Nigéricine va activer NLRP3 ainsi permettre son assemblage avec ASC et la pro-caspase 1. L'inflammasome est alors formé. L'activation de NLRP3 peut également avoir lieu après sa relocalisation dans la mitochondrie qui va induire la formation de ROS. Le relargage de cathepsine B après déstabilisation des lysosomes est également une voie d'activation de NLRP3. Inspiré de (Guo, Callaway et al., 2015)

iv. Mécanismes de régulation de l'inflammasome NLRP3

La maturation et la libération d'IL-1β et d'IL-18 induite par l'activation de l'inflammasome NLRP3 et du système immunitaire peut endommager les tissus de l'hôte dès lors qu'elle se poursuit après l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Pour parer à ces conséquences dramatiques, le système immunitaire adaptatif peut exercer une inhibition profonde sur le système immunitaire inné. En effet les lymphocytes T CD4 mémoire et effecteur permettent l'inhibition de l'activation de la caspase-1 et la libération d'IL-1β par l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages et les cellules dendritiques. Cette inhibition de

contact a lieu *via* les molécules de la superfamille de TNFR telles que le ligand de CD40 (Guarda, Dostert et al., 2009).

De plus, l'Interféron-γ, dérivé des lymphocytes T, régule négativement l'activité de NLRP3 *via* l'activation du monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS) dans un modèle de souris porteuses de tuberculose. Le monoxyde d'azote (NO) induit la nitrosylation de NLRP3 et inhibe ainsi son activité (Mishra, Rathinam et al., 2013)

Concernant les interférons de type 1, ceux-ci peuvent réduire la production d'IL-1β et d'IL-18 selon deux processus. Ils peuvent inhiber la production des pro-formes de ces cytokines ou bien empêcher le clivage de ces pro-formes (Guarda, Braun et al., 2011).

Par ailleurs, la quantité d'ARNm de NLRP3 est très étroitement régulée par le microARN miR-223. Ce microARN entraîne une diminution des taux de protéines en ciblant la partie 3'-UTR de NLRP3. miR223 est plus ou moins exprimé en fonction du type cellulaire qu'il régule. En effet, le niveau d'expression le plus bas se retrouve dans les cellules dendritiques tandis que le plus haut se retrouve dans les neutrophiles (Latz, Xiao et al., 2013).

Enfin l'autophagie est l'un des mécanismes de répression de l'inflammasome NLRP3. L'autophagie a des fonctions immunologiques multiples qui influent sur l'inflammation et les réponses immunes. Par exemple, cette mort cellulaire de type 2, peut limiter l'activation de l'inflammation par NLRP3 en inhibant la libération d'ADN mitochondrial à partir de mitochondries endommagées. Cette libération d'ADN mitochondrial, régulée par les protéines autophagiques LC3B et beclin1, est également finement régulée par la production de ROS mitochondriaux. En effet l'autophagie peut diminuer la production de ROS par la mitochondrie et ainsi indirectement diminuer l'activation de NLRP3 et la production des cytokines pro-inflammatoires (Chen & Sun, 2013, Nakahira, Haspel et al., 2011).

Ces différents mécanismes permettent une régulation négative de l'inflammasome NLRP3, contribuant ainsi à réduire les processus pro-inflammatoires. D'une manière intéressante, certaines molécules naturelles permettent de contenir ou d'inhiber l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Tőzsér & Benkő, 2016) en jouant sur les mécanismes précédemment décrit.

Dans le cadre des pathologies inflammatoires de l'intestin, l'andrographolide, une molécule naturelle issue d'une plante médicinale asiatique *Andrographis paniculata*, permet la

protection de souris contre la carcinogenèse du côlon induite par l'azoxyméthane / sulfate de sodium dextrane (DSS). En effet, l'andrographolide inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages en diminuant l'expression de la forme clivée de la caspase-1, en empêchant l'assemblage du complexe NLRP3-PYCARD-CASP1 et en diminuant la sécrétion d'IL-1β (Guo, Sun et al., 2014).

Par ailleurs, une autre molécule naturelle, le resvératrol a également pu montrer un effet anti-inflammatoire. Une étude sur des macrophages humains a montré que le cis-resvératrol est non seulement capable de diminuer la production et la sécrétion d'IL-1 β mais également d'inhiber le récepteur purinergique de l'ATP, P2X7R. Le resvératrol a également la capacité de diminuer la production de ROS (Huang, Lai et al., 2014). De plus le resvératrol a une action sur les protéines du cytosquelette en jeu lors de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. En effet, suite à l'induction d'un stress mitochondrial, l'inflammasome NLRP3 des macrophages est activé et la réduction intracellulaire en *Nicotinamide Adenine Dinucleotide+* (NAD+) induit une accumulation de l'α-tubuline acétylée (Misawa, Takahama et al., 2013). Or le resvératrol permet de prévenir de l'accumulation de l'α-tubuline acétylée dans les macrophages (Misawa, Saitoh et al., 2015).

L'inhibition du récepteur purinergique P2X7, la diminution de production des ROS et l'activité sur les protéines du cytosquellette sont autant de mécanismes sur lesquels le resvératrol peut influer afin d'empêcher l'assemblage de l'inflammasome NLRP3, diminuant ainsi le processus inflammatoire.

De nombreux mécanismes de régulation ont été identifiés dans le but d'affaiblir ou inhiber l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cette meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'inflammasome est essentielle pour le développement de nouvelles thérapies contre les maladies inflammatoires chroniques.

c) De l'IL-17 au Th17 pro-inflammatoire

Lors du phénomène de cancérogénèse, le microenvironnement tumoral est composé de molécules pro-inflammatoires telles que les cytokines IL-1β et IL-6. Il est maintenant bien établi que l'IL-6, accompagnée du TGFβ, est nécessaire à la différenciation du lymphocyte T helper 17 (Th17) (Veldhoen, Hocking et al., 2006).

Les lymphocytes Th17 sont caractérisés par leurs capacités à produire de l'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 (Dong, 2008, Liang, Tan et al., 2006). Il a déjà été montré qu'un infiltrat de la tumeur en Th17 est de mauvais pronostic pour les patients atteints de cancers colorectaux (Sharp, Avram et al., 2017). De plus Limagne et coll. ont pu mettre en évidence un effet pro-tumoral de l'IL-17 chez la souris en utilisant des animaux IL-17 KO (travaux non publiés).

L'IL-17 apparait donc, dans le cadre du cancer colorectal, comme une cytokine pro-inflammatoire qu'il serait intéressant de cibler à des buts chimiopréventifs ou thérapeutiques.

Par ailleurs, l'initiation du programme de transcription du Th17 est dépendant de STAT3, IRF4, BATF et est également régulé par le facteur de transcription clé : RORγt (Ciofani, Madar et al., 2012, Ivanov, McKenzie et al., 2006). Le facteur de transcription STAT3 est essentiel pour la différenciation Th17 car il permet, *via* la fixation à son promoteur, la synthèse de l'*IL-17A* et de l'*IL17-F.* Cependant ce mécanisme nécessite une phosphorylation de STAT3. Consécutivement à la phosphorylation de STAT3 par JAK2 (Huang, Yan et al., 2014) qui a lieu sur la tyrosine 705 et la sérine 727 (Wen, Zhong et al., 1995), il apparait, dans certains types cellulaires, que l'activation du programme transcriptionnel du Th17 nécessite une acétylation de STAT3. Cette acétylation sur la lysine 685 est assurée par p300 mais est inhibée par Sirtuin 1 (SIRT1), une histone désacétylase. Limagne et coll. ont montré que des activateurs pharmacologiques de SIRT1 comme la metformine ou des activateurs naturels comme le resvératrol répriment la différenciation Th17 de manière dépendante de l'acétylation de STAT3 (Limagne et al., 2017).

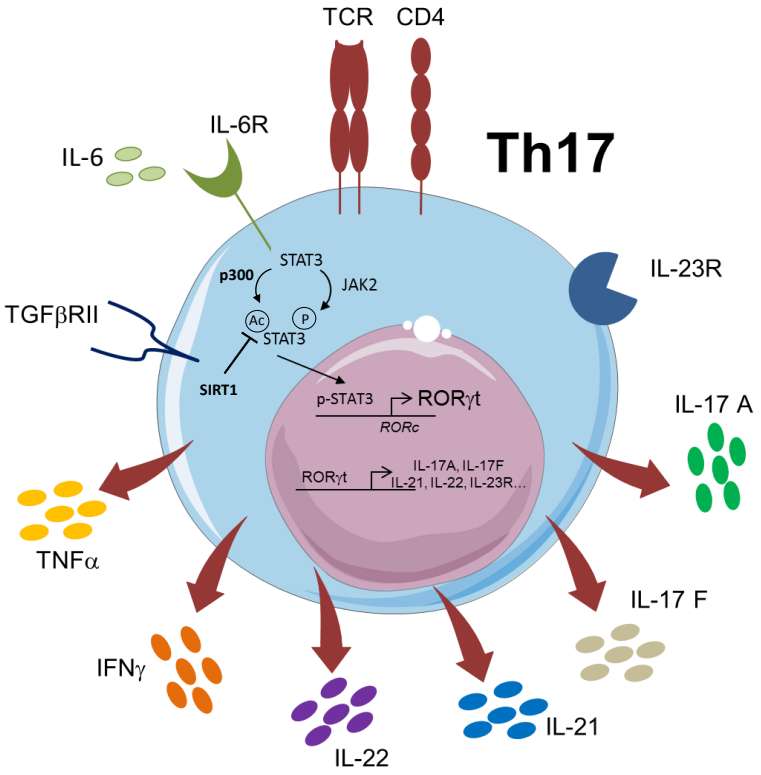


Figure 9. Mécanismes d'activation et voies transcriptionnelles du lymphocyte T helper 17. Afin de se différencier en Th17, une cellule naïve a besoin des signaux de co-stimulation du TCR ainsi que la fixation de l'IL-6 et du TGFβ sur ses récepteurs. Ainsi, STAT3 peut être phosphorylé par JAK2 et acétylé par p300 et permettre la transcription de Rorγt puis de l'*IL-17A* et de l'*IL17-F.* La sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires est une des caractéristiques du Th17 dans le cadre du cancer colorectal. Schéma inspiré de (Lane, Robins et al., 2010)

C'est dans ce contexte que Limagne et coll. ont pu montrer que le resvératrol joue un rôle sur le système immunitaire et la réponse anti tumorale. En effet le resvératrol, un activateur de Sirtuine 1, une histone déacétylase, a la capacité de diminuer la synthèse et la production de l'IL-17 ainsi que la translocation de *Rorc* dans le noyau. Ceci a pour conséquence d'empêcher la différenciation *in vitro* du lymphocyte T helper 17 murin ou humain. Cette modulation de l'activité du Th17 passe par la déacétylation de STAT3 *via* Sirtuine 1. De plus le resvératrol a la capacité de réduire la croissance tumorale chez la souris par un blocage de la différenciation Th17 (Limagne et al., 2017).

Cependant, le rôle des Th17 dans le cancer est très controversé montrant à la fois des effets positifs et des effets négatifs dans des études chez l'homme ou chez la souris. En effet, les cellules Th17 peuvent être divisées en deux groupes, l'un avec des propriétés régulatrices et l'autre avec des propriétés inflammatoires. Cette ambivalence est liée au

microenvironnement tumoral que rencontrent les Th17 au cours de leur différenciation. Ces différences de phénotypes peuvent expliquer pourquoi les lymphocytes Th17 ont des propriétés antitumorales puissantes dans certains contextes expérimentaux tout en favorisant la croissance tumorale chez d'autres (Martin, Apetoh et al., 2012).

Objectifs

Les cellules et les médiateurs du système immunitaire interagissent entre eux formant un réseau dynamique dans le but d'assurer à l'organisme une protection continue contre les pathogènes, tout en maintenant la tolérance vis-à-vis du « soi ».

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense. Parmi les effecteurs cellulaires interviennent les macrophages qui initient la réponse des cellules T, les cellules dendritiques qui jouent un rôle de sentinelles dans l'initiation de la réponse des cellules T, et les cellules tueuses ou cellules NK qui participent à la réponse précoce contre les virus et dans l'immunosurveillance anti-tumorale. La réponse immunitaire adaptative fait suite à la réponse immunitaire innée en permettant d'amplifier la réponse immunitaire spécifique de l'antigène de l'agent infectieux qui pourra être remise en place rapidement lorsque l'organisme sera de nouveau confronté à ce même pathogène. Parmi les cellules impliquées, on distingue les lymphocytes T contribuant à l'immunité par médiation cellulaire des lymphocytes B responsables de l'immunité par médiation humorale.

Nous étudierons l'impact d'un extrait polyphénolique de vin rouge sur un effecteur cellulaire de la réponse immunitaire adaptative, le lymphocyte Thelper 17. Par le biais de cette étude, nous cherchons à voir si une consommation de vin riche en polyphénols peut activer la réponse immunitaire essentielle dans le cadre d'une prévention de maladies et plus particulièrement du cancer colorectal.

Par ailleurs, il est maintenant clairement établi que l'inflammation est souvent à l'origine de la survenue et du développement de cancers. La modulation de la réponse immunitaire est liée à la modification du contexte inflammatoire du microenvironnement tumoral. En effet, les cellules du système immunitaire peuvent communiquer entre elles par contact direct mais également à travers la sécrétion de cytokines, d'interleukines et de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires contrôlant la balance entre progression tumorale et immunité anti-tumorale.

Dans cette seconde partie, nous étudierons comment les polyphénols du vin peuvent réduire l'inflammation à partir des substances pro-inflammatoires produites par les cellules immunitaires ou *via* la formation de l'inflammasome NLRP3. Plus particulièrement, nous

évaluerons si les polyphénols du vin peuvent diminuer la production d'interleukines (IL-1β, IL-17) impliquées dans les processus d'inflammation lors de la cancérogenèse.

Ces études devront obligatoirement être confirmées *in vivo* sur des modèles animaux permettant de montrer à la fois la diminution des signaux pro-inflammatoires favorisant l'accroissement des processus de transformation maligne et de croissance des cellules tumorales.

En résumé, ce travail permettra de mieux appréhender l'impact des apports nutritionnels en polyphénols du vin sur le système immunitaire et les processus inflammatoires associés. En effet, ces facteurs sont à l'origine de nombreux processus pathologiques dont le développement de cancers. Ainsi, cette étude a pour but de comprendre les effets préventifs de composés bioactifs issus de la vigne et du vin.

MATERIEL ET METHODES

I. Culture cellulaire et modèles murins

1. Lignées cellulaires

a) Origine des lignées

Notre étude a été réalisée sur différentes lignées de cancer colique murines (CT26 et MC38) et humaine (SW620 et HCT116) mais aussi deux lignées de macrophages murins (Raw 264.7 et J774A.1). Les lignées CT26, HCT116, SW620 et Raw 264.7 proviennent de l' « American Type Culture Collection » (ATCC) et la lignée J774A.1 provient de l' « European Collection of Authenticated Cell Cultures » (ECACC).

b) Entretien des lignées

Les lignées CT26, MC38, HCT116 et Raw 264.7, sont cultivées dans du Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640 ; dominique Dutscher) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ; lot n° 1280/1, dominique Dutscher) et de 1 % d'antibiotiques (10000 U/ml Pénicilline, 10 mg/ml Streptomicyne, 25µg/ml Amphotericine; PAN Biotech). Les cellules SW620 ont été cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM High Glucose ; dominique Dutscher) supplémenté de 10 % de SVF et de 1 % d'antibiotiques. Les cellules J774A.1 ont été cultivées dans du DMEM High Glucose supplémenté de 10 % de SVF, 2 mM de L-Glutamine et de 1 % d'antibiotiques. La culture de l'ensemble des lignées se déroule dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide et avec un pourcentage en CO_2 de 5 %.

Les cellules sont maintenues dans des flacons de culture cellulaire de 75 cm^2 jusqu'à atteindre une confluence de 80 %. Cette confluence atteinte, les cellules de cancer colique humain et murin sont lavées par 5 ml de Phosphate-buffered saline (PBS ; dominique Dutscher) puis décollées de leur support plastique par 2 ml de Trypsine-EDTA (Trypsine (0,5 g/l) - Ethylenediaminetetraacetic acid (0,22 g/l) ; dominique Dutscher). L'action de la Trypsine est arrêtée par le SVF contenu dans le milieu de culture et 1/10ème des cellules sont repiquées dans 15 ml de milieu de culture neuf. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours.

En ce qui concerne les lignées de macrophages murin, le surnageant est partiellement récupéré puis centrifugé pour récupérer les cellules non adhérentes de ces lignées dites « semi-adhérentes ». Le tapis cellulaire est gratté dans le surnageant restant puis mélangé aux

cellules non adhérentes. Les cellules sont alors repiquées au 1/10ème dans 15 ml de milieu neuf. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours.

Pour les expériences in vitro, les cellules sont comptées et ensemencées à la densité souhaitée dans le contenant adapté. Le comptage des cellules se fait sur cellule de Malassez et selon la méthode de coloration au bleu Trypan.

Un suivi quotidien au microscope est réalisé afin de vérifier qu'aucune contamination bactérienne ou fongique ne se soit installée et un test de détection des mycoplasmes est réalisé tous les mois par luminescence sur le surnageant de culture cellulaire.

2. Modèles murins et modèles de tumeurs coliques associés

Au cours de ce travail, nous avons utilisé le modèle animal murin pour sa similarité génétique à l'homme. D'autres caractéristiques telles que sa taille réduite, son développement et sa reproduction rapide sont autant d'atouts pour notre étude.

L'intégralité des expérimentations s'est déroulée au centre de zootechnie de l'Université de Bourgogne et les animaux ont été manipulés selon la loi Européenne et les directives du Ministère de la Recherche et de la Technologie ; dans le respect de la règle des 3R.

Lors de chacune des expérimentations animales de cette étude, le régime alimentaire des souris a été supplémenté de 2 mg d'un extrait de vin par jour et par animal (soit une dose de 100 mg/kg/j) durant trois semaines. Cet apport journalier en extrait de vin permet de mimer une supplémentation alimentaire et ainsi de constater des effets préventifs de ces molécules. Durant la croissance tumorale, l'apport journalier est poursuivi jusqu'au sacrifice de l'animal.

Différents modèles murins, provenant de Charles River Laboratory, ont été utilisés pour cette étude.

a) Le modèle Balb/c

Les souris Balb/c (Figure 10) sont des rongeurs immunocompétents issus d'une lignée consanguine albinos, créés en 1913 par H.J Bagg. Nous avons utilisé ces animaux, âgés de 6 semaines ; afin d'étudier le phénomène de croissance tumorale. En effet, des cellules CT26, décrites précédemment dans la section I.1., ont été injectées en sous cutanée sur le flanc gauche de l'animal (5.10^5 cellules par injection). Un suivi de la taille des tumeurs a été réalisé

2 fois par semaine, par une mesure au pied à coulisse, jusqu'au sacrifice de l'animal lorsque la tumeur atteint une longueur de 20 mm (point limite).

b) Le modèle C57BL/6

La souche de souris C57BL/6 (Figure 10) est la première dont le génome a été séquencé et est couramment utilisé comme modèle animal dans la recherche médicale.

Ce modèle de souris immunocompétente, également âgé de 6 semaines, nous a permis de réaliser l'isolement de lymphocyte T Naïfs à partir les organes lymphoïdes afin de les différencier en lymphocyte Th17.

Figure 10. Modèles murins utilisés. Les souris immunocompétentes Balb/c (A) et C57BL/6 (B)

3. Culture primaire de lymphocyte T helper 17 (Th17)

a) Purification des lymphocytes T Naïfs

Afin d'obtenir une population cellulaire de lymphocytes Th17, nous avons récupéré les organes lymphoïdes secondaires de souris C57BL/56. Les ganglions et la rate ont été prélevés après sacrifice de l'animal par dislocation cervicale et conservés dans du RPMI 1640. Les organes sont ensuite écrasés stérilement à travers un filtre de 30 µm dans du milieu RPMI 1640 enrichi de 10 % SVF + 1 % d'antibiotiques + 1 % Sodium Pyruvate soit 1 mM (Gibco by Life Technologies) + 1 % HEPES soit 10 mM (Gibco by Life Technologies) (=milieu complet). La suspension cellulaire est alors centrifugée 10 minutes à 1000 rpm et le culot est resuspendu dans du tampon MACS (PBS + 0.5 % Albumine de sérum bovin (BSA ; m/v) + 2 mM EDTA) avant ajout des billes anti-CD4 du kit L3T4 (Milteny Biotec). Après 15 minutes de marquage à 4°C, les cellules sont lavées dans du tampon MACS puis centrifugées 5 minutes à 1250 rpm. Les anticorps anti-CD4 couplés à des billes magnétiques permettent le marquage des cellules lymphoïdes TCD4$^+$ ainsi que leur sélection sur une colonne aimantée ; nous pouvons ainsi récupérer une suspension cellulaire enrichie en lymphocyte T CD4$^+$. La suspension cellulaire

est centrifugée 5 minutes à 1250 rpm puis le culot est resuspendu dans du tampon MACS avant l'ajout des anticorps α-CD62L couplé à la phycoérythrine et α-CD4 couplé à l'allophycocyanin. Après 20 minutes de marquage dans la glace et à l'obscurité, les cellules sont lavées dans du tampon MACS puis centrifugée 5 minutes à 1250 rpm. Le culot cellulaire est repris dans du milieu complet à la densité de 30 millions de cellules par ml. Ces anticorps couplé à des sondes fluorescentes vont permettre le tri par cytométrie en flux des cellules doubles positives $CD62L^+$ $CD4^+$: les T $CD4^+$ naïfs.

b) Différenciation des lymphocytes T Naïfs en lymphocytes Th17

La différenciation des cellules T $CD4^+$ naïves se déroule dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide et avec un pourcentage en CO2 de 5 % et dans du milieu RPMI 1640 enrichi de 10 % SVF + 1 % d'antibiotiques + 1 % Sodium Pyruvate + 1 % HEPES + 1 % d'acides aminés non essentiels soit (MEM NEAA ; Glycine 10 mM, L-Alanine 10 mM, L-Asparagine 10 mM, acide L-aspartique 10 mM, acide L-glutamique 10 mM, L-proline 10 mM, L-Sérine 10 mM ; Gibco by Life Technologies) (= milieu de différenciation). Les puits des plaques de culture sont au préalable coatés avec les anticorps anti-CD3 (2 µg/ml, clone 145-2c11, BioXCell) et anti-CD28 (2 µg/ml, clonePV-1, BioXCell) pendant 1 heure afin de mimer le signal du TCR. Les lymphocytes T naïfs sont ensuite ensemencés dans ces puits à une densité de 1,3 millions de cellules par cm^2 en présence d'un cocktail de cytokine ; IL-6 (25 ng/ml), TGF-β (2 ng/ml), anti-IL-4 (50 ng/ml), anti-IFNγ (50 ng/ml). Ce cocktail spécifique de la différenciation Th17 va permettre la différenciation du $TCD4^+$ Naïf en Th17 et les cellules reçoivent simultanément le traitement adapté aux conditions de l'expérience. Le temps de différenciation est déterminé en fonction de l'analyse faite par la suite : 6 h et 24 h de différenciation pour les analyses par immunoblotting ; 72 h pour les analyses par RT-qPCR et ELISA.

4. Traitement des cellules

Pour les différents tests *in-vitro,* les cellules sont ensemencées dans un contenant dont la surface est optimale pour l'expérimentation. La densité cellulaire minimale est de 15000 cellules/cm^2 pour les HCT116, de 10000 cellules /cm^2 pour les lignées CT26, MC38, Raw264.7 et J774A.1. Après 24 h de culture sur leur support, les cellules peuvent être traitées selon le protocole expérimental (molécules naturelles, inducteurs et activateurs de l'inflammasome, chimiothérapies…)

II. Préparation de l'extrait polyphénolique de vin rouge (RWE)

1. Le vin

Le vin utilisé pour cette extraction est un Santenay 1er cru Les Gravières 2012, mis en bouteille par EARL Capuano-Ferreri à Santenay, Côte-d'Or, France. Ce Côte de Beaune, sélectionné par le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB), nous a été fourni par le Centre Technique Interprofessionnel de la Vigne et du Vin (CTIVV). Il est issu d'un cépage unique; le Pinot Noir, et compte 13 degrés d'alcool (13 % volume).

2. L'extraction de polyphénols

J'ai pu réaliser cette extraction grâce à une collaboration avec Valérie SHCINI-KERTH et Phillipe CHABERT de l'UMR CNRS 7213 de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg.

a) Préparation de la colonne

Cette extraction se déroule sur une matrice de billes de vinyl-divinyl benzène ; Diaion® HP20 (Supelco). 300 g de billes (poids sec) sont réhydratées dans du méthanol (1 volume de billes : 2 volumes de méthanol) puis transférées dans une colonne d'un diamètre de 8 cm, munie d'un robinet. Un coton et une fine couche de sable de Fontainebleau sont disposés à la base de la colonne et permettent de retenir la matrice. Les billes sont lavées par 4 fois leur volume en eau distillée. Il faut s'assurer que la colonne soit toujours hydratée tout au long du protocole d'extraction.

b) Séparation des composés

Afin de séparer les composés polyphénoliques des autres composés, il faut évaporer l'alcool et une partie de l'eau de 200 ml de vin grâce à un évaporateur rotatif (Rotavapor RII, BUCHI) couplé à une pompe à vide, au bain marie à 37°C. Les 15 ml de concentrât obtenu sont déposés sur le dessus de la colonne de billes puis celle-ci est lavée par 4 fois son volume en eau distillée à débit faible : 20 gouttes par minute. Cette étape permet d'éliminer les sucres et les acides organiques libres afin de purifier la fraction contenant les polyphénols.

c) Elution des composés

Less polyphénols accrochés à la matrice sont élués par une solution d'éthanol absolu, 0,1 % acide acétique glacial à un débit de 40 gouttes par minute. La solution contenant l'anneau

coloré en rouge bordeaux est récupérée puis arrêter l'élution est arrêtée lorsque la colonne est redevenue de couleur blanche. L'erlenmeyer contenant la fraction d'intérêt est conservé à l'abri de la lumière afin d'éviter toute altération des polyphénols.

La colonne est alors lavée par 4 fois son volume en eau distillée afin de retirer toute trace d'éthanol qui pourrait altérer l'extraction suivante. L'opération est répétée jusqu'à épuisement du contenu de la bouteille de vin.

d) Désalcoolisation et déshydratation de la fraction d'intérêt

Il faut alors procéder à l'évaporation des solvants de la fraction contenant les composés polyphénoliques grâce à l'évaporateur rotatif. Cette étape nécessite l'ajout d'éthanol absolu à plusieurs reprises afin de former un mélange azéotrope et ainsi faciliter l'évaporation de l'eau ; ceci permettra de passer d'une substance cireuse à des cristaux secs. Cette poudre, d'une couleur bordeaux foncé, est un extrait de vin concentré en polyphénols. Elle est conservée à -20°C et l'abri de la lumière. Une solution stock d'extrait de vin à 100 mg/mL, dans de l'éthanol à 50 % est conservée à -20°C.

3. Description qualitative et quantitative de l'extrait de vin

Tableau 2 : Description qualitative et quantitative de l'extrait de vin

		mg/L de vin	mg/g d'extrait
Acides phénoliques	Acide gallique	21	5,04
	Acide caftarique	53	12,74
	Acide coutarique	20	4,80
	Acide caféique	10	2,40
Stilbène	Picéide	1	0,24
	Resvératrol	7	1,68
Anthocyanes	Delphinidine	15	3,60
	Pétunidine	10	2,40
	Péonidine	14	3,36
	Malvidine	78	18,75
Catéchines	Catéchine	31	7,45
	Epicatéchine	8	1,92
	Dimère de procyanidine	42	10,09
Flavonols	Quercétine	4	0,96

III. Test de cytotoxicité au crystal violet

Le Crystal violet est un colorant spécifique des noyaux cellulaires. Après traitement, le tapis cellulaire est lavé par du PBS directement dans le puits puis fixé 20 minutes par de l'éthanol absolu. La solution de crystal violet (Sigma-Aldrich) est ensuite appliquée sur les cellules durant 5 minutes puis rincée à l'eau jusqu'à ce que cette dernière soit claire. Après séchage du puits, une solution d'acide acétique à 33 % (acide acétique glacial 1 : 2 eau distillée) est ajoutée ; elle permet la dissolution du crystal violet incorporé par les noyaux. 30 minutes après agitation, l'absorbance de la solution est lue à 540 nm par un spectrophotomètre. L'absorbance du contrôle est rapportée à 100 % et l'absorbance des différentes conditions de traitements est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle.

IV. Western Blotting

1. Préparation de l'extrait protéique

Après traitement des cellules sur une surface minimale de 10 cm^2, les cellules sont récupérées et centrifugées 5 minutes à 300 g à 4 °C. Le culot est lavé dans du PBS puis centrifugé 5 minutes à 300 g et 4°C. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est repris dans du tampon de lyse Boiling (1 % (m/v) de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 1 mM d'orthovanadate, 10 mM Tris (pH=7.4)) et des anti-protéases (Roche). Cette lyse chimique est suivie d'une lyse mécanique par ultra-son.

2. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la technique BCA (Bicinchoninic Acid Assay, QuantiPro™ BCA Assay Kit, Sigma). Ce test colorimétrique implique la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{+} par les liaisons peptidiques des protéines. Le réactif BCA chélate les ions Cu^{+} pour former des complexes de couleur pourpre solubles dans l'eau. Le dosage est réalisé en plaque 96 puits dans un volume de 200 µL (99 µL d'eau, 1 µL d'extrait protéique, 49 µL de solution A, 49 µL de solution B et 2 µL de Cu^{2+}). Après 30 minutes à 37°C et à l'obscurité, la plaque est lue à 595 nm par un spectrophotomètre. Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle des échantillons sur la plaque avec différentes quantités de BSA : 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 µg.

3. Préparation des échantillons

Chaque échantillon est préparé à l'aide de la gamme étalon ce qui permet de déposer la même quantité de protéine pour chaque échantillon et ainsi procéder à une analyse quantitative.

Les échantillons sont préparés sur la glace dans un tampon de lyse Laemmli (250 mM TrisHCl, 40 % Glycérol (v/v), 20 % β-mercaptoéthanol (v/v), 10 % SDS (v/v), pH 6.8, quelques cristaux de bleu de bromophénol). Le volume et la quantité protéique doivent être identiques pour tous les échantillons et compris respectivement entre 20 et 30 µL (qsp eau distillée) et 20 µg à 120 µg selon la protéine à mettre en évidence. Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C afin d'optimiser la dénaturation des protéines.

4. Préparation des gels d'acrylamide, migration et transfert

La migration est réalisée dans un gel SDS-PAGE de 1,5 mm d'épaisseur, constitué de 2 parties. La première, le gel de concentration, permet aux protéines d'arriver en même temps dans la seconde partie, le gel de séparation. Il permet la séparation des protéines selon leur masse moléculaire et sa composition en acrylamide ; de 7 à 15 % ; est variable selon la résolution de séparation souhaitée (Voir composition dans **tableau 3**).

Tableau 3 : Composition des gels SDS-PAGE

	Gel de séparation			**Gel de concentration**
	7 %	**10 %**	**15 %**	
Eau distillée	5,75 mL	5 mL	3,75 mL	1 ,95 mL
Tris Base, SDS 0,4 %, pH 8.8	2,5 mL			X
Tris Base, SDS 0,4 %, pH 6.8	X			750 µL
Acrylamide/Bisacrylamide	1,75 mL	2,5 mL	3,75 mL	300 µL
APS 10 %	50 µL			25 µL
TEMED	10 µL			5 µL
Pyronine G	X			25 µL

Ces gels sont ensuite placés dans un système d'électrophorèse Biorad ; rempli de tampon de migration (3,03 g Tris base, 14,4 g Glycine, 1 g SDS, qsp 1 L eau distillée). Les échantillons sont déposés dans les puits préalablement formées par un peigne dans le gel de concentration. La migration débute à 50 V afin que les protéines atteignent le gel de séparation puis le voltage est augmenté à 100 V.

Le gel de séparation est ensuite récupéré monté selon le montage suivant : tampon en mousse, papier Wattman, membrane de nitrocellulose, gel de séparation, papier Wattman, tampon en mousse. Ce montage est placé dans une cuve remplie de tampon de transfert pendant 1 h à 2 h à 45 V. Le temps de transfert ainsi que le tampon varient en fonction de la masse moléculaire des protéines d'intérêt. Nous utilisons usuellement le tampon borate (6,06 g Tris base, 3.09 g acide borique, q.s.p. 1 L eau distillée) mais pour les petites protéines (inférieur à 20 kDa) un tampon éthanol est utilisé (3,75 g Tris base, 17,85 g glycine, 375 mL d'Ethanol, q.s.p. 1,5 L eau distillée)

5. Révélation

La membrane est alors mise à saturer 1 h sous agitation dans du TBS Tween 0.5 %, lait (Régilait®) 5 %. Cette étape évite la fixation non spécifique des anticorps.

La membrane est alors incubée la nuit dans l'anticorps primaire (voir références **tableau 4**), à 4°C sous agitation. Puis la laver 3 fois 10 minutes dans du TBST 0,5 % à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite incubée 1 h dans l'anticorps secondaire (voir références **tableau 5**), à température ambiante, sous agitation. L'anticorps secondaire est choisi en fonction de l'espèce de production de l'anticorps primaire et il est couplé à une péroxydase (HRP : Horse Radish Peroxidase). La membrane est de nouveau lavée 3 fois 10 minutes dans du TBST 0,5 % à température ambiante sous agitation puis égoutée.

Les solutions (1:1) du kit de révélation « SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate » (Thermo Scientific) sont utilisées pour mettre en évidence le signal HRP grâce au luminol qu'elles contiennent (substrat chemoluminescent de l'HRP). L'imageur ChemiDocXRS+ (Bio-rad) nous permet de mettre en évidence le signal lumineux émit sur une image.

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires

Protéine cible	Masse moléculaire (kDa)	Réactivité	Isotype	Fournisseur	Référence/Clone	Dillution
β-Actine	42	Humain, souris	Souris	Sigma-Aldrich	A1978 / clone AC-15	1/5000
Ror-γ t	56/58	Humain, souris	Rat	eBioscience	14-6988 / clone AFKJS-9	1/1000
STAT3 (His 124)	79/86	Humain, souris	Souris	Cell Signaling	9139 / clone 124H6	1/1000
STAT3	79/86	Humain, souris	Lapin	Cell Signaling	12640	1/1000
Acetyl-STAT3 (Lys685)	79/86	Humain	Lapin	Cell Signaling	2523	1/1000
Phospho-STAT3 (Tyr 705)	79/86	Humain, souris	Lapin	Cell Signaling	9145	1/1000
SirT1	120	Souris	Lapin	Cell Signaling	2028	1/1000
Caspase-1 (p-10)	10	Souris	Souris	AdipoGen®	AG-20B-0044 / clone Casper-2	1/500
Caspase-1 (p-20)	20	Humain	Souris	AdipoGen®	AG-20B-0048-C100 / clone (Bally-1)	1/500
NLRP3	118	Humain, Souris	Souris	AdipoGen®	AG-20B-0014 / clone Cryo-2	1/1000
Asc	25	Humain, souris	Lapin	AdipoGen®	AG-25B-0006 / clone AL177	1/500

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires

Cible	Fournisseur	Référence	Dillution
Anti-souris	Jackson Immunoresearch Laboratory	115-035-146	1/10000
Anti-lapin	Jackson Immunoresearch Laboratory	111-035-144	1/10000
Anti-rat	Santa Cruz Biotechnology	sc-2006	1/5000

V. Analyses par cytométrie en flux

1. Marquage Annexine V / 7AAD

Le marquage AnnexineV / 7AAD permet de mettre en évidence et quantifier la mort cellulaire. Lors de l'apoptose précoce, l'Annexine V qui couplé à un fluorochrome FITC, fixe les phospatidyl-serines qui se trouvent transloquées de l'intérieur à l'extérieur de la membrane plasmique. Plus tardivement, l'intégrité de la membrane plasmique est perturbée, ainsi, le 7AAD (7-aminoactinomycine D), un agent intercalant de l'ADN, peut entrer dans la cellule et fixer l'ADN ; on peut alors parler d'apoptose tardive ou de nécrose. La combinaison de ces deux marqueurs permet de différencier les cellules vivantes (Annexine V- / 7AAD-) des cellules en phase précoce d'apoptose (Annexine+ V / 7AAD-) ou en phase tardive d'apoptose ou de nécrose (Annexine V+ / 7AAD+).

Après culture et traitement des cellules en plaque 12 puits, les cellules et le surnageant sont récupérés dans des tubes polypropylène. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 300 g puis lavées 2 fois dans du PBS puis centrifugées 5 minutes à 300 g. Le culot cellulaire est repris dans 50 µL de Binding buffer, 5 µL d'Annexine V couplé à une sonde fluorescente FITC (Fluorescein isothiocyanate) (laser bleu λEx_{max} 488 nm, λEm_{max} 519 nm) et 5 µL de 7AAD (laser bleu λEx_{max} 488 nm, λEm_{max} 647 nm) durant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La suspension cellulaire est alors diluée dans 100 µL de Binding buffer et les cellules sont passées au cytomètre en flux (Digital LSRII). Le traitement des données est réalisé avec le logiciel FlowJo.

VI. Microscopie

1. Marquage au Hoechst 33342

L'apoptose est identifiée par marquage au Hoechst 33342 (λEx_{max} 350nm, λEm_{max} 461nm) et par le dénombrement des cellules dont les noyaux sont fragmentés et condensés ; tandis que les cellules viables présentent un noyau régulier et rond.

Après traitement, les cellules et le surnageant sont récupérés et centrifugés 5 minutes à 300 g. Le culot cellulaire est lavé au PBS puis centrifugé 5 minutes à 300 g. Le culot cellulaire est repris dans une solution de Hoechst 33342 à 1 µg/ml durant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS, centrifugées 5 minutes à 300 g puis

cytospinées sur une lame. Les spots de cellules sont recouverts d'un milieu de montage Glycérol : PBS (1:1) et d'une lamelle lutée. Les lames sont alors observées au microscope en utilisant un filtre DAPI (λEx_{max} 365nm, λEm_{max} >397nm)

2. Immunofluorescence

Dans une plaque 12 puits, les cellules sont ensemencées à une densité de 35000 cellules/cm² sur des lamelles au préalablement disposées dans le puits et recouvertes de poly-L-lysine. Le lendemain, les cellules sont traitées selon les conditions de l'expérimentation puis les lamelles sont lavées deux fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite fixées à la lamelle 10 minutes dans du paraformaldéhyde (PFA) 4 % à 4°C puis lavées deux fois par du PBS. Afin de saturer les sites non spécifiques et perméabiliser les cellules, les lamelles sont incubées 20 minutes à température ambiante dans un mélange contenant 3 % de BSA, 0.2 % de Saponine dans du PBS. La lamelle est ensuite incubée une nuit à 4°C dans l'anticorps primaire puis lavées trois fois 5 minutes à température ambiante dans du PBS. La lamelle est ensuite incubée dans l'anticorps secondaire durant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière puis lavée trois fois 5 minutes pans du PBS. Enfin, la lamelle est déposée sur une lame dans du milieu de montage ProLong® antifade with Dapi (Life Technologies). Les Lames sont observées au microscope à l'objectif x40 en utilisant l'ApoTome.

VII. Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction : RT-qPCR

1. Lyse cellulaire et extraction d'Acide RiboNucléique totaux (ARN)

Après ensemencement et traitement, les cellules sont récupérées, centrifugées 5 minutes à 300 g puis lavées dans du PBS et de nouveau centrifugées 5 minutes à 300 g. le culot cellulaire est repris dans du Trizol® Reagent (Life Technologies) avant d'y ajouter du chloroforme puis homogénéisater les échantillions. Les échantillions sont vortéxés 15 secondes minimum puis centrifugés 15 minutes à 12 000 g. Afin d'obtenir une séparation de phase (Trizol/chloroforme) permettant de récupérer les ARN dans la phase chloroformique. Ceux-ci sont alors précipités et purifiés par l'ajout de l'isopropanol. Avant centrifugation 15 minutes à 12 000g puis lavage du culot avec de l'Ethanol à 70 %, les ARNm sont alors centrifugés 5 minutes à 7 500 g ; cette étape étant répétée 3 fois. Le culot d'ARN est séché puis repris dans

10 µL d'eau Ultra Pure (RNAse DNAse free ; Life Technologies). La quantité d'ARN totaux est dosée par spectrophotométrie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

2. Transcription inverse

La transcription inverse se déroule en deux étapes à l'aide du kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) et de RNaseOUT (Invitrogen). Dans un premier temps, 300 ng d'ARN totaux ont été dénaturés pendant 5 minutes à 65°C en présence de 100 ng/µl d'amorces aléatoires (Random Primers ; ThermoFischer), 0,5 mM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP, Promega) et d'eau ultra pure (q.s.p. 15 µL). Lors de la seconde étape, l'ARN est rétrotranscrit en ADNc en présence de First Strand Buffer, 10 U/µl de M-MLV, 5 mM de DTT et 40 UI de RNAse-OUT, dans un thermocycleur iCycler (BioRad) durant 1 h à 42°C puis 15 minutes à 70°C. Les ADNc fraîchement synthétisés sont dilués au 1/10 ème dans de l'eau ultra pure puis utilisés pour l'amplification par qPCR ou stokés à -20°C.

3. Réaction par polymérisation en chaîne quantitative: qPCR

Lors de cette étape les ADNc précédemment synthétisés sont utilisés en présence d'amorces sens et anti-sens ciblés contre la séquence de notre gène d'interêt (voir **tableau 6**), de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) et d'eau distilée. Le Power SYBR® Green PCR Master Mix met en jeu un mélange des 4 désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs, Promega), une Taq polymérase qui permet l'assemblage des dNTPs à la suite des amorces, et un agent intercalant de l'ADN fluorescent : le SYBR® Green qui permet de suivre l'amplification. La qPCR est réalisée dans un thermocycleur ViiA™ 7 Real-Time PCR System selon le programme suivant.

- 10 minutes à 95°C : dénaturer les brins d'ADN
- 15 secondes à 95°C : dénaturer les brins d'ADN
- 1 minute à 60°C : hybridation des amorces et phase d'extension } X 40 cycles
- 15 secondes à 95°C
- 1 minute à 60°C
- 15 secondes à 95°C } Courbes de dissociation : permet de déterminer la spécificité des amorces utilisées

Les valeurs de Ct (Cycle threshold) des gènes cibles ont été normalisées par rapport à celles de la *β-actine* (ΔCt). Le calcul de l'expression transcriptionnelle relative utilise la formule 2-(Δ(ΔCt)).

Tableau 6 : Séquence des amorces

Gène cible	Espèce	Séquence sens	Séquence anti-sens
β-Actine	Souris	ATGGAGGGGAATACAGCCC	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT
Ror-c	Souris	GGTGATAACCCCGTAGTGGA	CTGCAAAGAAGACCCACACC
IL-17 A	Souris	TGAGCTTCCCAGATCACAGA	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA
IL-17 F	Souris	TTGATGCAGCCTGAGTGTCT	AATTCCAGAACCGCTCCAGT
IL-21	Souris	AAAACAGGCAAAAGCTGCAT	TGACATTGTTGAACAGCTGAAA
IL-22	Souris	TCGCCTTGATCTCTCCACTC	GCTCAGCTCCTGTCACATCA
Nalp3	Souris	TCACAACTCGCCCAAGGAGGAA	AAGAGACCACGGCAGAAGCTAG
Asc	Souris	GCTGGTCCACAAAGTGTCCT	GAGCAGCTGCAAACGACTAA
Caspase-1	Souris	CGTACACGTCTTGCCCTCAT	ACTCCTTGTTTCTCTCCACGG
IL-1β	Souris	GGTCAAAGGTTTGGAAGCAG	TGTGAAATGCCACCTTTTGA
β-Actine	Humain	GTTGTCGACGACGACGAGCG	GCACAGAGCCTCGCCTT
Nalp3	Humain	AGGAAGATGATGTTGGACTGG	GTGGATGGGTGGGTTTGG
Asc	Humain	AGTTTCACACCAGCCTGGAA	TTTTCAAGCTGGCTTTTCGT

VIII. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* : ELISA

La technique ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) permet de quantifier la sécrétion de molécules dans le surnageant de culture cellulaire. Ici nous avons estimé la quantité d'IL-17 A ou IL-1β sécrétée par les cellules en utilisant les kits Mouse IL-17A ELISA MAX Standard (BioLegend) et Mouse IL- 1 beta /IL-1F2 DuoSet® ELISA (R&D Systems) et Human IL- 1 beta /IL-1F2 DuoSet® ELISA (R&D Systems).

Un anticorps dit « de capture » est fixé dans le fond du puits d'une plaque 96 puits durant une nuit à 4°C. Après saturation des sites aspécifiques par les protéines d'une solution de SVF à 5 % ou de BSA à 1 % durant 2 h à température ambiante, les surnageants de culture cellulaire sont déposés et incubés à 4°C durant une nuit. L'anticorps de détection, couplé à l'enzyme HRP, vient ensuite fixer les molécules d'intérêts lors d'une heure d'incubation à température ambiante. Le substrat de l'enzyme HRP : le tétraméthylbenzidine (TMB) est ensuite ajouté et une coloration bleu clair apparait. Cette réaction est arrêtée par ajout d'une solution d'acide sulfurique 2N (H_2SO_4), qui en changeant le pH de la solution, change sa couleur en jaune. La lecture de l'absorbance à 450 nm est réalisée par un spectrophotomètre lecteur de plaques UVM 340 Asys (BioServ) et l'analyse des données est réalisée par comparaison au contrôle.

i. Tests statistiques

Les expérimentations *in-vitro* ont été répétées trois fois (sauf si mentionné). Les résultats sont exprimés en moyenne avec l'erreur type sur celle-ci (SD, Standard Deviation) et une expérience représentative est présentée dans les résultats pour chaque type d'expérience. Nous avons utilisé pour les expérimentations *in vivo* le test de Student et pour les expérimentations *in vitro* le test T apparié. *$p<0.05$ **$p<0.01$ ***$p<0.001$.

RESULTATS

I. Activité biologique de l'extrait polyphénolique de vin rouge *in vitro et in vivo*

Au cours de ces vingt dernières années, le resvératrol, un polyphénol que l'on retrouve dans l'alimentation au travers du raisin, des baies rouges, des cacahuètes, a montré de nombreuses activités pharmacologiques. Il permet la modulation des voies de signalisations de la division cellulaire, de l'apoptose, de l'inflammation ou encore de l'angiogenèse (Kundu & Surh, 2008). Parallèlement, Mazué et coll. ont pu montrer un effet antiprolifératif d'un extrait de vin désalcoolisé sur des cellules de cancer colorectal colique (Mazué et al., 2014). Nous nous intéresserons ici à l'étude d'un extrait polyphénolique de vin rouge issu d'un Santenay Premier Cru de 2012. Celui-ci contient du resvératrol mais également un grand nombre d'autres molécules polyphénoliques telles que la malvidine et la delphinidine de la famille des anthocyanes, de la catéchine, des dimères de procyanidine, des acides phénoliques…. Le procédé de fabrication ainsi que la description qualitative exhaustive de l'extrait de vin rouge est décrit dans la section Matériel et méthode, II. Préparation de l'extrait polyphénolique de vin rouge.

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'étude de l'activité anti-proliférative et cytotoxique de notre extrait polyphénolique de vin rouge (RWE : Red Wine Extract) sur des lignées cellulaires de cancer colorectal humaines et murines.

1. Effet cytotoxique de l'extrait polyphénolique de vin rouge *in vitro*

Afin d'évaluer l'effet cytotoxique de notre extrait polyphénolique de vin rouge et de déterminer le type de mort qu'il induit, nous avons procédé à diverses analyses. Dans un premier temps nous avons évalué l'effet antiprolifératif de RWE.

a) Evaluation de l'effet antiprolifératif de l'extrait polyphénolique de vin rouge

Nous avons d'abord étudié l'effet antiprolifératif de RWE sur des lignées cellulaires de cancer colorectal murines (CT26 et MC38) et humaines (HCT116 et SW620). Pour cela, nous avons réalisé un test colorimétrique de viabilité cellulaire au Crystal Violet après 48 h et 72 h de traitement par l'extrait de vin selon une gamme de concentration croissante allant de 10 à 500 µg/ml (Figure 11).

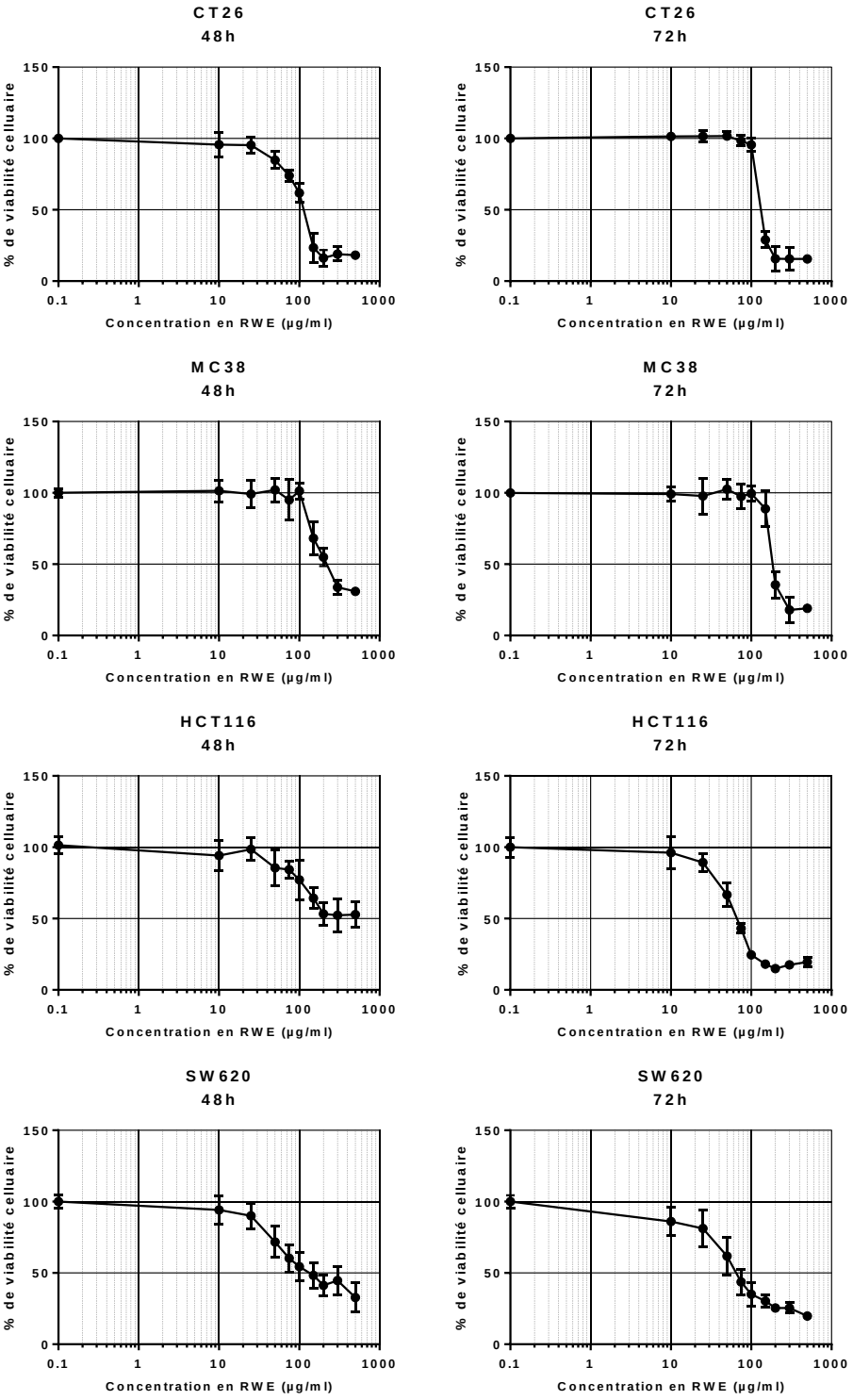


Figure 11. Evaluation de la viabilité cellulaire sur quatre lignées cellulaires de cancer colorectal murines et humaines. Ces tests ont été réalisés sur les lignées cellulaires murines CT26 et MC38 et sur les lignées humaines HCT116 et SW620. Les cellules ont été traitées durant 48 h ou 72 h à des concentrations allant de 10 µg/ml à 500 µg/ml de RWE. La détermination de la concentration en RWE induisant 50 % de viabilité cellulaire a été obtenue en faisant la moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes comprenant au minimum 2 réplicats.

Tableau 7. Tableau récapitulatif des valeurs d'IC50 de la figure 11

Lignées cellulaires		Concentration de RWE (µg/ml) pour 50 % de cellules viables	
		48 h de traitement	72 h de traitement
Murines	CT26	123,7 ± 11,9	153,3 ± 15,7
	MC38	122,0 ± 4,3	74,5 ± 11 ,6
Humaines	HCT116	213,5 ± 30,4	77,3 ± 6,6
	SW620	221,0 ± 9,8	227,5 ±30,0

Ces résultats nous montrent une diminution de la viabilité cellulaire des cellules de lignées de cancer colique CT26, MC38, HCT116 et SW620 lorsqu'elles sont traitées par l'extrait polyphénolique de vin rouge. Ces effets augmentent en fonction de la concentration de RWE utilisés pour les 4 lignées. Néanmoins, une augmentation du temps de traitement ne semble pas affecter la viabilité cellulaire pour les lignées CT26 et SW620.

Afin de déterminer le mécanisme par lequel passe la diminution de viabilité cellulaire précédemment observée, nous avons procédé à une analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux.

b) Induction de la mort cellulaire par l'extrait polyphénolique de vin rouge

Afin de mettre en évidence et quantifier la mort cellulaire induite par RWE, nous avons procédé à un marquage AnnexineV / 7AAD. En effet, l'AnnexineV se fixe sur les phosphatidyl-serines qui se trouvent transloquées à l'extérieur de la membrane plasmique puis plus tardivement, l'intégrité de cette membrane est perturbée, ainsi, le 7AAD peut entrer dans la cellule et fixer l'ADN. La combinaison de ces deux marqueurs permet de différencier les cellules vivantes (AnnexineV- / 7AAD-), des cellules en phase précoce d'apoptose (AnnexineV+ / 7AAD-) ou des cellules en phase tardive d'apoptose ou de nécrose (AnnexineV+ / 7AAD+) (Figure 12).

Nous pouvons observer une augmentation de la proportion de cellules marquées par l'AnnexineV et le 7AAD en fonction de l'augmentation de la concentration de traitement par l'extrait de vin. Le marquage de l'apoptose précoce AnnexineV+/ 7AAD- est faiblement

augmenté dans les lignées de cancer colique murine CT26 et MC38 (maximum d'augmentation : 3 %) comparativement aux lignées humaines (maximum d'augmentation : 30%). Néanmoins l'ensemble des lignées présentent un taux de cellules doublement positives nettement supérieur à celui de l'apoptose précoce. On peut observer une augmentation du double marquage de 5 % pour les lignées murines et jusqu'à 80 % pour les lignées humaines.

Ces résultats montrent que la diminution de la viabilité cellulaire observée précédemment est due à l'induction de la mort cellulaire par l'extrait polyphénolique de vin rouge. Cependant il est nécessaire d'affiner les analyses afin de déterminer plus précisément le type de mort induit par l'extrait polyphénolique de vin rouge.

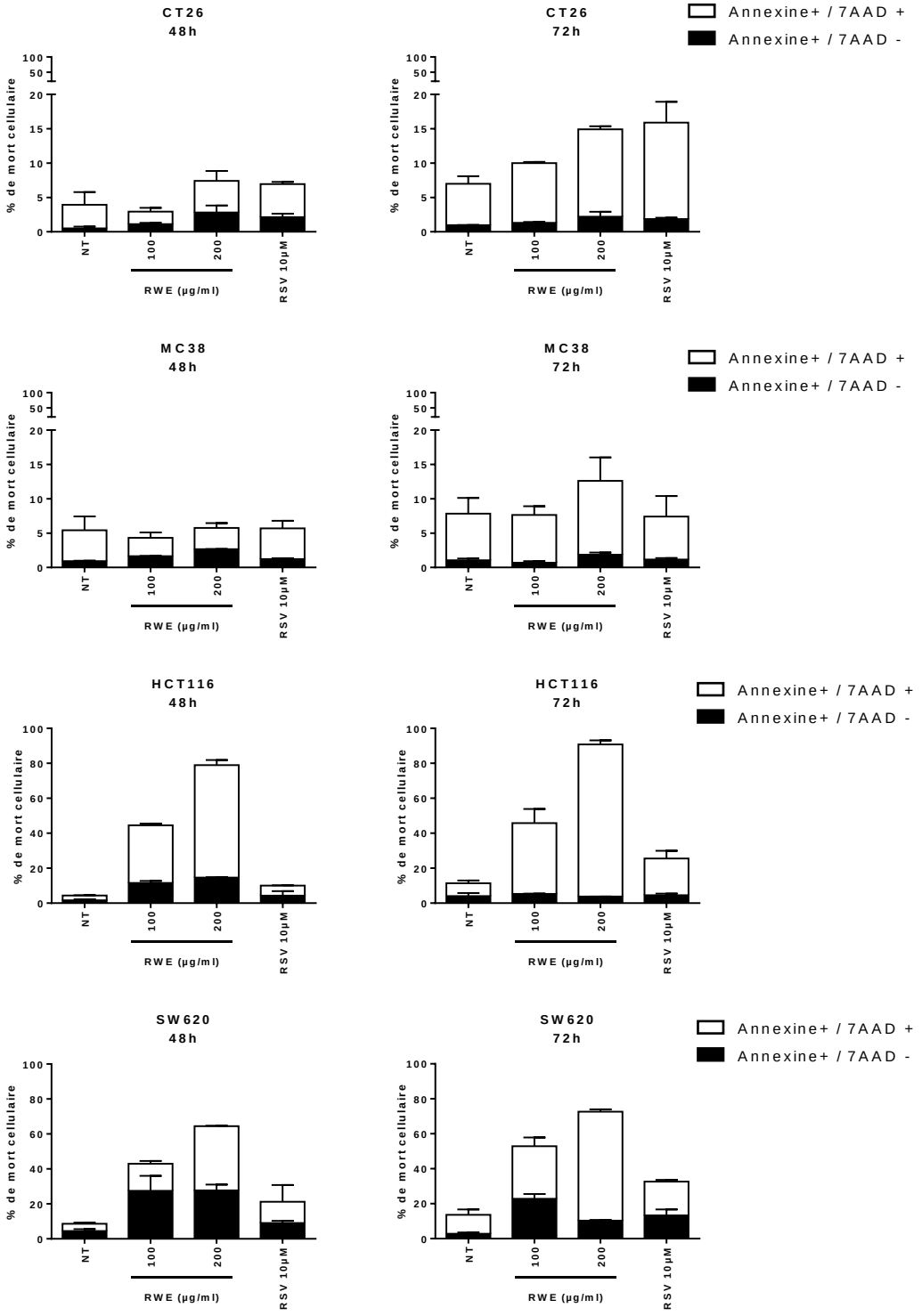


Figure 12. Caractérisation de la mort cellulaire induite par l'extrait de vin rouge. Ces tests ont été réalisés sur les lignées cellulaires murines CT26 et MC38 et sur les lignées humaines HCT116 et SW620. Les cellules ont été traitées durant 48 h ou 72 h à des concentrations de 100 µg/ml et 200 µg/ml de RWE et de 10µM de resvératrol (RSV, contrôle positif). La mort cellulaire a été analysée par cytométrie en flux après un marquage des cellules à l'AnnexineV/7AAD. Le pourcentage de mort cellulaire exprimé ici est représentatif des résultats de deux expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats.

c) Mise en évidence de la mort cellulaire par apoptose

Pour déterminer plus précisément le caractère apoptotique de la mort induite par l'extrait de vin, nous avons procédé à un marquage des noyaux cellulaires par du Hoechst 33342. Ce marquage permet de repérer par microscopie les corps apoptotiques induit par la condensation de la chromatine lors du processus d'apoptose. La chromatine des noyaux cellulaires des cellules apoptotiques sera alors fragmentée (Figure 13).

Pour cela, nous avons traité les cellules des lignées de cancer colique CT26, MC38, HCT116 et SW620 durant 48 h avec l'extrait polyphénolique de vin rouge puis nous les avons marquées par le Hoechst 33342. Nous pouvons observer une augmentation du nombre de noyaux présentant une fragmentation de la chromatine dans le champ de cellules traitées par l'extrait de vin rouge comparativement aux noyaux des cellules contrôles. La mort induite par l'extrait polyphénolique de vin rouge implique alors les voies apoptotiques.

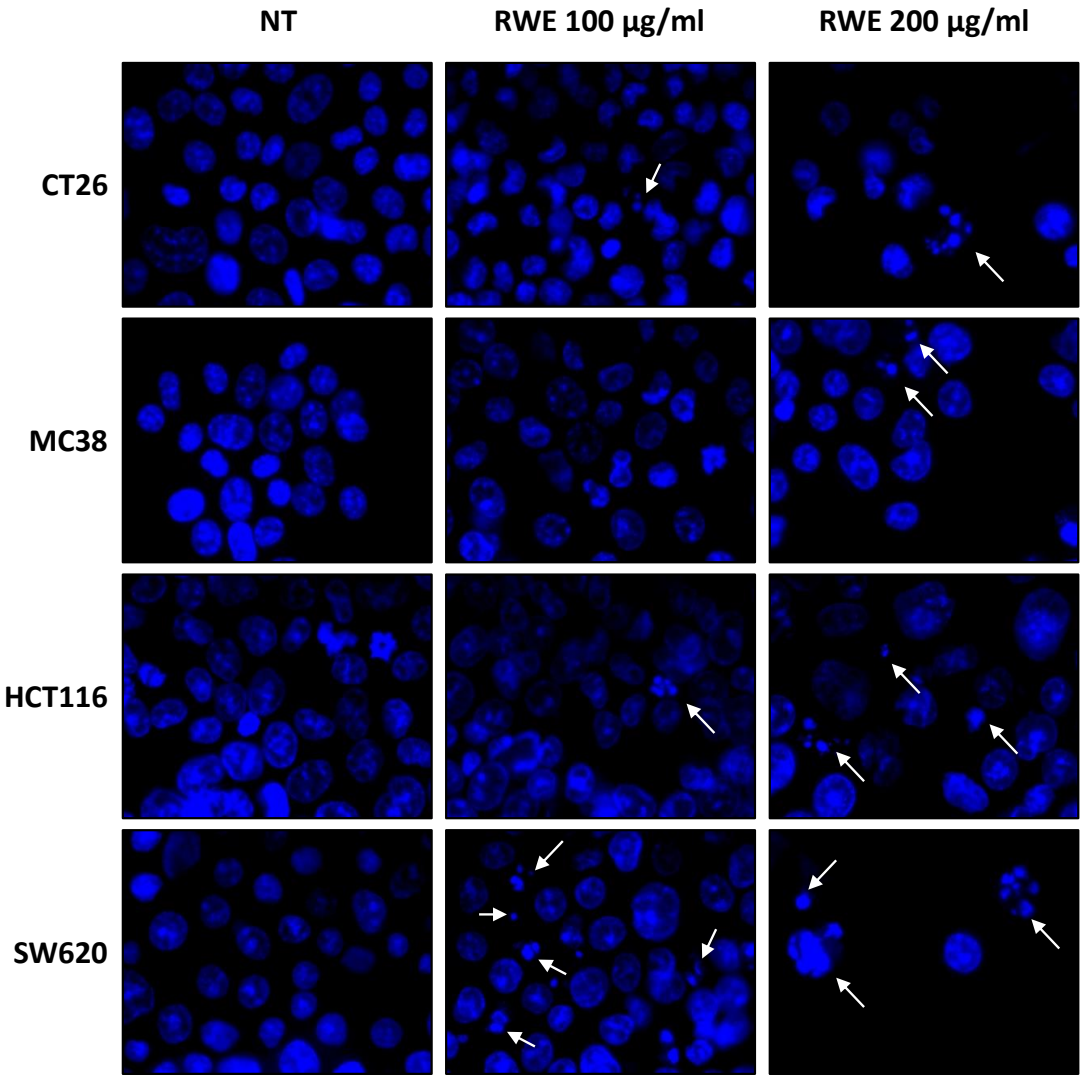


Figure 13. Mise en évidence de la mort cellulaire par apoptose induite par l'extrait de vin rouge. Un marquage par du Hoechst 33342 a été réalisé sur les lignées cellulaires murines CT26 et MC38 et sur les lignées humaines HCT116 et SW620. Les cellules ont été traitées durant 48 h à des concentrations de 100 µg/ml et 200 µg/ml de RWE puis marquées par le Hoechst 33342. La condensation et la fragmentation de la chromatine est indiquée par une flèche, est observée par microscopie. Ces résultats sont représentatifs des résultats de deux expériences indépendantes.

A ce stade de l'étude, nous avons pu mettre en évidence un effet cytotoxique de l'extrait polyphénolique de vin sur les quatre lignées cellulaires de cancer colorectal humaines (HCT116 et SW620) et murines (CT26 et MC38). Cet extrait induit *in vitro* la mort cellulaire par apoptose néanmoins, il semble également induire la mort cellulaire par nécrose ou apoptose tardive.

Compte tenu des résultats obtenus précédemment, il s'agit maintenant d'évaluer si l'extrait polyphénolique de vin rouge peut avoir un effet anti-tumoral *in vivo.*

2. Evaluation de l'activité anti-tumorale de l'extrait polyphénolique de vin rouge *in vivo*

Afin de rendre compte d'un éventuel effet anti-tumoral de l'extrait polyphénolique de vin *in vivo*, nous avons étudié son effet sur la croissance de tumeurs issues de xénogreffes de cellules de cancer colique murines CT26 chez des souris Balb/c agées de six semaines réparties en deux groupes. Le premier groupe de huit souris voit son régime alimentaire quotidiennement supplémenté de 100 mg/kg d'extrait de vin rouge, on le nommera « RWE » pour Red Wine Extract. Tandis que le second groupe, de huit souris également, dit « contrôle », reçoit un régime alimentaire ordinaire ; les deux groupes suivent ce régime durant trois semaines. Cette supplémentation alimentaire par voie orale pourrait mimer la prise quotidienne d'un complément alimentaire à base d'extrait de vin chez l'Homme. A la suite des trois semaines de supplémentation, les souris reçoivent en injection sous-cutanée des cellules cancéreuses coliques murines CT26. Le suivi de la croissance tumorale est réalisé jusqu'à euthanasie de l'animal et le régime alimentaire est maintenu tout au long de l'expérience (Figure 14). Par ailleurs, le poids des souris est suivi de façon hebdomadaire.

Les résultats nous montrent que le régime alimentaire enrichi en extrait de vin rouge n'a pas d'influence sur le poids des souris traitées comparativement à celle du groupe contrôle (Figure 14A). En revanche, la surface des tumeurs est significativement réduite chez le groupe RWE comparativement au groupe contrôle. En effet, la surface tumorale moyenne du groupe RWE est de 155 mm^2 à 19 jours tandis qu'elle est de 258 mm^2 pour le groupe contrôle (Figure 14B). Nous observons donc un effet anti-tumoral de l'extrait polyphénolique de vin rouge.

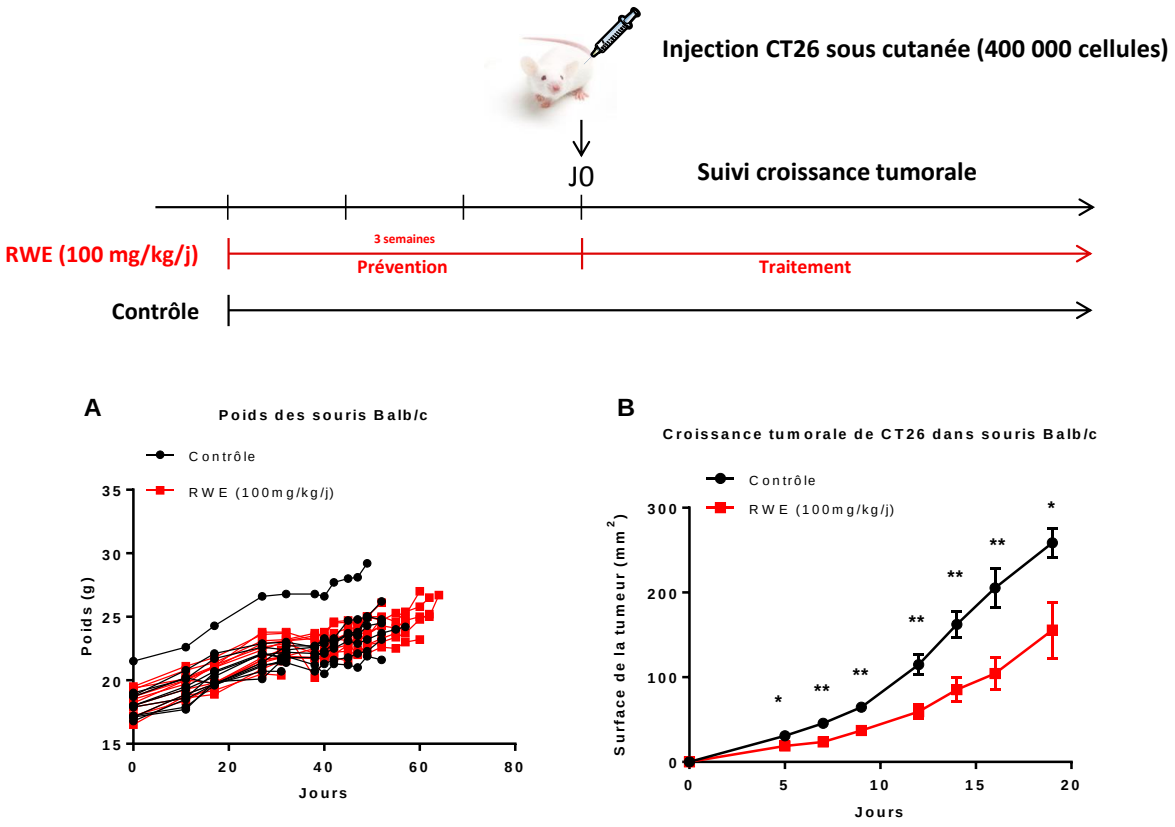


Figure 14. Effet anti-tumoral de l'extrait de vin rouge *in vivo.* Après trois semaines de supplémentation alimentaire « RWE » ou absence de supplémentation « contrôle », les souris Balb/c reçoivent en injection sous cutanée de cellules cancéreuses coliques CT26. A. Le poids des souris est surveillé sur l'ensemble de la période de l'expérience. B. Le suivi de croissance tumorale est réalisée 3 fois par semaines jusqu'au sacrifice de l'animal. Test de Student *p<0.05 **p<0.01

Jusqu'alors, nous avons pu montrer que l'extrait polyphénolique de vin rouge permet de prévenir la prolifération des cellules tumorales coliques *in vitro* sur quatre lignées de cellules humaines et murines et *in vivo* chez la souris avec un modèle CT26/Balb/c. En effet, l'extrait diminue la viabilité cellulaire de ces cellules et induit leur mort cellulaire par apoptose et nécrose. De plus, nous avons pu montrer que l'extrait présente un effet anti-tumoral chez des souris Balb/c injectées en sous cutanée avec des cellules de cancer colique CT26.

L'extrait polyphénolique de vin rouge semble donc être un candidat intéressant pour la chimioprévention des cancers colorectaux. On entend ici par chimioprévention, la prévention des cancers par l'ingestion d'agents naturels réduisant ainsi le risque de cancérogenèse. Or dans la littérature, de nombreux travaux mettent en évidence une corrélation entre les phénomènes d'inflammation chronique et de cancérogénèse (Coussens & Werb, 2002). En

effet, lors du phénomène de cancérogénèse, la réponse immunitaire, qui est déclenchée par les différents effecteurs du système immunitaire, est de type pro-inflammatoire.

Dans le cadre de notre projet, nous avons donc cherché à mettre en évidence un effet immuno-modulateur de notre extrait de vin et plus précisément sur la modulation de la réponse immunitaire pro-inflammatoire liée aux lymphocytes Th17.

II. Etude de la modulation de la différenciation du lymphocyte Th17 par l'extrait polyphénolique de vin rouge

Pour réaliser cette partie de l'étude, nous avons procédé à la différenciation *in vitro* de lymphocytes T naïfs ($CD4^+$ $CD62L^{hi}$) en lymphocytes Th17. Pour cela nous avons isolé des lymphocytes T naïfs de souris C57bl/6 puis mis en culture en présence d'un milieu de différenciation spécifique du Th17 comprenant de l'IL-6 et du TGF-β.

1. Mise en évidence de la diminution de la production d'IL-17 par le Th17 *in vitro* après un traitement par l'extrait polyphénolique de vin rouge

Dans un premier temps nous avons recherché la sécrétion de l'interleukine pro-inflammatoire IL-17 produite par les Th17. Pour cela, nous avons récupéré le surnageant de culture des lymphocytes après différenciation en Th17 et procédé à une quantification de l'IL-17A par ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Figure 15).

Nous pouvons observer une diminution significative de la quantité d'IL-17 produite en présence d'un traitement par l'extrait de vin, et ce, dès la concentration de 50 µg/ml comparativement à la condition non traitée. De plus, comme il a déjà pu être observé dans l'équipe, le resvératrol induit une diminution significative de la production d'IL-17 par les lymphocytes Th17 (Limagne et al., 2017).

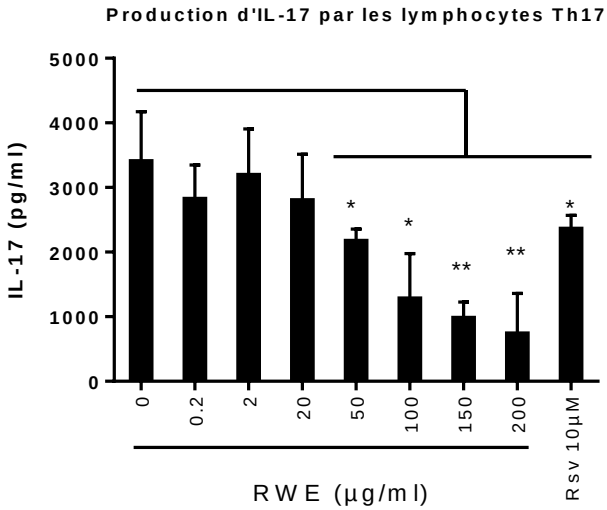


Figure 15. Diminution de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-17. Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d'extrait polyphénolique de vin rouge (RWE) et une concentration de resvératrol (RSV), simultanément à l'induction de la différenciation des cellules par le milieu de différenciation enrichi en IL-6 et TGF-β et durant toute l'expérimentation. Les surnageants de culture cellulaire ont été récupérés après 3 jours de différenciation puis l'IL-17 A est dosé par la technique d'ELISA. L'expérience, comprenant au minimum 2 réplicats, a été réalisée trois fois de manière indépendante. Test statistique T apparié *p<0.05 **p<0.01

L'extrait polyphénolique de vin permet donc de moduler la production d'interleukine 17 par les lymphocytes Th17. Cette modulation est-elle la conséquence d'une atteinte du gène codant pour l'*il-17*?

2. Mise en évidence de la diminution de l'expression génique de l'*il-17A* et l'*il-17F in vitro* après un traitement à l'extrait polyphénolique de vin rouge

Afin de mettre en évidence un éventuel effet de l'extrait de vin au niveau de l'expression génique du lymphocyte Th17, nous avons procédé à une RT-qPCR sur les ARN des lymphocytes Th17 traités, ou non, par l'extrait de vin (Figure 16).

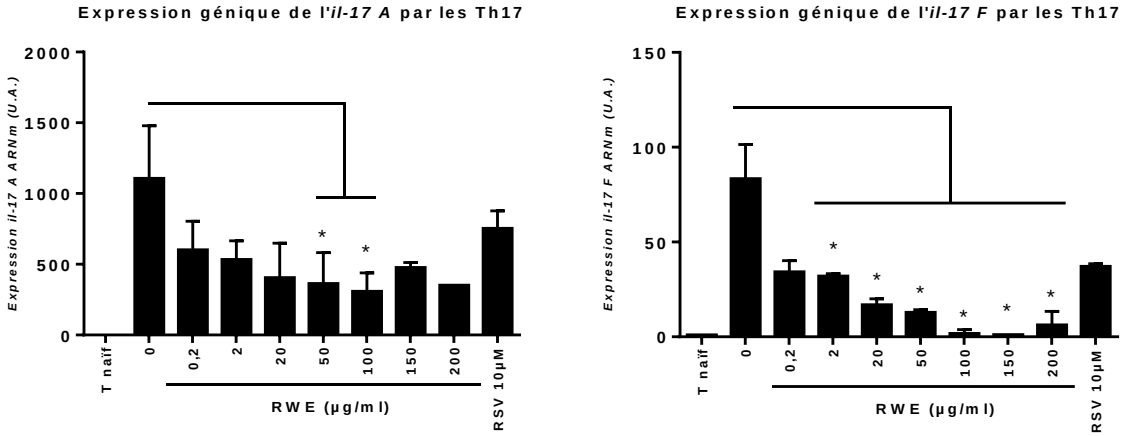


Figure 16. Diminution de l'expression génique de l'*il-17A* et de l'*il-17-F* des Th17. Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d'extrait polyphénolique de vin rouge (RWE) et une concentration de resvératrol (RSV) simultanément à l'induction de la différenciation des cellules par le milieu de différenciation enrichi en IL-6 et TGF-β. Les cellules ont été récupérées après 3 jours de différenciation puis nous avons réalisé une RT-qPCR. L'expérience, comprenant au minimum 2 réplicats, a été réalisée trois fois de manière indépendante. Test statistique T apparié *p<0.05

L'extrait de vin, pour des concentrations de traitement allant de 50 et 100 µg/ml, induit de manière significative la diminution de l'expression de l'*IL-17A*. De plus, l'expression de l'*IL-17F* par les lymphocytes Th17 est significativement diminuée par un traitement à l'extrait de vin à partir de la concentration de 2 µg/ml. Un traitement des lymphocytes Th17 par l'extrait polyphénolique de vin rouge permet donc une modulation de l'expression génique de l'*il-17A* et de l'*il-17F* et ce de manière similaire à ce qui a pu être montré par le resvératrol.

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer s'il y a une modulation de la transcription ou une stabilisation des ARNm.

Nous venons de montrer que l'extrait polyphénolique de vin rouge à la capacité de moduler la synthèse des gènes de la différenciation d'un lymphocyte Th17 mais également de moduler sa sécrétion en cytokine pro-inflammatoire. Néanmoins l'extrait de vin est-il capable d'affecter directement le processus de différenciation du lymphocyte Th17 en jouant sur les facteurs de transcription clés de ce processus : STAT3 et Rorγt ?

3. Mise en évidence de la modulation du taux protéique de STAT3, P-STAT3 et Rorγt *in vitro* après un traitement à l'extrait polyphénolique de vin

Dans le but de mettre en évidence un effet de l'extrait de vin sur l'expression protéique des facteurs de transcription du lymphocyte Th17, nous avons traité, ou non ces derniers, par l'extrait de vin puis, après extraction des protéines des cellules, nous avons procédé à un immunoblotting. (Figure 17).

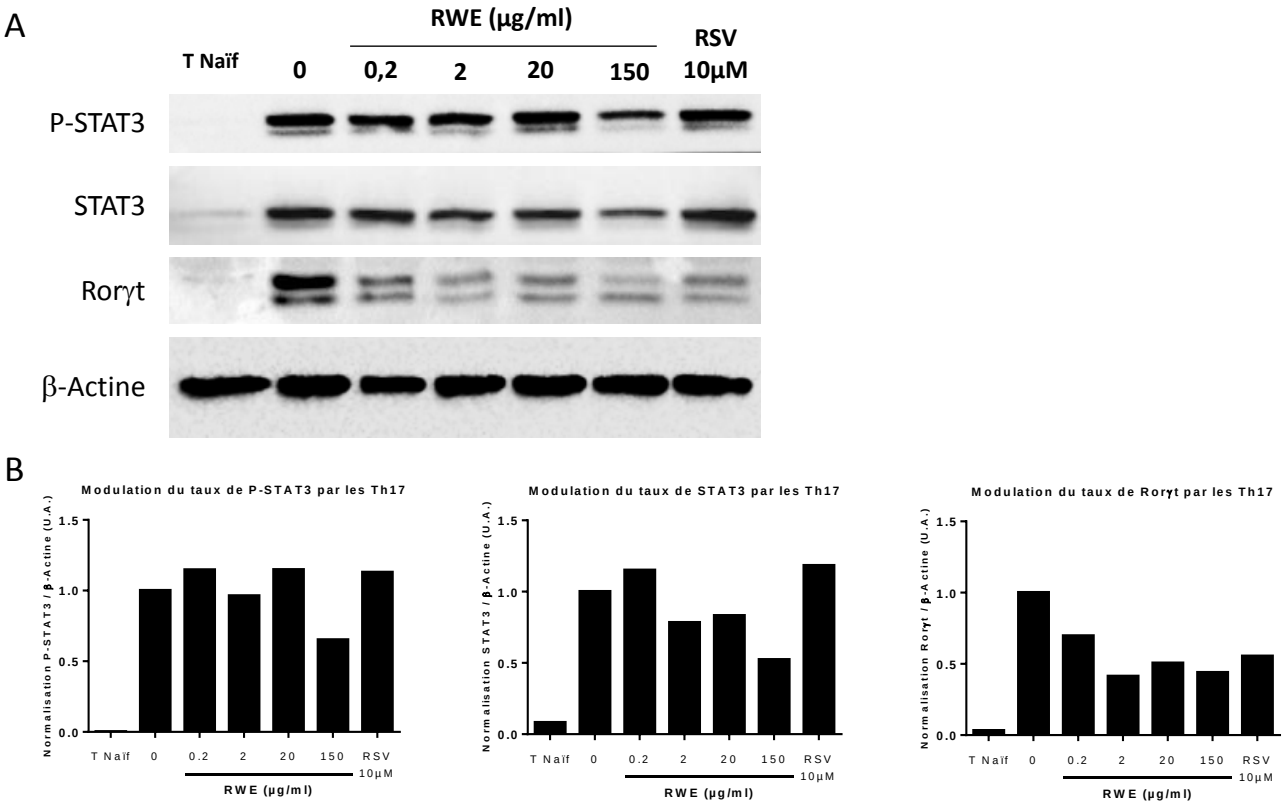


Figure 17. Mise en évidence du taux de protéines régulant la différenciation du Th17 après traitement par l'extrait polyphénolique de vin rouge. Les cellules Th17 ont été traitées par des concentrations croissantes d'extrait polyphénolique de vin rouge (RWE) et une concentration de 10 µM de resvératrol (RSV) durant tout le temps de l'expérimentation. Les cellules ont été récupérées après 6 h (STAT3 et P-STAT3) ou 3 jours (Rorγt) de différenciation puis après une lyse cellulaire, nous avons réalisé un immunoblotting (A). La quantification des bandes a également été réalisée et normalisée par rapport à la β-actine (B). Ce résultat est représentatif de trois expériences réalisées de manière indépendante.

Nous pouvons observer ici, une diminution de la synthèse protéique de nos trois protéines d'intérêt : P-STAT3, STAT3 et Rorγt lorsque les Th17 sont traités avec l'extrait polyphénolique de vin comparativement au contrôle, ce qui n'est pas le cas pour le resvératrol qui est seulement capable de diminuer l'expression protéique de Rorγt.

Ces résultats montrent que l'extrait de vin permet de diminuer l'expression des différents facteurs de transcriptions clés de la différenciation du lymphocyte Th17 pro-inflammatoire.

Nous avons donc pu montrer que l'extrait polyphénolique de vin rouge :

- Induit une diminution significative de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire IL-17 ;
- Provoque une diminution significative de l'expression de l'*il-17A* et l'*il-17F ;*
- Induit la diminution du taux de STAT3 et de sa forme phosphorylée ainsi que du taux de Rorγt, deux facteurs de transcription clés du programme de différenciation Th17.

Au vue de ces résultats, nous avons mis en évidence un effet immuno-modulateur des molécules polyphénoliques présentes dans l'extrait de vin rouge, en régulant négativement le programme de différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte Th17 pro-inflammatoire.

L'IL-17 n'est pas la seule cytokine pro-inflammatoire ayant un rôle majeur dans l'inflammation. C'est le cas, par exemple de l'IL-1β qui participe notamment à la formation de l'inflammasome. Dans une seconde partie, nous avons donc recherché si l'extrait de vin peut agir sur celle-ci.

III. Etude de l'activité de l'extrait polyphénolique de vin rouge sur le «priming » ou l'activation de l'inflammasome NLRP3

Chang et coll ont cherché à savoir si le resvératrol avait un rôle sur le « priming » de l'inflammasome *via* le LPS ou s'il influence l'activation du signal NLRP3 par différents activateurs de l'inflammasome tels que l'ATP ou la Nigéricine. Ils ont pu mettre en évidence un effet du resvératrol sur l'activation de NLRP3 et de l'inflammasome *via* l'ATP néanmoins aucun effet du resvératrol n'est détecté sur le « priming » de NLRP3. (Chang, Ka et al., 2015).

Comme décrit précédemment dans l'introduction, l'induction de l'inflammation *via* l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux. Le premier consiste en une augmentation de la synthèse protéique de NLRP3, on parle alors de « priming » de NLRP3 et le second consiste

en son activation qui va permettre l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et *in fine* la maturation de cytokines pro-inflammatoire telles que l'IL-1β et l'IL-18.

Lors de notre étude nous avons évalué le potentiel immunomodulateur des molécules polyphénoliques de notre extrait de vin rouge sur le « priming » de NLRP3 ou sur l'activation et la formation de l'inflammasome NLRP3. Afin de procéder à cette étude nous avons utilisé deux lignées de macrophages murins, les cellules Raw264.6 et J774A.1. Ces deux lignées cellulaires sont des macrophages murins issus respectivement d'ascites d'un mâle porteur de tumeurs induite par le virus de la leucémie murine d'Abelson et de sang d'une femelle Balb/c porteuse d'une tumeur.

1. Absence de toxicité de l'extrait polyphénolique de vin sur les macrophages murins Raw264.7

Afin de rendre compte de la cytotoxicité de l'extrait polyphénolique de vin rouge sur les macrophages de la lignée Raw264.7, nous avons réalisé un test de viabilité cellulaire par coloration au Crystal Violet sur ces cellules (figure 18).

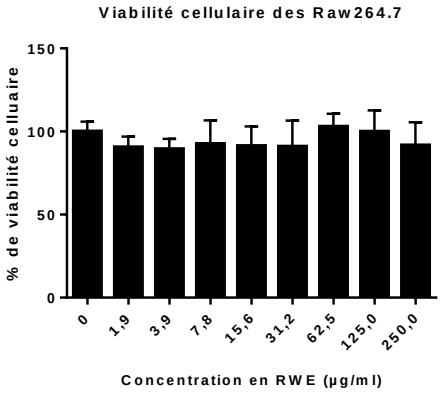


Figure 18. Evaluation de la viabilité cellulaire sur les macrophages murins Raw264.7 après un traitement à l'extrait de vin. Les cellules ont été traitées durant 24 h à des concentrations croissantes de RWE allant de 1,9 µg/ml à 250 µg/ml. La viabilité cellulaire a été mise en évidence par coloration au Crystal Violet. L'expérience a été réalisée deux fois de manière indépendante avec 5 réplicats.

Nous observons que l'extrait polyphénolique de vin n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire des macrophages Raw264.7 malgré des concentrations croissantes allant jusqu'à 250 µg/ml.

L'extrait de vin ne montrant pas de cytotoxicité, nous avons pu évaluer, dans un second temps, son effet sur le « priming » de NLRP3 dans ces mêmes cellules.

2. Mise en évidence du « Priming » et de l'activation de l'inflammasome de NLRP3 par le LPS dans les Raw264.7

Dans un premier temps nous avons vérifié si un traitement de 6 h par le LPS induit le priming de NLRP3 dans notre lignée de macrophages murins : Raw264.7 (Figure 19).

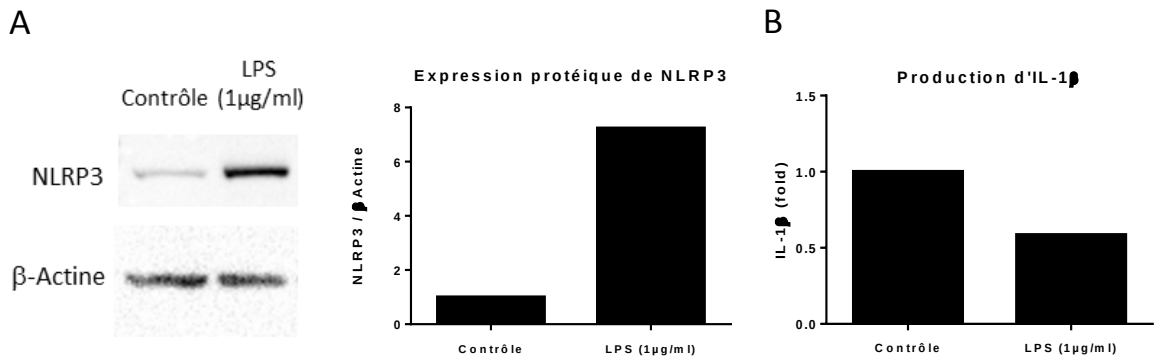


Figure 19. Mise en évidences du « Priming » et de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par le LPS. Les macrophages murins Raw264.7 ont été traités 6 h par du LPS (1 µg/ml). Les protéines de ces cellules sont extraites puis analysées par immunoblotting (A) et un dosage de l'IL-1β par ELISA a été réalisé sur le surnageant (B). Ce résultat est représentatif de deux expériences répétées indépendamment.

Nous pouvons observer une augmentation du niveau d'expression protéique de NLRP3 dans les Raw264.7 en présence d'un traitement au LPS comparativement au contrôle. Par ailleurs, le traitement au LPS n'induit pas la maturation de l'IL-1β.

Au travers de ces résultats, nous avons pu confirmer que le LPS induit le priming de NLRP3 mais que son activation et l'assemblage de l'inflammasome n'est pas effectif.

Afin de juger de l'assemblage et de l'activité de l'inflammasome NLRP3, il est nécessaire d'induire le « priming » de NLRP3 par le LPS mais également d'activer NLRP3 par un activateur de l'inflammasome tel que l'ATP ou la Nigéricine.

3. Mise en évidence d'un effet de l'extrait polyphénolique de vin sur le « priming » de NLRP3 et l'activation et l'assemblage de l'inflammasome

Lors de notre étude nous avons voulu montrer à quel stade de la formation de l'inflammasome l'extrait polyphénolique de vin était capable d'agir. Est-il capable d'influer sur le « priming » de NLRP3 ou peut-il jouer sur l'activation de NLRP3 et l'assemblage de l'inflammasome ?

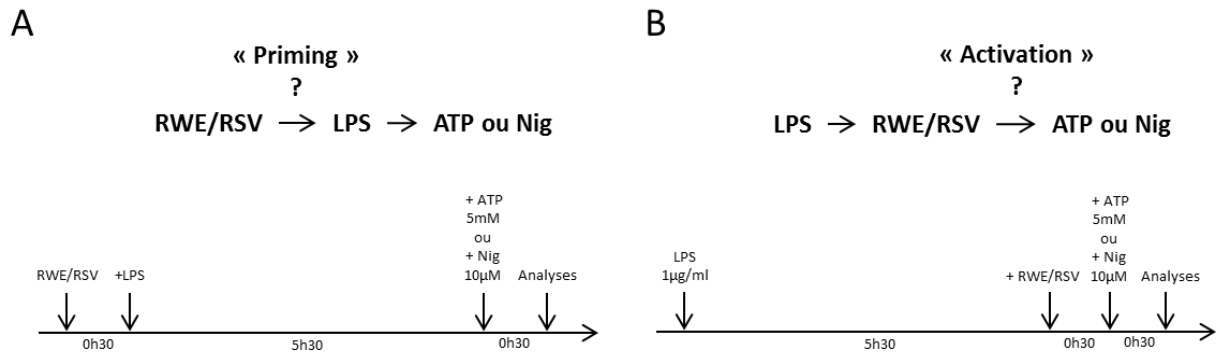


Figure 20. Chronologie des deux cinétiques de traitements utilisés lors des expérimentations. Pour étudier le « priming » de NLRP3 et de l'inflammasome, nous avons procédé à un prétraitement des cellules par l'extrait de vin ou le resvératrol durant 30 minutes. Nous avons ensuite, par ajout dans le milieu de culture, traités les cellules avec du LPS durant 5h30 à la concentration de 1 µg/ml ; en présence ou absence de RWE/RSV. Dans un troisième temps, l'ATP ou la Nigéricine a été ajouté au surnageant de culture afin d'activer l'inflammasome aux concentrations respectives de 5 mM et 10 µM durant 30 minutes (A). Afin d'étudier l'activation de NLRP3 et de son inflammasome nous avons d'abord traité les cellules avec du LPS à la concentration de 1 µg/ml durant 5h30 puis, par l'extrait de vin ou le resvératrol durant 30 minutes en absence ou présence de LPS. Les cellules ont ensuite été traitées par l'ATP à une concentration de 5 mM ou à la Nigéricine à la concentration de 10 µM durant 30 minutes (B). Les analyses par Western Blot, ELISA, PCR ou immunomarquages ont été réalisées à la fin de ces cinétiques.

Pour notre étude, nous avons d'abord évalué l'effet modulateur de l'extrait polyphénolique de vin sur le « priming » de NLRP3 et de son inflammasome. Pour cela nous avons traité les cellules selon la première cinétique de traitement exposée Figure 20 A. Puis, dans un second temps, nous avons évalué l'effet modulateur de l'extrait de vin sur l'activation et l'assemblage de NLRP3 et de son inflammasome. Pour cette seconde partie, nous avons traité les cellules selon la seconde cinétique de traitement exposée Figure 20 B.

a) Mise en évidence d'un effet de RWE sur le « priming » de NLRP3 sur les Raw264.7

Afin de mettre en évidence un effet de notre extrait de vin sur le « priming » de NLRP3 sur les Raw264.7, nous avons utilisé deux activateurs de l'inflammasome différents. Dans un premier temps nous avons utilisé l'ATP. Cette molécule permet l'activation de l'inflammasome en provoquant un efflux de potassium suite à sa fixation sur son récepteur purinergique P2X7 (Gicquel et al., 2014). Dans un second temps nous avons utilisé la Nigéricine. Cette molécule est un antibiotique qui, en s'insérant dans la membrane plasmique, va créer des pores et permettre la fuite de potassium (Pétrilli et al., 2007).

i. Utilisation de l'ATP comme inducteur de l'inflammasome

Afin d'évaluer un éventuel effet de l'extrait de vin et du resvératrol sur le « priming » de NLRP3, nous avons prétraités des macrophages murins Raw264.7 par l'extrait de vin ou le resvératrol puis « primé » et activé NLRP3 respectivement par le LPS et l'ATP (Figure 21A).

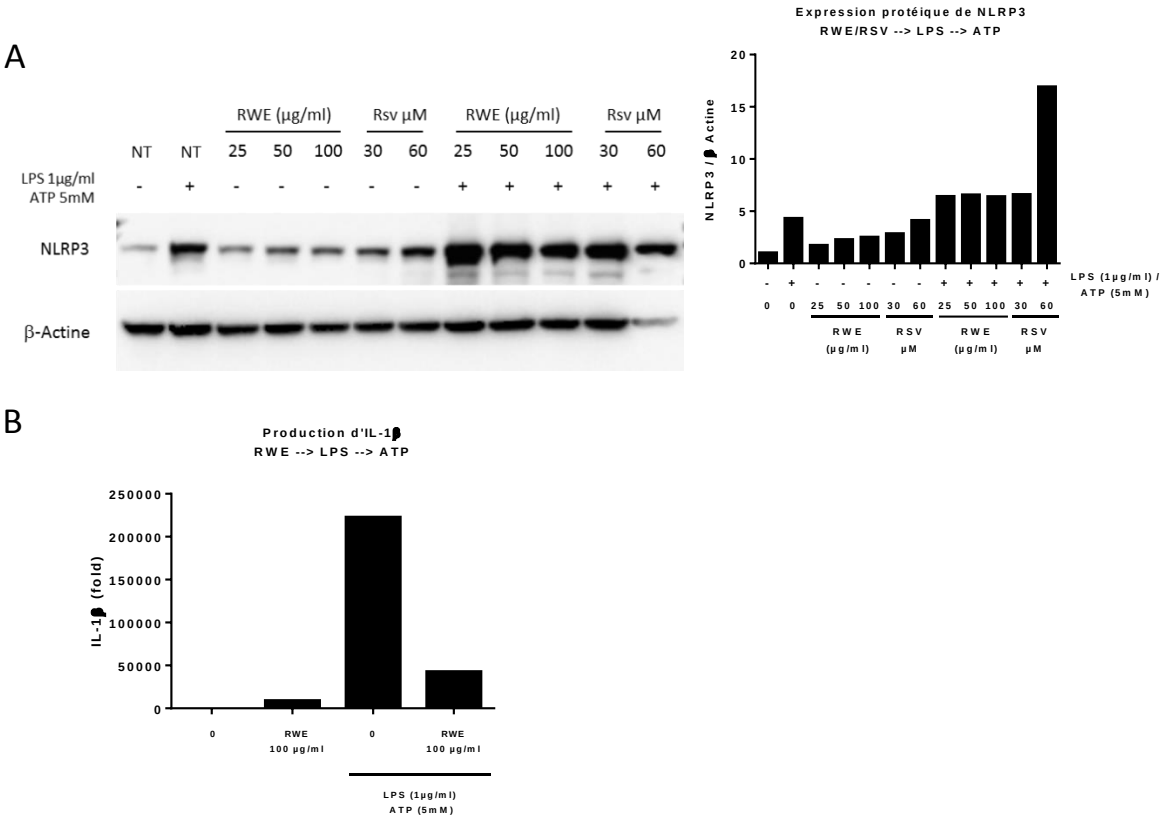


Figure 21. Activité du RWE et du RSV sur le « priming » de NLRP3 par les Raw264.7 suite à une activation par ATP. Les macrophages Raw264.7 ont été prétraités, ou non, durant 30min avec du RWE (100 µg/ml) puis par du LPS (1 µg/ml) puis par de l'ATP (5 mM). Les protéines ont été extraites puis analysées par immunoblotting (A) ; un dosage de l'IL-1β par ELISA a été réalisé sur le surnageant (B). Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes.

D'après les résultats de la figure 21, nous pouvons observer une augmentation de la synthèse protéique de NLRP3 dans les Raw264.7 en présence d'un traitement au LPS comparativement au contrôle. Les traitements par l'extrait de vin ou par le resvératrol ne diminuent pas l'expression protéique de NLRP3 après « priming » de NLRP3 par le LPS. Ces résultats confirment ceux obtenu dans la littérature (Chang et al., 2015). Nous pouvons cependant identifier sur le dernier puits (A), 30 µM de resvératrol LPS ATP ; un problème au niveau de l'intensité de la bande d'actine. Ceci peut être dû au dépôt des protéines ou à la révélation de

celles-ci et engendre un défaut au niveau de la quantification de la bande. Ce point ne doit donc pas être pris en compte dans l'analyse des résultats.

Les résultats de l'ELISA montrent une augmentation de la production d'IL-1β par les macrophages traités par le LPS puis l'ATP comparativement au contrôle. L'extrait de vin rouge associé au LPS et à l'ATP induit une forte diminution de cette sécrétion comparativement aux cellules « primées » et activées.

Au travers de ces résultats, nous avons pu montrer que le LPS combiné à l'ATP induit le priming de NLRP3 par une augmentation de son niveau d'expression protéique. De plus, le prétraitement par l'extrait de vin sur des macrophages « primés » et activés, n'a aucun effet sur le « priming » de NLRP3. Or nous avons constaté qu'un prétraitement par l'extrait de vin diminue la production d'IL-1β mature dans des macrophages « primés » et activés.

Ces résultats s'inscrivent parfaitement dans les ressources bibliographiques contradictoires sur les macrophages Raw264.7. En effet, ces cellules sont décrites comme ayant une déficience de la protéine ASC (Lin, Li et al., 2016, Pelegrin, Barroso-Gutierrez et al., 2008). Or ASC est un composant indispensable pour l'activation de la caspase-1 et le clivage de la pro-IL-1β en IL-1β mature *via* la voie canonique de l'inflammasome NLRP3 (Lin et al., 2016). Il est vrai que des macrophages avec une déficience pour ASC présentent un défaut de maturation des cytokines pro inflammatoires IL-1β et IL-18. (Mariathasan, Newton et al., 2004). Dans ce cas, ce modèle cellulaire n'est pas optimal pour étudier l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Or d'autres publications indiquent que le traitement des cellules Raw264.7 par du LPS est un modèle idéal pour l'étude de l'inflammation *via* la voie canonique (Xiang, Chen et al., 2015). Xiao et coll. ont révélé une augmentation de l'expression des composants de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules RAW 264.7 après traitement par LPS. Par ailleurs, cette augmentation de NLRP3 et la production d'IL-1β peut être inhibée par un prétraitement à l'Orientine (Xiao, Qu et al., 2017).

Afin de pouvoir positionner notre étude dans le contexte bibliographique actuel, nous avons décidé d'utiliser un autre activateur de l'inflammasome et d'en comparer les résultats.

ii. Utilisation de la Nigéricine (Nig) comme inducteur de l'inflammasome

Dans cette partie, nous avons cherché à valider, ou non, les précédents résultats obtenus avec un « priming » des Raw264.7 par le LPS et une activation de l'inflammasome par un autre activateur de l'inflammasome NLRP3, la Nigéricine (Pétrilli et al., 2007) (Figure 22).

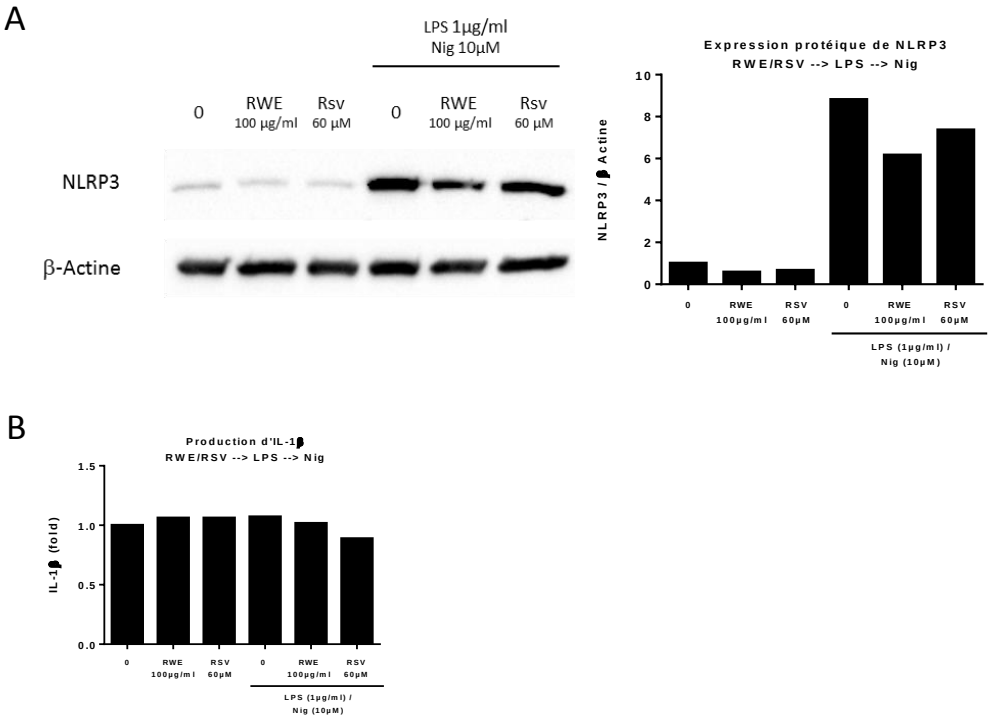


Figure 22. Activité du RWE et du RSV sur le « priming » de NLRP3 par les Raw264.7 suite à une activation par la Nigéricine. Les Raw264.7 ont été prétraités, ou non, durant 30 min avec du RSV (60 µM) ou du RWE (100 µg/ml) puis par du LPS (1 µg/ml) puis par de la Nigéricine (10 µM). Les protéines ont été extraites puis analysées par immunoblotting (A) ; un dosage de l'IL-1β par ELISA a été réalisé sur le surnageant (B). Ce résultat est représentatif de deux expériences réalisées de manière indépendantes.

Ces résultats nous montrent une augmentation de la synthèse protéique de NLRP3 dans les Raw264.7 en présence d'un traitement au LPS/Nig comparativement au contrôle. Tout comme précédemment, les traitements par l'extrait de vin et le resvératrol ne semblent pas moduler l'expression protéique de NLRP3 après « priming » et activation de NLRP3 par le LPS et la Nigéricine.

Les résultats de l'ELISA ne montrent aucun effet des différents traitements : absence d'augmentation de l'IL-1β par un traitement LPS/Nig et absence d'effet d'un traitement à l'extrait polyphénolique de vin tant seul qu'en prétraitement du LPS/Nig.

Afin d'interpréter au mieux les résultats obtenus dans les Raw264.7 avec la Nigéricine, nous formulons deux hypothèses. Soit le traitement par la Nigéricine n'est pas optimal afin d'activer l'inflammasome dans les conditions du protocole mis en place ; soit la déficience de la protéine ASC dans les Raw264.7 implique un défaut de l'assemblage de l'inflammasome ayant pour finalité une absence de variations de la production d'IL-1β mature (Lin et al., 2016).

Afin de soutenir les résultats précédemment obtenus, nous avons cherché à montrer un effet de l'extrait polyphénolique de vin sur le « priming » de l'inflammasome *via* l'expression génique de *NLRP3, IL-1β, caspase-1* et *ASC* (Figure 23).

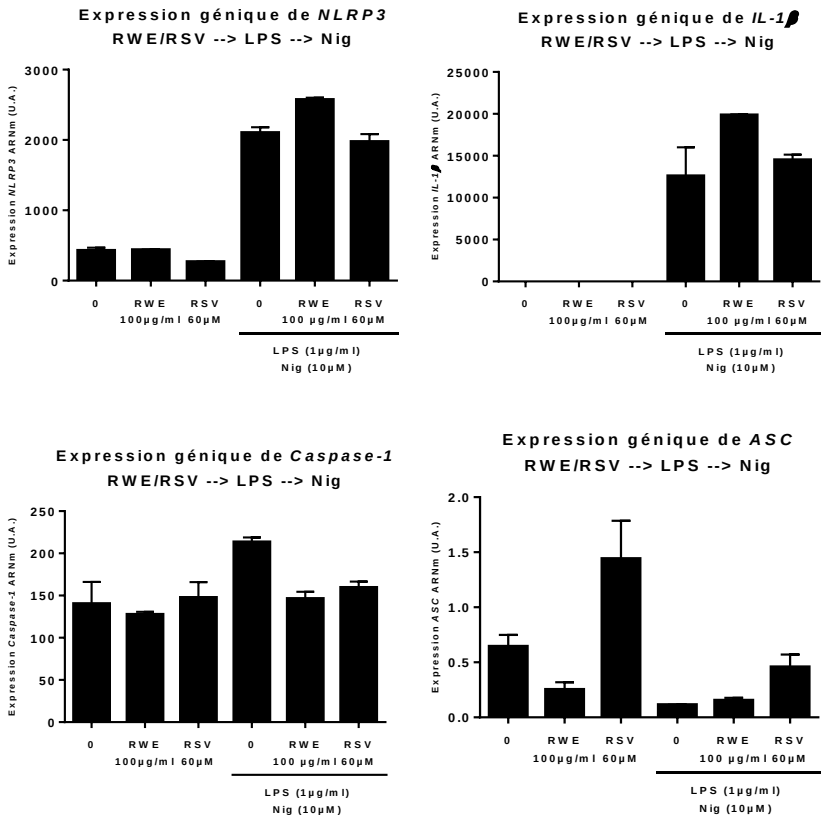


Figure 23. Effet de RWE et du RSV l'expression génique de *NLRP3, IL-1β, caspase-1* et *ASC* par les Raw264.7 après leur « priming » par le LPS et activation par la Nigéricine. Les Raw264.7 ont été prétraités, ou non, durant 30 min avec du RSV (60 µM) ou du RWE (100 µg/ml) puis par du LPS (1 µg/ml) puis par de la Nigéricine (10 µM). Les ARNm ont été extraits puis nous avons réalisé une RT-qPCR. Ces données résultent d'une expérience avec 2 réplicats.

Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'expression de *NLRP3* et de l'*IL-1β* par un traitement LPS/Nig comparativement aux macrophages contrôles et independemment de la présence ou non de RWE et RSV. En ce qui concerne l'expression génique de la *caspase-1,* elle semble augmentée dans des Raw264.7 traités par LPS/Nig comparativement au contrôle.

Néanmoins lorsque les Raw264.7 sont prétraités par l'extrait de vin ou le resvératrol avant d'être « primés » et activés, il semblerait que le niveau d'expression de la *caspase-1* soit similaire à celui de macrophages contrôles. Nous pouvons également constater sur cette figure, la très faible expression de ASC dans les Raw264.7.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'extrait polyphénolique de vin rouge ne semble pas avoir d'effet sur le « priming » de NLRP3, dans les Raw264.6, lorsque celui-ci est utilisé en amont du « priming » par le LPS et de l'activation de l'inflammasome à la fois par l'ATP et la Nigéricine. Cependant il faut tenir compte des résultats montrant la sécrétion et l'expression génique de l'IL1β. Cette production d'IL-1β peut être due à l'activation d'un autre inflammasome tel que NLRP1, IPAF (*Ice Protease-Activating Factor*) et AIM2 (*absent in melanoma 2*) (Schroder & Tschopp, 2010).

b) Mise en évidence d'un effet de RWE sur l'activation de NLRP3 dans les Raw264.7

Tout comme pour l'étude de l'extrait polyphénolique de vin sur le « priming » de NLRP3, nous avons utilisé deux activateurs de l'inflammasome différents afin de mettre en évidence un effet de notre extrait de vin sur l'activation de NLRP3 et de son inflammasome. Nous avons dans un premier temps utilisé l'ATP puis dans un second, la Nigéricine.

i. Utilisation de l'ATP comme inducteur de l'inflammasome

Afin d'évaluer le potentiel immunomodulateur de l'extrait de vin et du resvératrol sur l'activation de NLRP3 et l'assemblage de l'inflammasome, nous avons prétraités des macrophages murins Raw264.7 par le LPS avant de les traiter par l'extrait de vin ou le resvératrol. Les cellules ont ensuite été traitées par l'ATP afin d'activer NLRP3 ; protocole décrit figure 20 (B) (Figure 24).

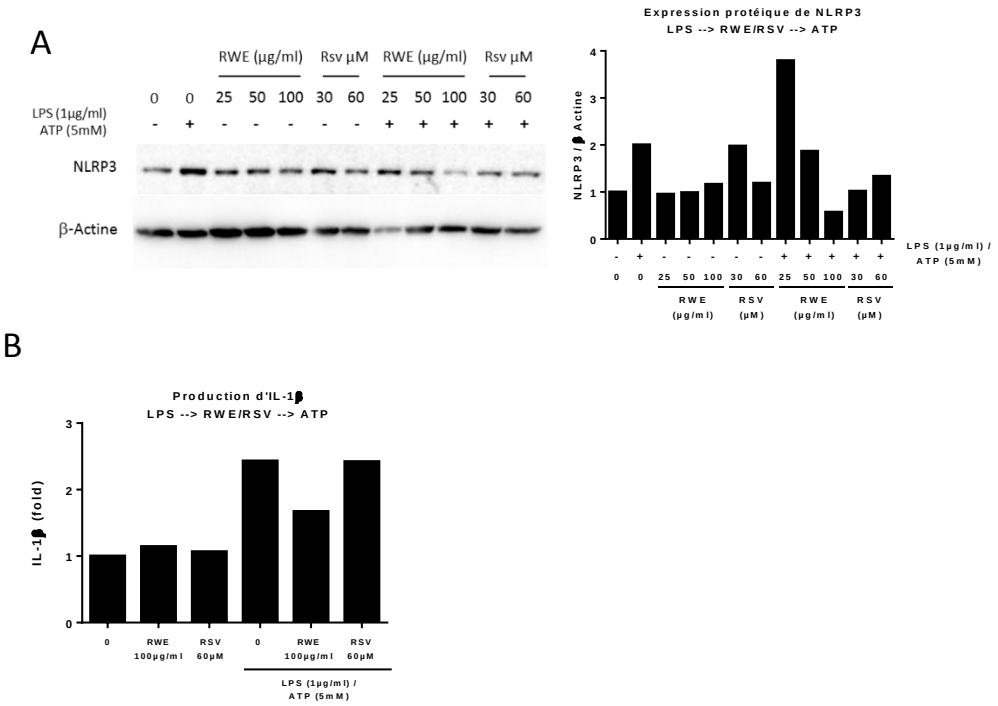


Figure 24. Activité du RWE et du RSV sur l'activation de NLRP3 dans les Raw264.7 suite à une activation par l'ATP. Les macrophages murins Raw264.7 ont été traités par (1 µg/ml) de LPS durant 5h30 puis par RWE (100 µg/ml) ou RSV (60 µM) durant 30minutes, puis par 5 mM d'ATP durant 30 min. Les protéines ont été extraites puis analysées par immunoblotting (A) ; un dosage de l'IL-1β par ELISA a été réalisé sur le surnageant (B). Ce résultat est représentatif de trois expériences réalisées de manière indépendantes.

Comme montré dans la figure 24, nous pouvons observer une augmentation de la synthèse protéique de NLRP3 dans les Raw264.7 en présence d'un traitement au LPS/ATP comparativement au contrôle. De plus, les traitements par l'extrait de vin ou par le resvératrol semblent globalement diminuer l'expression protéique de NLRP3 des Raw264.7 après « priming » de NLRP3 par le LPS et activation par ATP. Il est important de noter que 100 µg/ml d'extrait de vin induit une diminution de 80 % de l'expression protéique de NLRP3 dans les Raw264.7 « primées » et activées.

Les résultats de l'ELISA montrent une augmentation de la production d'IL-1β par les macrophages traités par le LPS puis l'ATP comparativement au contrôle alors que l'extrait de vin rouge associé au LPS et à l'ATP induit une diminution de 33 % de cette sécrétion comparativement aux cellules « primées » et activées.

Ces résultats semblent donc indiquer que l'extrait de vin est capable de moduler l'activation de l'inflammasome en modulant la synthèse protéique de NLRP3 et la production de cytokine pro inflammatoire IL-1β. Afin d'affiner ces résultats, nous avons évalué le potentiel de l'extrait

de vin à moduler l'assemblage de l'inflammasome. Pour cela nous avons réalisé un immunomarquage de deux protagonistes de l'inflammasome NLRP3 : NLRP3 et ASC (Figure 25).

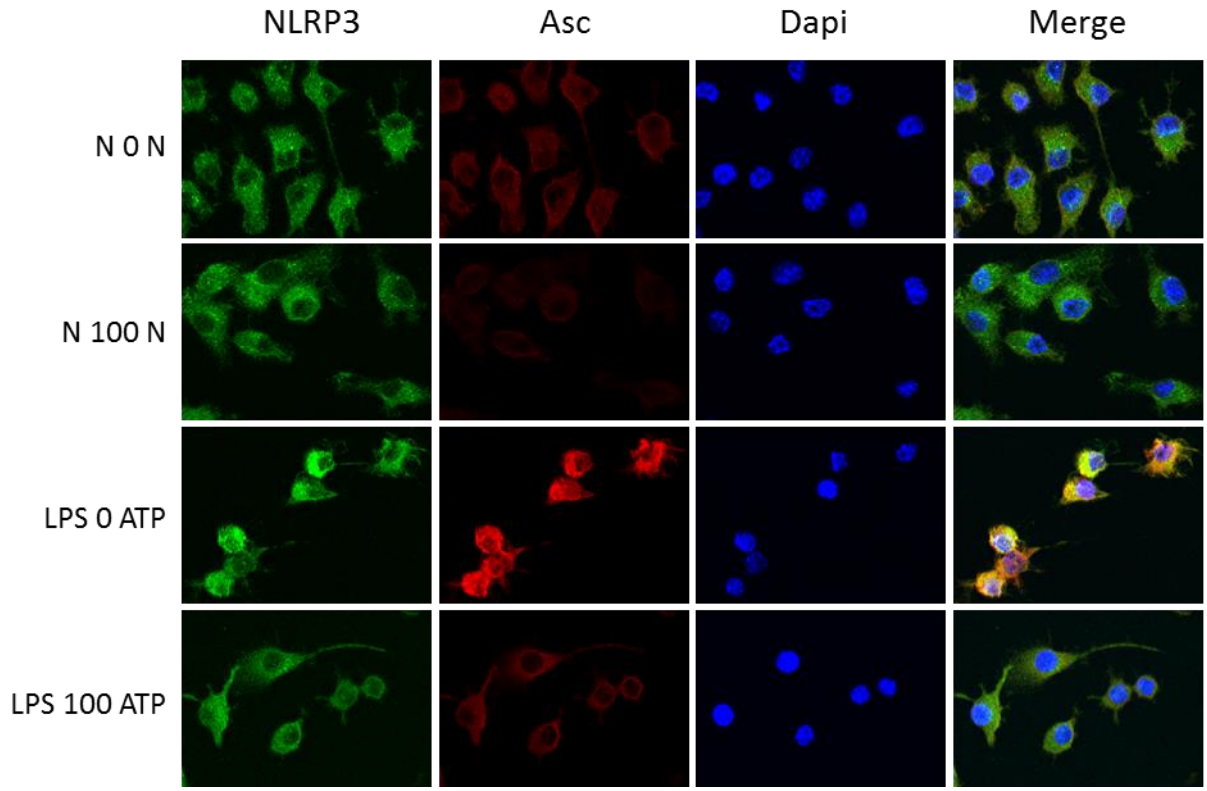


Figure 25. Effet de RWE sur l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 suite à une activation par l'ATP. Les macrophages murins Raw264.7, ensemencés sur des lamelles, ont été traités par 1µg/ml de LPS durant 5h30 puis par 100 µg/ml RWE durant 30 minutes, puis par 5 mM d'ATP durant 30 minutes. N = absence de traitement, 0 et 100 = traitement par RWE aux concentrations respectives de 0 et 100 µg/ml. Les lamelles sont récupérées, marquées puis observées au microscope avec utilisation de l'ApoTome, grossissement x40. La protéine NLRP3 a été immunomarquée en vert et la protéine ASC en rouge tandis que les noyaux ont été marqués par du Dapi en bleu. Le merge représente la superposition des trois canaux. Les témoins sans anticorps primaires anti-NLRP3 et anti-ASC ont été réalisés. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

Nous pouvons observer une augmentation de l'intensité de fluorescence de NLRP3 et de ASC dans les Raw264.7 en présence d'un traitement au LPS/ATP (LPS 0 ATP) comparativement au contrôle (N 0 N). Cette intensité semble être diminuée par un traitement à l'extrait de vin dans les Raw264.7 traité au LPS/ATP (LPS 100 ATP). De plus nous pouvons observer une forte colocalisation de ASC et de NLRP3 dans les Raw264.7 traitées par LPS/ATP mise en évidence par la couleur jaune (LPS 0 ATP). Or cette colocalisation est drastiquement amoindrie dès lors que ces cellules sont traitées par l'extrait polyphénolique de vin (LPS 100 ATP).

Ces résultats montrent que dans des Raw264.7 « primés » par le LPS et activés par l'ATP, l'extrait polyphénolique de vin est capable de moduler l'activation de l'inflammasome en diminuant (1) la synthèse protéique de NLRP3 ; (2) la production de cytokines pro inflammatoire IL-1β; (3) la colocalisation de NLRP3 et de ASC.

ii. Utilisation de la Nigéricine (Nig) comme inducteur de l'inflammasome

Dans cette partie, nous avons cherché à évaluer le potentiel immunomodulateur de l'extrait de vin et du resvératrol sur l'activation de NLRP3 et l'assemblage de l'inflammasome (Figure 26). Nous avons dans un premier temps « primé » des macrophages murins Raw264.7 par du LPS puis fait un traitement de ces cellules par l'extrait de vin ou le resvératrol. Enfin nous avons traité les cellules par la Nigéricine dans le but d'activer l'inflammasome. La cinétique de traitement est précisément décrite dans la figure 20 (B).

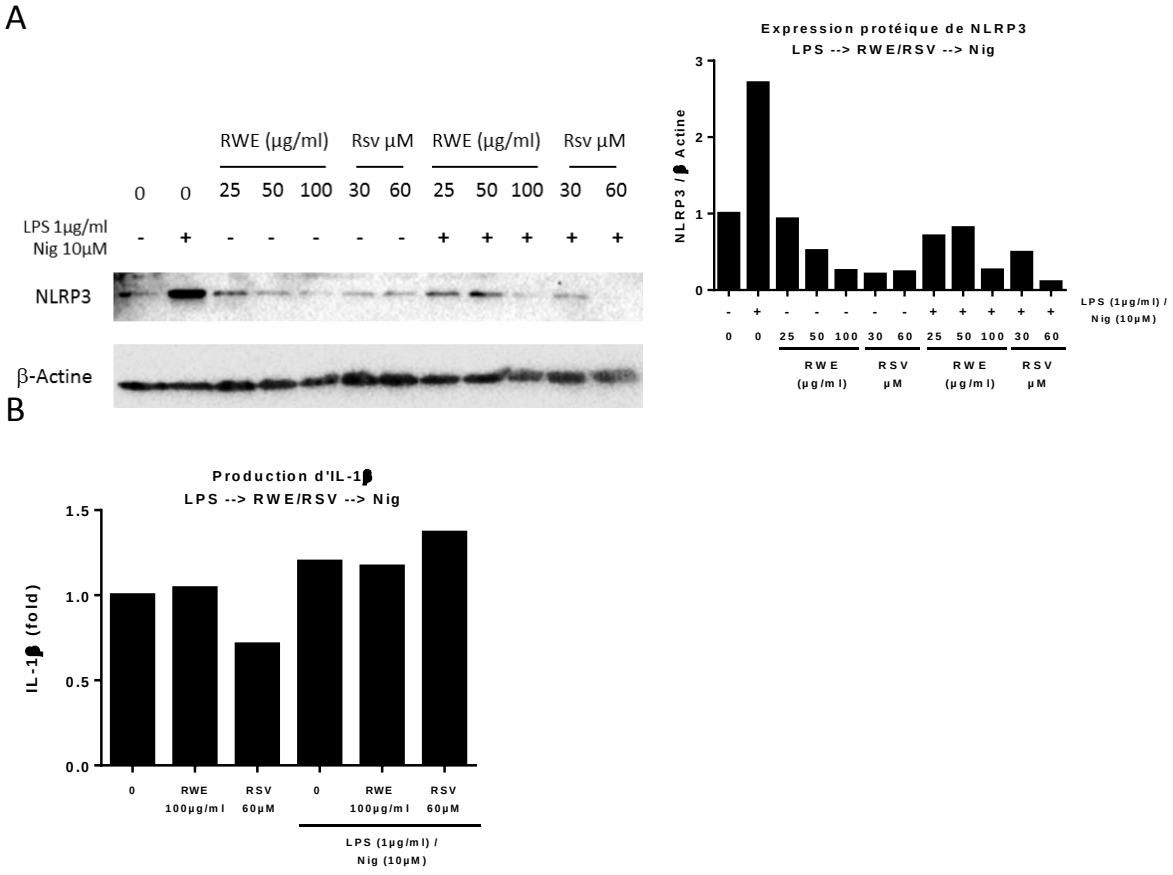


Figure 26. Activité du RWE et du RSV sur l'activation de NLRP3 dans les Raw264.7 suite à une activation par la Nigéricine. Les macrophages murins Raw264.7 ont été traités par (1µg/ml) de LPS durant 5h30 puis par RWE (25, 50 et 100 µg/ml) ou RSV (30 et 60 µM) durant 30 minutes, puis par 10 µM de Nigéricine durant 30 minutes. Les protéines ont été extraites puis analysées par WB (A) ; un dosage de l'IL-1β par ELISA a été réalisé sur le surnageant (B). Ce résultat est représentatif de trois expériences réalisées de manière indépendantes.

Nous pouvons observer une augmentation de la synthèse protéique de NLRP3 dans les Raw264.7 en présence d'un traitement au LPS/Nigéricine de 170 % par rapport au contrôle. Les traitements par l'extrait de vin ou par le resvératrol diminuent l'expression protéique de NLRP3 des Raw264.7 après « priming » de NLRP3 par le LPS et activation par la Nigéricine. Il est important de noter que 100 µg/ml d'extrait de vin induit une diminution de 75 % de l'expression protéique de NLRP3 dans les Raw264.7 « primées » et activées.

Comme précédemment dans la figure 23, les résultats de l'ELISA ne montrent pas d'effets des différents traitements sur la quantité d'IL-1β sécrétée : (1) absence d'augmentation de l'IL-1β par un traitement LPS/Nig (2) absence d'effet d'un traitement à l'extrait polyphénolique de vin sur les Raw264.7 « primés » et activés.

Nous avons alors cherché à montrer un effet de l'extrait polyphénolique de vin sur l'activation de l'inflammasome *via* l'expression génique de NLRP3, IL-1β, caspase-1 et ASC (Figure 27).

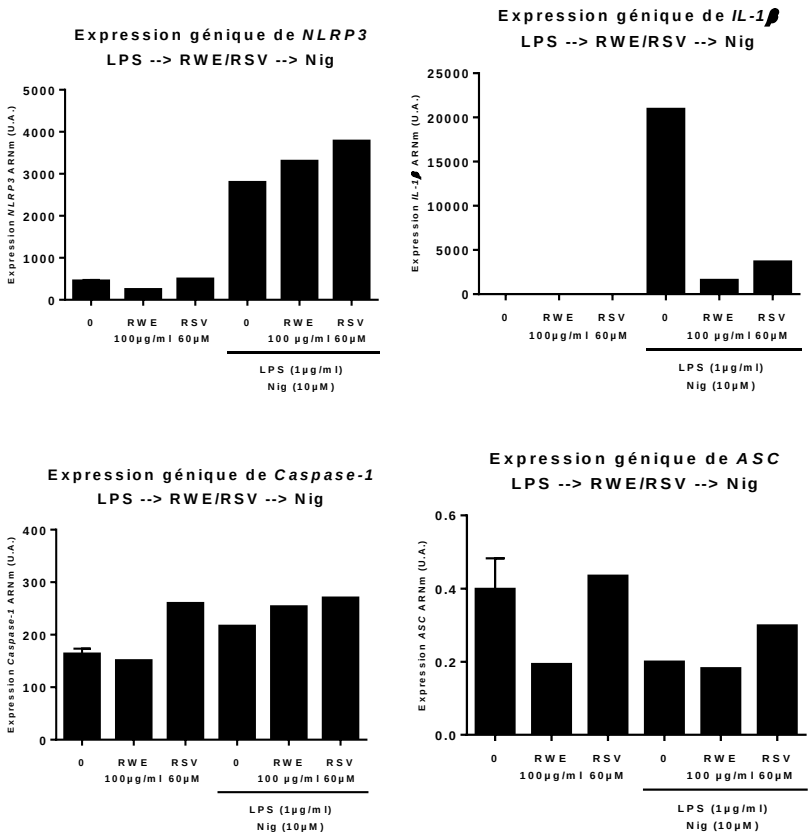


Figure 27. Effet de RWE et du resvératrol sur l'expression génique de NLRP3, IL-1β, caspase-1 et ASC par les Raw264.7 après leur « priming » par le LPS et activation par la Nigéricine. Les macrophages murins Raw264.7 ont été traités par (1 µg/ml) de LPS durant 5h30 puis par RWE (100 µg/ml) ou RSV (60 µM) durant 30 minutes, puis par 10 µM de Nigéricine durant 30 minutes. L'ARNm est extrait des cellules puis nous avons réalisé une RT-qPCR. Ces données résultent d'une unique expérience comprenant 2 réplicats.

Les résultats préliminaires montrent une augmentation de l'expression génique de *NLRP3* et de l'*IL-1β* par un traitement LPS/Nig comparativement aux macrophages contrôles. Cependant cette augmentation ne semble pas être impactée par un prétraitement à l'extrait de vin pour le gène *NLRP3* alors que l'expression de l'*IL-1β* est diminuée de plus de 90 % dans des Raw264.7 « primés » et activés. En ce qui concerne le gène de la *caspase-1,* aucun des traitements ne semble impacter son expression dans des Raw264.7. Sur cette figure, nous pouvons de nouveau constater la très faible expression de ASC dans les Raw264.7.

L'ensemble des données recueillies concernant l'effet de l'extrait polyphénolique de vin sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 indique qu'il est capable de moduler l'activation de l'inflammasome en diminuant l'expression protéique de NLRP3 dans les Raw264.7 « primés » par le LPS et activés par l'ATP ou la Nigéricine. Néanmoins nous avons observé une différence sur la production d'IL-1β en fonction des deux activateurs utilisés (ATP ou Nigéricine). De plus

les résultats sur l'expression génique de NLRP3, IL-1β et de la caspase-1 ne semblent pas en accord avec le reste.

Ces résultats et des données bibliographiques actuelles montrent bien à quel point l'étude de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages Raw264.7 est complexe. C'est pourquoi nous avons décidé de poursuivre l'analyse de l'effet immunododulateur de notre extrait polyphénolique de vin sur l'inflammasome NLRP3 sur une autre lignée de macrophages murins : les cellules J774A.1. Afin de mieux illustrer nos propos, nous avons réalisé un Western Blot comparant l'expression protéique de NLRP3 et de ASC dans les deux lignées (Figure 28).

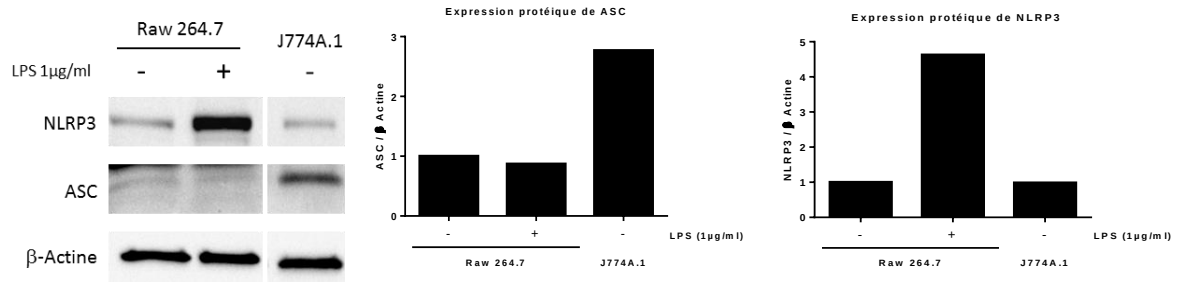


Figure 28. Niveau d'expression protéique basal de ASC et NLRP3 dans les Raw264.7 et J774A.1. Les cellules Raw264.7 et J774A.1 ont été traitées 6 h par du LPS (1 µg/ml) puis les protéines ont été extraites et analysées par Western Blot.

Cette analyse nous montre que les deux lignées Raw264.7 et J774A.1 présentent un niveau basal de l'expression protéique de NLRP3 similaire, cependant le niveau d'expression de ASC est moindre dans les Raw264.7, même après un priming au LPS, comparativement à celui des J774A.1. Ces dernières semblent alors plus appropriées à l'étude de l'inflammasome NLRP3.

c) Mise en évidence d'un effet de RWE sur le « priming » de NLRP3 dans les J774A.1

Afin de mettre en évidence un effet de notre extrait de vin sur le « priming » de NLRP3 sur les J774A.1, nous avons traité les cellules selon la cinétique décrite figure 20 (A) (Figure 29).

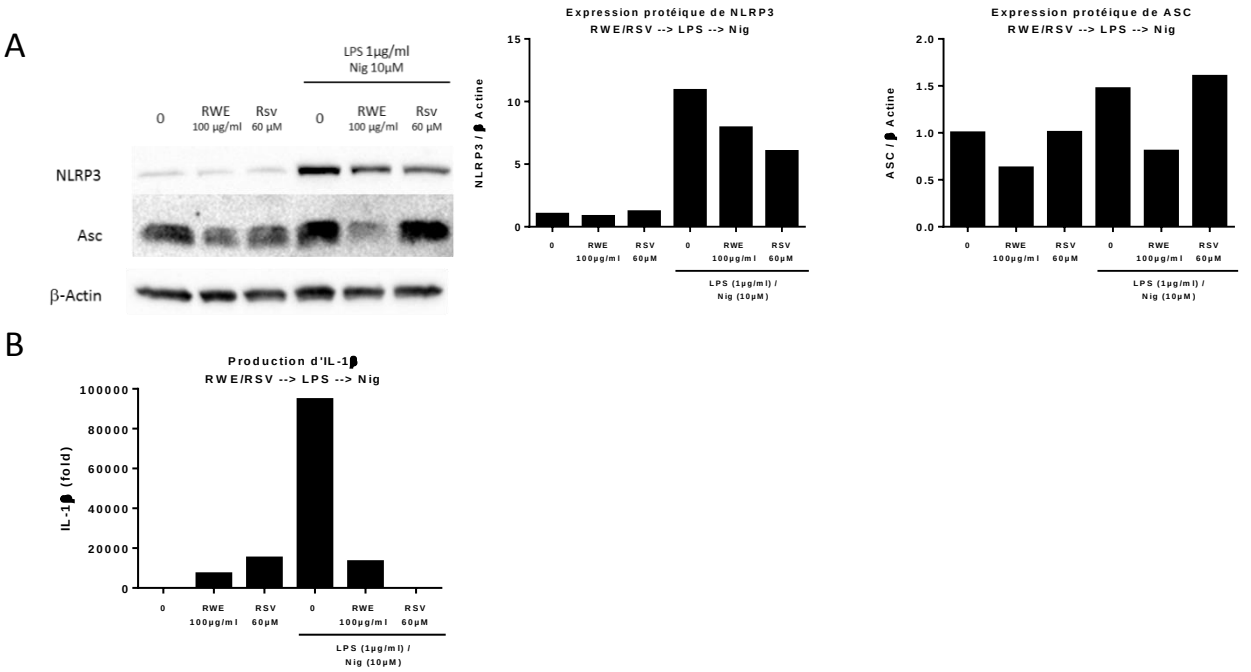


Figure 29. Activité du RWE et du RSV sur le « priming » de NLRP3 dans les J774A.1 suite à une activation par la Nigéricine. Les J774A.1 ont été prétraités, ou non, durant 30 min avec du RWE (100 µg/ml) ou du RSV (60 µM) puis par du LPS (1 µg/ml) et enfin par de la Nigéricine (10 µM). Les protéines ont été extraites puis analysées par immunoblotting (A) ; un dosage de l'IL-1β par ELISA a été réalisé sur le surnageant (B). Ce résultat est représentatif de deux expériences réalisées de manière indépendantes.

Nous pouvons observer une augmentation de l'expression protéique de NLRP3 et de ASC dans les J774A1 en présence d'un traitement au LPS/Nig comparativement au contrôle. Le traitement par l'extrait de vin semble diminuer l'expression protéique de NLRP3 et de ASC dans les J774A.1 après « priming » de NLRP3 par le LPS et activation par la Nigéricine alors que le Resvératrol ne diminue que l'expression de NLRP3.

Les résultats de l'ELISA montrent une augmentation de la production d'IL-1β par les macrophages traités par le LPS/Nig comparativement au contrôle. L'extrait de vin rouge diminue cette augmentation d'IL-1β induite par le traitement LPS/Nig.

Ces résultats semblent donc montrer que l'extrait de vin, tout comme le resvératrol, est capable de moduler le « priming » de l'inflammasome et son activation en diminuant la synthèse protéique de NLRP3 et la production d'IL-1β. Afin d'affiner ces résultats, nous avons cherché à évaluer l'effet de l'extrait polyphénolique de vin sur le « priming » de l'inflammasome *via* l'expression génique de NLRP3, IL-1β, caspase-1 et ASC (Figure 30).

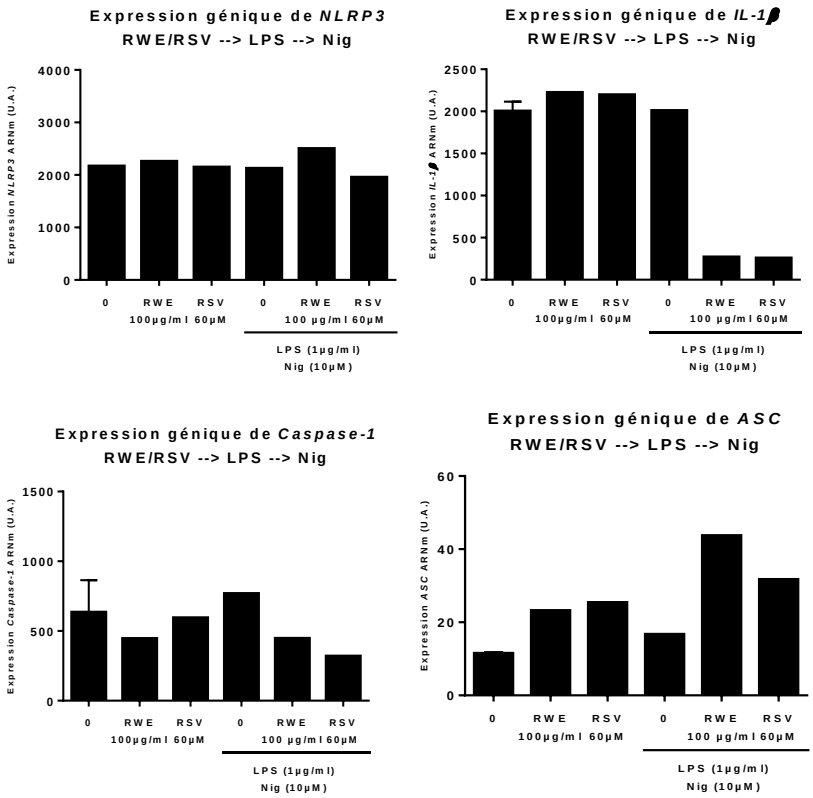


Figure 30. Evaluation de l'effet de RWE et du resvératrol sur le « priming » de NLRP3 dans les J774A.1 *via* l'expression génique de *NLRP3, IL-1β, caspase-1 et ASC*. Les macrophages murins J774A.1 ont été prétraités par RWE (100 µg/ml) ou RSV (60 µM) durant 30 minutes, puis par 1 µg/ml de LPS durant 5h30 et enfin par 10 µM de Nigéricine durant 30 minutes *cf* figure 20A. L'ARNm est extrait des cellules puis nous avons réalisé une RT-qPCR. Ces données résultent d'une expérience réalisée une fois avec 2 réplicats.

Au travers de ces résultats, nous ne pouvons conclure sur une quelconque activité de l'extrait de vin et du resvératrol sur le « priming » de NLRP3 du fait qu'aucune variation de l'expression génique de *NLRP3* n'est observée. Les résultats obtenus dans cette figure n'ayant été obtenus qu'une seule fois, leur analyse nécessite de les répéter afin de pouvoir conclure.

L'ensemble des résultats obtenus sur J774A.1 semblent donc indiquer que l'extrait de vin est capable de moduler le « priming » de l'inflammasome en diminuant (1) la synthèse protéique de NLRP3 et (2) la production de cytokine pro inflammatoire IL-1β.

Dans une seconde partie de l'étude de l'inflammasome NLRP3 dans les J774A.1, nous avons évalué l'effet de l'extrait polyphénolique de vin sur l'activation de l'inflammasome NLRP3.

d) Mise en évidence d'un effet de RWE sur l'activation et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 dans les J774A.1

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait polyphénolique de vin sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 nous avons procédé à l'étude génique des protagonistes de cet inflammasome (Figure 31).

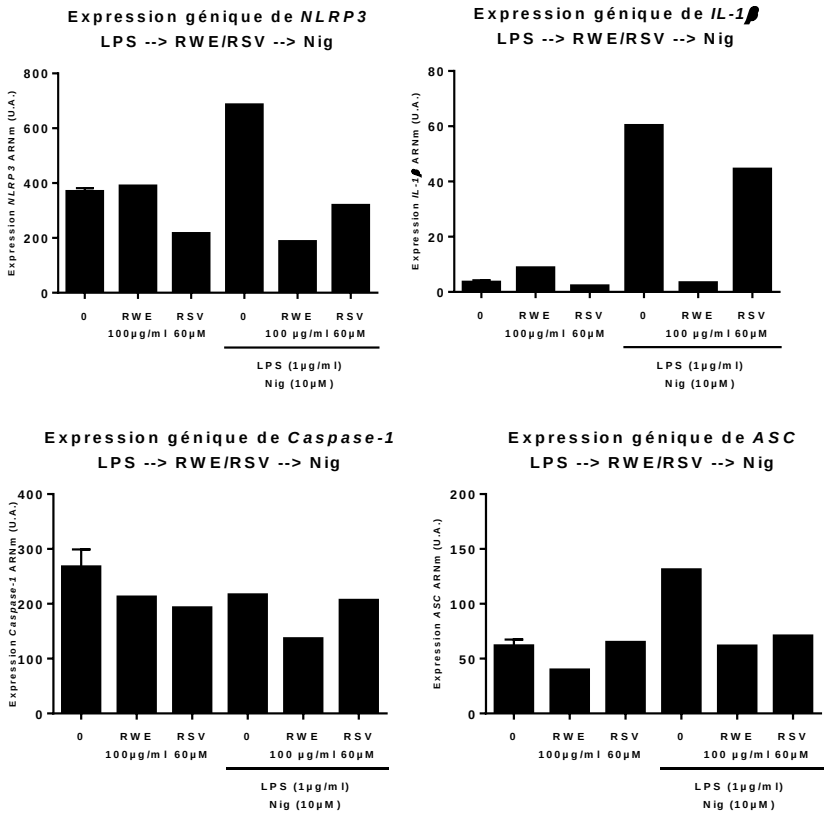


Figure 31. Evaluation de l'effet de RWE et du resvératrol sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les J774A.1 *via* l'expression génique de *NLRP3, IL-1β, caspase-1 et ASC*. Les macrophages murins J774A.1 ont été traités par 1 µg/ml de LPS durant 5h30 puis par RWE (100 µg/ml) ou RSV (60 µM) durant 30 minutes, et enfin par 10 µM de Nigéricine durant 30 minutes *cf* figure 20B. L'ARNm est extrait des cellules puis nous avons réalisé une RT-qPCR. Ces données résultent d'une expérience réalisée une fois avec 2 réplicats.

Ces résultats semblent mettre en évidence une augmentation de l'expression génique de NLRP3 et de l'IL-β dans les J774A1 en présence d'un traitement au LPS/Nig comparativement au contrôle. De plus, le traitement par l'extrait de vin semble diminuer le niveau d'expression génique de *NLRP3,* de l'*IL-1β* et de *ASC* dans les J774A.1 après « priming » de NLRP3 par le LPS et activation par la Nigéricine. Ces diminutions sont de l'ordre de 70 %, 90 % et 50 % respectivement pour *NLRP3*, l'*IL-1β* et *ASC.* Néanmoins le resvératrol semble avoir une activité moins importante avec une diminution de 55 % de l'expression de *NLRP3* et de 25 %

pour l'*IL1-β* et 45 % pour *ASC.* Cependant aucun effet n'est détectable sur le niveau d'expression génique de la *Caspase-1* que ce soit par le LPS/Nig, l'extrait de vin ou le resvératrol ou encore la combinaison des deux traitements. Ces résultats n'ayant pas été reproduit, il est essentiel de réitérer l'expérience afin de conclure sur un effet de l'extrait de vin.

Afin d'approfondir les résultats obtenus précédemment, nous avons cherché à mettre en évidence l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 en immunomarquant deux des protagonistes de cet inflammasome (Figure 32).

Nous pouvons observer une augmentation de l'intensité de fluorescence de NLRP3 dans les J774A.1 en présence d'un traitement au LPS/Nigéricine comparativement au contrôle. Cette intensité est fortement diminuée par un traitement à l'extrait de vin dans les J774A.1 traité au LPS/Nig. Il en est de même pour le resvératrol avec un effet moindre. Ces résultats confirment ceux obtenus sur l'expression de ces gènes. Cependant, au travers de cette figure, il est difficile de conclure sur une colocalisation de ASC et NLRP3 dans ces cellules.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'extrait de vin semble capable de moduler l'activation de l'inflammasome NLRP3 (1) en diminuant l'expression protéique et génique de NLRP3, (2) en diminuant le niveau d'expression génique de *ASC* et (3) en diminuant le niveau d'expression génique de l'*IL-1β* et sa production. Néanmoins, nous n'avons pu observer de diminution de la caspase-1 en ARN et de colocalisation entre NLRP3 et ASC. Ces deux dernières constatations pourraient nous faire penser que la diminution de production d'IL-1β pourrait être due à un autre processus inflammatoire autre que l'activation et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 dans les J774A.1.

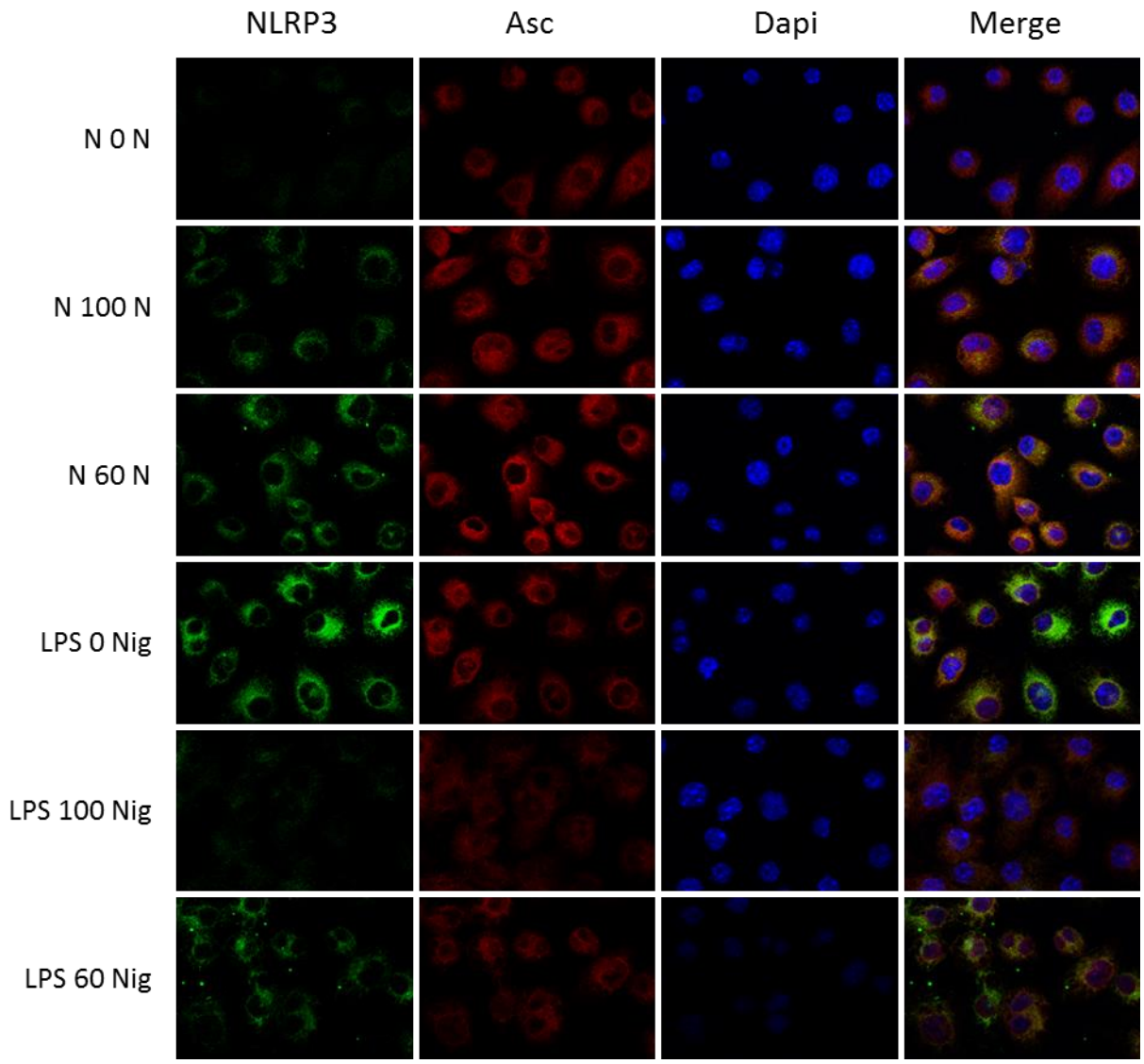


Figure 32. Effet de RWE sur l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 par une activation à la Nigéricine. Les macrophages murins J774A.1, ensemencés sur des lamelles, ont été traités par 1µg/ml de LPS durant 5h30 puis par RWE (100 µg/ml) ou RSV (60 µM) durant 30 minutes, puis par la Nigéricine (10 µM) durant 30 minutes. N = absence de traitement, 0 et 100 = traitement par RWE aux concentrations respectives de 0 et 100 µg/ml. Les lamelles sont récupérées, marquées puis observées au microscope avec utilisation de l'ApoTome, grossissement x40. La protéine NLRP3 a été immunomarquée en vert et la protéine ASC en rouge tandis que les noyaux ont été marqués par du Dapi en bleu. Le merge représente la superposition des trois canaux. Les témoins sans anticorps primaires anti-NLRP3 et anti-ASC ont été réalisés. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

CONCLUSIONS,

DISCUSSION,

PERSPECTIVES

Les cellules et les médiateurs du système immunitaire interagissent entre eux en formant un réseau dynamique dans le but d'assurer à l'organisme une protection continue contre les pathogènes, tout en maintenant la tolérance vis-à-vis du « soi ». Néanmoins, lorsqu'une lésion arrive à échapper à la surveillance du système immunitaire, ce dernier met en place une réponse qui peut devenir favorable à cette lésion.

Actuellement, un quart des cancers à travers le monde est associé à un processus inflammatoire (Coussens & Werb, 2002, Hussain & Harris, 2007). En effet, lors du processus de cancérogénèse, l'inflammation permet la mise en place d'un microenvironnement favorable au développement de la tumeur, participe à l'angiogenèse facilitant la dissémination des métastases à travers l'organisme et aide à établir des mécanismes immunosuppressifs qui limitent la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur.

C'est donc dans le cadre d'une prévention primaire de l'inflammation que nous avons étudié l'impact d'un extrait polyphénolique de vin rouge sur (1) la mort cellulaire *in vitro*, (2) la croissance tumorale *in vivo*, (3) sur un effecteur cellulaire de la réponse immunitaire adaptative, le lymphocyte Thelper 17 mais également (4) sur un autre acteur de la réponse immunitaire, le macrophage et plus particulièrement l'activation de l'inflammasome NLRP3. Par le biais de cette étude, nous cherchons à montrer si une consommation de vin riche en polyphénols peut activer la réponse immunitaire essentielle dans le cadre d'une prévention de maladies inflammatoires et plus particulièrement du cancer colorectal.

Dans la première partie de l'étude nous avons évalué la capacité globale des polyphénols du vin rouge à inhiber la prolifération des cellules de cancer colique. Après traitement de différentes lignées de cancers colique murines (CT26, MC38) et humaines (HCT116, SW620) par l'extrait polyphénolique de vin rouge, nous avons tout d'abord pu observer une diminution de la viabilité cellulaire (Figure 11). Par la suite nous avons recherché par quel moyen l'extrait de vin induit la diminution de la viabilité cellulaire. Nous avons alors pu mettre en évidence une augmentation de la mort cellulaire dans les quatre lignées de cancer colorectal et plus particulièrement la mort cellulaire par apoptose (Figure 12 et 13). Ces résultats confirment ceux déjà décrit dans la littérature (Mazué et al., 2014).

Néanmoins il semblerait également que l'extrait de vin induise de la mort cellulaire par nécrose ou apoptose tardive (Figure 12). D'autres analyses telles que la mise en évidence de

la caspase 3 par western blot ou un marquage au Bleu Trypan des cellules nous permettraient de consolider ces résultats.

L'extrait de vin présentant une activité biologique *in vitro*, nous avons évalué son potentiel anti-tumoral *in vivo*. Après supplémentation du régime alimentaire de souris Balb/c porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique par l'extrait polyphénolique de vin, nous avons pu constater que l'extrait de vin induit un ralentissement de la croissance tumorale (Figure 14). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature (Walter, Etienne-Selloum et al., 2010).

Afin de tester l'effet de notre extrait de vin sur un modèle de cancérogénèse plus proche de celui de l'Homme, nous pourrions établir un modèle de cancérogénèse colique chimiquement induite par l'Azoxyméthane. En effet les tumeurs du colon induites par l'azoxyméthane chez le rat partagent de nombreuses caractéristiques similaire à celles de tumeurs du colon humain telles que la mutation sur K-ras et la β-caténine (Dashwood, Suzui et al., 1998, Perše & Cerar, 2011). De plus, il a déjà été montré que le resvératrol est capable de supprimer la carcinogenèse du côlon induite chez le rat par le DMH (un inducteur chimique de cancérogénèse de la famille de l'azoxyméthane) et ce, à différents stades (Sengottuvelan, Viswanathan et al., 2006).

Au travers de ces travaux, nous venons d'évaluer la capacité globale des polyphénols du vin rouge à inhiber la prolifération de cellules de cancer colique *in vitro* et *in vivo*. Cependant nous ignorons sur quel(s) acteur(s) et mécanisme(s) de la cancérogénèse l'extrait de vin agit. Or l'inflammation étant un fort facteur de risque pour le développement de tumeur, nous nous sommes intéressés à deux acteurs du processus inflammatoire : le lymphocyte Th17 et le macrophage. Dans les deux dernières parties de ce travail, nous avons étudié comment les polyphénols du vin peuvent réduire l'inflammation médiée par la production de substances pro-inflammatoires produites par les cellules immunitaires Th17 ou *via* la formation de l'inflammasome NLRP3 par les macrophages.

Nous nous sommes intéressés à l'effet immunomodulateur de l'extrait de vin sur le lymphocyte Th17. Ce sous type de lymphocyte TCD4 est caractérisé par sa capacité à produire des cytokines telles que l'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22. Or l'IL-17 est connu pour son rôle pro-tumoral dans le cancer du côlon (Wu, Wu et al., 2013). Cette cytokine pro inflammatoire devient alors la cible de notre extrait de vin afin d'évaluer la modulation de la réponse

immunitaire et d'en faire une cible thérapeutique privilégiée dans le cadre de la prévention des maladies inflammatoires.

Nous avons montré pour la première fois que l'extrait de vin est capable de diminuer la production d'IL-17 par un lymphocyte Th17 *in vitro* (Figure 15), cette diminution étant corrélée à la diminution de l'expression génique d'*il-17A* et d'*il-17F* (Figure 16). De plus l'extrait de vin diminue l'expression protéique des différents facteurs de transcription clés de la différenciation du lymphocyte Th17 ; Rorγ-t et STAT3 (Figure 17).

Au travers des travaux de cette deuxième partie, nous avons pu mettre en évidence un effet immunomodulateur des molécules polyphénoliques de notre extrait de vin rouge. En effet, celui-ci est capable de réguler négativement le programme de différenciation du lymphocyte Th17 en ayant une action sur la synthèse ribonucléique, protéique et moléculaire de ce sous type lymphocytaire *ex vivo*.

Il serait donc intéressant de voir si *in vivo*, l'extrait de vin est capable de moduler le profil immunitaire au sein de la tumeur. Plus particulièrement d'étudier l'infiltrat en Th17 de la tumeur et de mesurer leur capacité à produire de l'IL-17.

Par ailleurs, lors du programme de différenciation Th17, la phosphorylation de STAT3 consécutive à la fixation de l'IL-6 sur son récepteur est finement régulée par SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*). En effet SOCS3 empêche la phosphorylation de STAT3 en entrant en compétition avec JAK2 (Chen, Laurence et al., 2006). D'un autre côté, PPARγ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ*) se fixe sur le promoteur de SOCS3 et active son expression dans les Th17 conduisant à une diminution de la phosphorylation STAT3, de l'expression de Rorγt et *in fine* à la diminution de la sécrétion d'IL-17 (Berger, Végran et al., 2013). Or il s'avère que le resvératrol est un activateur de PPARγ dans des cellules de cancer colorectal (Aires, Brassart et al., 2014) mais également dans les macrophages murins (Ge, Zhang et al., 2007). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'extrait polyphénolique de vin en tant qu'activateur de PPARγ et régulateur de l'activation du programme transcriptionnel des Th17 indépendamment de la voie de SIRT1.

Nous venons de montrer que l'extrait polyphénolique de vin rouge est capable de diminuer la production de la cytokine pro inflammatoire IL-17. Qu'en est-il de l'IL-1β?

Nous avons alors étudié l'impact des polyphénols du vin sur la réduction de l'inflammation *via* la formation de l'inflammasome NLRP3. Plus particulièrement, nous avons évalué si les polyphénols du vin peuvent diminuer la production d'interleukine-1β impliquée dans les processus inflammatoires du microenvironnement tumoral.

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense de l'organisme vis à vis des pathogènes. Parmi les effecteurs cellulaires, interviennent les macrophages qui initient la réponse des cellules T. De par leur statut de cellules résidantes dans les tissus, les macrophages vont répondre rapidement aux signaux de stress.

L'inflammasome est un complexe multiprotéique responsable de la maturation et de la production d'IL-1β et d'IL-18 mature (Rathinam, Vanaja et al., 2012, Yu & Finlay, 2008). Ce complexe incluant NLRP3, ASC et la caspase-1 est localisé dans le cytosol (Lamkanfi, 2011) et sa biologie a été largement étudiée dans les macrophages. Pour notre étude nous avons travaillé sur deux lignées de macrophages murins : les cellules Raw2647 et les J774A.1.

Tout d'abord dans les Raw264.7, nous avons pu mettre en évidence une absence de cytotoxicité de l'extrait polyphénolique de vin sur ces cellules (Figure 18). Puis nous avons confirmé que le LPS induit le « priming » des macrophages (Figure 19) (Chang et al., 2015, Pan, Shen et al., 2016, Xiao et al., 2017). Nous avons ensuite voulu savoir si l'extrait de vin agit sur le « priming » de NLRP3 ou sur l'activation et la formation de l'inflammasome.

Concernant l'effet de l'extrait de vin sur le « priming », nous n'observons pas de répression de l'expression de NLRP3 de l'extrait de vin suite à son « priming » et activation avec l'ATP (Figure 21) mais nous observons une très légère diminution avec la Nigéricine (Figure 22). Cependant cette diminution de NLRP3 ne se retrouve pas en ARNm (Figure 23). De plus, nous avons mis en évidence une variation de la sécrétion d'IL-1β mature avec l'activation par l'ATP (Figure 21). Cependant nous ne retrouvons pas cette variation de sécrétion avec la Nigéricine comme activateur (Figure 22). L'absence de variation de l'expression génique de l'IL-1β confirme ce dernier résultat (Figure 23).

Ces résultats contradictoires s'accordent avec les grandes variations de résultats observées dans la littérature. En effet ces cellules sont décrites par certains comme ayant une déficience pour l'expression de la protéine ASC (Lin et al., 2016, Pelegrin et al., 2008). Or ASC est la protéine adaptatrice qui permet la liaison avec ses partenaires NLRP3 et la caspase-1 et ainsi

la formation de l'inflammasome. ASC est donc indispensable pour le clivage de la pro-capspase-1 et de la pro-IL-1β en caspase-1 active et IL-1β mature (Lin et al., 2016, Mariathasan et al., 2004).

Nous avons alors montré que les Raw264.7 présentent un faible taux d'expression d'ASC à la fois par PCR et par Western Blot (Figure 23, 27 et 28) ; néanmoins nous arrivons à détecter son expression par immunofluorescence (Figure 25).

Par ailleurs dans la bibliographie Verhoef et coll. ont mis en évidence un défaut au niveau des voies de signalisations liées au récepteur purinergique P2X7 nécessaire à la formation de l'inflammasome et au clivage de la caspase-1 dans les Raw264.7 (Verhoef, Kertesy et al., 2005). De plus, Antonopoulos et coll. ont pu mettre en évidence une suppression complète de la production d'IL-1β par des macrophages issus de moelle osseuse de souris déficientes pour ASC (Antonopoulos, El Sanadi et al., 2013).

Or d'autres publications indiquent que le traitement des cellules Raw264.7 par du LPS est un modèle idéal pour l'étude de l'inflammation *via* la voie canonique (Xiang et al., 2015). Xiao et coll. ont révélé une augmentation de l'expression des composants de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules RAW 264.7 après traitement par LPS. Cependant, cette augmentation de NLRP3 et la production d'IL-1β peut être inhibée par un prétraitement à l'Orientine (Xiao et al., 2017). D'autres auteurs, montrent qu'une molécule nommée NZ est capable de diminuer la production d'IL-1β et d'IL-18 dans les macrophages Raw264.7 « primés » et activés. Cette diminution est due à la diminution de l'expression de la protéine NLRP3 et de l'inhibition de l'adaptateur ASC et de la caspase-1 (Xiang et al., 2015).

Dans le cadre de notre étude, l'absence de variations de l'expression protéique et génique de NLRP3 dans les Raw264.7 « primés » et activés et prétraités par l'extrait de vin, nous suggérons que l'extrait polyphénolique de vin rouge n'a pas d'action sur le « priming » de l'inflammasome NLRP3. Qu'en est-il de son effet sur l'activation et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 ?

Afin de mettre en évidence un effet sur l'activation de l'inflammasome de l'extrait de vin, nous avons traité les cellules avec celui-ci après les avoir « primées » au LPS. Nous observons alors une forte diminution de l'expression protéique de NLRP3 que ce soit pour l'ATP ou la Nigéricine (Figure 24 et 26). Cependant ces variations ne sont pas retrouvées en ARNm (Figure

27). Comme pour l'étude du « priming », la sécrétion d'IL-1β mature après traitement à l'extrait de vin varie avec l'activation par l'ATP (Figure 24) tandis qu'elle ne varie pas avec la Nigéricine (Figure 26). Cette différence de résultat pourrait s'expliquer par le fait que l'ATP et la Nigéricine n'activent pas l'inflammasome de la même manière. En effet, l'ATP se fixe sur le récepteur purinergique P2X5 tandis de la nigéricine créée des pores dans la membrane plasmique.

De plus de manière étonnante, l'expression génique de l'IL-1β est fortement diminuée en présence d'un traitement par l'extrait de vin après « priming » et avant activation (Figure 27). Parallèlement, l'immunomarquage nous montre une diminution de la colocalisation NLRP3/ASC en présence d'un traitement par l'extrait de vin après priming et avant activation (Figure 25).

L'ensemble des résultats semble convenir d'un effet de l'extrait polyphénolique de vin rouge sur l'activation et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Néanmoins, si on considère que les Raw264.7 présentent un défaut d'ASC, la variation de la production d'IL-1β mature par l'extrait de vin en présence de LPS et d'ATP (Figure 21 et 24) et la mise en évidence d'une colocalisation NLRP3/ASC (Figure 25) restent inexpliqué. Peut-être la variation de sécrétion d'IL-1β, lors d'une activation par l'ATP, est-elle due à l'activation et la modulation d'un autre inflammasome tel que NLRP1, IPAF, and AIM2 qui permettent également la production d'IL-1β (Schroder & Tschopp, 2010).

Les variations de résultats concernant l'étude de l'inflammasome NLRP3 dans ce modèle cellulaire étant trop importantes, nous avons décidé d'étudier une lignée cellulaire de macrophages murins : J774A.1.

Tout d'abord, nous avons mis en évidence l'expression de ASC (Figure 28) dans cette lignée cellulaire de macrophages murins. Puis nous avons étudié l'effet de l'extrait de vin d'abord sur le « priming » de NLRP3 puis sur l'activation et l'assemblage de l'inflammasome.

Concernant le « priming » de NLRP3, nous observons, sur les macrophages J774A.1 prétraités par l'extrait de vin, « primés » et activés, une diminution de l'expression protéique de NLRP3 et ASC mais également une diminution de la production d'IL-1β mature (Figure 29). Néanmoins ces résultats ne sont pas confirmés par l'étude des ARNm des acteurs de

l'inflammasome (Figure 30). Toutefois, les résultats de l'expression génique n'ayant été obtenus qu'une seule fois, leur analyse nécessite de les répéter afin de pouvoir conclure.

Cependant, la première partie de l'analyse nous indique que l'extrait de vin a un effet sur le « priming » de l'inflammasome NLRP3

Concernant l'activation et l'assemblage de NLRP3, le niveau d'expression génique de *NLRP3,* de l'*IL-1*β et de *ASC* dans les J774A.1, après « priming » et activation, est fortement modulé par l'extrait polyphénolique de vin (Figure 31). Ces résultats sont confirmés par immunomarquage cependant ce marquage ne permet pas de mettre en évidence une colocalisation NLRP3/ASC (Figure 32).

Ces résultats suggèrent que l'extrait de vin semble capable de moduler l'activation de l'inflammasome NLRP3 sans pouvoir conclure sur l'assemblage de celui-ci. Ces dernières constatations pourraient nous faire penser que la diminution de production d'IL-1β pourrait être due à un autre processus inflammatoire autre que l'activation et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 dans les J774A.1.

Afin de compléter ces résultats, nous pourrions étudier l'activité de l'extrait polyphénolique de vin rouge sur le « priming » et l'activation de l'inflammasome NLRP3 *ex vivo* sur les macrophages issus de moelle osseuse de souris.

De plus il serait intéressant d'étudié l'effet de l'extrait de vin sur les voies de signalisation de NF-κB/MAPK dans les macrophages. En effet, il a été montré que ces voies de signalisation sont impliquées dans l'expression de l'IL-1β, NLRP3 et la caspase-1 (Bauernfeind, Horvath et al., 2009, Hsu & Wen, 2002, Liao, Chao et al., 2013). Dans ce contexte, Lee et coll. ont montré un effet suppresseur de l'inflammasome NLRP3 de la sinigrine et *in fine* une diminution de la production d'IL-1β. La sinigrine est une molécule naturelle présente dans les choux de Bruxelles, brocolis et graines de moutarde.

Nous pourrions également investiguer les voies de régulation de l'inflammasome NLRP3 comme l'autophagie. En effet Chang et coll. ont montré que le resvératrol, par une diminution de la production de ROS, préserve l'intégrité des mitochondries et permet ainsi une induction de l'autophagie. Par cette voie d'activation de l'autophagie, le resvératrol inhibe l'inflammasome NLRP3 en jouant à la fois sur le « priming » mais également sur l'activation ce dernier (Chang et al., 2015).

Nous avons mis en évidence, au travers de cette étude, que l'extrait polyphénolique de vin rouge se dévoile comme un candidat intéressant de par son activité immunomodulatrice anti-inflammatoire. En effet, il présente des effets inhibiteurs sur la production de cytokines pro inflammatoires aussi bien sur la réponse immunitaire innée que sur la réponse immunitaire adaptative. L'extrait polyphénolique de vin rouge pourrait donc être un axe nutritionnel important dans la prévention de l'inflammation et des maladies inflammatoires.

Durant ces trois années de diplôme EPHE, j'ai également eu l'occasion de travailler sur un autre projet au sein du groupe de recherche du Pr. Ghiringhelli (UMR1231 INSERM) à Dijon. Les travaux portaient sur l'effet du resvératrol, un agoniste de SIRT1, sur la différenciation Th17. L'étude de la voie de signalisation par laquelle le resvératrol affaibli le programme de différenciation Th17 a permis la publication d'un article scientifique dans *Cell Reports* (Limagne et al., 2017).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aires V, Brassart B, Carlier A, Scagliarini A, Mandard S, Limagne E, Solary E, Martiny L, Tarpin M, Delmas D (2014) A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in resveratrol-induced colon cancer cell apoptosis. Mol Nutr Food Res 58: 1785-94

Aires V, Limagne E, Cotte AK, Latruffe N, Ghiringhelli F, Delmas D (2013) Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. Mol Nutr Food Res 57: 1170-81

Antonopoulos C, El Sanadi C, Kaiser WJ, Mocarski ES, Dubyak GR (2013) Proapoptotic chemotherapeutic drugs induce noncanonical processing and release of IL-1β via caspase-8 in dendritic cells. J Immunol 191: 4789-803

Arvers P, Batel P, Choquet M, Daoust M, De Witte P, Facy F, Favre J-D, Hispard E, Lebrun T, Lehr-Drylewicz A-M, Lejoyeux M, Nahoum-Grappe V, Pérez-Diaz C, Tsikounas M (2003) Alcool : Dommages sociaux : Abus et dépendance. In p 564. INSERM

Balogh J, Victor D, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP (2016) Hepatocellular carcinoma: a review. J Hepatocell Carcinoma 3: 41-53

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol 183: 787-91

Berger H, Végran F, Chikh M, Gilardi F, Ladoire S, Bugaut H, Mignot G, Chalmin F, Bruchard M, Derangère V, Chevriaux A, Rébé C, Ryffel B, Pot C, Hichami A, Desvergne B, Ghiringhelli F, Apetoh L (2013) SOCS3 transactivation by PPARγ prevents IL-17-driven cancer growth. Cancer Res 73: 3578-90

Bishehsari F, Mahdavinia M, Vacca M, Malekzadeh R, Mariani-Costantini R (2014) Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. World J Gastroenterol 20: 6055-72

Boya P, Kroemer G (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death. Oncogene 27: 6434-51

Bruchard M, Mignot G, Derangère V, Chalmin F, Chevriaux A, Végran F, Boireau W, Simon B, Ryffel B, Connat JL, Kanellopoulos J, Martin F, Rébé C, Apetoh L, Ghiringhelli F (2013) Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat Med 19: 57-64

Chang SH, Mirabolfathinejad SG, Katta H, Cumpian AM, Gong L, Caetano MS, Moghaddam SJ, Dong C (2014) T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 5664-9

Chang YP, Ka SM, Hsu WH, Chen A, Chao LK, Lin CC, Hsieh CC, Chen MC, Chiu HW, Ho CL, Chiu YC, Liu ML, Hua KF (2015) Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy. J Cell Physiol 230: 1567-79

Chao C, Haque R, Caan BJ, Poon KY, Tseng HF, Quinn VP (2010) Red wine consumption not associated with reduced risk of colorectal cancer. Nutr Cancer 62: 849-55

Chen S, Sun B (2013) Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling. Protein Cell 4: 251-8

Chen XW, Zhou SF (2015) Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF-κB axis, and tumorigenesis. Drug Des Devel Ther 9: 2941-6

Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L, O'Shea JJ (2006) Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 8137-42

Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM et al. (2012) A validated regulatory network for Th17 cell specification. Cell 151: 289-303

Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. Nature 420: 860-7

Crockett SD, Long MD, Dellon ES, Martin CF, Galanko JA, Sandler RS (2011) Inverse relationship between moderate alcohol intake and rectal cancer: analysis of the North Carolina Colon Cancer Study. Dis Colon Rectum 54: 887-94

Dashwood RH, Suzui M, Nakagama H, Sugimura T, Nagao M (1998) High frequency of beta-catenin (ctnnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. Cancer Res 58: 1127-9

Delmas D, Jannin B, Latruffe N (2005) Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. Mol Nutr Food Res 49: 377-95

Delmas D, Passilly-Degrace P, Jannin B, Cherkaoui Malki M, Latruffe N (2002) Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells. Int J Mol Med 10: 193-9

Delmas D, Rébé C, Lacour S, Filomenko R, Athias A, Gambert P, Cherkaoui-Malki M, Jannin B, Dubrez-Daloz L, Latruffe N, Solary E (2003) Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. J Biol Chem 278: 41482-90

Delmas D, Xiao J (2012) Natural polyphenols properties: chemopreventive and chemosensitizing activities. Anticancer Agents Med Chem 12: 835

Dinarello CA (2006) Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. Am J Clin Nutr 83: 447S-455S

Dong C (2008) TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nat Rev Immunol 8: 337-48

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol 3: 991-8

Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med 315: 1650-9

Dyson JK, Rutter MD (2012) Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? World J Gastroenterol 18: 3839-48

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 136: E359-86

Fernandes I, Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V (2017) Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. Molecules 22

Frenzel L, Hermine O (2013) Mast cells and inflammation. Joint Bone Spine 80: 141-5

Ge H, Zhang JF, Guo BS, He Q, Wang BY, He B, Wang CQ (2007) Resveratrol inhibits macrophage expression of EMMPRIN by activating PPARgamma. Vascul Pharmacol 46: 114-21

Geijtenbeek TB, Gringhuis SI (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. Nat Rev Immunol 9: 465-79

German JB, Walzem RL (2000) The health benefits of wine. Annu Rev Nutr 20: 561-93

Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini JL, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Génin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, André F et al. (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. Nat Med 15: 1170-8

Ghiringhelli F, Rebe C, Hichami A, Delmas D (2012) Immunomodulation and anti-inflammatory roles of polyphenols as anticancer agents. Anticancer Agents Med Chem 12: 852-73

Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, Couillin I, Catros V, Boichot E, Lagente V (2014) Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. Clin Exp Pharmacol Physiol 41: 279-86

Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB (2003) Interleukin-18. J Leukoc Biol 73: 213-24

Grønbaek MN, Becker PU, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen GB, Sørensen TI (2001) [Beer, wine, spirits and mortality. Results from a prospective population study]. Ugeskr Laeger 163: 2946-9

Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, Farlik M, Decker T, Du Pasquier RA, Romero P, Tschopp J (2011) Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. Immunity 34: 213-23

Guarda G, Dostert C, Staehli F, Cabalzar K, Castillo R, Tardivel A, Schneider P, Tschopp J (2009) T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. Nature 460: 269-73

Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, Tardivel A, Mattmann C, Tschopp J (2011) Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. J Immunol 186: 2529-34

Guo H, Callaway JB, Ting JP (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat Med 21: 677-87

Guo W, Sun Y, Liu W, Wu X, Guo L, Cai P, Shen Y, Shu Y, Gu Y, Xu Q (2014) Small molecule-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inhibition is responsible for the prevention of colitis-associated cancer. Autophagy 10: 972-85

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. Cell 100: 57-70

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144: 646-74

Hardison SE, Brown GD (2012) C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. Nat Immunol 13: 817-22

He S, Sun C, Pan Y (2008) Red wine polyphenols for cancer prevention. Int J Mol Sci 9: 842-53

Hsu HY, Wen MH (2002) Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. J Biol Chem 277: 22131-9

Huang G, Yan H, Ye S, Tong C, Ying QL (2014) STAT3 phosphorylation at tyrosine 705 and serine 727 differentially regulates mouse ESC fates. Stem Cells 32: 1149-60

Huang TT, Lai HC, Chen YB, Chen LG, Wu YH, Ko YF, Lu CC, Chang CJ, Wu CY, Martel J, Ojcius DM, Chong KY, Young JD (2014) cis-Resveratrol produces anti-inflammatory effects by inhibiting canonical and non-canonical inflammasomes in macrophages. Innate Immun 20: 735-50

Hussain SP, Harris CC (2007) Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. Int J Cancer 121: 2373-80

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006) The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell 126: 1121-33

Jamilloux Y, Henry T (2013) [The inflammasomes: platforms of innate immunity]. Med Sci (Paris) 29: 975-84

Kawai T, Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity 34: 637-50

Kim R, Emi M, Tanabe K (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology 121: 1-14

Klarich DS, Brasser SM, Hong MY (2015) Moderate Alcohol Consumption and Colorectal Cancer Risk. Alcohol Clin Exp Res 39: 1280-91

Kono H, Rock KL (2008) How dying cells alert the immune system to danger. Nat Rev Immunol 8: 279-89

Kundu JK, Surh YJ (2008) Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. Cancer Lett 269: 243-61

Lamkanfi M (2011) Emerging inflammasome effector mechanisms. Nat Rev Immunol 11: 213-20

Lane N, Robins RA, Corne J, Fairclough L (2010) Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells. Clin Sci (Lond) 119: 75-86

Lang T, Ducimetière P, Arveiler D, Amouyel P, Ferrières J, Ruidavets JB, Montaye M, Haas B, Bingham A (1998) Is hospital care involved in inequalities in coronary heart disease mortality? Results from the French WHO-MONICA Project in men aged 30-64. J Epidemiol Community Health 52: 665-71

Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. Nat Rev Immunol 13: 397-411

Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J Exp Med 203: 2271-9

Liao PC, Chao LK, Chou JC, Dong WC, Lin CN, Lin CY, Chen A, Ka SM, Ho CL, Hua KF (2013) Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression and caspase-1-mediated interleukin-1β secretion. Inflamm Res 62: 89-96

Limagne E, Thibaudin M, Euvrard R, Berger H, Chalons P, Végan F, Humblin E, Boidot R, Rébé C, Derangère V, Ladoire S, Apetoh L, Delmas D, Ghiringhelli F (2017) Sirtuin-1 Activation Controls Tumor Growth by Impeding Th17 Differentiation via STAT3 Deacetylation. Cell Rep 19: 746-759

Lin QR, Li CG, Zha QB, Xu LH, Pan H, Zhao GX, Ouyang DY, He XH (2016) Gossypol induces pyroptosis in mouse macrophages via a non-canonical inflammasome pathway. Toxicol Appl Pharmacol 292: 56-64

Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, Lin Z, Zhu B (2011) IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 407: 348-54

Lu H, Ouyang W, Huang C (2006) Inflammation, a key event in cancer development. Mol Cancer Res 4: 221-33

Maniati E, Hagemann T (2013) IL-17 mediates resistance to anti-VEGF therapy. Nat Med 19: 1092-4

Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. Nature 430: 213-8

Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F (2012) Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-β-dependent immunosuppressive activity? Trends Mol Med 18: 742-9

Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell 10: 417-26

Matsuo K, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Sugawara Y, Sasazuki S, Nagata C, Tamakoshi A, Wakai K, Inoue M, Tsugane S, Japan DaEoCPSi (2012) Association between body mass index and the colorectal cancer risk in Japan: pooled analysis of population-based cohort studies in Japan. Ann Oncol 23: 479-90

Mazué F, Delmas D, Murillo G, Saleiro D, Limagne E, Latruffe N (2014) Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis. Food Funct 5: 663-70

Misawa T, Saitoh T, Kozaki T, Park S, Takahama M, Akira S (2015) Resveratrol inhibits the acetylated α-tubulin-mediated assembly of the NLRP3-inflammasome. Int Immunol 27: 425-34

Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S (2013) Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. Nat Immunol 14: 454-60

Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, Sassetti CM (2013) Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1β. Nat Immunol 14: 52-60

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol 27: 16-25

Na HK, Lee JY (2017) Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. Int J Mol Sci 18

Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol 12: 222-30

Narod SA (2011) Alcohol and risk of breast cancer. JAMA 306: 1920-1

Nowosielska-Grygiel J, Owczarek K, Bielińska M, Wacławek M, Olszewski J (2017) Analysis of risk factors for oral cavity and oropharynx cancer in the authors' own material. Otolaryngol Pol 71: 23-28

Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. Curr Opin Immunol 17: 359-65

Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM (1996) Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. Clin Chim Acta 246: 163-82

Pan Y, Shen B, Gao Q, Zhu J, Dong J, Zhang L, Zhang Y (2016) Caspase-1 inhibition attenuates activation of BV2 microglia induced by LPS-treated RAW264.7 macrophages. J Biomed Res 30: 225-33

Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, West KP, Booth TD, Perloff M, Crowell JA, Brenner DE, Steward WP, Gescher AJ, Brown K (2010) Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. Cancer Res 70: 7392-9

Pelegrin P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. J Immunol 180: 7147-57

Perše M, Cerar A (2011) Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. J Biomed Biotechnol 2011: 473964

Pierini R, Gee JM, Belshaw NJ, Johnson IT (2008) Flavonoids and intestinal cancers. Br J Nutr 99 E Suppl 1: ES53-9

Py BF, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J (2013) Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. Mol Cell 49: 331-8

Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ 14: 1583-9

Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA (2012) Regulation of inflammasome signaling. Nat Immunol 13: 333-42

Renaud S, Gueguen R (1998) The French paradox and wine drinking. Novartis Found Symp 216: 208-17; discussion 217-22, 152-8

Saxena M, Yeretssian G (2014) NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. Front Immunol 5: 327

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science 331: 1565-70

Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. Cell 140: 821-32

Secretan B (2009) A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. Lancet Oncol 10: 1033-4

Sengottuvelan M, Viswanathan P, Nalini N (2006) Chemopreventive effect of trans-resveratrol--a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. Carcinogenesis 27: 1038-46

Sharp SP, Avram D, Stain SC, Lee EC (2017) Local and systemic Th17 immune response associated with advanced stage colon cancer. J Surg Res 208: 180-186

Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A (2014) Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. Public Health Nutr 17: 2769-82

Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 140: 805-20

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A (1994) Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. Circulation 90: 583-612

Tőzsér J, Benkő S (2016) Natural Compounds as Regulators of NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1β Production. Mediators Inflamm 2016: 5460302

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity 24: 179-89

Verhoef PA, Kertesy SB, Lundberg K, Kahlenberg JM, Dubyak GR (2005) Inhibitory effects of chloride on the activation of caspase-1, IL-1beta secretion, and cytolysis by the P2X7 receptor. J Immunol 175: 7623-34

Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF (2012) Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. Int J Biol Sci 8: 1248-53

Walter A, Etienne-Selloum N, Brasse D, Khallouf H, Bronner C, Rio MC, Beretz A, Schini-Kerth VB (2010) Intake of grape-derived polyphenols reduces C26 tumor growth by inhibiting angiogenesis and inducing apoptosis. FASEB J 24: 3360-9

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell 82: 241-50

Wilhoit LF, Scott DA, Simecka BA (2017) Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Characteristics, Complications, and Treatment. Community Ment Health J

Wu D, Wu P, Huang Q, Liu Y, Ye J, Huang J (2013) Interleukin-17: a promoter in colorectal cancer progression. Clin Dev Immunol 2013: 436307

Xiang P, Chen T, Mou Y, Wu H, Xie P, Lu G, Gong X, Hu Q, Zhang Y, Ji H (2015) NZ suppresses TLR4/NF-κB signalings and NLRP3 inflammasome activation in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Inflamm Res 64: 799-808

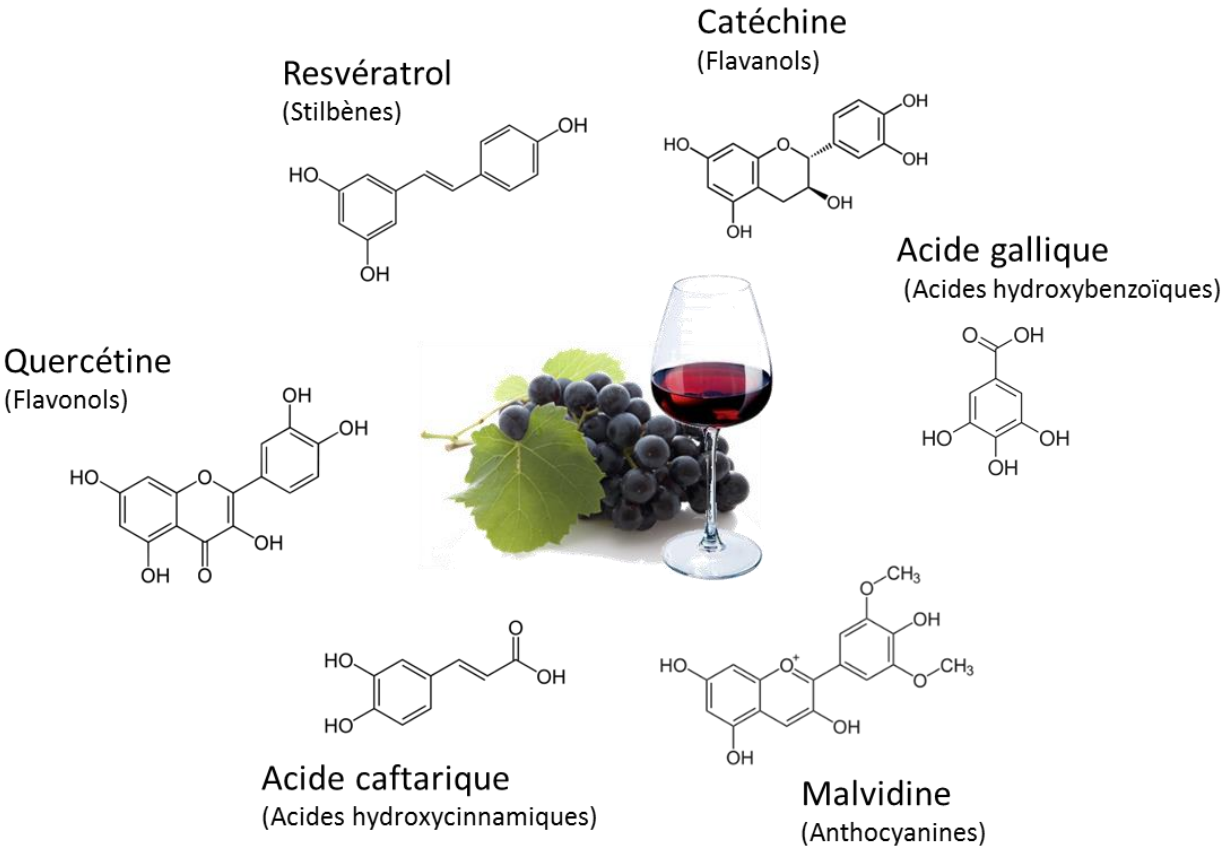
Xiao Q, Qu Z, Zhao Y, Yang L, Gao P (2017) Orientin Ameliorates LPS-Induced Inflammatory Responses through the Inhibitory of the NF-κB Pathway and NLRP3 Inflammasome. Evid Based Complement Alternat Med 2017: 2495496

Yu HB, Finlay BB (2008) The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. Cell Host Microbe 4: 198-208

Zenaro E, Donini M, Dusi S (2009) Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. J Leukoc Biol 86: 1393-401

ANNEXES

Annexe 1: Structures des polyphénols présents dans le vin



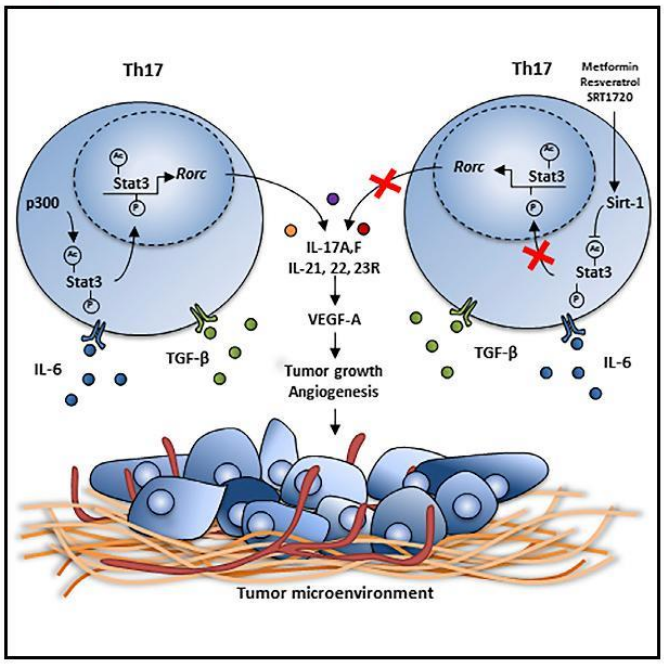
Annexe 2. Limagne E, Thibaudin M, Euvrard R, Berger H, Chalons P, Végan F, Humblin E, Boidot R, Rébé C, Derangère V, Ladoire S, Apetoh L, Delmas D, Ghiringhelli F., 2017, Sirtuin-1 Activation Controls Tumor Growth by Impeding Th17 Differentiation via STAT3 Deacetylation. *Cell Report*.19(4):746-759.

Article

Cell Reports

Sirtuin-1 Activation Controls Tumor Growth by Impeding Th17 Differentiation via STAT3 Deacetylation

Graphical Abstract



Highlights

- SIRT1 activation impedes Th17 cell differentiation through STAT3 deacetylation
- STAT3 deacetylation reduces its capacity to bind to the *Rorc* promoter
- SIRT1 activation limits tumor growth in mice and reduces Th17 frequency in patients
- SIRT1 activators might be used to target IL-17A protumor functions in cancer patients

Authors

Emeric Limagne, Marion Thibaudin, Romain Euvrard, ..., Lionel Apetoh, Dominique Delmas, François Ghiringhelli

Correspondence

elimagne@cgfl.fr (E.L.), fghiringhelli@cgfl.fr (F.G.)

In Brief

Limagne et al. use drugs to activate SIRT1 and find that this leads to STAT3 deactylation and reduced mouse and human Th17 cell differentiation. SIRT1 agonists reduce tumor growth in mice and the frequency of Th17 cells in cancer patients. This study suggests that activating SIRT1 may target IL-17A protumor functions.

Limagne et al., 2017, Cell Reports *19*, 746–759
April 25, 2017 © 2017 The Author(s).
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.004

CellPress

OPEN ACCESS
CellPress

Cell Reports
Article

Sirtuin-1 Activation Controls Tumor Growth by Impeding Th17 Differentiation via STAT3 Deacetylation

Emeric Limagne,[1,2,3,5,*] Marion Thibaudin,[1,2,5] Romain Euvrard,[1,2] Hélène Berger,[1,2] Pauline Chalons,[1,2] Frédérique Végan,[1,2,3] Etienne Humblin,[1,2] Romain Boidot,[1,2,3] Cédric Rébé,[1,2,3] Valentin Derangère,[1,2,3] Sylvain Ladoire,[1,2,3,4] Lionel Apetoh,[1,2,4,6] Dominique Delmas,[1,2,6] and François Ghiringhelli[1,2,3,4,6,7,*]

[1]University Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR866, 21000 Dijon, France
[2]INSERM, LNC UMR866, 21000 Dijon, France
[3]Platform of Transfer in Oncology, University Bourgogne Franche-Comté, Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France
[4]Department of Medical Oncology, Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France
[5]These authors contributed equally
[6]Senior author
[7]Lead Contact
*Correspondence: elimagne@cgfl.fr (E.L.), fghiringhelli@cgfl.fr (F.G.)
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.004

SUMMARY

Sirtuin-1 deacetylates proteins and has emerged as a critical regulator of different cellular processes, particularly inflammation. Basal SIRT1 activity was previously found to limit Th9 and enhance Th17 differentiation in mice, but the effect of pharmacological SIRT1 activation on T cell differentiation and antitumor responses remains unclear. Here, we find that SIRT1 pharmacological agonists selectively impede mouse and human Th17 cell differentiation. SIRT1 activation induces STAT3 deacetylation, thus reducing its ability to translocate into the nucleus, bind to *Rorc* promoter, and induce its transcription. SIRT1 agonists reduce tumor growth in mice by blocking Th17 cell differentiation. In cancer patients, the SIRT1 agonist metformin reduced the frequency of Th17 cells and STAT3 acetylation levels. Altogether, these data underscore that SIRT1 activation impedes Th17 cell differentiation and thereby limits tumor growth and suggest that SIRT1 activators may directly target IL-17A functions.

INTRODUCTION

Th17 cells develop from naive $CD4^+$ T cells in the presence of TGF-β and IL-6 and are maintained long-term in the presence of IL-21 and IL-23 (Stritesky et al., 2008). Th17 cells are characterized by their capacity to secrete IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and CCL20 (Dong, 2008; Liang et al., 2006). The initiation of their transcriptional program is dependent on STAT3, IRF4, and BATF and also is controlled by the master transcription factors retinoic acid-related orphan receptors *RORγt* and *RORα* (Ciofani et al., 2012; Ivanov et al., 2006). The role of Th17 cells in cancer is controversial with positive and negative effects described in both mouse and human cancers. Th17 cells can be separated into two different subsets with either regulatory or inflammatory properties depending on the stimuli they encounter. These divergent phenotypes may explain why Th17 cells have potent antitumor properties in some experimental settings while promoting tumor growth in others (Martin et al., 2012). In the context of human colorectal cancer, Th17 cells that infiltrate the tumor bed are often associated with a poor prognosis, suggesting that targeting such cells may have clinical relevance in this disease (Liu et al., 2011). Two main mechanisms explain why Th17 cells can favor tumor outgrowth. IL-17A is known to promote tumor angiogenesis and stimulate VEGF-A production (Martin-Orozco et al., 2009; Numasaki et al., 2003). In addition, IL-17A induces STAT3 activation in cancer cells, thus enhancing their resistance to apoptosis and promoting their proliferation (Loncle et al., 2015). We and others have shown that targeting IL-17A or Th17 in vivo restrains tumor growth (Berger et al., 2013; He et al., 2010; Wang et al., 2009), thus supporting the development of pharmacological tools that could limit Th17 cell induction.

The transcription factor STAT3 is essential for Th17 cell differentiation. STAT3 is required for the initiation of the Th17 cell transcriptional program and regulates the expression of several essential genes for Th17 cell development (Ciofani et al., 2012). STAT3 directly binds to the promoters of *Il17a* and *Il17f* and also controls chromatin accessibility at these loci. STAT3 activation, which is driven by the Th17-differentiating cytokines, requires STAT3 phosphorylation on tyrosine 705 and serine 727 (Wen et al., 1995). In addition to phosphorylation, it was observed in different cell types that the transcriptional activity of STAT3 can be regulated by acetylation on lysine 685, mediated by the acetyltransferase p300 and inhibited by Sirtuin 1 (SIRT1). This modification is required for STAT3 dimerization, phosphorylation of tyrosine 705, and transcriptional function (Nie et al., 2009; Yuan et al., 2005). However, the role of STAT3 acetylation and its regulation in T cells is elusive. Here, we found that pharmacological SIRT1 activation selectively impedes Th17 development by limiting STAT3 acetylation in mouse and human,

 © 2017 The Author(s).
This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

OPEN ACCESS
CellPress

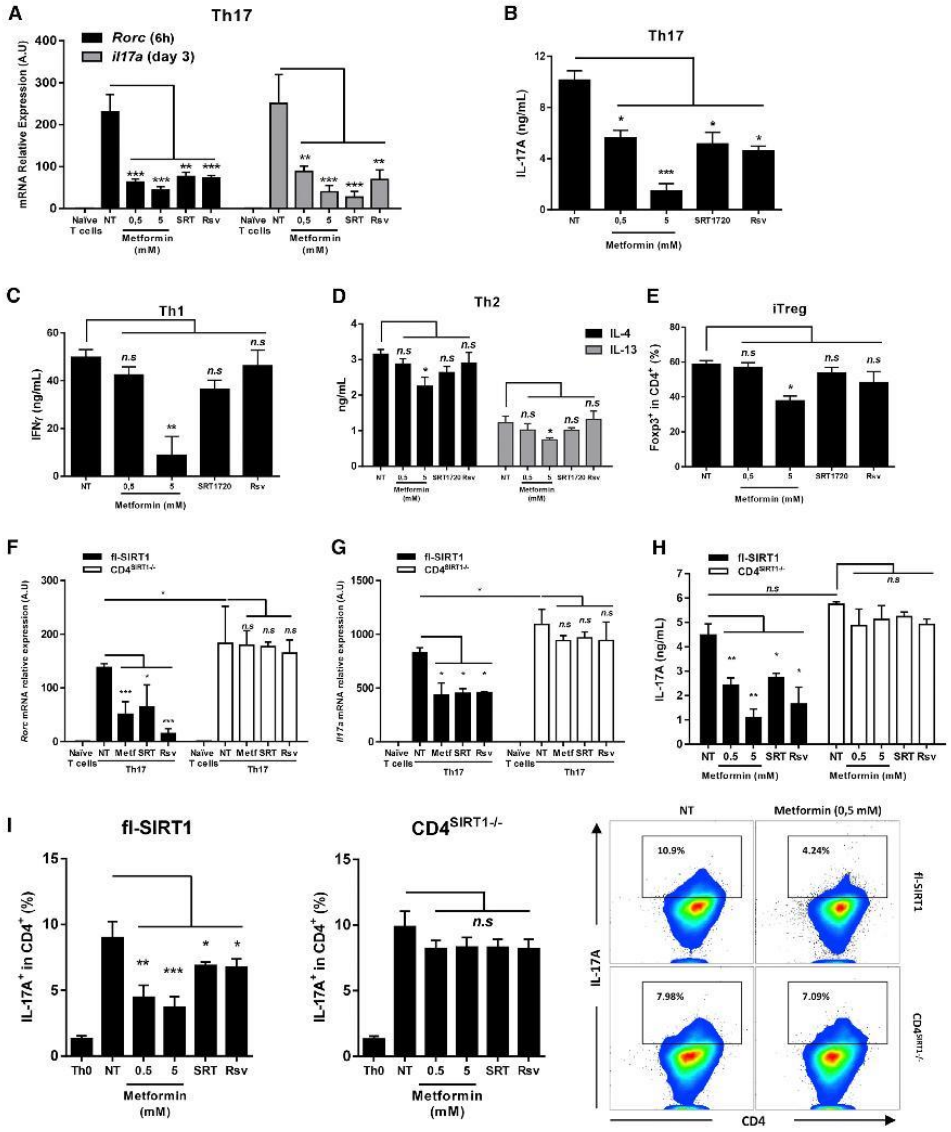


Figure 1. SIRT1 Activation Selectively Blunts Th17 Differentiation

Cell-sorted naive CD4$^+$ CD62L^{hi} T cells were isolated from naive or fl-CD4/SIRT1-Cre C57BL/6 mice and differentiated into Th1, Th2, iTreg, or Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hr and required cytokines in the presence or not of 0.5 or 5 mM metformin, 10 μM Rsv, or 1 μM SRT1720.

(A) qRT-PCR analysis of *Rorc* and *il17a* mRNA expression was assessed after 6 hr (*Rorc*) or 3 days (*il17a*) of culture, and expression is presented relative to *Actb* expression.

(B–D) ELISA analysis of IL-17A (B), IFN-γ (C), and IL-4 and IL-13 (D) in supernatants of CD4$^+$ T cells differentiated for 3 days.

(E) Flow cytometry analysis of intracellular staining for Foxp3 in naive CD4$^+$ T cells polarized in iTreg in the presence or not of metformin, Rsv, or SRT1720 assessed on day 3 of culture.

(F and G) qRT-PCR analysis of *Rorc* (F) and *il17a* (G) mRNA expression of CD4$^+$ T cells isolated from fl-SIRT1 or CD4$^{SIRT1-/-}$ mice polarized in Th17 in the presence or not of SIRT1agonists assessed on day 3 of culture.

(H) Same as in (F) and (G), ELISA analysis of IL-17A in supernatants of CD4$^+$ T cells differentiated for 3 days.

(legend continued on next page)

thus demonstrating the role of STAT3 acetylation for Th17 differentiation. Such an observation has clinical relevance as illustrated by limitation of Th17-dependent tumor growth in mouse models upon SIRT1 activation.

RESULTS

SIRT1 Activation Selectively Blunts Th17 Differentiation

To test the role of pharmacological SIRT1 activation on $CD4^+$ T cell differentiation in mice, we generated in vitro Th1, Th2, Th17, and induced regulatory T (iTreg) cells from naive CD4 T cells with T cell receptor (TCR) triggering and the appropriate cytokine cocktail in the presence or not of SIRT1 activators. We used resveratrol (Rsv), low-dose metformin, and SRT1720 as classical activators of SIRT1 (Chauhan et al., 2011; Chini et al., 2015; Harikumar et al., 2010; Harper et al., 2007; Hung et al., 2016; Tyack et al., 2015; Zhang et al., 2015). We validated that low-dose metformin induced SIRT1 activation as demonstrated by a global deacetylation of protein without AKT/mTor inhibition (Figure S1A). As a control, high doses of metformin induced both inhibition of AKT/mTor pathway (demonstrated by dephosphorylation of p70-S6K) and activation of SIRT1 (demonstrated by global deacetylation of protein) (Figure S1A). We observed using qPCR that SRT1720, Rsv, and low dose of metformin specifically reduced *il17a* and *Rorc* mRNA expression in CD4 T cells during Th17 differentiation (Figure 1A) but did not affect *Ifng* and *Tbx21* mRNA expression during Th1 differentiation or *il4*, *il5*, *il13*, and *Gata3* mRNA expression during Th2 differentiation, or *Ctla4*, *Gitr*, and *Foxp3* mRNA expression during iTreg differentiation (Figure S1B). Using ELISA, we confirmed that only IL-17A production is reduced by the three SIRT1 activators (Figure 1B), whereas they did not affect IFN-γ production by Th1 (Figure 1C) or IL-4 and IL-13 production by Th2 (Figure 1D). Intracellular staining also showed that SIRT1 activators did not affect Foxp3 expression at the protein level in iTreg cells (Figure 1E). A lower dosage of metformin of 10 μM equivalent to the dosage classically found in mouse serum (Chandel et al., 2016) also impedes the in vitro Th17 differentiation (Figure S1B). As a control, we observed that a high dose of metformin, which affects both SIRT1 and AKT/mTor pathway, partially impeded Th1, Th2, Th17, and iTreg CD4 T cell differentiation (Figure S1C and Figures 1A–1E). To confirm that the effect of SIRT1 activators is specifically driven by SIRT1 activation, we used CD4 T cells from transgenic mice with conditional invalidation of SIRT1 in CD4 T cells by crossing CD4-Cre mice with SIRT1-Flox mice. Such CD4 T cells were named $CD4^{SIRT1-/-}$ in the manuscript. These cells did not express SIRT1 protein upon western blotting analysis (Figure S1D). Sirt1 deficiency completely blunts the ability of the three SIRT1 activators to blunt Th17 polarization as demonstrated by their inability to reduce *Rorc* and *il17a* mRNA expression (Figures 1F and 1G) and IL-17A protein expression using ELISA (Figure 1H) and intracellular staining by flow cytometry (Figure 1I). Such data are surprising considering the previous report from Lim et al. (2015) showing that SIRT1 deletion blunts Th17 differentiation. In our setting, we also observed that genetic or pharmacological inactivation of SIRT1 modestly but significantly reduces Th17 differentiation (Figures 1F–1I), thus suggesting a biphasic role of Sirt1 on Th17 differentiation.

Together, these data show that SIRT1 agonists selectively blunt murine Th17 polarization in vitro.

SIRT1 Regulates IL-17A and RORγt Expression by Deacetylation of STAT3

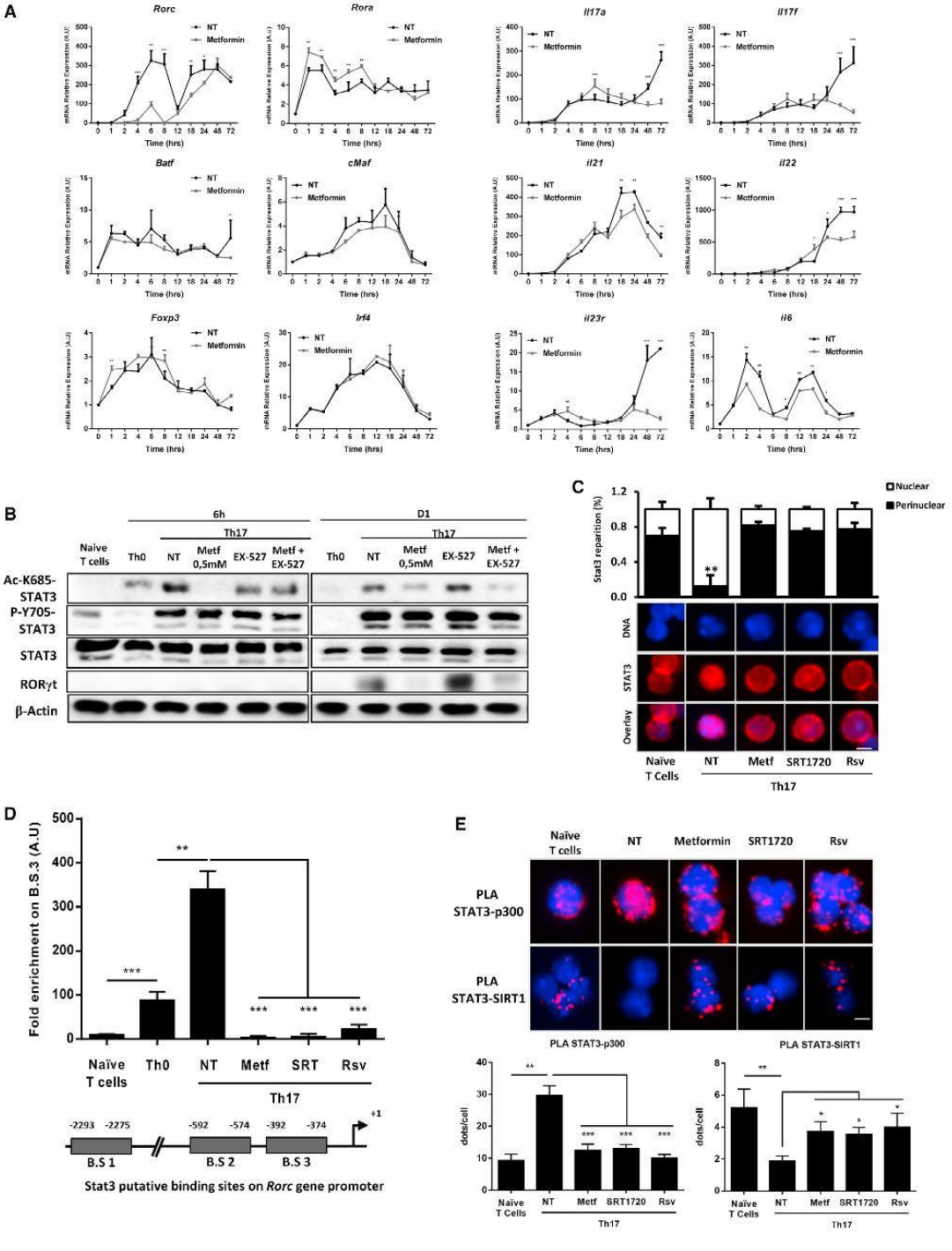
To determine the effect of SIRT1 agonists on Th17 transcriptional profile, we performed kinetic analysis of Th17-related gene mRNA expression by qPCR in Th17 cells differentiated in the presence or not of SIRT1 agonist. We observed that expression of all Th17-related cytokines is impeded by addition of SIRT1 agonist (Figure 2A). Interestingly, in addition to cytokines, the gene that is the most rapidly affected by SIRT1 agonist is *Rorc*, with a significant downregulation after 2 hr of differentiation (Figure 2A). We confirmed that the rapid decrease in *Rorc* mRNA expression is mirrored by a decrease RORγt protein expression by western blotting performed 24 hr after induction of Th17 differentiation (Figure 2B). STAT3 is a transcription factor required for initiation of Th17 program and induction of *Rorc* mRNA expression (Durant et al., 2010). As STAT3 requires acetylation to exert its transcriptional function, we hypothesized that SIRT1 activation may affect STAT3 activation. We observed by western blotting that the three SIRT1 agonists reduced both STAT3 acetylation (K685) and STAT3 phosphorylation (Y705) (Figure S2A). STAT3 deacetylation by SIRT1 activator occurred after 6 hr of treatment and was maintained at 24 hr (Figure 2B). A lower dosage of metformin of 10 μM equivalent to the dosage classically found in mouse serum also impedes the in vitro Th17 difSTAT3 acetylation in Th17 cells (Figure S2B). In contrast, STAT3 acetylation and phosphorylation were not affected in $CD4^{SIRT1-/-}$ cells by SIRT1 activators (Figure S2C). Inhibition of SIRT1 using EX-527 did not affect STAT3 acetylation (Figure 2B). When we examined RORγt expression, we observed that RORγt expression is only detectable after 24 hr of differentiation (Figure 2B). Although SIRT1 activator inhibited RORγt expression, inhibitor of SIRT1 modestly enhanced RORγt expression (Figure 2B).

In addition to its capacity to deacetylate STAT3, SIRT1 is also known to be able to deacetylate RORγt, PPARγ, and p65 (Ghisays et al., 2015; Han et al., 2010; Lim et al., 2015), which are molecules involved in Th17 differentiation (Berger et al., 2013; Lim et al., 2015; Ruan and Chen, 2012). To test whether STAT3 deacetylation is involved in the effect of SIRT1 activator on Th17 differentiation, we treated naive CD4 T cells with either RORγt, PPARγ, p65, or STAT3 inhibitor in the presence or absence of SIRT1 activator and performed Th17 differentiation. We observed that SIRT1 activator enhanced the capacity of RORγt, PPARγ, and p65 inhibitor to blunt Th17 polarization,

(I) Flow cytometry analysis of intracellular staining for IL-17A in naive $CD4^+$ T cells isolated from fl-SIRT1 (left panel) or $CD4^{SIRT1-/-}$ (middle panel) mice polarized or not in Th17 in the presence or not of SIRT1 agonists assessed on day 3 of culture. Numbers in outlined areas indicate percentage of cells in gate. Representative data from one of three independent experiments are shown in right panel.

NS, not significant; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Data are from three independent experiments (median and SEM).

OPEN ACCESS
CellPress



(legend on next page)

whereas SIRT1 activator was unable to enhance the inhibitory effect of STAT3 inhibitor, thus demonstrating that SIRT1 activator and STAT3 activator target the similar pathway. Together, such data strongly suggested that the main effect of SIRT1 activator relied on its capacity to target STAT3 (Figure S2D).

STAT3 acetylation was previously shown to affect its ability to translocate into the nucleus (Zhuang, 2013). Using immunofluorescence, we observed that Th17 differentiation induced STAT3 translocation from the cytoplasm into the nucleus. SIRT1 agonists blunted this nuclear translocation and maintained STAT3 in the cytoplasm (Figure 2C). Accordingly, STAT3 chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay on three putative binding sites on *Rorc* promoter gene using nuclear extract of Th17 cells treated or not with SIRT1 agonists showed that STAT3 binding on *Rorc* promoter (binding site 3 [B.S3]) is dramatically impeded by the SIRT1 agonist treatment (no enrichment was observed on B.S1 and B.S2) (Figure 2D). STAT3 can heterodimerize with either the histone deacetylase SIRT1 or the histone acetylase p300 to regulate its acetylation. These interactions dictate the acetylation status of STAT3 and its ability to migrate into the nucleus to drive its transcriptional effect (Zhuang, 2013). In contrast, a previous report showed that basal SIRT1 activity deacetylates RORγt (Lim et al., 2015). To determine whether SIRT1 activation modifies such interactions in Th17 cells, we performed a proximity ligation assay using anti-STAT3, anti RORγt antibody, and anti-SIRT1 or p300 antibodies. This experiment revealed that, in the absence of activator, SIRT1 did not interact with STAT3 but with RORγt in Th17 (Figure S2E). p300 and STAT3 strongly interacted in Th17 nuclei compared to naive CD4 T cells, thus corroborating the role of this complex in the induction of the Th17 program (Figure 2E). SIRT1 agonists strongly reduced p300-STAT3 interacting dots and enhanced the number of SIRT1 STAT3 interacting dots (Figure 2E). Importantly, most of these dots were found outside the nucleus (Figure 2E), thus supporting the hypothesis that SIRT1 is involved in STAT3 exclusion of the nucleus of CD4 T cells via its deacetylase activity and a competition with p300 interaction. In the presence of SIRT1 activator, SIRT1 does not interact with RORγt, thus confirming that in the activating condition SIRT1 mostly acts on STAT3 (Figure S2E).

Overall, our results support the hypothesis that SIRT1 interacts with STAT3 to deacetylate and maintain it outside of the nucleus of Th17 cells, thus preventing its association with p300 and the initiation of the Th17 program.

SIRT1 Inhibition Blunts In Vivo Th17 Polarization

We previously demonstrated during B16F10 melanoma tumor growth that Th17 accumulates in both tumor bed and draining lymph nodes (Bruchard et al., 2013; Chalmin et al., 2012). Using metformin to activate SIRT1 in vivo, we observed a reduction of IL-17A-expressing CD4 T cell frequency in the tumor bed and draining lymph nodes of B16F10 tumor-bearing mice (Figures 3A and 3B). In contrast, metformin did not affect IL-17A-expressing CD4 T cell frequency in transgenic $CD4^{SIRT1-/-}$ mice in this setting of subcutaneous transplanted B16F10 tumors (Figures 3A and 3B). As a control, we observed that metformin did not affect Th1, Th2, and iTreg frequency (Figure S3). Similarly, to in vitro data, we observed a reduction of STAT3 acetylation in Th17 infiltrating cells in mice after metformin treatment, and this reduction was not observed in Th17 from $CD4^{SIRT1-/-}$ mice (Figure 3C).

Together, these data underscore that in vivo pharmacological SIRT1 activation in CD4 T cells reduces Th17 polarization and STAT3 acetylation without affecting other T helper differentiation in the context of cancer.

The Anticancer Therapeutic Effects of SIRT1 Agonists Rely on Their Ability to Target IL-17A

IL-17A was shown to contribute to tumor growth by different mechanisms notably by its ability to promote tumor angiogenesis (Liu et al., 2011). In B16F10 and CT26 models, two models of subcutaneous transplantable tumors in C57BL/6 and Balb/C mice, respectively, we observed that metformin and Rsv delayed tumor growth (Figures 4A and 4B). This effect was blunted by the SIRT1 antagonist EX-527 (Figures 4A and 4B). Similar results were observed in the B16F10 metastasis lung tumor model (Figure 4C). The effect of SIRT1 agonist was completely dependent on T cells because in the two tumor models the treatment efficacy was completely blunted in athymic nude mice (Figures 4D and 4E). As SIRT1 agonist reduced Th17 cell polarization and IL-17A production without affecting other T helper polarization, we searched for a role of IL-17A in the therapeutic effect of SIRT1 agonist. B16F10 tumor progression is reduced in IL-17A-deficient mice (Figure 4F). Importantly, although metformin and Rsv reduced tumor growth in wild-type (WT) mice, these drugs had no effect in $IL17a^{-/-}$ mice, thus demonstrating that IL-17A was required for the antitumor effect of SIRT1 agonists (Figure 4F). Similar results were observed in the CT26 model using IL-17A neutralizing antibody (Figure 4G). In the setting of B16F10 tumor, IL-17A production was observed in the tumor

Figure 2. SIRT1 Regulates IL-17A and RORγt Expression by Deacetylation of STAT3

(A) Cell-sorted naive $CD4^+CD62L^{hi}$ T cells were isolated from C57BL/6 and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, and 72 hr in the presence or not of SIRT1 agonist (low dose of metformin). qRT-PCR analysis of *Rorc*, *Rora*, *Foxp3*, *Batf*, *cMaf*, *Irf4*, *il6*, *il17a*, *il17f*, *il21*, *il22*, and *il23r* expression. Expression is presented relative to *Actb* expression.

(B) Expression of Ac-STAT3 (K685), p-STAT3 (Y705), or RORγt in naive T cells, Th0, or Th17-differentiated cells for 6 and 24 hr treated or not with the SIRT1 agonist (low dose of metformin), or the SIRT1 inhibitor (EX-527), or both was determined by western blotting.

(C) Naive T cells and Th17-differentiated cells for 6 hr treated or not with the SIRT1 agonists were stained and analyzed for STAT3 expression and localization (nuclear or perinuclear) using immunofluorescence (upper panel is quantification on 100 cells; lower panel, a representative cell).

(D) ChIP analysis of the interaction between STAT3 and *Rorc* promoter in naive T cells and in vitro Th17 cells that were differentiated and treated or not with the SIRT1. Analysis on the putative B.S3 for STAT3 on *Rorc* promoter (−392 −374) is shown. For the putative B.S1 and B.S2, any amplification was obtained.

(E) Proximity ligation assay (PLA) analysis of the interaction between STAT3 and p300 or STAT3 and SIRT1 in naive T cells and in vitro-differentiated Th17 cells treated or not with the SIRT1 agonists. (The lower panel shows quantification of interacting dots on 100 cells; in the upper panel, a representative cell is shown). NS, not significant; $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, and $^{***}p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Data are from three (A and D) independent experiments (median and SEM); (B), (C), and (E) are one experiment representative of three independent experiments.

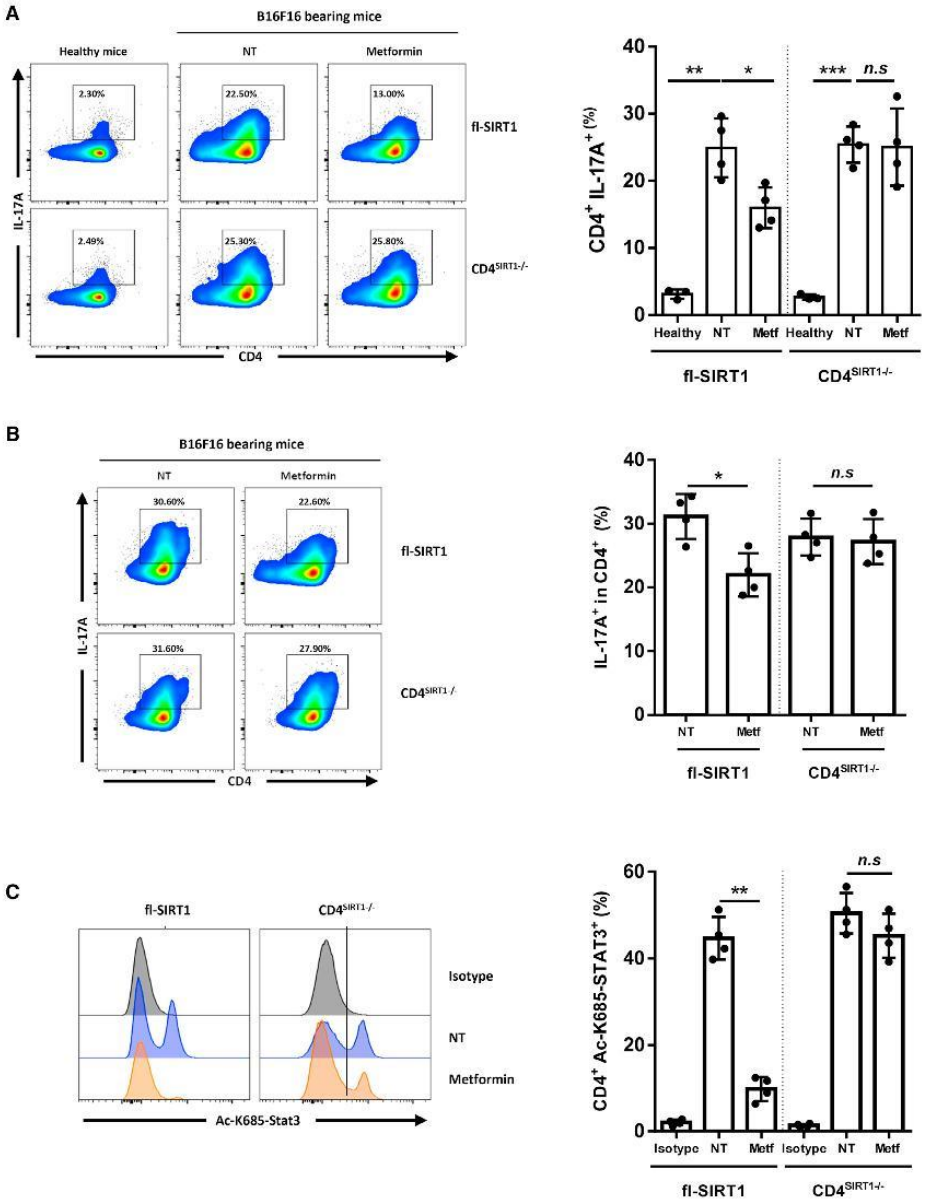


Figure 3. SIRT1 Activation Blunts In Vivo Th17 Polarization

$CD4^+$ T cells isolated from draining lymph nodes or tumor-infiltrating lymphocytes isolated from B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice under control or metformin (150 mg/kg/day) treatment. Cells were activated for 6 hr with PMA/Iono and monensin. Then, the proportion of Th17 cells was determined by IL-17A intracellular cytokine staining.

(A and B) IL-17A expression from Th17 cells was assessed by intracellular cytokine staining in draining lymph nodes of WT mice, B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control, or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice (A) or in the tumor bed of B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice (B) under control or metformin treatment. The left panel is a representative dot plot; the right panel represents data from four independent mice.

(C) Same as (B), expression of Ac-STAT3 in $CD4^+$ cells was assessed by intracellular cytokine staining.

NS, not significant; $^*p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ (Mann-Whitney test). Data are from four (right panels) independent mice (median and SEM) or are from one representative of four independent mice (left panels).

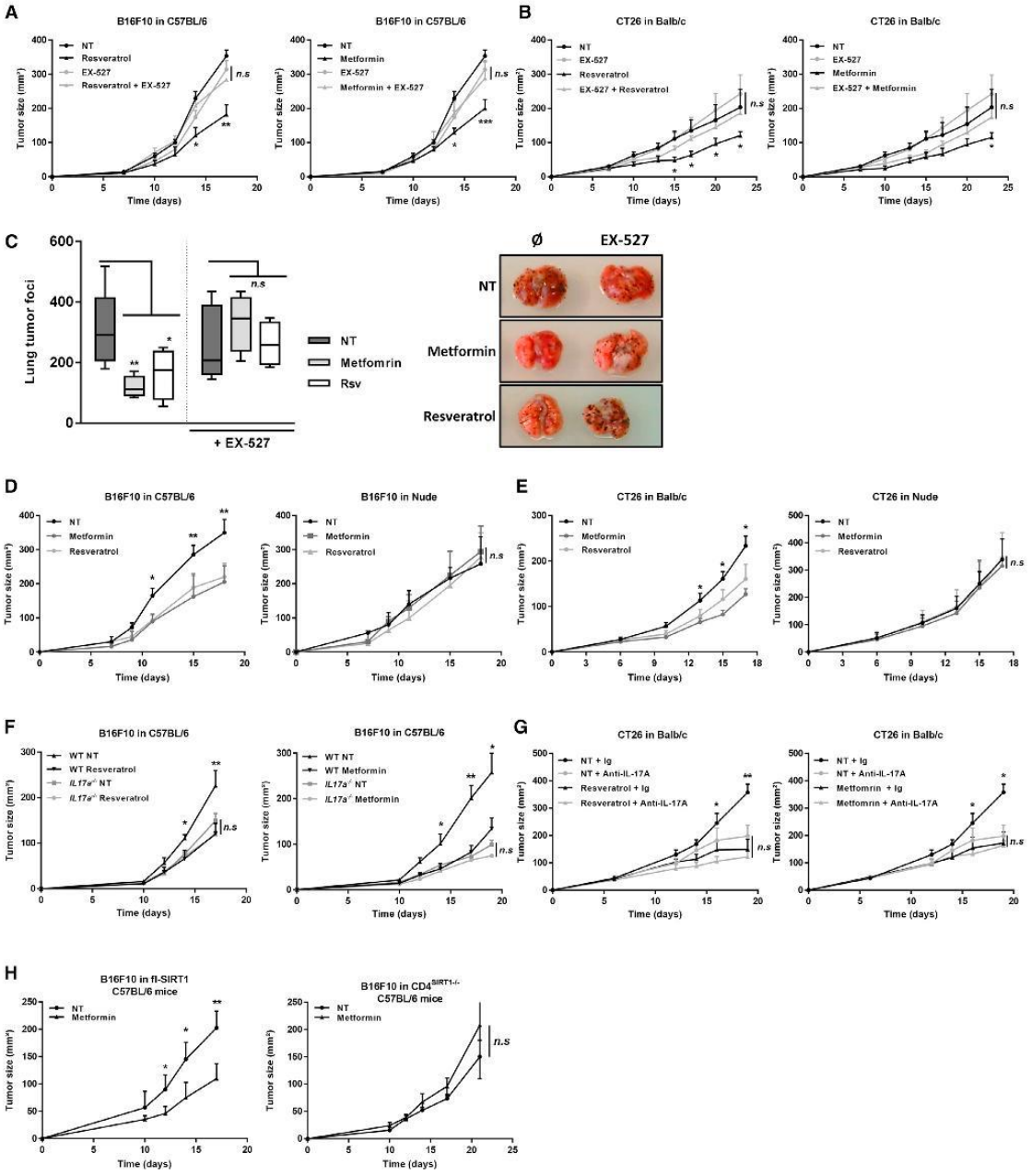


Figure 4. The Anticancer Therapeutic Effect of SIRT1 Agonists Relies on Their Ability to Target IL-17A

(A and B) C57BL/6 (A) and BALB/c mice (B) under control, Rsv (35 mg/kg/day) (left), or metformin (150 mg/kg/day) (right) treatments with or without EX-527 (1 mg/kg/day) treatment were inoculated with B16F10 and CT26 cells, respectively, and tumor growth was monitored over 2.5 weeks.

(C) Lung tumor foci in WT mice 13 days after intravenous injection of B16F10 melanoma cells with or without metformin or Rsv treatment and with or without EX-527 (1 mg/kg/day) treatment in some cases.

(D and E) Same as in (A), but B16F10 (D) and CT26 (E) cells were injected subcutaneously in C57BL/6 or BALB/c mice (left) or in Nude mice (right), and tumor growth was monitored over 2.5 weeks.

(legend continued on next page)

bed. This IL-17A production is reduced by metformin or Rsv and restored by EX-527 (Figure S4A). Finally, to validate that the effect of SIRT1 agonist is related to its specific effect on CD4 T cells, we treated $CD4^{SIRT1-/-}$ mice bearing B16F10 tumor with metformin. We observed that this treatment did not affect tumor growth in these mice (Figure 4H). Interestingly, IL-17A deficiency and SIRT1 activation by metformin both reduced VEGF-A production by B16F10 tumor, thus suggesting that IL-17A inhibition impacts on tumor growth via a reduction of proangiogenic factors (Figures S4A and S4B).

Together, these data show that SIRT1 agonist antitumor effect in mice is dependent on T cells, IL-17A, and SIRT1 expression in CD4 T cells, thus suggesting that it relies on the downregulation of IL-17A secretion by Th17 cells.

SIRT1 Agonists Are Also Effective on Human Th17 Cells

We tested the ability of SIRT1 agonists to impede in vitro differentiation of naive human T cells from blood healthy donors, into Th17 cells. We cell-sorted $CD4^+$ $CD45RA^+$ cells from blood and differentiated them with IL-6 plus IL-23 and TGFβ with TCR triggering, as previously described (Bettelli et al., 2008; Gaffen, 2008; Laurence et al., 2007; Veldhoen et al., 2009). We observed that adding Rsv, SRT1720, or low-dose metformin reduced STAT3 acetylation (Figure 5A). As for our mouse study, we selected a dose of metformin that did not affect the AKT/mTor pathway as demonstrated by persistence of AKT phosphorylation and absence of the inhibitory phosphorylation of serine 792 of Raptor (Figure S5A). SIRT1 agonists reduced *il17a* and *Rorc* mRNA expression during Th17 differentiation (Figure 5B). At the protein level, we confirmed that SIRT1 inhibitors reduced IL-17A protein production using ELISA (Figure 5C) and RORγt expression using western blotting (Figure 5D). Importantly, the SIRT1 antagonist EX-527 restored IL-17A production and RORyt expression in Th17 differentiated from CD4 T cells treated by SIRT1 activators (Figures 5E and 5F). Using intracellular staining, we validated that SIRT1 agonists reduced IL-17A expression in human Th17 cells (Figure 5G). The SIRT1 antagonist EX-527 restored IL-17A expression (Figure 5G). Like in mouse settings, we also observed that SIRT1 activators did not affect *Ifng* and *Tbx21* mRNA expression in Th1, *Gata3*, *il4*, and *il13* mRNA expression in Th2 and *Ctla4*, *Gitr*, and *Foxp3* mRNA expression in iTreg cells generated in vitro (Figure S5B).

Using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from blood healthy donors, we isolated by flow cytometry memory CD4 T cell subpopulations using chemokine receptor labeling as previously described (Mahnke and Roederer, 2007; Thibaudin et al., 2015). Th1 ($CXCR3^+$ $CCR6^-$), Th2 ($CXCR3^-$ $CCR6^-$ $CCR4^+$), iTreg ($CD25^+$ $Foxp3^+$), and Th17 cells ($CXCR3^-$ $CCR6^+$) were characterized (Figure S6A). We validated the purity of each subset by ELISA and qPCR as we previously reported (Thibaudin et al., 2015). Th17 cells were treated ex vivo with SIRT1 agonists during 3 days with TCR stimulation in presence of Th17-polarizing cytokines. Using qPCR, we observed that such treatment reduced *Rorc* and *il17a* mRNA expression in Th17 cells (Figure 5H). We validated that SIRT1 agonists reduced IL-17A production in Th17 by ELISA (Figure S6B) and by intracellular staining (Figure S6C). This effect is blunted by the SIRT1 antagonist EX-527 (Figures S6D and S6E).

Together, these data demonstrate that SIRT1 agonists blunt selectively in vitro differentiation of human naive T cells into Th17 cells but also Th17 program of memory Th17 cells.

Administration of the SIRT1 Agonist Metformin to Metastatic Colon Cancer Patients Blunts IL-17A Production by Blood Th17 Cells

To test the clinical relevance of our observations, we determined the effect of the SIRT1 agonist metformin in patients bearing metastatic colorectal cancer. We focused on metastatic colorectal cancer because previous reports have shown an accumulation of Th17 cells in PBMCs and that IL-17A in tumors is associated with poor prognosis (Tosolini et al., 2011). We selected metastatic colorectal cancer patients still untreated by chemotherapy and diagnosed with a non insulino-dependent diabetes and for whom a treatment by metformin (500 mg per day bid) was proposed by the oncologist. We could include 10 patients (7 men and 3 women; mean age of 65 years; clinical and biological characteristics of the patients are presented in Figure S6F and Table S1). Blood samples were obtained before and after 1-month metformin treatment initiation. Using CXCR3 and CCR6 labeling, we tested STAT3 acetylation in Th17 cells (Figure 6A). We observed that the treatment induced a downregulation of STAT3 acetylation in Th17 lymphocytes (Figure 6B). The frequency of each T helper subset is not affected by this treatment (Figure 6C). However, the frequency of IL-17A-producing Th17 cells determined by intracellular staining is significantly reduced by metformin treatment (Figure 6D). In contrast, the frequency of IFN-γ production by Th1 cells and Foxp3 expression by Treg cells is not affected by the treatment (Figure 6D).

Together, these data corroborate that in vivo metformin deacetylates STAT3 and reduces the production of IL-17A by Th17 cells in metastatic colorectal cancer patients.

DISCUSSION

SIRT1 is a member of the family of class III deacetylases (NAD^+-dependent). This enzyme is involved in the control of many cellular pathways, including metabolism, stress, and genome stability. In the context of T cell biology, SIRT1-deficient mice

(F) Monitoring of tumor growth of B16F10 melanoma cells in C57BL/6 and $IL17a^{-/-}$ mice. Mice were also treated with Rsv (left) or metformin (right).
(G) Monitoring of tumor growth of CT26 colon cancer cells in BALB/c mice injected with an anti-IL-17A antibody (200 mg/day injected on day 0, 1, 2, 3, 4, and 6) or control rat immunoglobulin G (Ig). Mice were also treated with Rsv (left) or metformin (right).
(H) Monitoring of tumor growth of B16F10 melanoma cells in fl-SIRT1 control mice (left) or in $CD4^{SIRT1-/-}$ mice (right) treated or not with metformin, and tumor growth was monitored over 3 weeks.
All experiments were done two times with seven to eight mice per group.
NS, not significant; $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, and $^{***}p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Data are from two (A–H) independent experiments with seven to eight mice per group (median and SEM) or are from one representative of two independent experiments (C).

OPEN ACCESS
CellPress

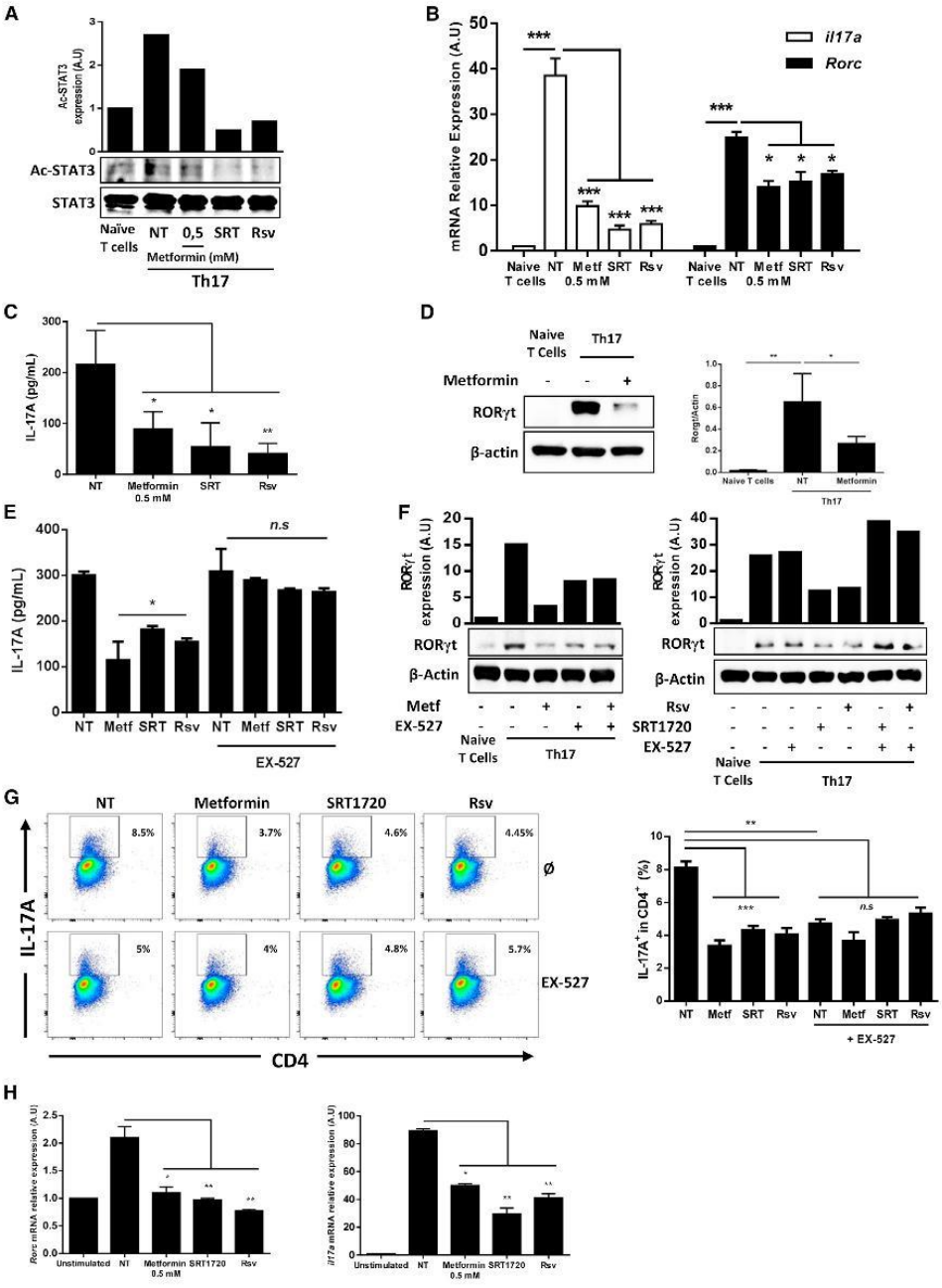


Figure 5. SIRT1 Agonists Are Also Effective on Human Th17 Cells

CD4 naive T cells ($CD4^+$ $CD45RA^+$) were sorted from the blood of healthy volunteers and then differentiated or not into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hr, treated or not with the SIRT1 agonists (0.5 mM metformin, Rsv, and SRT1720).

(A) Expression of Ac-STAT3 was assessed by western blotting in naive T cells or differentiated Th17 cells after 6 hr of culture (lower panel). STAT3 was used as a reference for Ac-STAT3 quantification (A.U, arbitrary unit) (upper panel).

(legend continued on next page)

show increased T cell activation and a breakdown of $CD4^+$ T cell tolerance. SIRT1 interacted with and deacetylated c-Jun, thus resulting in an inactive AP-1 factor. SIRT1-deficient mice were unable to maintain T cell tolerance and developed severe experimental allergic encephalomyelitis, a Th17-dependent disease as well as spontaneous autoimmunity (Zhang et al., 2009). Similar results were also obtained by another team that used Rsv as a SIRT1 activator and observed that such treatment could globally reduce T cell activation (Zou et al., 2013). This led to the hypothesis that SIRT1 may have a general role in the control of excessive autoimmune responses. In contrast, in reports using $CD4^{SIRT1-/-}$ mice to investigate the role of SIRT1 deletion specifically in the CD4 T cell compartment, authors observed that SIRT1 invalidation does not affect function of effector cells in contrast to the previous report that was generated using SIRT1 knockout mice. This difference may be explained by the effect of SIRT1 in other cells such as myeloid cells. In $CD4^{SIRT1-/-}$ mice, Treg numbers and their suppressive function are increased. It was reported that Foxp3 is deacetylated by SIRT1, and SIRT1 inhibition leads to increased Foxp3 acetylation, which makes Foxp3 more resistant to proteasomal degradation and thus stabilizes it post-translationally (Akimova et al., 2014; Beier et al., 2011). Such SIRT1 inactivation promotes prolonged allograft survival and limits the development of experimental colitis, thus suggesting that SIRT1 inhibition could be deleterious in cancer. Together, these data suggest that SIRT1 activity in CD4 T cells is proinflammatory by limiting the Treg transcriptional program. In the context of Th9 differentiation, SIRT1 controls mTOR-HIF1α signaling, inhibits Th9 cell differentiation, and limits Th9-dependent antitumor immunity (Wang et al., 2016). Recently, Lim et al. (2015) tested the role of basal SIRT1 function in a transgenic model using mice generated by crossing Flox-SIRT1 mice with RORc-Cre mice, leading to the specific deletion of SIRT1 in RORγt-expressing cells. In this model, they observed that SIRT1 deletion blunts RORγt transcriptional activity and limits Th17 cell generation and function. The mechanism relies on the ability of SIRT1 to induce deacetylation of RORγt, thus enhancing its transcriptional activity. Similar results were also observed in our experiments. Importantly, this report and all other reports that addressed SIRT1 function in T cells only focuses on the basal effect of SIRT1 without activation and not its pharmacological activation. Our study unravels a biphasic role of SIRT1 on Th17 polarization with a capacity to induce Th17 differentiation on basal status and a capacity to impede Th17 differentiation after pharmacological activation. Previous reports suggested that some endogenous proteins like AROS could modestly activate SIRT1 function in comparison to ligand such as Rsv (Kim et al., 2007). We therefore could speculate that endogenous activation of SIRT1 enhances Th17 function by deacetylation of RORγt, whereas high activation of SIRT1 via pharmacological activators in therapeutic setting induces inhibition of Th17 differentiation via STAT3 deacetylation.

SIRT1 regulates a wide variety of cellular functions. SIRT1 was shown to deacetylate histone like H3K9, thus leading to the induction of a repressive transcriptional complex (Chen et al., 2015). SIRT1 can act on many non-histone proteins, including transcription factors, transcriptional coregulatory proteins, and histones. These functions mediate stress resistance, apoptosis, hypoxia, inflammatory signaling, and autophagy as physiological responses to environmental toxicity. Although SIRT1 was previously shown to deacetylate STAT3 in gastric cancer cells (Lu et al., 2014), keratinocytes (Sestito et al., 2011), and liver cells (Nie et al., 2009), the effect of SIRT1 on STAT3 acetylation and the role of STAT3 acetylation in CD4 T cells have not been explored. Our work shows that SIRT1 activation induces competition between p300 and SIRT1 in Th17 cells, thus leading to deacetylation of STAT3, its absence of migration into the nucleus, and reduction of its transcriptional function on the Th17 program. However, we cannot exclude that SIRT1 could also act on epigenetic modifications of histones or other transcription factors that could affect Th17 cell differentiation.

Many studies describe some anticancer properties of SIRT1 agonist like SRT1720 (Chauhan et al., 2011) or Rsv (Bishayee, 2009). In addition, the commonly used antidiabetic drug metformin could induce SIRT1 expression and activation in an AMPK-dependent manner (Song et al., 2015). The anticancer effect of metformin is currently well known clinically and experimentally, but the mechanism of action of metformin remains obscure. Metformin was shown to exert both chemopreventive and chemotherapeutic activities. Notably, it has been shown that cancer rates in diabetics using metformin are lower than in patients using other insulin-sensitizing agents or insulin (Chlebowski et al., 2012; Gong et al., 2016; He et al., 2016). In addition, metformin is known to affect tumor growth and cancer prognosis in different mouse and human cancers (Aldea et al., 2014; Pernicova and

(B) qRT-PCR analysis of *Rorc* and *il17a* mRNA expression was assessed on hour 6 (*Rorc*) and on day 3 (*il17a*) of culture. Expression is presented relative to *Actb* expression.

(C) IL-17A secretion was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture.

(D) Expression of RORγt was assessed using western-blotting experiment (left panel), and quantification using β-actin as reference is shown (right panel).

(E) Same as in (C), but a treatment with an inhibitor of SIRT1, EX-527, was also performed in some conditions. IL-17A secretion was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture.

(F) Same as in (E), but expression of RORγt was assessed using western-blotting experiment after 3 days of culture. β-Actin was used as loading control and as a reference for RORγt quantification (A.U, arbitrary unit).

(G) Same as in (E), but IL-17A expression was assessed using intracellular cytokine staining after 3 days of culture. Numbers beside outlined areas indicate percentage of cells in gate. Representative data from one of three independent experiments are shown.

(H) Memory Th17 ($CD4^+$ $CD45RA^-$ $CCR6^+$ $CXCR3^-$) cells were sorted from blood of healthy volunteers and stimulated in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hr, treated or not with the SIRT1 agonists. qRT-PCR analysis of *Rorc* (left panel) and *il17a* (right panel) mRNA expression were assessed after 3 days of culture. Expression is presented relative to *Actb* expression.

NS, not significant; $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, and $^{***}p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Data are from three (B, C, E, G, and H) independent experiments (median and SEM). (A), (D), (F), and (G) are one representative of three independent experiments.

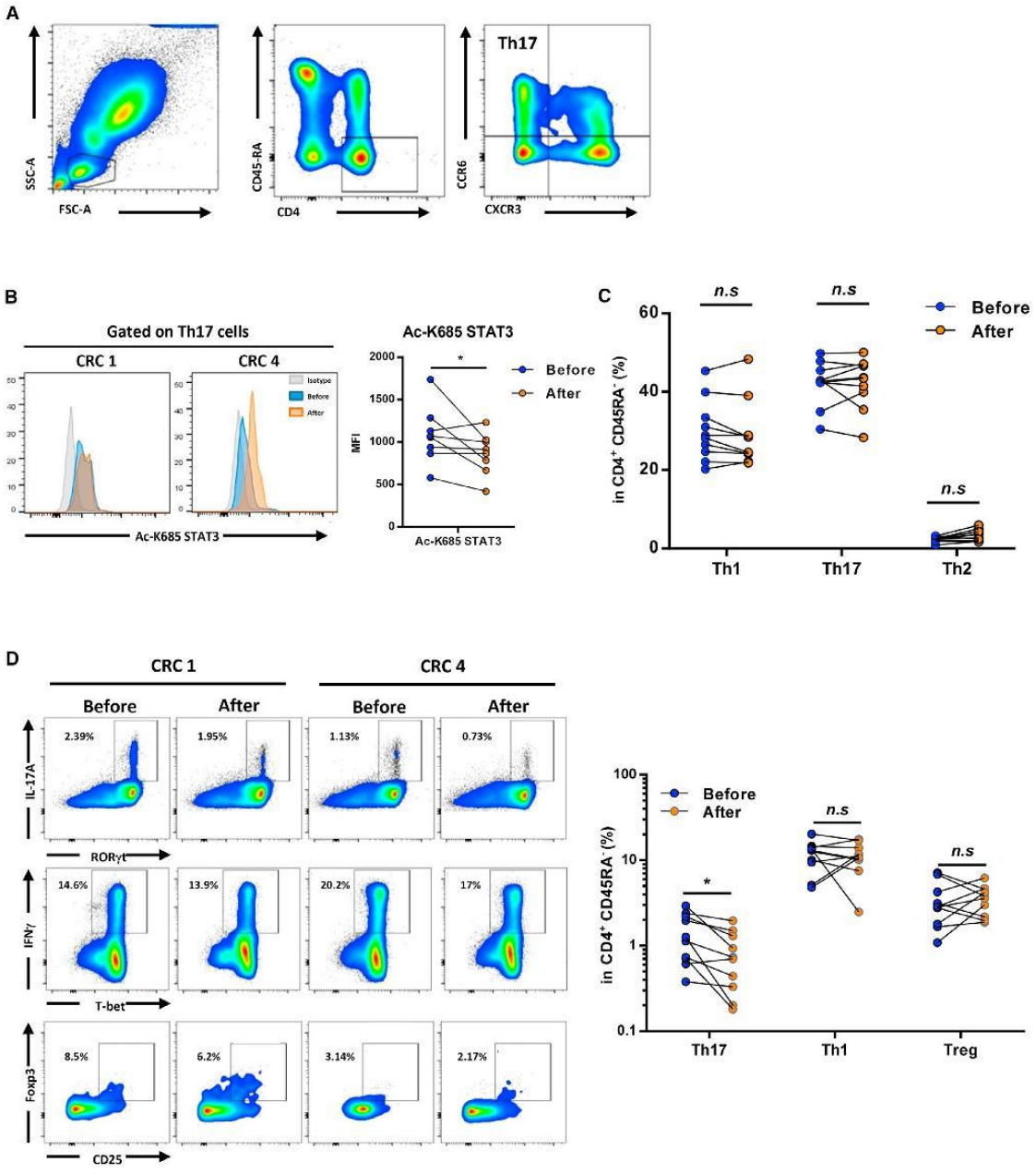


Figure 6. Administration of the SIRT1 Agonist Metformin to Metastatic Colon Cancer Patients Blunts IL-17A Production by Blood Th17 Cells

Ten mCRC patients still untreated by chemotherapy and diagnosed with a non insulino-dependent diabetes were selected and treated by metformin (500 mg per day bid). Blood samples were obtained before and after 1-month metformin treatment initiation.

(A) Flow cytometry-gating strategy to identify memory Th17 cells through chemokine receptor expression.

(B) Expression of Ac-STAT3 was assessed by intracellular cytokine staining before and after metformin treatment; (left panel) two representative histograms are shown; (right panel) mean fluorescence intensity (MFI) for eight patients is shown.

(C) Proportion of memory Th1, Th2, and Th17 cells was assessed by flow cytometry before and after metformin treatment.

(legend continued on next page)

Korbonits, 2014; Yin et al., 2013). The typically used concentrations in such studies are 5–30 mM, which are much higher than the plasma and tissue concentrations measured in individuals who have received recommended therapeutic doses, and less than 1 mM metformin has little effect on cancer cell proliferation. Therefore, we decided to use an in vitro dosage of 0.5 mM, which does not affect mTor. In addition, the relevance of in vitro dosage is experimentally validated by the in vivo results in mice and humans, which give similar results. In the context of inflammatory disease or hepatocellular carcinoma, a high dosage of metformin reduces Th17 cells, but this effect is dependent on mTor pathway inhibition (Sun et al., 2016; Zhao et al., 2015). The respective role of SIRT1 activation versus mTor inhibition was not tested, and the link between metformin effect on SIRT1 and Th17 polarization was not tested. Our model highlights a function of SIRT1 activators as defined by the selective targeting of SIRT1 and not mTor pathway in vitro and in vivo in mice and humans. Using this strategy, we observed that SIRT1 activators blunt only Th17 polarization and affect tumor growth only in immunocompetent mice. Moreover, metformin antitumor effect is aborted in $CD4^{SIRT1-/-}$ mice in our settings. Together, such data suggest that only a low dose of metformin can selectively modulate the SIRT1 pathway. Such treatment affects tumor growth mostly by targeting Th17 polarization in a SIRT1-dependent manner.

In conclusion, our study unravels the particular ability of pharmacological activation of SIRT1 to limit STAT3 acetylation in Th17 cells, thus limiting the STAT3-dependent initiation of the Th17 program. We propose that pharmacological activation of SIRT1 using a low dose of metformin could be a valuable tool to control deleterious Th17 expansion in cancer patients.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse Strains

All animals were bred and maintained according to both the Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, Dijon, France). Animals were used between 6 and 22 weeks of age.

In Vitro T Cell Differentiation

Naive $CD4^+$ T cells ($CD4^+$ $CD62L^{hi}$) were obtained from spleens and lymph nodes of C57BL/6 WT or fl-CD4/Sirt-1-Cre mice. Purification of $CD4^+$ T cells was achieved as described by Berger et al. (2013).

Human Sample

Experiments on human $CD4^+$ T cells were carried out using peripheral blood from healthy volunteers (provided by the "Etablissement Français du Sang," Besançon, France). Written informed consent was obtained from all healthy blood donors.

Between January 2014 and December 2015, we collected whole blood from (n = 10) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients in the Centre Georges François Leclerc. Because of concomitant diagnosis of diabetes, a metformin treatment (500 mg twice a day) was introduced. A blood sample was harvested before initiation of metformin and 1 month later. All patients gave informed consent approved by the local ethics committee. The collection of blood sample was authorized by French authorization number AC2014-2460.

ChIP Assay

Purified naive T cells were differentiated for 6 hr into murine Th0 or Th17 cells with or without metformin, Rsv, or SRT720. ChIP was conducted according to the manufacturer's instructions (ChiP-IT Express Enzymatic; Active Motif). Primers designed to assess ChIP assay are as described in Table S2.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA from T cells was extracted with TriReagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), and analyzed by real-time qPCR with the SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primers designed to assess gene expression are as described in Table S3.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, six figures, and three tables and can be found with this article online at http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.004.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.G., D.D., and L.A. conceived the experiments. E.L. and M.T. performed all experiments and analyzed the results. R.E., H.B., P.C., F.V., E.H., R.B., C.R., and V.D. participated in some experiments. R.E., H.B., P.C., F.V., E.H., R.B., C.R., V.D., S.L., and L.A. read the manuscript. E.L., M.T., D.D., and F.G. wrote the manuscript. L.A., S.L., R.B., F.V., D.D., and F.G. sustained this project.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are supported by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (F.G.), Fondation de France (L.A.), Institut National du Cancer (F.G.), Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA20131200160) (S.L.), Conseil Régional Bourgogne, the FEDER, INSERM (E.L., D.D., and M.T.), Fondation Lilliane Betancourt (R.E.), the French National Research Agency (ANR-13-JSV3-0001 [L.A.] and ANR-11-LABX-0021), Ligue Régionale contre le Cancer Comité Grand-Est (L.A., S.L., R.B., F.V., E.L., and D.D.), Cancéropôle Grand-Est (L.A.), and the European Community (Marie Curie Fellowship PCIG10-GA-2011-303719) (L.A.).

Received: December 29, 2016
Revised: February 24, 2017
Accepted: March 31, 2017
Published: April 25, 2017

REFERENCES

Akimova, T., Xiao, H., Liu, Y., Bhatti, T.R., Jiao, J., Eruslanov, E., Singhal, S., Wang, L., Han, R., Zacharia, K., et al. (2014). Targeting sirtuin-1 alleviates experimental autoimmune colitis by induction of $Foxp3^+$ T-regulatory cells. Mucosal Immunol. *7*, 1209–1220.

Aldea, M., Craciun, L., Tomuleasa, C., Berindan-Neagoe, I., Kacso, G., Florian, I.S., and Crivii, C. (2014). Repositioning metformin in cancer: genetics, drug targets, and new ways of delivery. Tumor Biol. *35*, 5101–5110.

Beier, U.H., Wang, L., Bhatti, T.R., Liu, Y., Han, R., Ge, G., and Hancock, W.W. (2011). Sirtuin-1 targeting promotes $Foxp3^+$ T-regulatory cell function and prolongs allograft survival. Mol. Cell. Biol. *31*, 1022–1029.

(D) Expression of RORγt, IL-17A, T-bet, IFN-γ, and Foxp3 to identify Th17 ($ROR\gamma t^+$ $IL\text{-}17A^+$), Th1 ($T\text{-}bet^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$), and Treg cells ($CD25^{high}$ $Foxp3^+$) was assessed by intracellular cytokine staining before and after metformin treatment. Numbers beside outlined areas indicate percentage of cells in gate. Representative data from 2 of 10 patients are shown (left panel). Percentage of positive cells for each patient is shown (right panel).
NS, not significant; $^*p < 0.05$ (paired Mann-Whitney test). Data are from ten mCRC patients.

Berger, H., Végran, F., Chikh, M., Gilardi, F., Ladoire, S., Bugaut, H., Mignot, G., Chalmin, F., Bruchard, M., Derangère, V., et al. (2013). SOCS3 transactivation by PPARγ prevents IL-17-driven cancer growth. Cancer Res. *73*, 3578–3590.

Bettelli, E., Kom, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of T_H17 cells. Nature *453*, 1051–1057.

Bishayee, A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. Cancer Prev. Res. (Phila.) *2*, 409–418.

Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., et al. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat. Med. *19*, 57–64.

Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Végran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangère, V., Vincent, J., Masson, D., et al. (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. Immunity *36*, 362–373.

Chandel, N.S., Avizonis, D., Reczek, C.R., Weinberg, S.E., Menz, S., Neuhaus, R., Christian, S., Haegebarth, A., Algire, C., and Pollak, M. (2016). Are metformin doses used in murine cancer models clinically relevant? Cell Metab. *23*, 569–570.

Chauhan, D., Bandi, M., Singh, A.V., Ray, A., Raje, N., Richardson, P., and Anderson, K.C. (2011). Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells. Br. J. Haematol. *155*, 588–598.

Chen, C.W., Koche, R.P., Sinha, A.U., Deshpande, A.J., Zhu, N., Eng, R., Doench, J.G., Xu, H., Chu, S.H., Qi, J., et al. (2015). DOT1L inhibits SIRT1-mediated epigenetic silencing to maintain leukemic gene expression in MLL-rearranged leukemia. Nat. Med. *21*, 335–343.

Chini, C.C., Espindola-Netto, J.M., Mondal, G., Guerrico, A.M., Nin, V., Escande, C., Sola-Penna, M., Zhang, J.S., Billadeau, D.D., and Chini, E.N. (2015). SIRT1-activating compounds (STAC) negatively regulate pancreatic cancer cell growth and viability through a SIRT1 lysosomal-dependent pathway. Clin. Cancer Res. *22*, 2496–2507.

Chlebowski, R.T., McTiernan, A., Wactawski-Wende, J., Manson, J.E., Aragaki, A.K., Rohan, T., Ipp, E., Kaklamani, V.G., Vitolins, M., Wallace, R., et al. (2012). Diabetes, metformin, and breast cancer in postmenopausal women. J. Clin. Oncol. *30*, 2844–2852.

Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkhurst, C.N., Muratet, M., et al. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. Cell *151*, 289–303.

Dong, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nat. Rev. Immunol. *8*, 337–348.

Durant, L., Watford, W.T., Ramos, H.L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., Takahashi, H., Sun, H.W., Kanno, Y., Powrie, F., and O'Shea, J.J. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. Immunity *32*, 605–615.

Gaffen, S.L. (2008). An overview of IL-17 function and signaling. Cytokine *43*, 402–407.

Ghisays, F., Brace, C.S., Yackly, S.M., Kwon, H.J., Mills, K.F., Kashentseva, E., Dmitriev, I.P., Curiel, D.T., Imai, S.I., and Ellenberger, T. (2015). The N-terminal domain of SIRT1 is a positive regulator of endogenous SIRT1-dependent deacetylation and transcriptional outputs. Cell Rep. *10*, 1665–1673.

Gong, Z., Aragaki, A.K., Chlebowski, R.T., Manson, J.E., Rohan, T.E., Chen, C., Vitolins, M.Z., Tinker, L.F., LeBlanc, E.S., Kuller, L.H., et al. (2016). Diabetes, metformin and incidence of and death from invasive cancer in postmenopausal women: results from the women's health initiative. Int. J. Cancer *138*, 1915–1927.

Han, L., Zhou, R., Niu, J., McNutt, M.A., Wang, P., and Tong, T. (2010). SIRT1 is regulated by a PPARγ-SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. Nucleic Acids Res. *38*, 7458–7471.

Harikumar, K.B., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G., Diagaradjane, P., Anand, P., Pandey, M.K., Gelovani, J., Krishnan, S., Guha, S., and Aggarwal, B.B. (2010). Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. Int. J. Cancer *127*, 257–268.

Harper, C.E., Patel, B.B., Wang, J., Arabshahi, A., Eltoum, I.A., and Lamartiniere, C.A. (2007). Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice. Carcinogenesis *28*, 1946–1953.

He, D., Li, H., Yusuf, N., Elmets, C.A., Li, J., Mountz, J.D., and Xu, H. (2010). IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. J. Immunol. *184*, 2281–2288.

He, X.K., Su, T.T., Si, J.M., and Sun, L.M. (2016). Metformin is associated with slightly reduced risk of colorectal cancer and moderate survival benefits in diabetes mellitus: a meta-analysis. Medicine (Baltimore) *95*, e2749.

Hung, C.H., Chan, S.H., Chu, P.M., Lin, H.C., and Tsai, K.L. (2016). Metformin regulates oxLDL-facilitated endothelial dysfunction by modulation of SIRT1 through repressing LOX-1-modulated oxidative signaling. Oncotarget *7*, 10773.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17$^+$ T helper cells. Cell *126*, 1121–1133.

Kim, E.J., Kho, J.H., Kang, M.R., and Um, S.J. (2007). Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. Mol. Cell *28*, 277–290.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. Immunity *26*, 371–381.

Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J. Exp. Med. *203*, 2271–2279.

Lim, H.W., Kang, S.G., Ryu, J.K., Schilling, B., Fei, M., Lee, I.S., Kehasse, A., Shirakawa, K., Yokoyama, M., Schnölzer, M., et al. (2015). SIRT1 deacetylates RORγt and enhances Th17 cell generation. J. Exp. Med. *212*, 607–617.

Liu, J., Duan, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, W., Long, H., Lin, Z., and Zhu, B. (2011). IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. *407*, 348–354.

Loncle, C., Bonjoch, L., Folch-Puy, E., Lopez-Millan, M.B., Lac, S., Molejon, M.I., Chuluyan, E., Cordelier, P., Dubus, P., Lomberk, G., et al. (2015). IL17 functions through the novel REG3β-JAK2-STAT3 inflammatory pathway to promote the transition from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. Cancer Res. *75*, 4852–4862.

Lu, J., Zhang, L., Chen, X., Lu, Q., Yang, Y., Liu, J., and Ma, X. (2014). SIRT1 counteracted the activation of STAT3 and NF-κB to repress the gastric cancer growth. Int. J. Clin. Exp. Med. *7*, 5050–5058.

Mahnke, Y.D., and Roederer, M. (2007). Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. Clin. Lab. Med. *27*, 469–485, v.

Martin, F., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2012). Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-β-dependent immunosuppressive activity? Trends Mol. Med. *18*, 742–749.

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. Immunity *31*, 787–798.

Nie, Y., Erion, D.M., Yuan, Z., Dietrich, M., Shulman, G.I., Horvath, T.L., and Gao, Q. (2009). STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. Nat. Cell Biol. *11*, 492–500.

Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. Blood *101*, 2620–2627.

Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014). Metformin–mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat. Rev. Endocrinol. *10*, 143–156.

Ruan, Q., and Chen, Y.H. (2012). Nuclear factor-κB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. Adv. Exp. Med. Biol. *946*, 207–221.

Sestito, R., Madonna, S., Scarponi, C., Cianfarani, F., Failla, C.M., Cavani, A., Girolomoni, G., and Albanesi, C. (2011). STAT3-dependent effects of IL-22 in human keratinocytes are counterregulated by sirtuin 1 through a direct inhibition of STAT3 acetylation. FASEB J. *25*, 916–927.

Song, Y.M., Lee, Y.H., Kim, J.W., Ham, D.S., Kang, E.S., Cha, B.S., Lee, H.C., and Lee, B.W. (2015). Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. Autophagy *11*, 46–59.

Stritesky, G.L., Yeh, N., and Kaplan, M.H. (2008). IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. J. Immunol. *181*, 5948–5955.

Sun, Y., Tian, T., Gao, J., Liu, X., Hou, H., Cao, R., Li, B., Quan, M., and Guo, L. (2016). Metformin ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating T helper 17 and regulatory T cells in mice. J. Neuroimmunol. *292*, 58–67.

Thibaudin, M., Chaix, M., Boidot, R., Végran, F., Derangère, V., Limagne, E., Berger, H., Ladoire, S., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2015). Human ectonucleotidase-expressing CD25(high) Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. Oncolmmunology *5*, e1055444.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.H., Pagès, F., and Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer Res. *71*, 1263–1271.

Tyack, P.L., Calambokidis, J., Friedlaender, A., Goldbogen, J., and Southall, B. (2015). Formal comment on Schorr GS, Falcone EA, Moretti DJ, Andrews RD (2014) First long-term behavioral records from Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*) reveal record-breaking dives. PLoS One 9(3): e92633. doi: 10.1371/journal.pone.0092633. PloS One *10*, e0142287.

Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. J. Exp. Med. *206*, 43–49.

Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. J. Exp. Med. *206*, 1457–1464.

Wang, Y., Bi, Y., Chen, X., Li, C., Li, Y., Zhang, Z., Wang, J., Lu, Y., Yu, Q., Su, H., et al. (2016). Histone deacetylase SIRT1 negatively regulates the differentiation of interleukin-9-producing $CD4^+$ T cells. Immunity *44*, 1337–1349.

Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J.E., Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell *82*, 241–250.

Yin, M., Zhou, J., Gorak, E.J., and Quddus, F. (2013). Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Oncologist *18*, 1248–1255.

Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Chatterjee, D., and Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. Science *307*, 269–273.

Zhang, J., Lee, S.M., Shannon, S., Gao, B., Chen, W., Chen, A., Divekar, R., McBurney, M.W., Braley-Mullen, H., Zaghouani, H., and Fang, D. (2009). The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. J. Clin. Invest. *119*, 3048–3058.

Zhang, E., Guo, Q., Gao, H., Xu, R., Teng, S., and Wu, Y. (2015). Metformin and resveratrol inhibited high glucose-induced metabolic memory of endothelial senescence through SIRT1/p300/p53/p21 pathway. PLoS One *10*, e0143814.

Zhao, D., Long, X.D., Lu, T.F., Wang, T., Zhang, W.W., Liu, Y.X., Cui, X.L., Dai, H.J., Xue, F., and Xia, Q. (2015). Metformin decreases IL-22 secretion to suppress tumor growth in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma. Int. J. Cancer *136*, 2556–2565.

Zhuang, S. (2013). Regulation of STAT signaling by acetylation. Cell. Signal. *25*, 1924–1931.

Zou, T., Yang, Y., Xia, F., Huang, A., Gao, X., Fang, D., Xiong, S., and Zhang, J. (2013). Resveratrol inhibits $CD4^+$ T cell activation by enhancing the expression and activity of Sirt1. PLoS One *8*, e75139.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Impact des polyphénols du vin sur le système immunitaire et la réponse inflammatoire comme acteurs majeurs de prévention nutritionnelle

Pauline CHALONS

Aujourd'hui, la consommation moyenne de vin en France est d'environ 40 litres de vin par personne et par an, ce qui classe les français comme les premiers consommateurs mondiaux de cette boisson. De plus dans notre belle région viticole, il est logique de se demander quels sont les effets qu'une consommation de vin peut avoir sur la santé de la population. Dans le cas des gros buveurs (au-delà de trois verres de vin par jour), des effets néfastes principalement dus à l'éthanol sont clairement observés (cirrhose du foie, cancer, infarctus, …). En revanche, il est généralement admis qu'une consommation modérée (un ou deux verres de vin par jour) est bonne pour la santé lorsqu'elle est accompagnée d'une alimentation saine et variée. Cet effet bénéfique est avéré par de nombreuses études épidémiologiques concernant principalement l'espérance de vie globale ou les maladies coronariennes, mais quelques travaux suggèrent des effets bénéfiques vis-à-vis du cancer. Or il s'avère que l'inflammation et plus particulièrement l'inflammation chronique, est l'un des mécanismes prépondérants à l'initiation et au développement d'une tumeur. Cette étude a eu comme objectif d'étudier l'effet d'un extrait polyphénolique de vin rouge sur la production de cytokines pro-inflammatoire par deux acteurs du système immunitaire : le lymphocyte Th17, acteur de l'immunité adaptative et le macrophage, acteur de l'immunité innée. Nous avons pu montrer pour la première fois, que l'extrait polyphénolique de vin est capable de moduler l'activité pro-inflammatoire du système immunitaire en diminuant la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire IL-17 par le lymphocyte Th17 ainsi qu'en affaiblissant l'activité de l'inflammasome NLRP3 des macrophages, menant ainsi à la diminution sécrétion de cytokine pro-inflammatoire IL-1β.

L'extrait polyphénolique de vin rouge pourrait donc être un axe nutritionnel important dans la prévention de l'inflammation et des maladies inflammatoires.

Mots-clés : inflammation, cancer, prévention primaire, extrait polyphénolique de vin rouge, mort cellulaire, cytokines pro-inflammatoires, inflammasome NLRP3, lymphocyte Th17.