

République Algérienne Démocratique Et Populaire

Ministère de L'Enseignements Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad DAHLAB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de master en

Spécialité : Nutrition et Diététique Humaine

Filière : Sciences Alimentaires

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Thème

**Mise en évidence de l'effet radio-sensibilisateur de la pectine d'orange
modifiée sur les Cellules HEP2 de larynx par Cytométrie en flux**

Présenté par : M^{elle} KEBAIRIA Raounak

Devant le jury composé de :

M^r OUSSADOU Larbi	MCA	USDB1	Président
M^{me} KADRI Farida	MCA	USDB1	Examinatrice
M^{me} ABDOUN-OUALLOUCHE K	Chercheurconfirmé	CRNA	Encadreur
M^{me} KANANE Amel	MCB	USDB1	Co-Encadreur
M^{me} SOUILAH Souâd	Ingénieurspécialisé	CRNA	Invitée

Année universitaire 2020/2021



REMERCIEMENTS



D'abord je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé, la force et le Courage afin de pouvoir réussir ce travail malgré les conditions difficiles.

Je remercie vivement Mr OUSSADOU Larbi, maître de conférences A à la faculté Saad Dahleb Blida 1, pour m'avoir fait l'honneur de présider et juger ce mémoire ainsi que Mme Kadri Farida d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à ma promotrice, Mme ABDOUN-OUALLOUCHE Khalida. Merci pour votre écoute, votre soutien et vos encouragements tout au long de ce travail.

Je vous remercie non seulement de m'avoir encadré, mais également pour votre disponibilité, votre implication et vos précieux conseils qui m'ont permis de mener mon travail à bon port.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à ma Co-promotrice Madame KANANE Amel. Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour moi un modèle. Votre gentillesse et votre disponibilité permanente ont toujours suscité mon admiration. Vos encouragements, m'ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ce travail. J'espère avoir été à la hauteur.

Je souhaite également remercier Mme SOUILAH Souad pour son aide précieuse et ses encouragements, et de m'avoir conseillée tout au long de mon stage pratique.

Je tiens également à remercier Mme Gais Soumeyya pour sa disponibilité pour les analyses en cytométrie en flux

Je tiens à remercier Mme DJEFAL-KERRAR Assia et Mr Moulla, Directeurs de Division des Applications Nucléaires du Centre de Recherche Nucléaire D'Alger (CRNA) de m'avoir accueillie et de m'avoir intégrer dans l'équipe du travail.

Je voudrais aussi souligner mon extrême gratitude à l'égard de mes enseignants qui m'ont soutenu tout au long de mon cursus universitaire

En guise de reconnaissance, je tiens à témoigner mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de mon stage de fin d'étude et à l'élaboration de ce modeste travail.



DEDICACES

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut.
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance,...,
C'est tout simplement pour qui je dédie ce travail...?

À ma très chère mère Akilafekrini qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude qui, si grande
qu'elle puisse être, ne sera à la hauteur de ses sacrifices et ses prières pour moi.
À mon père Mohamed mon premier encadrant, supporteur depuis ma naissance.

Qu'ils trouvent en moi la source de leur fierté. A qui je dois tout

À mes oncles surtout Sofiane et ma tante Fouzia pour m'avoir orienté et encouragé dans ma
vie personnelle et professionnelle.

À mes sœurs Radjaa et Radhoua pour leurs soutiens et vœux de réussite.

À mes grands-parents.

Merci à AHMED SERRIR Hamza pour son aide et ses conseils avisés

Enfin, merci à Amira, Zahia, Assia, Hadjer, Hafsa, Houda, Noussaiba, qui m'ont soutenue bien
au-delà de ce mémoire.

Résumé

La radiothérapie est l'une des thérapies primaires pour le cancer. Cependant, la radiorésistance est le problème majeur de cette thérapie. Dans le but d'y remédier, de nombreuses molécules d'origine naturelle sont étudiées pour sensibiliser les cellules cancéreuses qui développent cette radio-résistance.

Pour notre travail, nous nous intéressons à la pectine d'orange qui après sa modification chimique et physique a montré un effet pro-apoptotique et radio-sensibilisateur sur les cellules tumorales du Larynx Humain HEP-2 (HumanEpithelioma type-2, ATCC). Ils sont révélés et évalués par la technique de cytométrie en flux.

Les résultats montrent un effet délétère de l'irradiation sur les cellules cancéreuses, ainsi que celui de la pectine modifiée, avec un effet apoptotique qui est aux environs de (30%). Par contre le traitement concomitant n'a pas montré l'effet radiosensibilisant escompté.

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire ont montré une accumulation des cellules dans la phase G2/M dans le cas du traitement combiné (pectine+irradiation) par rapport au témoin suggérant un arrêt du cycle en phase G2.

Mots clés: Pectine d'Orange, Modification chimique et physique, Radio-sensibilisation, Cycle cellulaire, Apoptose, cytométrie en flux, HEP-2.

المُلخَص

العلاج الإشعاعي هو واحد من العلاجات الأولية للسرطان. ومع ذلك ، فإن العلاج الإشعاعي هو المشكلة الرئيسية في هذا العلاج. من أجل علاج هذه المشكلة، تتم دراسة العديد من الجزيئات ذات الأصل الطبيعي لتوعية الخلايا السرطانية التي تطور هذه المقاومة الراديوية لعملائنا، ونحن مهتمون في البكتين البرتقالي الذي بعد تعديله الكيميائي والفيزيائية أظهرت تأثير الموالية للأبوتوتيك والحساسية الإشعاعية على الخلايا السرطانية الظهارية البشرية من النوع 2 (HEp-2) الحنجرة الورم. يتم الكشف عنها وتقييمها عن طريق تقنية قياس التدفق الخلوي. تظهر النتائج تأثيرا ضارا للإشعاع على الخلايا السرطانية ، وكذلك تأثير البكتين المعدل ، مع تأثير أبوتوتي حوالي (30%). ومن ناحية أخرى، لم يظهر العلاج المصاحب التأثير المتوقع للحساسية الإشعاعية. وأظهرت نتائج تحليل دورة الخلية تراكم الخلايا في مرحلة G2/M في حالة العلاج المشترك (البكتين الإشعاع) مقارنة بالتحكم الذي يشير إلى توقف الدورة في مرحلة G2.

الكلمات الرئيسية: بكتين البرتقال، التعديل الكيميائي والمادي، التوعية الراديوية، دورة الخلية، موت الخلايا المبرمج، قياس التدفق الخلوي، HEp-2.

Abstract

Radiation therapy is one of the primary therapies for cancer. However, radioresistance is the major problem with this therapy. In order to remedy this problem, many molecules of natural origin are studied to sensitize cancer cells that develop this radio-resistance.

For our work, we are interested in orange pectin which after its chemical and physical modification has shown a pro-apoptotic and radiosensitizing effect on Human Epithelioma type-2 (HEp-2) Larynx tumor cells. They are revealed and evaluated by flow cytometry technique.

The results show a deleterious effect of irradiation on cancer cells, as well as that of modified pectin, with an apoptotic effect of about (30%). On the other hand, the concomitant treatment did not show the expected radiosensitizing effect.

The results of the cell cycle analysis showed an accumulation of cells in the G2/M phase in the case of the combined treatment (pectin+irradiation) compared to the control suggesting a cycle arrest in G2 phase.

Key words: Orange pectin, Chemical and physical modification, Radio-sensitization, Cell cycle, Apoptosis, Flow cytometry, HEp-2.

Liste des abréviations

- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- Akt:** Protéine Kinase isolée à partir du retrovirus AKT
- ARN:** Acideribonucléique
- ATM:** Ataxia Telangiectasia Mutated
- ATR:** Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
- Bcl-2:** B-cell lymphoma 2
- BER:** Base Excision-Resynthesis
- BSA:** Bovine SérumAlbumine
- CDB:** Cassure Double Brin
- Chk1:** Checkpoint 1
- CMIP:** Citrus Modified and Irradiated Pectin
- CMP:** Citrus Modified Pectin
- CP:** Citrus Pectin
- CRD:** Carbohydate Reconnaissance Domain
- CSB:** Cassure simple brin
- DALY:** L'espérance de vie corrigée de l'incapacité
- DAPI:** 4',6' diamidino-2-phényl-indole
- DE:** Degré d'Estérification
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DNA-PK:** DNA-dependent Protein Kinase
- DO:** DensitéOptique
- EGF:** Epidermal Growth Factor
- EV:** Electron volts
- FGF:** Fibroblast Growth Factor
- FTIR:**FourierTransformInfra Redspectroscopy
- Gal A:** Acide D-galacturonique
- Gal-3:** Galectine-3
- Gy:** Gray
- HEp2:**Cellules de carcinome laryngé humain
- HG:** Homogalacturonane

HM: Highly methylated
HTLV-1: Virus lymphotrophique T humain
IC50: Inhibitory concentration 50
IgG: Immunoglobulines G
KBr: Bromure de Potassium
KRas: Kristen Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog
LM: Low methoxyl
NER: *Nucleotide Excision-Resynthesis*
NHEJ: Non Homologous End Joining
ORL: Oto-Rhino-Laryngologie
PARP: Poly (ADP-ribose) polymérase
PBS: Phosphate Buffered Salin
PCa: Cellules du cancer de la prostate
PFA: Paraformaldehyde
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
POM: pectine d'orange modifiée
POMI: pectine d'orange modifiée et irradiée
RG-1 et RG-2: Rhamnogalacturonanes 1 et 2
RH: Recombinaison Homologue
RI: Rayonnement Ionisant
ROS: ReactiveOxygenSpecies
SQE: Motif du C-terminal de H2A
SRB: Sulforhodamine B
Sv: Sievert
SVF: Sérum de Veau Fœtal
TCA: TriChlorAcetic Acide
UV: Ultraviolet
VADS: Voies Aéro-Digestives Supérieures

Liste des figures

Figure 1: Localisation de la pectine au niveau de la paroi cellulaire	4
Figure 2: Structure chimique de la molécule de pectine.....	6
Figure 3: Les différents composants de la molécule de pectine et la préparation de la pectine modifiée.....	7
Figure 4: Activités anti-cancéreuses des différentes formes de pectine.....	8
Figure 5: Etapes de la cancérisation et de la cancérogénèse	9
Figure 6: Anatomie de larynx.....	10
Figure 7: Vue postérieure du larynx et des cordes vocales dans différents états	10
Figure 8: Principe des effets directs et indirects des rayonnements ionisant	14
Figure 9: Régulation des différents points de contrôle.....	15
Figure 10: Caractérisation morphologique des événements microscopiques de l'apoptose	16
Figure 11: Voies impliquées dans l'apoptose induite par les rayonnements ionisants.....	17
Figure 12: Structure tertiaire de la galectine-3.....	19
Figure 13: Agrégation homotypique des cellules tumorales.....	20
Figure 14: Inhibition de l'agrégation homotypique des cellules tumorales par la PCM.....	21
Figure 15: Précipitation de la pectine d'orange.....	24
Figure 16: Préparation des plaques multi-puits des HEP2 avant la mise en contact.....	26
Figure 17: Irradiation des cellules Hep2 par rayonnements gamma à 2Gy (irradiateur ELDORADO-78ACEL Unité de Cobalt 60).....	27
Figure 18: Le principe de la cytométrie en flux.....	28
Figure 19: Préparation des suspensions cellulaires pour l'analyse de l'apoptose par cytomètre de flux.....	29
Figure 20: Modification chimique de la pectine d'orange (POM): a) ajustement du pH, b) séchage, c) et d) pectine modifiée chimiquement (POM).....	32
Figure 21: Illustration des cellules HEP2 par microscope inversé (EVOS XL).....	33
Figure 22: Mise en évidence de l'apoptose par CMF des cellules HEP-2 par double marquage FITC-A et IP : a) témoin cellules non traitées; b) Après traitement à POMI (3mg/ml) ; c) Après traitement par irradiation à 2Gy au cobalt 60 ; d) Après traitement combiné (POMI+IRR).....	34
Figure 23: Effet du POMI et/ou Irradiation Gamma à 2Gy sur les cellules HEP-2.....	35
Figure 24: Mise en évidence de la distribution des populations cellulaires à travers les phases du cycle cellulaire après les différents traitements.....	38

Liste des tableaux

Tableau I: Les différents niveaux et sources de pectines végétales.....	4
Tableau II: Les différents stades du cancer du larynx.....	11
Tableau III: Effet de POMI et/ou Irradiation gamma à 2Gy sur les cellules HEP-2.....	35
Tableau VI: Effet de POMI et/ou Irradiation gamma à 2Gy sur le cycle cellulaire des cellules HEP-2.....	37

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie I: Recherche bibliographique

1. Pectine	4
1.1. Généralités sur la pectine.....	5
1.2. Domaines d'applications.....	5
1.3. Structure chimique des pectines.....	5
1.4. Propriétés physico-chimiques.....	6
1.5. Modification physico-chimique.....	7
2. Cancer	9
2.1. Généralités.....	9
2.2. Cancer du larynx.....	9
2.3. Épidémiologie de la pathogénie.....	12
2.4. Facteurs de risque.....	12
2.5. Prise en charge thérapeutique.....	12
3. Rayonnements ionisants	14
3.1. Définition et caractérisation.....	14
3.2. Mécanisme d'action des rayonnements ionisants.....	14
3.3. Réponse cellulaire face aux dommages radio-induits.....	15
3.4. Mécanisme de réparation des lésions radio-induites.....	15
3.5. Mort cellulaire radio-induite.....	16
3.6. Apoptose.....	16
3.7. Radiorésistance et radiosensibilité.....	17
4. Action de la pectine	19
4.1. Les galectines-3 et leur rôle dans la cancérisation.....	19
4.2. Activités anti-cancéreuses de la pectine modifiée, par interaction avec les galectines-3.....	20

Partie II: Matériels et Méthodes

1. Matériel	23
1.1. Matériel biologique.....	23
1.2. Matériel non biologique.....	23
2. Méthodes	23
2.1. Extraction de la pectine d'orange.....	23
2.2. Modification chimique de la pectine d'orange.....	23
2.3. Rendement de la pectine.....	24
2.4. Traitement physique de la pectine modifiée par irradiation.....	24
2.5. Culture cellulaire de la lignée cancéreuse Hep-2.....	24
2.6. Effet des différents traitements sur la lignée cancéreuse de larynx HEp-2.....	26
2.7. Analyse par cytométrie en flux.....	27
2.8. Analyse de l'effet des différents traitements sur l'apoptose des Cellules Hep-2.....	28
2.9. Analyse de l'effet des différents traitements sur l'évolution du cycle cellulaire.....	30

Partie III: Résultats et discussion

1. Rendement en pectine.....	32
2. Culture des HEp-2.....	32
3. Etude de l'effet des différents traitements sur les cellules HEp-2.....	33
3.1. Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux (CMF)	33
3.2. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux (CMF)	37
Conclusion et perspectives	41

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Introduction

La pectine est un mélange complexe de polysaccharides existant dans les parois cellulaires primaires des plantes supérieures, C'est un composé de longues molécules droites ou ramifiées à glucides simples (**Patterson, 2008**).

Connue comme un ingrédient alimentaire fonctionnel de grande valeur (E440) (**May et al, 1990**), elle est principalement utilisée comme gélifiants, épaississant et stabilisant. (**Suliman et al., 2013**). Elle a fait l'objet de nombreuses recherches et a attiré l'attention particulière des nutritionnistes en raison de ses potentialités d'utilisation.

Certaines études ont indiqué la richesse des pectines végétales en résidus galactosides jouant un rôle thérapeutique essentiel contre divers cancers (**Olano-Martin et al., 2003; Glinsky et Raz., 2009**).

En raison de sa structure complexe, la pectine peu soluble n'est pas dégradée par les cellules humaines par conséquent, des formes modifiées de pectine d'agrumes (MCP) ont été développé (**Baldwin et Shah, 1993; Pienta et al., 1995**). Il a été prouvé que la MCP joue un rôle plus important dans la suppression du cancer par son effet cytotoxique et antiprolifératif vis-à-vis des cellules cancéreuses en comparaison à la pectine native (**Glinsky et Raz., 2009, Hayashi et al., 2000**).

En effet, la MCP interagit avec une protéine anti apoptotique, la galectine-3 et inhibe ainsi la croissance tumorale et les métastases cancéreuses in vivo et in vitro en freinant l'agrégation, l'adhésion et l'angiogénèse dans divers types de cancers, notamment la prostate, le côlon, le sein, le mélanome et le myélome multiple (**Inohara et Raz, 1994; Hsieh et Wu, 1995; Hayashi et al., 2000; NangiaMakker et al., 2002; Glinskii et al., 2000; Sathisha et al., 2007; Glinsky et Raz, 2009**).

Bien que l'utilisation de la pectine dans le traitement du cancer soit appréciée, le mécanisme d'induction de l'apoptose par la pectine n'est pas connu. Il semble que les différents paramètres tels que la structure et la modification de la pectine par la chaleur ou le pH affectent l'apoptose (**Jackson et al., 2007**)

Le traitement physique de la solution de pectine par irradiation gamma provoque la dégradation des macromolécules en pectine de faible poids moléculaire. **Kang et al., (2005)** ont utilisé l'irradiation gamma pour la préparation de la solution de pectine et ont étudié son effet antioxydant et l'inhibition de la prolifération du cancer. Ils ont montré que

l'irradiation gamma est un traitement physique utile pour dépolymériser la pectine (**Kang et al, 2006**).

L'objectif de cette étude est la mise en évidence de l'effet Pro-apoptotique et radiosensibilisateur de la pectine modifiée sur les cellules tumorales du Larynx Humain HEP-2 (Human Epithelioma type-2, ATCC).

En effet, nous avons utilisé la pectine extraite à partir d'écorces d'oranges. Nous avons procédé à la modification chimique et physique de la pectine extraite dans le but d'évaluer d'une part son effet anti-apoptotique seule, et en concomitance avec le rayonnement gamma du cobalt 60 et d'autre part mettre en évidence son éventuel effet radio sensibilisateur.

Partie I:

Recherche

Bibliographique

1. Pectine

1.1. Généralités sur la pectine

La pectine est une classe complexe de phytopolysaccharides qui entre dans la composition des parois cellulaires de la plupart des végétaux supérieurs. Elle se trouve principalement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire. **(Figure 1) (Paquot et al., 2007).**

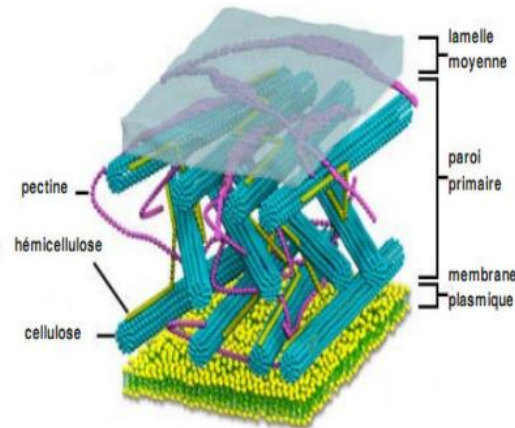


Figure 1: Localisation de la pectine au niveau de la paroi cellulaire **(Pérez et Mazeau, 2005).**

Elle se lie également à d'autres substances chimiques telles que la cellulose, l'hémicellulose ou la lignine, qui sont des composants des membranes cellulaires, par des liaisons chimiques ou physiques **(Paquot et al., 2007).**

D'un point de vue commercial, la plupart des pectines sont obtenues à partir d'agrumes (oranges, citrons et pamplemousses) et de pommes **(Brudieux., 2007).**

D'après le **tableau I**, la quantité et la qualité de celle-ci dépend de la variété et l'origine des fruits ou des légumes utilisés, du stade de développement et des conditions d'extraction.

Tableau I: Les différents niveaux et sources de pectines végétales **(Pelt, et al 2014)**

	Pectines, en % de fruit frais	
Pomme	0,5 - 1,6	Teneurs supérieures à 1,5 % Fruits très riches en pectines
Pelure de citron	2,5 - 4,0	
Pelure d'orange	3,5 - 5,5	
Abricot	1,0	Teneurs voisines de 1 % Fruits riches en pectines
Prune	0,9	
Goyave	0,8 - 1,0	
Poire	0,5	Teneurs comprises entre 0,5 et 1 % Fruits moyennement riches en pectines
Mûre	0,7	
Fraise	0,6 - 0,7	
Cerise	0,3	Teneurs inférieures à 0,5 % Fruits pauvres en pectines
Pêche	0,1 - 0,5	
Mangue	0,25 - 0,45	
Tomate	0,2 - 0,6	
Cassis	0,1	

0

1.2. Domaines d'applications

La pectine est utilisée pour la préparation des confitures, des gelées, des marmelades et des conserves, qui sont des gels tartinables (**Marathe et al, 2002**). Elle porte comme additif alimentaire le numéro de code européen : E 440 (**Clément., 1978**).

Elle est potentiellement utile en tant que produit pharmaceutique car elle diminue le niveau de cholestérol dans le sérum (**Cara et al., 1993**), et peut éliminer les métaux lourds toxiques (**Yokoi et al., 2002**). Elle entre dans la composition des anti-acides, hémostatiques ou anti-diarrhéiques (**Jourdain et al., 2005**), et peut aussi être utilisée comme adhésif dans la chirurgie dentaire (**Boonrod et al., 2006**).

Le sulfate de pectine prolonge la coagulation du sang, en plus les gels de pectine peuvent être utilisés en tant que porteurs à émission lente de médicaments (**O'Neill et al., 2001**). L'addition de fibres alimentaires réduit l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie post prandiale (**Chene, 2003**).

L'une des caractéristiques les plus importantes des pectines comme ingrédients alimentaires est leur capacité à stimuler la croissance des bifidobactéries intestinales. Par exemple, l'utilisation des pectines comme source de carbone entraîne une augmentation du nombre de bifidobactéries, de *Lactobacillus* et d'*Eubacterium rectale* (**Olano-Martin et al., 2002; Manderson et al., 2005**).

1.3. Structure chimique de la pectine

La pectine est une molécule complexe très ramifiée. C'est un polysaccharide soluble, sous forme d'une chaîne linéaire d'acide poly-galacturonique dont une grande proportion est méthylée (**Figure 2**). (**Smahi, 2008**). Le squelette pectique est principalement un homopolymère de l'acide galacturonique lié en 1-4 avec des groupes carboxyle méthyle estérifiés à divers degrés (**Oakenfull, 1991, Sonia et al., 2014**).

Beaucoup de groupes carboxyles sont estérifiés avec du méthanol pour former des groupes méthoxy; ceux-ci déterminent la capacité de gélification de la pectine utilisée dans la confiture, la marmelade, la gelée. (**Martini et al., 1999**).

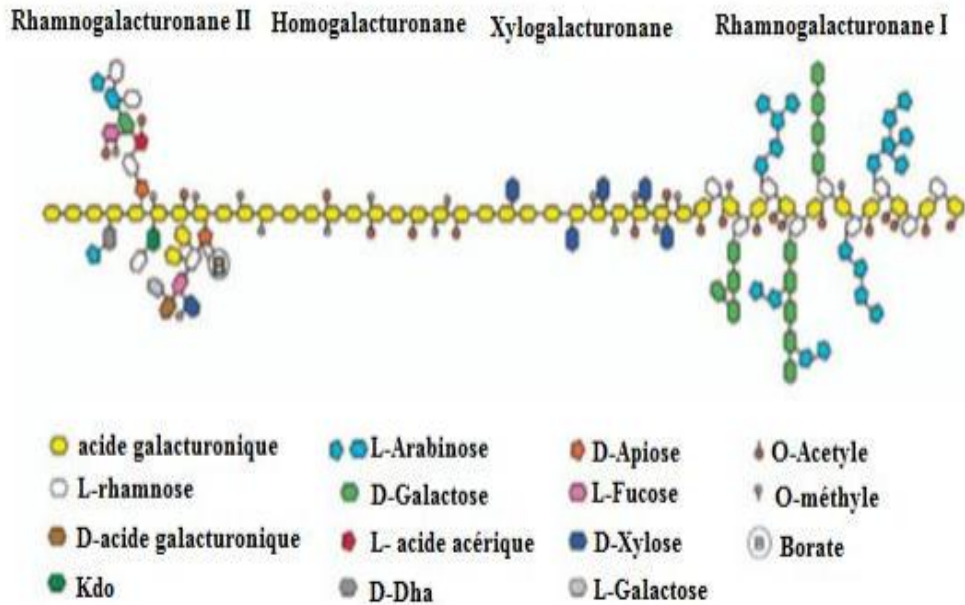


Figure 2: Structure chimique de la molécule de pectine (Schelleret al.,2007)

1.4. Propriétés physico-chimiques

La pectine est caractérisée par des propriétés physiques et chimiques spécifiques :

1.4.1. Degré d'estérification

Le DM c'est le nombre de fonctions carboxyliques méthylées des motifs d'acide galacturonique de la chaîne principale en pourcentage (Levigne et al., 2002). Il dépend de son origine végétale, du type de tissu et de la maturité de celui-ci. A l'état naturel, on retrouve essentiellement de la pectine HM (Hautement méthylée) avec un DM qui varie entre 60 et 90% (Walter 1991).

Trois types de pectines sont identifiés :

- Les acides pectiques : si un degré d'estérification est inférieur à 5 % (DE<5).
- Les « pectines hautement méthylées » (HM), correspondant à plus de 50% de méthylation des fonctions acides,
- Les « pectines faiblement méthylées » (LM), correspondant à moins de 50% deméthylation des fonctions acides

Le degré d'estérification des pectines a un impact sur la flexibilité de la molécule : plus le degré d'estérification est faible, plus la pectine est rigide (Axelos et Thibault, 1991; Morris et al., 2000). Il a également un fort impact sur leurs propriétés de gélification ; les pectines HM forment des gels en présence de sucres neutres ou en milieu acide, alors que les LM forment des gels en présence de calcium.

1.4.2. Solubilité

La structure de la pectine la rend insoluble dans les solvants organiques et soluble dans l'eau. La solubilité dans l'eau dépend de la distribution des groupements méthoxyles et de la masse molaire. Elle augmente avec la diminution du DM (Chen;2015) et de la masse molaire (Thakur;1997)

1.4.3. Masse moléculaire

Les propriétés physiques de la pectine dépendent largement de sa masse moléculaire (Guillotin et al., 2007). En raison de l'hétérogénéité de la plupart des échantillons et de l'existence d'agrégats, sa détermination est un problème difficile. Le poids moléculaire de la pectine dépend non seulement de la méthode utilisée pour le déterminer, mais aussi du type de matières premières utilisées et des conditions d'extraction choisies.

1.5. Modification physico-chimique

La faible solubilité de la pectine constitue un obstacle majeur à son application dans le domaine médical principalement pour la prévention du cancer. Les chercheurs ont développé de la pectine modifiée (MCP) de faible poids moléculaire, faiblement méthylée, qui augmente la capacité de la pectine à interagir avec des molécules biologiques telles que les protéines et les lipides (Suryakant et al., 2013).

Le processus de modification de la pectine d'agrumes native (ONP) consiste à la décomposer en chaînes glucidiques plus courtes, non ramifiées et riches en galactose. Par rapport à la pectine ordinaire à longue chaîne, ces chaînes glucidiques sont plus faciles à dissoudre dans l'eau et plus facilement absorbées par le corps. L'unité polysaccharidique plus courte ainsi produite, permet de se lier étroitement à la lectine liant le galactose à la surface de certains types de cellules cancéreuses (Strumetal., 1999) (Figure 3).

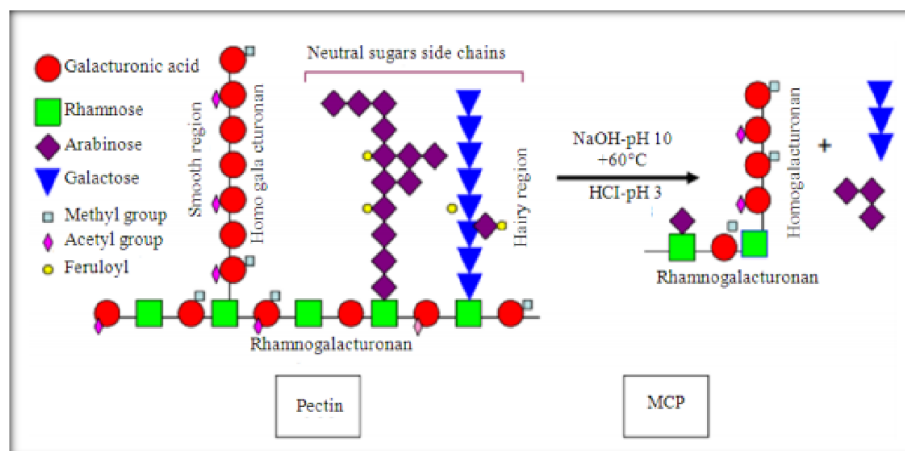


Figure 3: Les différents composants de la molécule de pectine (Vincken et al., 2003) et la préparation de la pectine modifiée (Pienta et al., 1995)

Par ailleurs, les chercheurs ont rapporté que des éléments structuraux spécifiques de la pectine d'agrumes responsables de l'apoptose cellulaire peuvent être enrichis par traitement thermique à 40 et 90 °C (Jackson et al., 2007), ou en utilisant un acide concentré ou dilué avec un PH acide ou alcalin. Par conséquent, la combinaison de traitements de PH et de température dans la préparation de MCP est la meilleure combinaison pour produire des polysaccharides de pectine avec des propriétés antiadhésives et induisant l'apoptose des cellules cancéreuses (Figure 4)(Platt et al., 1992; Pienta et al., 1995).

D'autres traitements physiques peuvent également être utilisés pour générer de la pectine d'agrumes modifiée, comme les micro-ondes, les ultrasons et les rayonnements gamma, qui induisent la formation de radicaux libres et catalysent la dépolymérisation des polysaccharides. (Barreteau et al., 2006 ; Courtois, 2009).

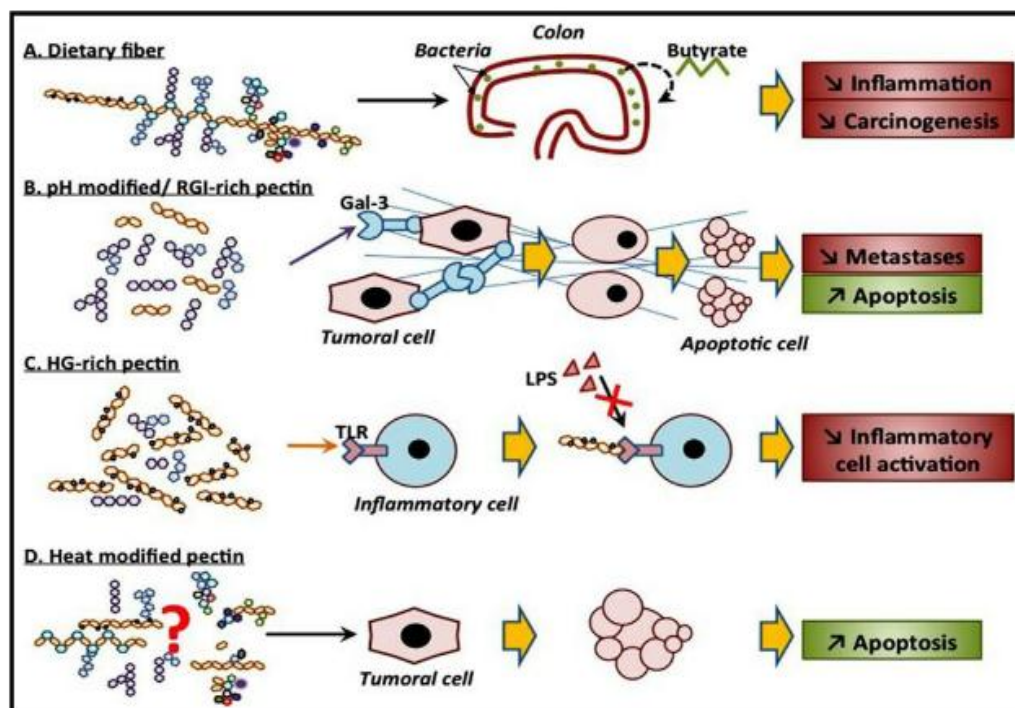


Figure 4: Activités anti-cancéreuses des différentes formes de pectine (Leclere et al., 2015).

D'après les chercheurs, la pectine la plus efficace est celle qui possède un degré d'estérification inférieur à 50%, qui est un indicateur de l'efficacité de la liaison pectine-galectines. Une estérification à 10% signifie que dix molécules de galactose sur cent sont liées (méthylées) et les 90 autres sont libres, donc disponibles pour se lier aux galectines et induisent leur inhibition (Hartati et al., 2011).

2. Cancer

2.1. Généralités

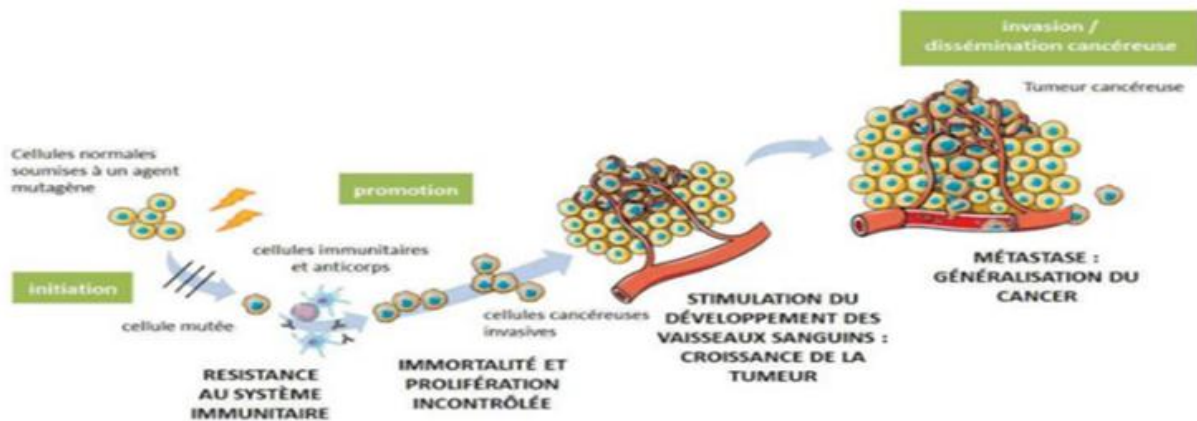
Le cancer se base sur des événements qui consistent en l'acquisition de caractéristiques spécifiques, telles qu'un stimulus permanent à la prolifération illimitée, l'évasion du contrôle mitotique et de la surveillance immunitaire, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité répliquative, l'activation de l'invasion et des métastases, l'angiogenèse, l'instabilité génétique et la dérégulation métabolique (Hanahan et Weinberg., 2011).

Le processus de cancérogenèse est simplifié en trois phases distinctes: l'initiation, la promotion et la progression (Gescher et al., 1998)(Figure 5).

Les cellules cancéreuses peuvent également acquérir des propriétés métastatiques.



(A)



B)

Figure 5: La cancérogenèse (Basu, 2018) et étapes de cancérisation (Aline Mongis 2017)

2.2. Cancer du larynx

Le larynx est un organe impair et médian, situé à la partie moyenne de la gaine viscérale du cou et qui occupe la partie supérieure de la région infra-thyroïdienne. Il participe à la phonation, la respiration et la déglutition (Touré, M. 2019) (Figure 6).

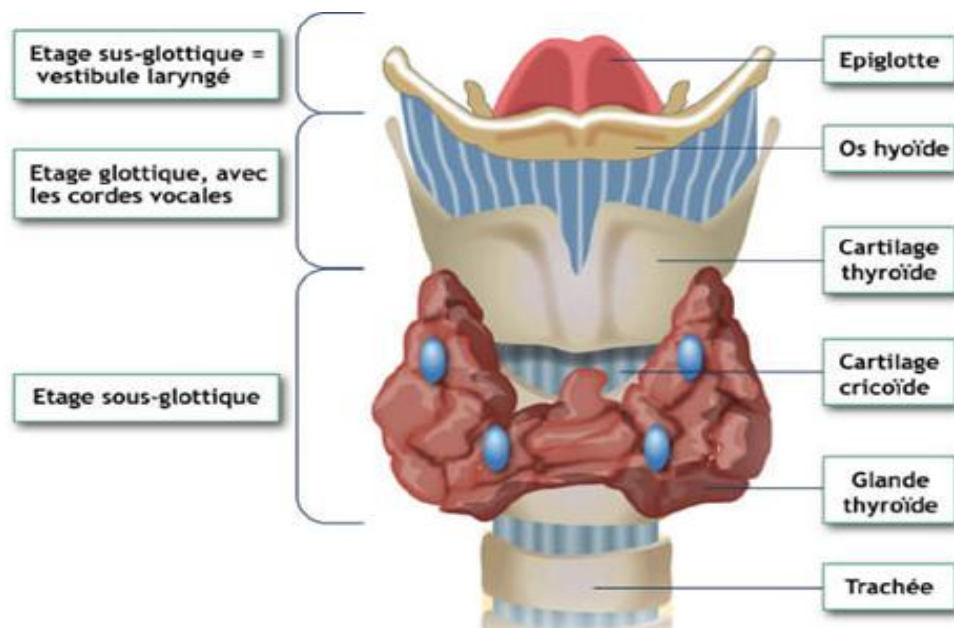


Figure 6: Anatomie de larynx (Charline D 2020)

Le cancer du larynx est une forme de malignité provenant du site anatomique appelé larynx (également connu sous le nom de "boîte vocale"). Il est divisé anatomiquement en trois régions, y compris le larynx supraglottique(englobant l'épiglotte, les fausses cordes vocales, les ventricules, les plis aryépiglottiques et les aryténoïdes), la glotte (englobant les vraies cordes vocales et les commissures antérieures et postérieures) et la région subglottique(**Figure 7**) (Steuer, et al 2017).

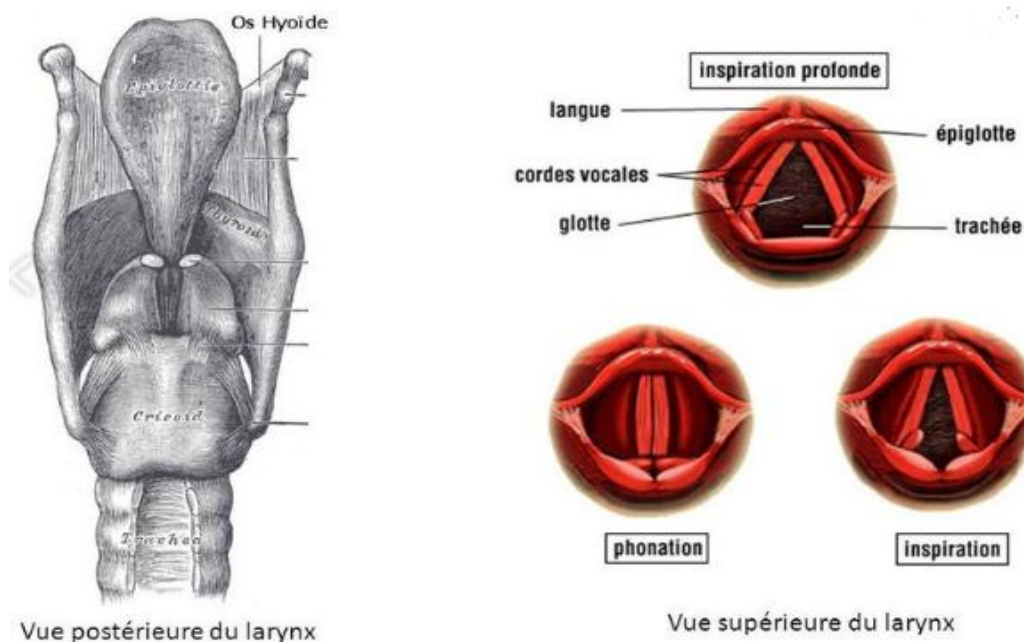


Figure 7: Vue postérieure du larynx et des cordes vocales dans différents états (Reannecy 2017)

Dans beaucoup de cas, on observe le développement de métastases, particulièrement au niveau des ganglions lymphatiques du cou (Mastronicola, R. 2015). En réalité, il n'existe pas un cancer du larynx, mais plusieurs. On distingue, les cancers sous-glottiques (au-dessous des cordes vocales) qui est très rare, glottiques (au niveau des cordes vocales) qui représentent la majorité d'entre eux et sur-glottiques (au-dessus des cordes vocales).

Le stade du cancer du larynx comprend la taille de la tumeur et le degré d'invasion des autres tissus situés autour du larynx. Le système de stadification le plus fréquemment employé pour le cancer du larynx est la classification TNM (Green et al., 2006), elle se rapporte à la propagation locale et distante du cancer. Par ailleurs, le stade du cancer du larynx est déterminé à l'aide de la « clé » suivante (tableau II).

Tableau II: Différents stades (classification TNM) du cancer du Larynx (Green et al., 2006)

T : tumeur primitive	
Tis	Carcinome in situ
T0	Pas de signe de tumeur primitive
T1	1a : Tumeur limitée à 1 corde vocale mobile 1b : Tumeur limitée aux 2 cordes vocales mobiles
T2	Diminution de mobilité de la corde vocale ou extension au fond du ventricule
T3	Hémilarynx bloqué
T4	Tumeur étendue en dehors du larynx ou extension cartilagineuse sur TDM
Tx	Tumeur inclassable
N : adénopathies	
N0	Pas d'adénopathie
N1	ADP homolatérale unique ≤ 3cm
N2a	ADP homolatérale unique]3-6] cm
N2b	ADP homolatérales multiples ≤ 6cm
N2c	ADP bilatérales ou controlatérales ≤ 6cm
N3	ADP > 6cm
Nx	N inclassable
M : métastases	
M0	Pas de signe de métastase à distance
M1	Métastase à distance
Mx	M inclassable

2.3. Épidémiologie de la pathogénie

Les cancers du larynx sont fréquents, directement liés au tabagisme chronique et souvent associés à une consommation excessive d'alcool.

Ils touchent l'homme dans l'immense majorité des cas. L'incidence, la prévalence et la mortalité actuelles par le cancer du larynx sont estimées à 2,76 cas/an pour 100 000 habitants, 14,33 cas/an pour 100 000 habitants et 1,66 décès/an pour 100 000 habitants, respectivement, soit une moyenne de 3,28 millions de DALY (espérance de vie corrigée de l'incapacité) par an. L'incidence et la prévalence ont augmenté de 12 % et de 24 % respectivement au cours des 3 dernières décennies, tandis que la mortalité a diminué d'environ 5%. Le fardeau épidémiologique de cette malignité est environ 5 fois plus élevé chez les hommes et augmente parallèlement au vieillissement, atteignant son maximum après 65 ans. Les taux d'incidence et de mortalité sont plus élevés en Europe et plus faibles en Afrique, mais le rapport entre les décès et l'incidence est le plus élevé en Afrique. L'incidence a diminué progressivement en Europe au cours des 3 dernières décennies, par contre, elle a augmenté en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental. Le tabagisme et l'abus d'alcool contribuent à environ 90 % de la mortalité mondiale pour le cancer laryngé. (Nocini et al.,2020).

2.4. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque ont été impliqués dans la pathogenèse du cancer du larynx.

Les plus importantes sont :

- **L'association de tabac et d'alcool:** Cette association cause deux à trois fois plus de cancers que l'un ou l'autre séparément ;
- **L'inhalation de substances irritantes:** par exemple, l'amiante ou certains produits chimiques ;
- **L'exposition à des rayonnements radioactifs.**
- **Une infection virale chronique:** L'infection par le HPV (ou papillomavirus) est responsable de verrues génitales. Or, il peut infecter la bouche lors de rapports sexuels buccaux. Certaines souches de ce virus prédisposent au cancer du larynx.

2.5. Prise en charge thérapeutique

Les soins aux patients atteints d'un cancer laryngé continuent d'évoluer et nécessitent une approche multidisciplinaire. Des troubles morbides uniques, comme la perte de la voix

naturelle, la respiration et la protection des voies respiratoires lors de la déglutition, sont observés avec cette maladie et nécessitent une attention particulière **(Pointreau et al, 2016)**.

En fonction des besoins, la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et les traitements au laser sont administrés seuls ou plus souvent, en combinaison avec d'autres. Par ailleurs, la prise en charge de ces cancers nécessite un suivi nutritionnel par une diététicienne afin de prévenir une perte de poids trop importante, ainsi que par une logopède en cas de problèmes de phonation et/ou de déglutition. **(Tamburini et al, 2015)**

2.5.1. Chirurgie

La chirurgie est généralement le premier traitement auquel les oncologues ont recours lorsque la tumeur est localisée à un endroit précis du corps. Elle consiste à enlever la quasi- totalité des cellules cancéreuses pour permettre de soulager les symptômes et de réduire les risques de propagation chez le patient **(Auckland, 2008;Lefferts et al., 2008)**.

2.5.2. Chimiothérapie

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

2.5.3. Radiothérapie

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

Habituellement, la radiothérapie du cancer du larynx est associée à la chirurgie et/ou à la chimiothérapie, mais les cellules tumorales peuvent acquérir une radiorésistance au cours de la radiothérapie clinique basée sur la radiothérapie à dose fractionnée **(Weber et al., 2005 ; Kaup et al., 2006)**. De plus, 5 à 10 % des cancers du larynx de stade 1 et plus de 25 % de stade 2 sont résistants aux radiations **(Klintonberg et al., 1996; Johansen et al., 2002)**.

3. Rayonnements ionisants

3.1. Définition et caractérisation

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le rayonnement ionisant est un rayonnement avec assez d'énergie pour arracher les électrons étroitement liés de l'orbite d'un atome, provoquant l'ionisation de ce dernier (WHO, 2020). Le rayonnement ionisant se déplace sous forme d'ondes électromagnétiques (gamma ou X) ou de particules (neutrons, bêta ou alpha). La désintégration spontanée des atomes est appelée radioactivité et l'excès d'énergie émis est une forme de rayonnement ionisant. Les éléments instables qui se désintègrent et émettent des rayonnements ionisants sont appelés radionucléides (WHO, 2016).

3.2. Mécanisme d'action des rayonnements ionisants sur l'ADN

Les rayonnements ionisants peuvent endommager les cellules par action directe ou indirecte sur l'ADN. (Figure 8).

3.2.1. Effets directs

Le rayonnement ionisant déclenche des phénomènes d'ionisation et d'excitation des atomes et molécules du milieu biologique qui cherchent leurs stabilités en cédant un électron, ce dernier interagit directement avec la molécule d'ADN entraînant une cassure sur un seul ou sur les deux brins. (Haton, 2005).

3.2.2. Effets indirects

L'eau représente plus de 80% du contenu cellulaire, son irradiation provoque une radiolyse avec formation des molécules stables comme H_2O_2 , H_2 et les radicaux libres tel que H^+ , OH^- et e^-_{aqueux} , qui peuvent induire des dommages au niveau des bases de l'ADN, des pontages ADN-protéines, des cassures simples (CSB) ou double-brins (CDB) (Haton, 2005).

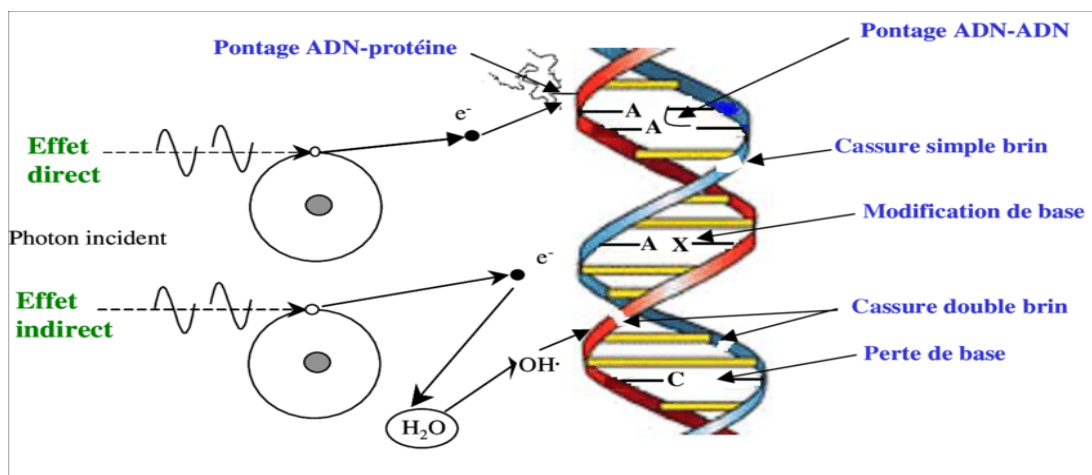


Figure 8: Principe des effets directs et indirects des rayonnements ionisants (Audrey, 2014).

3.3. Réponse cellulaire face aux dommages radio-induits

La réponse cellulaire immédiate à ces dommages est la stimulation de la machinerie de réparation de l'ADN et l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire (checkpoint). Ceci bloque de façon temporaire le cycle cellulaire lors des transitions entre les phases G1/S et/ou G2/M afin de permettre la réparation des dommages (Turesson et al., 2003). En fonction de l'efficacité de réparation, la cellule reprend son fonctionnement normal ou enclenche des processus d'apoptose, de différenciation ou de sénescence (Hamdi, 2016).

3.4. Mécanisme de réparation des lésions radio-induites

Chaque type de lésions radio-induites se caractérise par la voie de réparation qu'il déclenche. De ce fait, les cellules mettent en jeu différents systèmes de réparations adaptées aux différents types de lésions (Bencokova, 2007). La stimulation de la machinerie de réparation de l'ADN et l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire (checkpoint).

Ceci bloque de façon temporaire le cycle cellulaire lors des transitions entre les phases G1/S et/ou G2/M afin de permettre la réparation des dommages

En fonction de l'efficacité de réparation, la cellule reprend son fonctionnement normal ou enclenche des processus d'apoptose, de différenciation ou de sénescence (Figure 9).

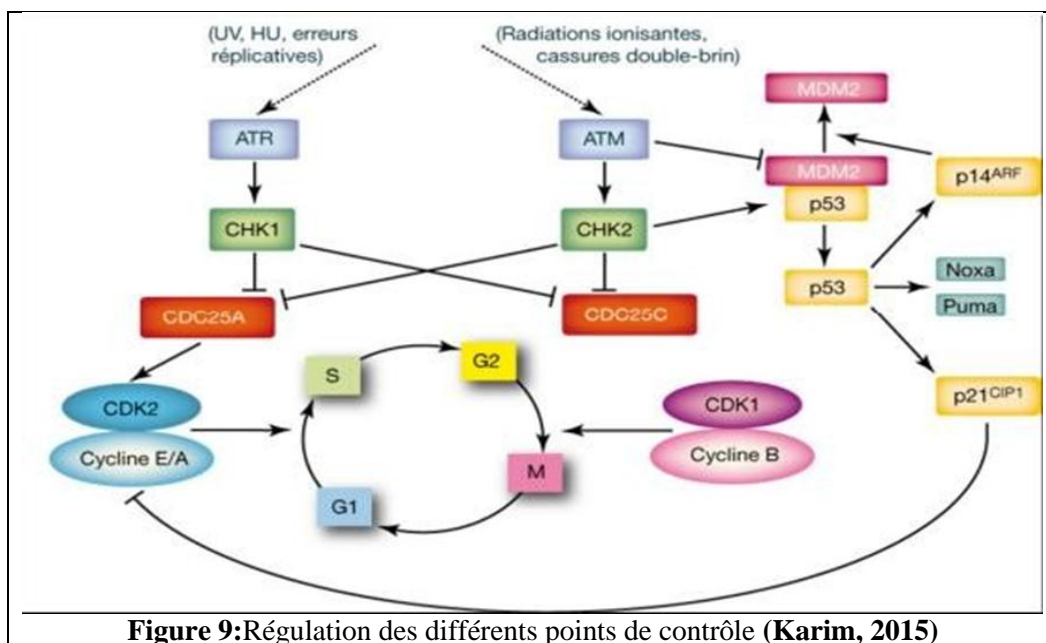


Figure 9: Régulation des différents points de contrôle (Karim, 2015)

Les CDB et CSB de l'ADN doivent être réparées pour maintenir l'intégrité génomique et prévenir la mort cellulaire. Deux mécanismes entrent en compétition pour la réparation des CDB, le premier est la Recombinaison Homologue (RH) qui nécessite la présence de la chromatide sœur (phase S/G2). Le second est la Jonction d'Extrémités Non-Homologue (NHEJ), qui est majoritaire et permet la ligature des deux brins rompus, mais peut donner lieu

à des erreurs ou à une mutation du gène concerné. La réparation des cassures double-brin survient rapidement. Le pic de signalisation des dommages survient généralement autour de 30 min à 1 h post-radiation et décroît au fur et à mesure de la réparation (**Kato et al., 2008; Martin et al., 2013**).

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

3.5. Mort cellulaire radio-induite

En radiobiologie, la mort d'une est définie comme perte irréversible de sa capacité à former une colonie. Malgré l'existence de différents mécanismes de réparation, la cellule peut échouer dans la réparation des dommages trop importants. Aussi et afin d'éviter de graves conséquences pour l'organisme, la mort cellulaire peut survenir. On distingue trois types principaux de mort cellulaire : l'apoptose (mort programmée), la nécrose et l'autophagie (**Sia et al., 2020**).

3.6. Apoptose

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisée pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées et potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule active une série d'évènements moléculaires et biochimiques spécifiques à l'apoptose, activant le programme de sa propre mort« Suicide cellulaire».(**Rayer, (2019) (Figure 10)**).

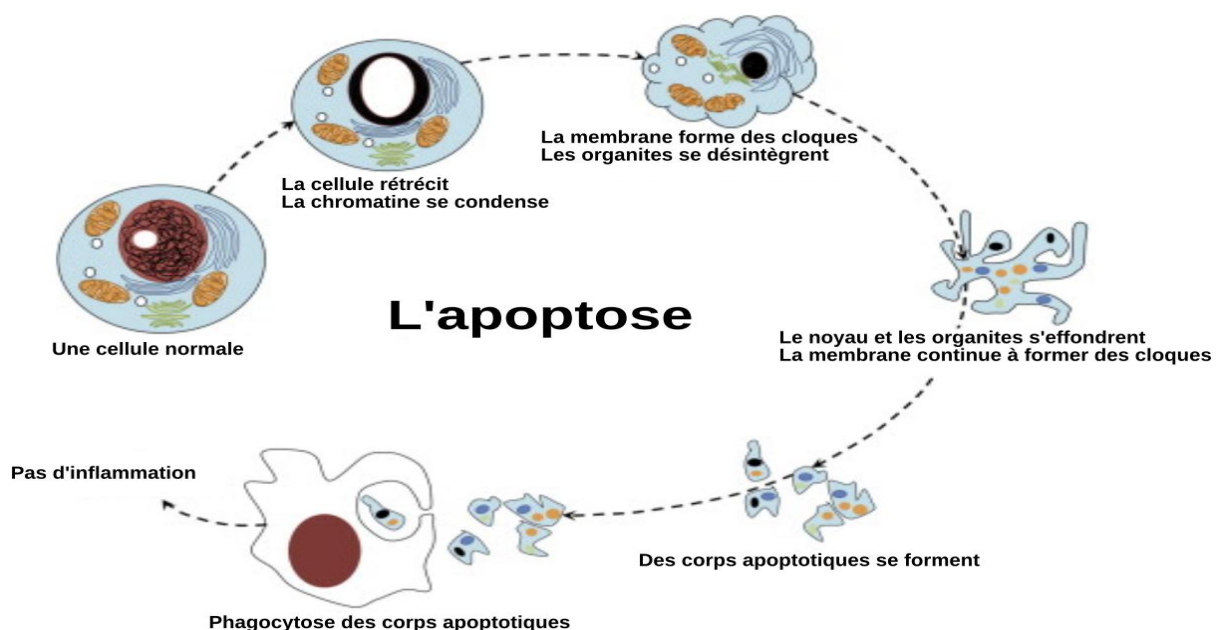


Figure10: Caractérisation morphologique des événements microscopiques de l'apoptose (**Abou-Ghali et al, 2015**).

L'apoptose est le processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal ou à un stress. Ce phénomène est enclenché par le DDR (DNA Damage Responses) (Watters, 1999). L'apoptose peut également survenir lorsque la cellule présente des altérations au niveau de la membrane (Figure 11)

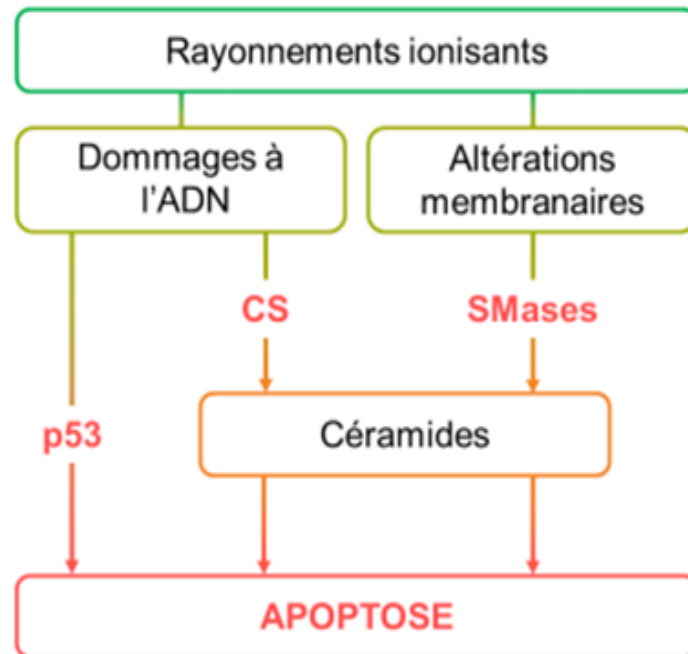


Figure 11: Voies impliquées dans l'apoptose induite par les rayonnements ionisants. (Kolesnick et al. Oncogene (2003)
CS: Ceramide Synthase; SMases: Sphingomyélinases

Selon la **figure 11**, les SMases sont des enzymes clés impliquées dans de nombreuses maladies causées par le stress oxydatif, telles que l'athérosclérose, le diabète sucré, la stéatose hépatique non alcoolique et la maladie d'Alzheimer. Les SMases hydrolysent la sphingomyéline pour générer du céramide, un lipide pro-apoptotique bien connu.

3.7. Radiorésistance et radiosensibilité:

La radiosensibilité est la susceptibilité des cellules saines ou tumorales, tissus, organe ou organisme à l'action nocive des rayonnements mesurée par l'étendue de la régression, la rapidité et la durabilité de la réponse. Plus une cellule est jeune, peu différenciée, à forte activité de reproduction, plus elle est radiosensible (Roch-Lefèvre et al., 2010; Yashar, 2018). Cette variabilité a été constatée pour tout groupe de patients recevant le même traitement, certains présentent une résistance alors que d'autres présentent des réactions plus sévères.

3.7.1. Facteurs de radiosensibilité des tumeurs humaines

Une tumeur est considérée comme peu sensible aux rayonnements ionisants, s'il survient une récurrence dans le volume irradié après régression de la tumeur ou lorsque l'irradiation n'a aucun effet sur celle-ci. Les facteurs déterminants la radiosensibilité peuvent être divisés en trois sous-groupes qui restent étroitement liés lors d'un traitement de radiothérapie (**Bourgier et al., (2021)**):

- **Déterminants cliniques:** définit la morphologie des cellules, des tissus, d'organe, leur taille, l'extension tumorale, l'état général de l'hôte, l'âge et le sexe.
- **Les déterminants thérapeutiques:** concernent le temps d'étalement de la tumeur, le volume traité, la dose totale et la thérapie associée.
- **Les déterminants biologiques:** correspondent au nombre de cellules clonogéniques (plus la tumeur contient de cellules clonogéniques et moins elle est radio curable). L'effet oxygène (le manque d'oxygène) est un facteur témoin de la diminution de la radiosensibilité. Une tumeur est d'autant moins radio curable qu'elle contient plus de cellules hypoxiques) (**Nordmark, 2005**). Le degré de la prolifération cellulaire (**Kim, 2005**), La radiosensibilité intrinsèque introduit par (**Fertil et Malaise, 1985**), est la mise en place de mécanismes moléculaires qui permettent à la cellule de résister aux rayonnements (**Milia, 2005**). Le concept de radiosensibilité intrinsèque peut être étudié par l'établissement de courbes de survie en fonction de la dose unique délivrée (**West, 1993 ; Vogin, 2011**).

3.7.2. Traitement concomitant

La médecine intégrative prouve que le meilleur moyen de vaincre le cancer est de l'attaquer sous plusieurs angles en utilisant des thérapies et des traitements anticancéreux collaboratifs. Les composés naturels de plantes fournissent une importante source de nouveaux agents radio-sensibilisants avec peu ou pas de toxicité, ce qui constitue une avancée dans le domaine de la radio-oncologie.

De nombreuses molécules radio-sensibilisantes sont à l'étude, pour augmenter la radiosensibilité de certaines tumeurs ou éliminer leur radorésistance, améliorant ainsi l'efficacité de la radiothérapie clinique. Il a été démontré que l'astaxanthine induit l'apoptose cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, en inhibant l'expression des facteurs anti-apoptotique Bcl-2, cycline B1, Cdc2 et pro-apoptotique, augmentant ainsi la radiosensibilité de l'œsophage épidermoïde du carcinome cellulaire (**Qian et al., 2017**). Il a

été découvert que la pectine d'agrumes modifiée (MCP), rend les cellules PCa du cancer de la prostate sensibles à la doxorubicine, et les cellules cancéreuses de l'ovaire au paclitaxel(Hossein et al., 2013). Les composés végétaux naturels constituent une source importante de nouveaux radio-sensibilisateurs, avec peu ou pas de toxicité, ce qui constitue une percée en radio-oncologie.

4. Action de la pectine

4.1. Galectines-3 et leur rôle dans la cancérisation

Les galectines-3 sont des protéines exprimées de façon ubiquitaire dans la cellule et surexprimées dans certains types de cancer. Au niveau de la membrane cellulaire, elles jouent le rôle de ligands endogènes participant aux interactions entre les cellules et entre les cellules avec la matrice extracellulaire (Desbène 2014). Ces liaisons sont permises par l'affinité spécifique de cette protéine aux β -galactosides (Figure 12).

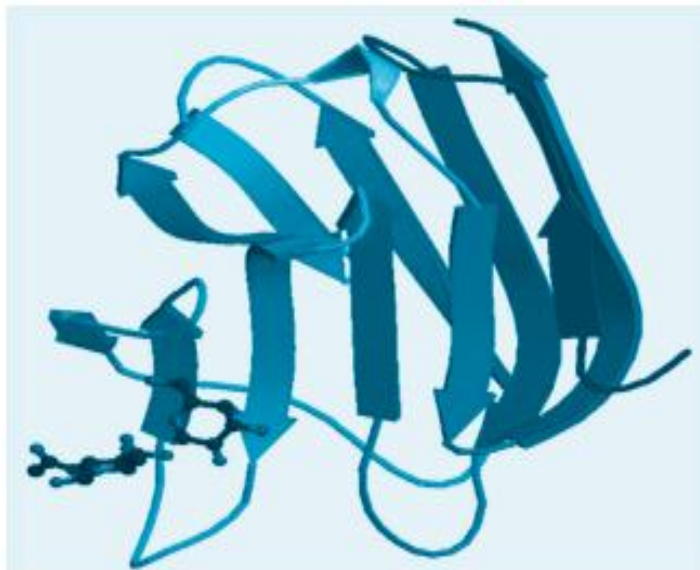


Figure 12: Structure tertiaire de la galectine-3 (Desbène 2014)

Dans la cancérogénèse, les galectines-3 ont trois rôles principaux (Fuchs 2004):

- Elles permettent aux cellules cancéreuses de se lier entre elles, formant des groupes de cellules qui peuvent survivre dans la circulation sanguine et voyager vers d'autres sites (Figure 13).
- Elles permettent aux cellules cancéreuses libres de se fixer sur de nouveaux sites, formant ainsi, une nouvelle tumeur (processus de métastase).

➤ Les cellules cancéreuses ont besoin de vaisseaux sanguins pour leur apporter des nutriments. Les galectines-3 peuvent interagir avec les vaisseaux sanguins pour stimuler la croissance de nouveaux vaisseaux (angiogenèse), et ainsi augmenter les apports sanguins à la tumeur.

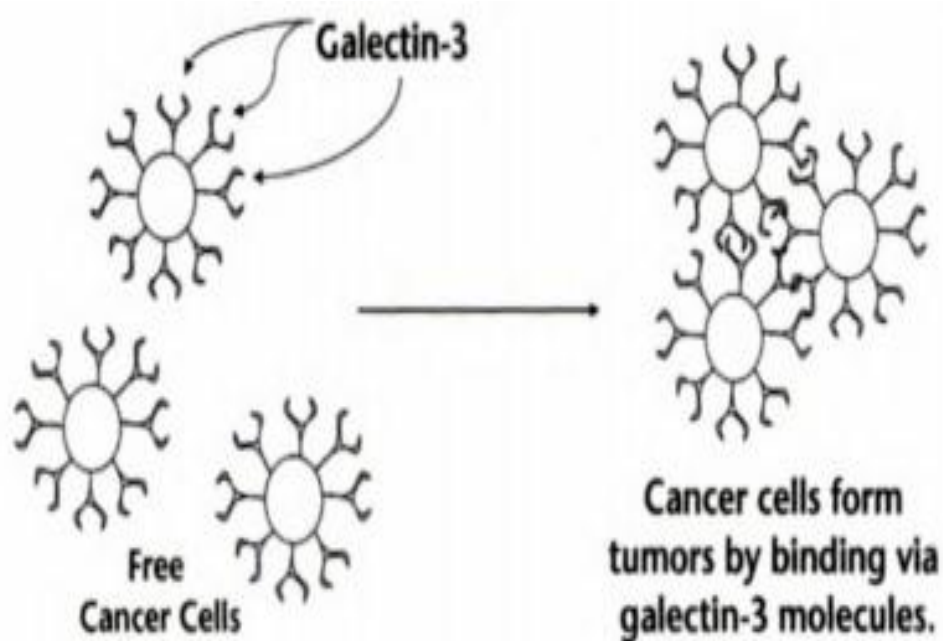


Figure 13: Agrégation homotypique des cellules tumorales (Fuchs 2004)

4.2. Activités anti-cancéreuses de la pectine modifiée, par interaction avec les galectines3

L'activité anti-cancéreuse de la pectine modifiée s'exprime par le fait de limiter les interactions des cellules tumorales entre elles et empêchent l'agrégation homotypique (**Figure 13**). La MCP, riche en résidus galactosides, semble altérer les interactions cellule-cellule, en entrant en compétition avec les ligands endogènes des "galactoside binding protéines", plus particulièrement de la galectine-3 (**Platt et Raz, 1992; Inohara et Raz, 1994**). Ainsi, il a été émis l'hypothèse que la PCM a un rôle antagoniste aux interactions intercellulaires, qui concurrence les ligands endogènes des cellules tumorales (**Platt 1992**). *In vivo*, ces interactions ont conduit à une réduction du nombre de métastases et du volume des tumeurs, qui se sont développées par rapport au traitement témoin (**Platt.,1992; Hayashi., 2000**). Ces résultats s'expliquent par la capacité de la PCM à former des liaisons avec les galectines-3: les liaisons glycosidiques. Cette réaction agit principalement sur les sucres neutres présents dans les régions ramifiées (**Leclere 2013**).

Ainsi, ces interactions pectine/galectine-3, inhibent les fonctions induites par cette protéine, telles que l'agrégation homotypique des cellules tumorales (Mahé 2019)(Figure 14).

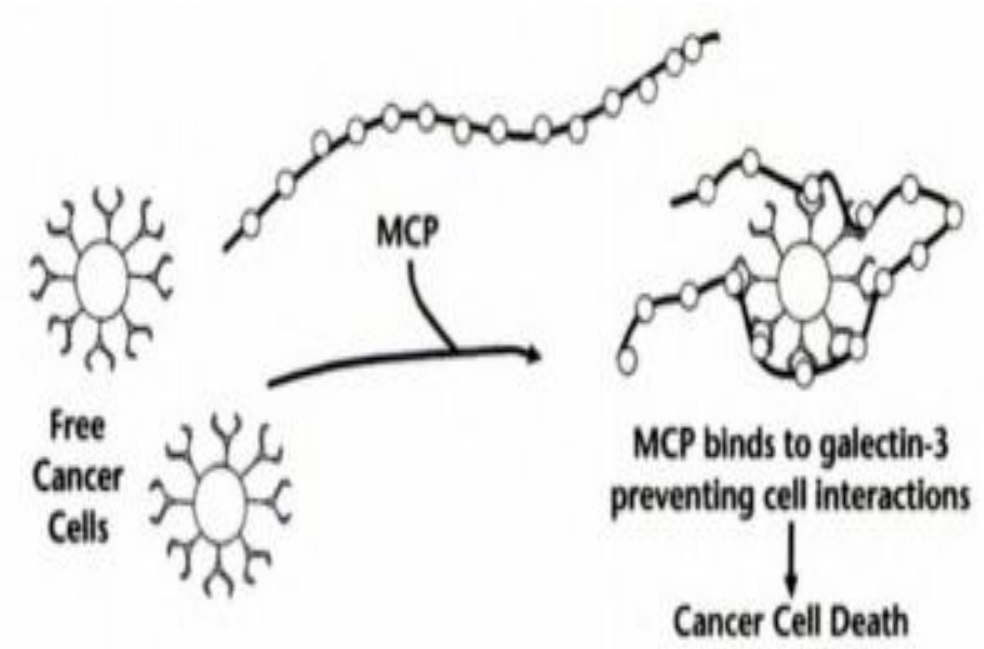


Figure 14: Inhibition de l'agrégation homotypique des cellules tumorales par la PCM (Fuchs 2004)

Il a été démontré que la PCM avait un rôle dans l'inhibition de l'angiogenèse, en se liant aux galectines-3 présentes dans la matrice et / ou sur les cellules endothéliales. Il a été constaté une réduction de la densité des vaisseaux sanguins associés aux tumeurs et une inhibition spécifique des liaisons cellules cancéreuses/cellules endothéliales, ce qui explique en partie l'inhibition de l'invasion et de la métastase (Nangia-Makker.,2002)

Partie II:

Matériel

et

Méthodes

1. Matériel

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Radiobiologie du Département des Applications Médicales de la Division des Applications Nucléaires au niveau du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) pour une durée de 4 mois.

1.1. Matériel biologique

Notre étude a porté sur la pectine extraite à partir des écorces d'oranges (*Citrus sinensis*), acquise sur le marché local et la lignée cellulaire qui est une lignée cancéreuse du Larynx Humain HEP-2 (Human Epithelioma type-2, ATCC fournie par l'institut Pasteur d'Alger.

Ce sont des cellules adhérentes à inhibition de contact formant une monocouche.

1.2. Matériel non biologique

Toutes les expériences de culture cellulaire ont été conduites sous hotte à flux laminaire (Poste de sécurité Microbiologique de type III), avec utilisation d'un matériel stérile, des réactifs de haute qualité analytique et des milieux spécifiques pour la culture cellulaire (**annexe 1**).

Les réactifs et les milieux de cultures dépendent principalement du type cellulaire et de ses exigences. Ils sont énumérés en **annexe 1**.

2. Méthodes

2.1. Extraction de la pectine d'orange

L'extraction de la pectine d'orange est réalisée par la méthode de **Khule et al., (2012)**, en modifiant quelques paramètres après leur optimisation dans un travail précédent au sein du C.R.N.A.. Les écorces d'orange séchées sont ajoutées à une solution d'acide citrique à 40% (poids/volume). Le mélange a été agité à 500 rpm pendant 1h dans un bain-marie à 65°C, puis refroidi et filtré. Le filtrat est mélangé avec de l'éthanol à 95% (vol/vol), la pectine ainsi précipitée est filtrée puis séchée à 40°C.

2.2 Modification chimique de la pectine d'orange

La modification chimique de la pectine d'orange nécessite l'utilisation de différents pH et températures. Un traitement alcalin entraînant une dépolymérisation du squelette polysaccharidique et une des-estérification des régions HG, suivi d'un traitement acide qui clive les sucres neutres (**Lionel et al., 2013**). Les protocoles de modification de (**Crystal et al, 2007, Yordan et al., 2012**) ont été suivis en modifiant quelques paramètres.

En effet, 1g de pectine native est solubilisé dans 1L d'eau distillée stérile, le pH de la solution est ajusté à 12 avec une solution de NaOH froid à 0.1 M. Après 1 heure à 4°C, le pH de la

solution a été réajusté à 5.2 avec une solution d'acide citrique à 40%. La pectine d'orange modifiée (POM) est ensuite précipitée par l'éthanol à 95 % (**Figure 15**) puis filtrée, et séchée dans une étuve à + 40°C.

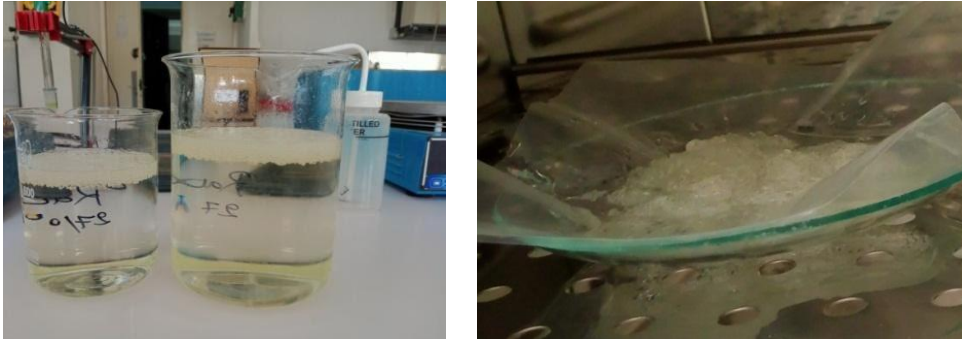


Figure 15:Précipitation de la pectine d'orange

2.3. Rendement de la pectine

Le rendement de la poudre de pectine après modification chimique (POM) est calculé à l'aide de la formule suivante:

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

Avec m_0 (g): poids de la pectine modifiée sèche

m (g): poids de la poudre de pectine

2.4. Traitement physique par irradiation de la pectine modifiée

Afin de réduire au maximum son poids moléculaire et augmenter sa solubilité(**El-Batal et al. 2012**), la pectine modifiée chimiquement (POM) a subi un traitement physique. En effet, elle est irradiée en solution par le rayonnement gamma à la dose de 25 kGy émis par une source de Cobalt-60 de l'irradiateur de (CRNA). Cette dose a permis d'apporter les modifications nécessaires et la stérilisation de la solution de pectine d'orange modifiée (POM). La pectine obtenue est notée (POMI).

2.5. Culture cellulaire de la lignée cancéreuse HEp-2

a) Décongélation des cellules adhérentes HEp-2

La décongélation des cellules cancéreuses HEp2 doit être rapidement conduite. Les cellules stockées dans de l'azote liquide, sont rapidement décongelées au bain marie à 37°C afin d'éliminer le cryoprotecteur (DMSO).

Les cellules sont diluées immédiatement dans environ 5 à 10 ml de milieu DMEM à 20% SVF, puis centrifugées à 1500 rpm à + 4°C pendant 7 min. Le culot cellulaire est re-suspendu dans 4ml de milieu pour booster le démarrage des cellules, etensemencé dans une boîte de culture de 25cm² (T25).

Les boîtes sont légendées en indiquant le nom de la lignée, le nombre de passage et la date.

Les boîtes sont agitées soigneusement (mouvements de ∞), puis incubées à 37°C sous atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO₂

La reprise des cellules est suivie le lendemain.

b) Mise en culture des HEp2

Les cellules (HEp-2) sont cultivées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité, contenant 5% de CO₂, dans du DMEM supplémenté de 10% de SVF et de 1% d'antibiotiques (pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 mg/ml).

c) Entretien des cellules adhérentes HEp-2

Pour maintenir la culture des cellules et afin de permettre leur prolifération adéquate, il faut procéder à des passages, c'est-à-dire les transférer dans des boîtes de culture plus grandes 75 cm² (T75) et 175 cm²(T175) contenant un milieu de DMEM à 10% SVF frais.

Lorsque les cellules sont confluentes, le milieu appauvri est enlevé. Le tapis cellulaire est rincé avec un tampon phosphate salin PBS, puis une solution de trypsine est ajoutée afin de détacher les cellules de la boîte de culture. Les cellules ainsi récupérées sont inoculées dans une boîte plus grande avec du milieu frais et incubées à 37°C et 5% de CO₂.

Le contrôle de la viabilité, le degré de confluence et l'absence de contamination de cette culture se fait par une observation des boîtes au microscope inversé (EVOS XL)(Annexe 3).

e) Dénombrement des cellules

La détermination du nombre de cellules par unité de volume de suspension cellulaire est réalisée après coloration au bleu de trypan 0.4%, afin de distinguer les cellules vivantes claires entourées d'un halo bleu, des cellules mortes totalement colorées en bleu. Les cellules sont ensuite comptées à l'aide de la Cellule de Malassez sous microscope à phase inverse.

Le nombre de cellules est déterminé selon la formule suivante :

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

2.6. Effet des différents traitements sur la lignée cancéreuse de larynx HEP-2

2.6.1. Traitement des cellules

Une suspension cellulaire de HEP-2 à 5×10^5 cellules/ml dans du DMEM à 10% SVF est ensemencée dans des plaques multi-puits (Boîtes à 06 puits) sur lesquelles sont mentionnées les informations suivantes : la date, le nombre de passage, et le traitement subi (**Figure 16**).

Les boîtes sont incubées dans le milieu DMEM à 10% SVF pendant 24h à 37°C et 5% de CO₂.

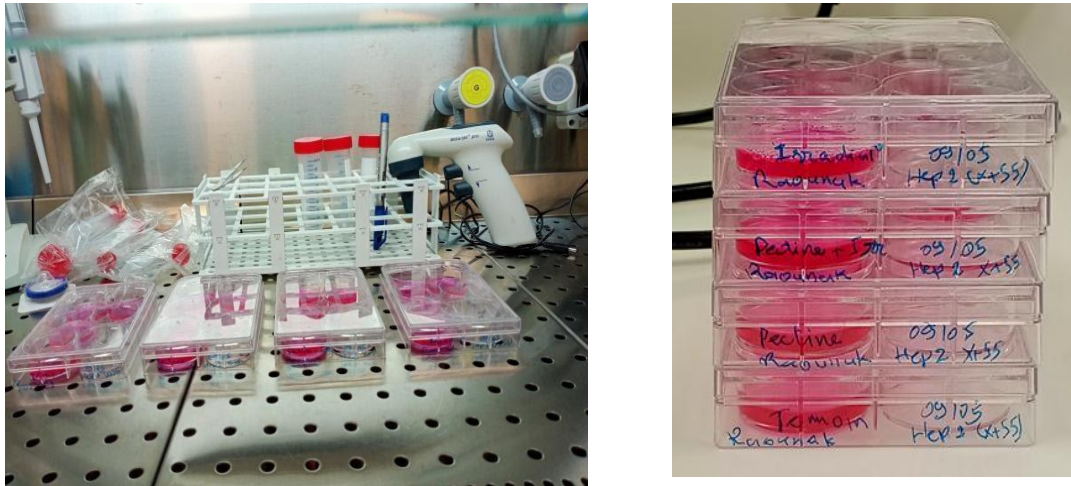


Figure 16: Préparation des plaques multi-puits des HEP2 avant la mise en contact.

Après 24h d'incubation, les cellules en phase exponentielle subissent les différents traitements suivants:

- Pectine modifiée (POMI) seule (à une concentration de 3mg/ml).
- Irradiation seule à 2Gy.(dose correspondante à la dose de la radiothérapie).
- Pectine modifiée (POMI) puis 1h après une irradiation à 2Gy pendant 10 min. (traitement concomitant).

L'irradiation des cellules se fait par une source radioactive de Cobalt 60 à une dose de 2 Gy, en utilisant l'irradiateur de type ELDORADO-78ACEL du CRNA illustrée sur la **figure 17**.

Après irradiation, les plaques sont replacées dans l'incubateur pendant 24h à 37°C et 5% CO₂.

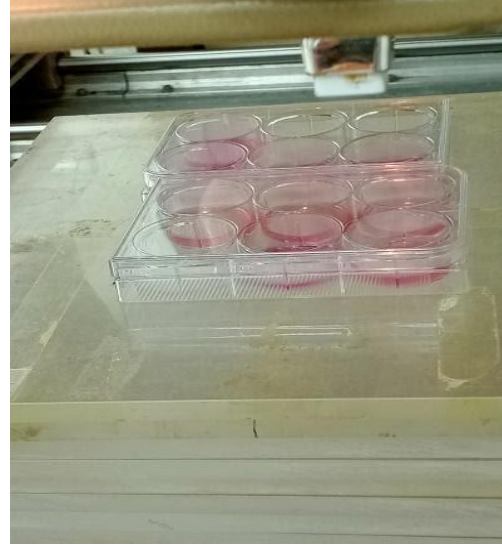


Figure 17: Irradiation des cellules Hep2 par rayonnements gamma à 2Gy (irradiateur ELDORADO-78ACEL Unité de Cobalt 60)

2.7. Analyse par cytométrie en flux

2.7.1. Principe

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse de cellules en suspension, véhiculées à grande vitesse jusqu'à une chambre d'analyse traversée par des faisceaux lasers. L'interaction des cellules avec la lumière permet de caractériser et classer les cellules selon différents critères tels que la taille, la forme, la complexité ou la présence d'une molécule révélée par un composé fluorescent.

2.7.2. Mode opératoire

L'utilisation de molécules fluorescentes (fluorochromes) couplées à des anticorps, protéines ou molécules permettent la détection spécifique des composants cellulaires ou leur intégration. Les marqueurs fluorescents absorbent l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée et émettent à une longueur d'onde plus élevée (émission > excitation). L'émission de fluorescence est canalisée et véhiculée par fibre optique jusqu'à une série de détecteurs (photomultiplicateurs) placés en aval de filtres (sélection chromatique). Il est ainsi possible d'identifier des sous-types cellulaires en fonction de leurs propriétés physiques et leurs caractéristiques fluorescentes, puis de les isoler et éventuellement les trier. (**Figure18**).

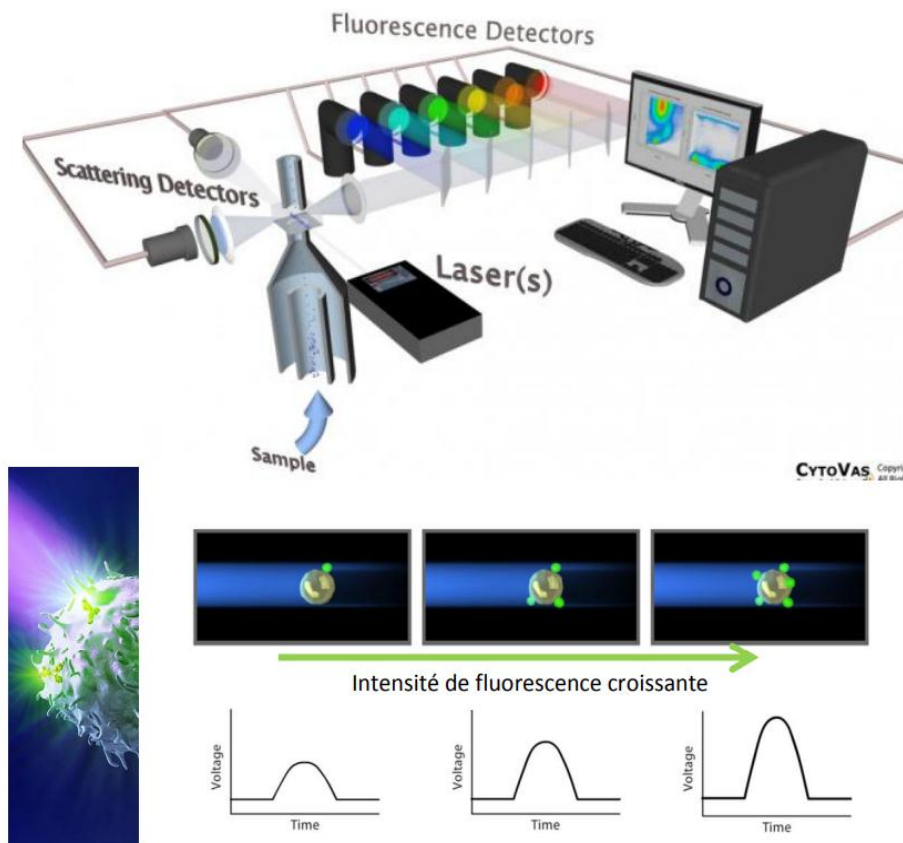


Figure 18: Principe de la cytométrie de flux

Après irradiation et traitement des cellules, les plaques sont incubées pendant 24h à 37°C et 5% CO₂, le milieu des cellules traitées et/ou irradiées est récupéré dans des tubes stériles coniques.

Deux lavages des puits sont effectués avec une solution PBS, avant de réaliser, une trypsination en rajoutant 0,5ml de trypsine dans chaque puit. Les plaques sont incubées 3min à 37°C puis un certain volume de solution de DMEM est rajouté et les cellules sont récupérées. Une centrifugation est effectuée à 1500 rpm pendant 7min. Le culot récupéré, subi deux lavages avec une solution de PBS froid en centrifugeant après chaque lavage. Les cellules obtenues sont reconstituées dans une solution tampon: le BindingBuffer 1X à une concentration de 10⁶cellules/ml après dénombrement à la cellule de Mallassez.

2.8. Analyse de l'effet des différents traitements sur l'apoptose des cellules HEP-2

Pour l'analyse de l'apoptose par cytométrie, en flux un kit prêt à l'emploi est utilisé. Il contient l'iodure de propidium (IP), la fluorescein isothiocyanate-conjugatedannexin V (Annexin V-FITC) comme marqueurs fluorescents de l'ADN et une solution tampon : le Binding Buffer 10X.

L'annexine V-FITC est utilisée en cytométrie de flux pour marquer les cellules en apoptose. Le test est basé sur l'exposition des phosphatidyl-sérines sur la face externe de la membrane plasmique. L'annexine V-FITC se fixe sur ces phosphatidyl-sérines, permettant ainsi de différencier les cellules apoptotiques des cellules vivantes. Cependant, lors de la nécrose, la membrane plasmique des cellules explose en partie ; elle devient poreuse et la cellule expose ainsi, ses phosphatidyl-sérines au milieu extérieur. Les cellules en nécrose sont donc également marquées par l'annexine V-FITC. On réalise alors un second marquage avec de l'iodure de propidium (IP) qui ne fixe les cellules que lorsque la membrane plasmique est poreuse.

Autrement dit, l'IP peut marquer les cellules en nécrose car la membrane est perméable, mais pas les cellules apoptotiques puisque la membrane reste imperméable.

L'utilisation conjointe des deux marqueurs Annexine V et IP permet de différencier les cellules vivantes (Annexine V et IP négatives), des cellules en apoptose précoce (Annexine V positives, IP négatives) et des cellules en nécrose (Annexine V positives, IP positives). [NucView™ 488 and RedDot™ 2 Apoptosis&Necrosis Kit].

La suspension cellulaire (100µl) à laquelle sont ajoutés les deux marqueurs (IP: 5µl et Annexin V-FITC: 5µl), est incubée au noir pendant 15min. Après on rajoute (400µl) de solution tampon. Trois essais ont été réalisés. L'analyse des tubes par cytométrie en flux (BD FACS Aria) est effectuée en ne dépassant pas 1h d'analyse.

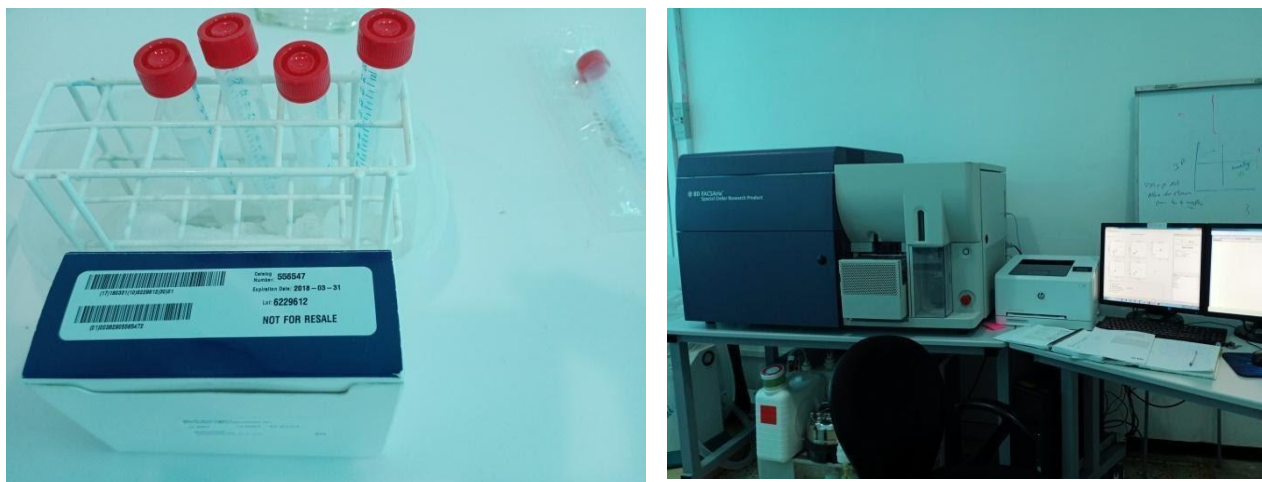


Figure 19: Préparation des suspensions cellulaires pour l'analyse de l'apoptose par cytomètre de flux

2.9. Analyse de l'effet des différents traitements sur l'évolution du cycle cellulaire

Pour l'analyse de l'effet des différents traitements sur l'évolution du cycle cellulaire, les cellules cancéreuses HEP-2 passent par les mêmes étapes que pour l'analyse de l'apoptose jusqu'au dénombrement par la cellule de Malassez ensuite elles sont fixées dans un millilitre d'éthanol glacé à 70%. La lecture au cytomètre en flux peut se faire après une heure d'incubation à -20°C ou bien les conserver au froid jusqu'à utilisation.

Pour la lecture au cytomètre en flux, on procède au marquage des cellules avec l'iodure de propidium en présence de RNase.

Pour cela on prépare 100 ml de PBS contenant 20mg de DNase free RNase et 2 mg d'iodure de propidium. Le culot de cellules est récupéré après élimination de l'éthanol dans 800 µl de PBS contenant l'IP et la RNase. On incube 30 minutes à température ambiante et on procède à la lecture.

Partie III:

Résultats

et

Discussion

Résultats et discussion

1 Rendement en pectine

Le rendement de la pectine d'oranges modifiée par le traitement chimique (POM) calculé et exprimé en pourcentage à partir du poids initial de la pectine native (PN) est de 54,35%. La poudre de la pectine modifiée chimiquement (POM) qu'on a récupéré est représentée sur la **figure 20**.

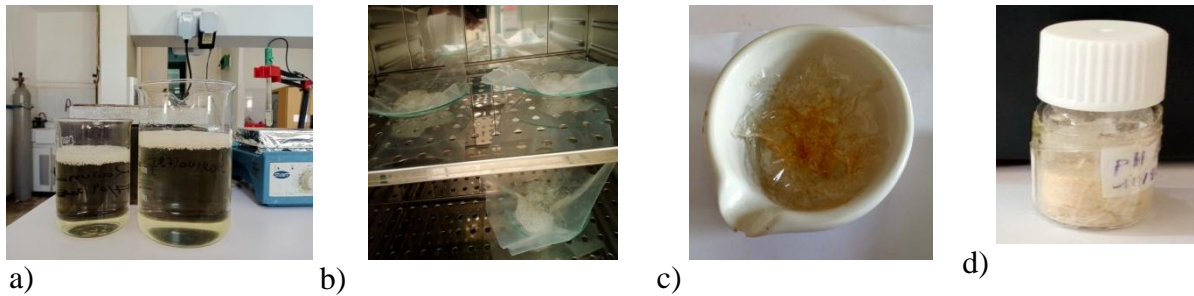


Figure 20: Modification chimique de la pectine d'oranges (POM):
a) ajustement du pH, b) séchage, c) et d) pectine modifiée chimiquement (POM).

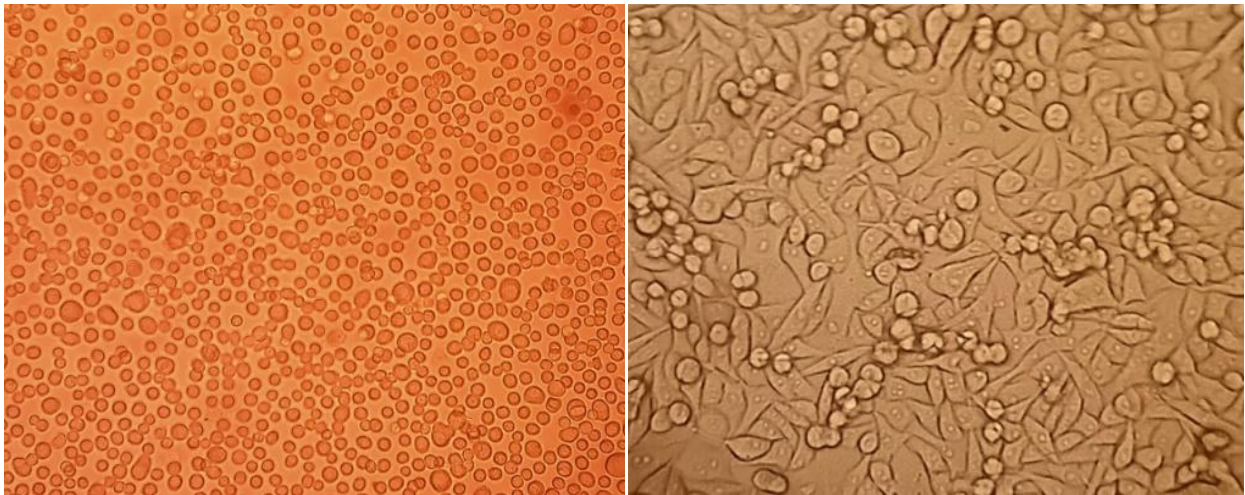
2 Culture des HEP-2

Après décongélation, les cellules HEP-2 ont étéensemencées et un suivi de la prolifération a été effectué par des observations microscopiques.

L'entretien des cellules cancéreuses HEP-2 a été réalisé sur une période de deux jours afin d'arriver à la concentration désirée qui est de 5×10^5 cellules/ml.

Les résultats iconographiques de la culture des HEP-2 observés au microscope photonique inversé, ont été représentés sur la figure 24. Ces photographies illustrent le développement réussi des HEP-2 et l'effet dispersif de la trypsine pour la réalisation des passages (**Figure21**).

Après 48h d'incubation à 37°C, un développement des cellules est observé en formant un tapis cellulaire (**Figure21**). Les HEP-2 apparaissent sous forme fusiforme. Ce résultat correspond à celui rapporté par **Ross et Wilson (2007)**.



a) HEp-2 dissociées par trypsination

b) HEp-2 après 48h d'incubation

Figure 21: Illustration des cellules HEp2 par microscope inversé (EVOS XL).

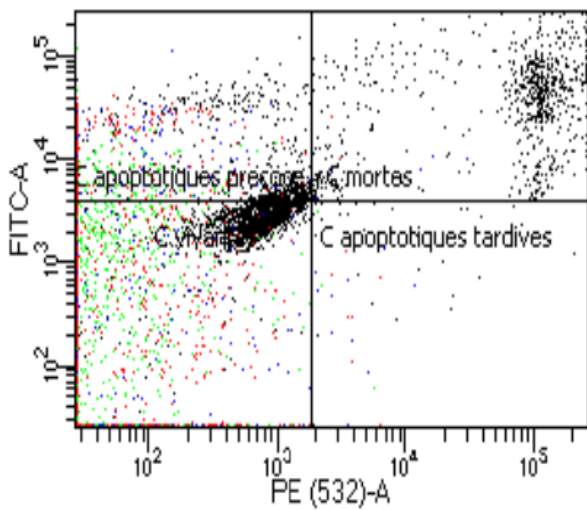
3. Etude de l'effet des différents traitements sur les cellules HEp-2

3.1. Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux (CMF)

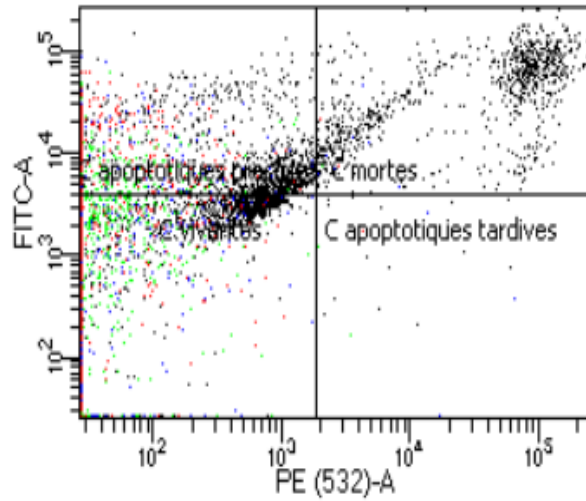
Nous avons évalué l'effet de la pectine d'orange modifiée chimiquement et irradiée (POMI à 3mg/ml), l'irradiation seule (2Greys) ainsi que l'effet combiné de la pectine modifiée + l'irradiation (3mg/ml + 2Greys) sur les cellules de cancer du larynx HEp-2. 24 heures après de différents traitements les cellules ont été récupérées. L'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux après un double marquage à l'annexine V (FITC-A) et l'iodure de propidium (IP).

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **tableau III** et la **figure 22 (a,b,c et d)**, ainsi plusieurs observations sont notées.

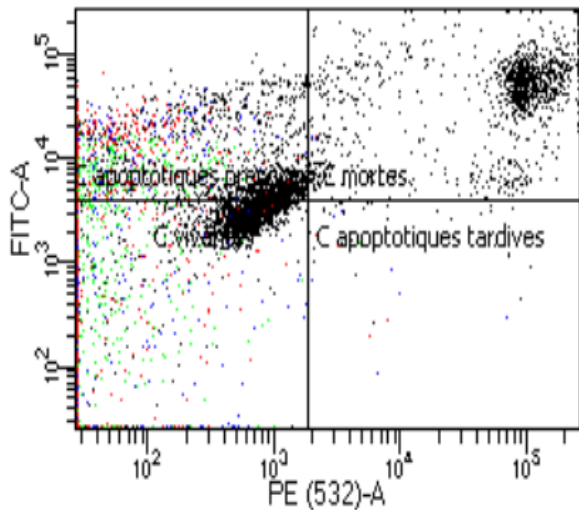
La figure 22, nous illustre la distribution des différentes populations des cellules après le double marquage FITC-A et IP, cellules vivantes FITC-A(-) et IP(-), cellules apoptotiques précoces FITC-A(+) et IP(-) et cellules apoptotiques tardives FITC-A(+) et IP(+) et cellules en nécrose FITC-A(-) et IP(+).



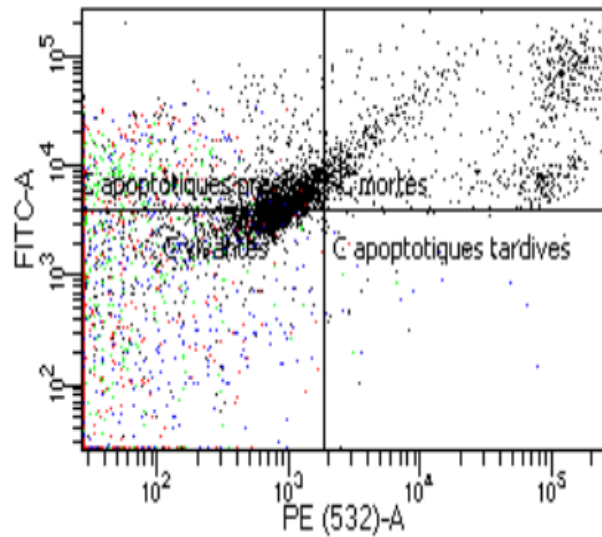
a)



b)



c)



d)

Population

- All Events
- Debris
- Population HEP2
- HEP2- singlet
- C apoptotiques precoce
- C mortes
- C vivantes
- C apoptotiques tardives

Figure 22: Mise en évidence de l'apoptose par CMF des cellules HEP-2 par double marquage FITC-A et IP: a) témoin cellules non traitées; b) Après traitement à POMI (3mg/ml); c) Après traitement par irradiation à 2Gy au Cobalt 60; d) Après traitement combiné (POMI+IRR)

Tableau III: Effet de POMI et/ou Irradiation gamma à 2Gy sur les cellules HEp-2

Echantillons	Témoin	POMI	IRR	POMI+IRR
C Apoptotiques précoces (Q1)	22,9	31,6	37,3	22,4
C Apoptotiques tardives (Q4)	0,6	0,5	0,4	0,3
C nécrotiques (Q2)	0,35	0,3	0,3	0
C vivantes (Q3)	76,1	67,5	62	77,3
C apoptotiques	23,5	32,1	37,7	22,7
C mortes (Q1+Q4+Q2)	23,85	32,4	38	22,7

D'après le **tableau III**, nous constatons un nombre moyen de cellules mortes pour tous les traitements aux environs de 25% en général, avec néanmoins un nombre important de cellules mortes (38%) générées par le rayonnement du Cobalt 60. La mort par nécrose est très faible pour tous les traitements aux environs de 0,3%. Le nombre de cellules mortes par apoptose est lui important, il est de 37,7 % pour les cellules traitées par irradiation et de 32,1% pour celles traitées avec la pectine seule. Le traitement combiné par contre n'a pas montré l'effet radiosensibilisateur attendu de la pectine.

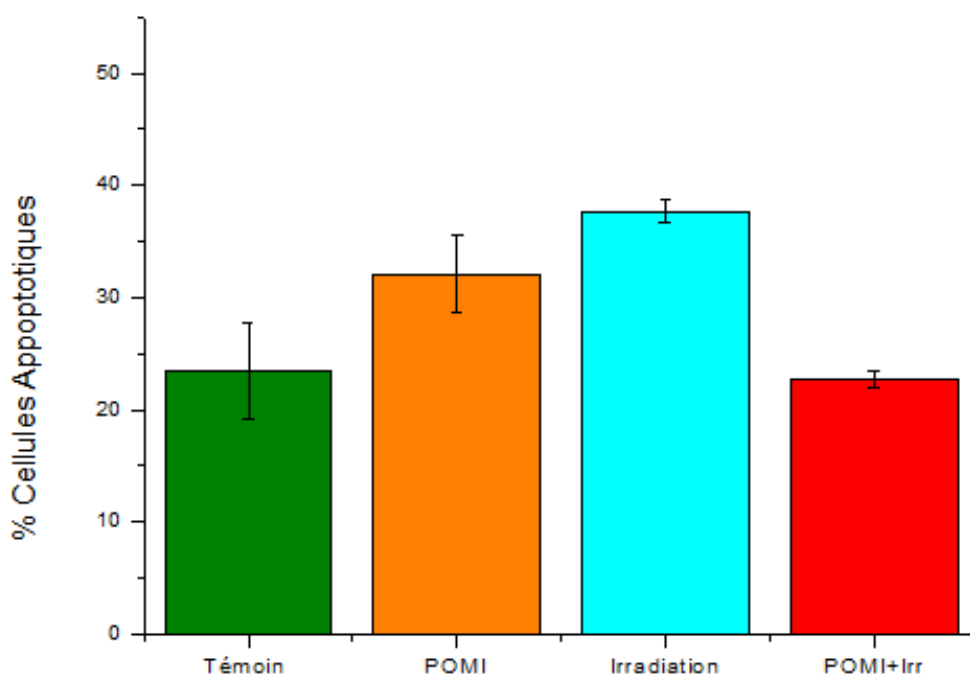


Figure 23: Effet du POMI et/ou Irradiation Gamma à 2Gy sur les cellules HEp-2

La représentation graphique des cellules apoptotiques en fonction des différents traitements, (**Figure23**) montre l'effet délétère de l'irradiation sur les cellules cancéreuses, ainsi que celui de la pectine modifiée.

Les dommages de la molécule d'ADN représentés par les cassures simple et surtout double brins, enclenchent la machinerie de la mort cellulaire programmée représentée par l'apoptose. En effet, l'effet apoptotique de la pectine modifiée sur les cellules cancéreuses HEP-2 est bien mis en évidence avec 32,1% de cellules apoptotiques.

Le même résultat est rapporté par **Conti et al., en (2016)** qui ont confirmé que l'activité anti-tumorale de la pectine ayant un faible poids moléculaire est associée à la voie apoptotique. **Fang et al., en (2018)** stipule que la pectine est un antagoniste de la galectine-3, et induit l'inhibition de cette dernière en induisant l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses de la vessie. Par ailleurs, les travaux de **Wang et al.,(2016)** ont montré l'effet apoptotique d'une pectine de faible poids moléculaire, par l'altération de l'expression de la galectine-3 sur des cellules cancéreuses gastro-intestinal.

Par contre, l'effet additif ou bien radio sensibilisateur escompté pour le traitement combiné n'a pas été mis en évidence dans cette expérience. Ceci est peut-être dû aux conditions expérimentales, en effet beaucoup de paramètres entrent en jeu, tels que le temps de mise en contact, le nombre de cellules traitées, le débit de dose d'irradiation et l'efficacité des produits utilisés.

Dans une étude précédente de **Abdoun-Ouallouche et al.,(2020)**(travail non encore publié), l'effet radio sensibilisateur de la pectine modifiée a été clairement mis en évidence grâce à une technique d'immunofluorescence. Il a été démontré une réduction de la capacité de réparation des cassures double brins des cellules HEP-2, en concomitance avec le rayonnement ionisant.

Une optimisation des conditions expérimentales est donc impérative, afin de révéler l'effet radio sensibilisateur de la pectine d'orange modifiée.

Dans la littérature, il a été prouvé que les substances qui amplifient les dommages causés à l'ADN ou qui inhibent les voies de réparation des cassures doubles brins sensibilisent les cellules tumorales à l'irradiation (**Nowsheen et al., 2011; Chow et al., 2013; Conti et al., 2018**).

3.2. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux (CMF)

La cytométrie en flux est une méthode de choix pour l'analyse du cycle cellulaire et la mesure de la quantité d'ADN au sein des cellules en prolifération. Elle permet en plus d'identifier la distribution cellulaire durant les différentes phases du cycle cellulaire.

Grace à un marquage à l'iodure de propidium, nous avons pu mettre en évidence les différentes phases du cycle cellulaire des cellules HEp-2, à savoir la phase G1, la phase S, la phase G2/M avec les proportions cellulaires correspondantes à chaque phase et cela pour chacun des traitements appliqués en plus du témoin.

Tableau VI: Effet de POMI et/ou Irradiation gamma à 2Gy sur le cycle cellulaire des cellules HEp-2

Echantillons	Témoin	POMI	IRR	POMI+IRR
G1	38,4	0,4	22,9	17,2
S	2,9	18	9,9	7
G2/M	4,4	4,5	3,1	9,1

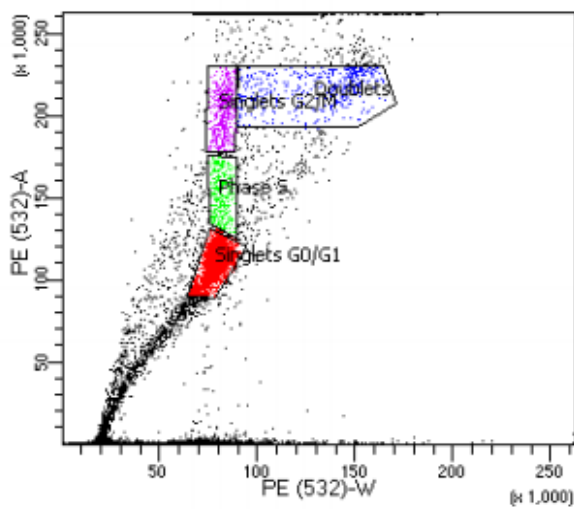
D'après le **tableau VI**, on remarque une accumulation de cellules en G2/M après le traitement combiné (pectine + irradiation) par rapport au témoin et aux autres traitements. Ceci plaiderait en faveur d'un arrêt du cycle en G2/M sous l'effet du double traitement pectine /irradiation.

Ce résultat est très encourageant, mais il doit être confirmé par d'autres études, d'autant plus que **Fang et al. en (2018)** ont obtenu le même résultat avec de la pectine d'agrumes modifiée (MCP: Modified Citrus Pectin) sur des cellules du cancer de la vessie (UBC cells: UrinaryBladder Cancer cells). En effet, ces auteurs ont enregistré un arrêt du cycle cellulaire en G2/M avec une régulation à la baisse de l'expression de deux protéines clés de la transition G2/M, notamment la cyclin B1 et la phosphorylated-Cdc2.

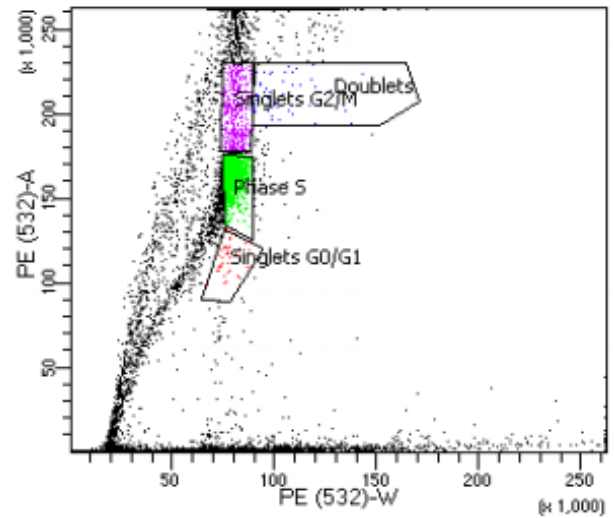
Huang et al en 2018 ont démontré de leur côté, l'effet d'un composant principal de la pectine (les oligogalacturonides OGA) sur le cycle cellulaire des cellules cancéreuses humaines de poumons A549 par accumulations des cellules en G2/M ainsi que l'augmentation de la fraction en sub G1.

D'après Wang et al. en 2016, le traitement de cellules de cancer gastrique (AGS) et de cancer colorectal (SW-480) par une pectine d'agrumes de faible poids moléculaire (LCP), a induit une augmentation de la population en phase G2/M et sa réduction en phase S du cycle cellulaire de manière dose-dépendante avec toujours la réduction à la baisse de l'expression de la cycline B1.

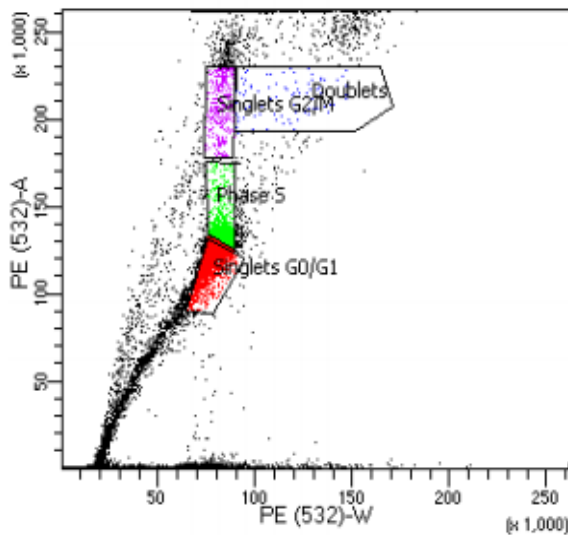
Voici la distribution des populations cellulaires à travers les phases du cycle cellulaire après les différents traitements(**Figure 24**).



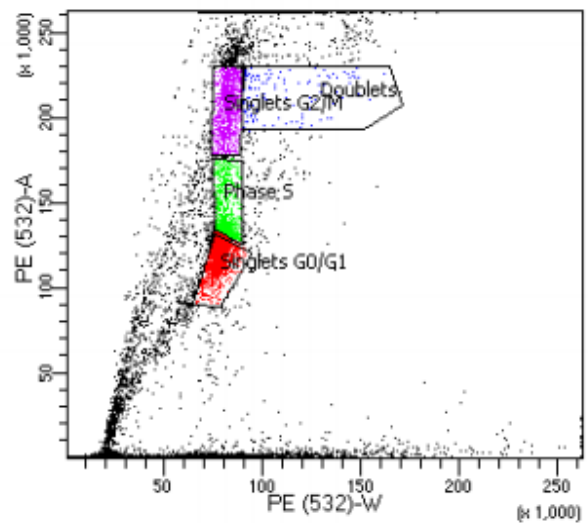
a) Témoin



b) Pectine



c) Irradiation



d) Pectine +Irradiation

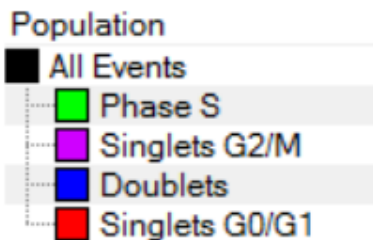


Figure 24: Mise en évidence de la distribution des populations cellulaires à travers les phases du cycle cellulaire après les différents traitements

La pectine modifiée est l'une des substances végétales les plus étudiées, elle est depuis longtemps reconnue pour son effet inhibiteur de la prolifération des cellules cancéreuses aussi bien in-vitro qu'in-vivo. L'effet inhibiteur de la pectine s'exerce par l'induction de l'apoptose ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire comme il a été rapporté par Delphi et al en 2015 et 2016 à propos de l'effet de la pectine de pomme in-vitro sur les cellules humaines de cancer du sein MDA-MB-231, et in-vivo sur les cellules de cancer du sein de souris 4T1. L'étude de Jackson et al en 2007 a montré également l'induction de l'apoptose par une pectine d'agrumes modifiée sur des lignées cellulaires de cancer de prostate .

Conti et al. en 2018 ont eux aussi démontré l'effet radiosensibilisateur de la pectine d'agrumes modifiée sur les cellules de cancer de prostate (PCa) par un arrêt modéré du cycle cellulaire en G2/M en parallèle avec le clivage du précurseur d'une protéine proapoptotique, la caspase-3 et l'augmentation de l'expression d'une protéine proapoptotique, également la Bax. De même Vayssade et al en 2010 ont montré l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M pour les melanocytes de souris B16F10 après traitement avec la pectine Okra.

Conclusion

Et

Perspectives

Notre travail réalisé au sein du laboratoire de Radiobiologie au niveau du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA), a eu pour objectifs:

1. la mise en évidence de l'effet radio-sensibilisateur de la pectine traitée et modifiée en concomitance avec une dose équivalente au traitement de radiothérapie (2Gy) sur les cellules tumorales du Larynx Humain HEP-2 (Human Epithelioma type-2, ATCC), par une technique d'analyse: la cytométrie en flux (CMF).
2. La détection de la mort cellulaire radio-induite par apoptose et étude de l'évolution du cycle cellulaire en réponse aux traitements.

La démarche expérimentale de notre étude a été concluante sur de nombreux points:

- La mise en culture des cellules cancéreuses est réalisée avec succès permettant d'avoir le nombre de cellules nécessaires pour la réalisation des différentes expériences.
- La maîtrise de la technique de cytométrie en flux (CMF) a permis la détection des différentes populations de cellules ainsi que les phases du cycle cellulaire en réponse aux différents traitements appliqués.
- La pectine modifiée chimiquement et irradiée CMIP a montré un effet apoptotique qui est aux environs de (30%).
- L'effet radio-sensibilisateur de la pectine modifiée a été révélé par l'analyse de l'évolution du cycle cellulaire qui a montré une accumulation des cellules cancéreuses en G2/M ce qui plaiderait en faveur d'un arrêt du cycle en phase G2
- On conclut que la pectine d'Orange telle que nous l'avons modifiée, a révélé un double effet apoptotique et radio_sensibilisateur sur une lignée cancéreuse particulièrement radio-résistante et pourrait donc constituer un candidat potentiel pour de nouvelles thérapies ciblées.

En perspective et en continuité à ce travail, il serait intéressant de réaliser:

- L'étude approfondie des voies de signalisation dans lesquelles la pectine serait impliquée et cela par d'autres techniques comme le western-Blot.....etc.
- L'expérimentation *in-vivo* de l'effet antitumoral et radio-sensibilisant.
- Optimisation des conditions.
- L'étude de l'effet radio-sensibilisateur de la pectine sur d'autres cancers radio-résistants.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

Almeida, EAMS., Facchib, S. P., Martinsa, A. F., Nocchic, S., Schuquela, I. T. A., Nakamurac, C.V., Rubiraa, A. F., Muniza, E. C. (2015). Synthesis and characterization of pectin derivative with antitumor property against Caco-2 colon cancer cells. *CarbohydrPolym*; 115 :139– 145.

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

Axelos, M. A. V., & Thibault, J. F. (1991). The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. *The chemistry and technology of pectin*, 6, 109–108.

Baldwin L, Domon J-M, Klimek JF, Fournet F, Sellier H, Gillet F, Pelloux J, Lejeune-Hénaut I, Carpita NC, Rayon C (2014) Structural alteration of cell wall pectins accompanies pea development in response to cold. *Phytochemistry* 104:37–47

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

Bencokova, Z. M. (2007). Signalisation et réparation des cassures double-brin de ADN dans les gliomes : Modulation de la réponse aux traitements chimio-radiothérapeutiques. *Biotechnologie, santé et management*. P 37, 39, 44, 47, 52.

Boonrod, D., Reanma, K., & Niamsup, H. Extraction and Physicochemical Characteristics of Acid-Soluble Pectin from Raw Papaya Acid-Soluble Pectin from Raw Papaya (Caricapapaya) Peel.

Bourgier, C., Azria, D., Gourgou, S; Hennequin, C. (2021). 5 Radiosensibilité des tissus tumoraux, des tissus sains et administration de la radiothérapie. In *Nouveautés en radiothérapie* (pp. 73–92). EDP Sciences.

Brudieux, V. (2007). Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques: application de la relation structure/activité à la dermocosmétique (Doctoral dissertation, Limoges).

C. E., Schofield, P. N. (2006). Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes. *Mutation Research*; 597:87–97.

Cédric Desbène, Olivier Gaillard. Caractéristiques immunoanalytiques de la galectine-3. *Annales de Biologie Clinique*. 2014;72(4):491–499.

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

Chauhan, D., Catley, L., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Velankar, M., & Anderson, K. C. (2005). A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer cell*, 8(5), 407–419.

Chen, J., Liu, W., Liu, C. M., Li, T., Liang, R. H., & Luo, S. J. (2015). Pectin modifications: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(12), 1684–1698.

Chene C., (2003). Les Fibres Alimentaires. *Journal de l'ADRIANOR*. Agro-Jonctionn33–Septembre/Octobre2003, pp1–8.

Clément J.M., (1978). *Dictionnaire des industries alimentaires*. MASSON (Ed). Paris, 219p.

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

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

Desouky, O., Ding, N., Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), 247–254.

Dr David AZRIA, Pr Jean-Bernard DUBOIS
Notions radiobiologiques; Principaux effets secondaires (2007); 3–7.

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

Delphi L; Sepehri H. (2016); Apple pectin: A natural source for cancer suppression in 4T1 breast cancer cells in vitro and express p53 in mouse bearing 4T1 cancer tumors, in vivo. *Biomed Pharmacother*. 84:637–644

Delphi L., Sepehri H., Mansoori F. (2015) Pectic-Oligosaccharides from Apples Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest in MDA-MB-231 Cells, a Model of Human Breast Cancer. *Chemistry, Medicine. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*

Fang, T., Liu, D., Ning, H., Sun, J., Huang, X., Dong, Y., Geng, M., Yun, S., Yan, J., Huang, R. (2018). Modified citrus pectin inhibited bladder tumor growth through downregulation of galectin-3. *Acta Pharmacol Sin*; 39(12):1885-1893.

Gao, W. Y., Cara, A., Gallo, R. C., Lori, F. (1993). Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 8925-8928.

Glicksman, M. (1969). Gum technology in the food industry.

Glinskii, O. V., Huxley, V. H., Glinsky, G. V., Pienta, K. J., Raz, A., & Glinsky, V. V. (2005). Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia*, 7(5), 522-527.

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

Green, M. C. (2006). Narratives and cancer communication. *Journal of communication*, 56, S163-S183.

Guess, B. W., Scholz, M. C., Strum, S. B., Lam, R. Y., Johnson, H. J.; Jennrich, R. I. (2003). Modified citrus pectin (MCP) increases the prostate-specific antigen doubling time in men with prostate cancer: a phase II pilot study. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 6(4), 301-304.

Guillotin, S. E., Van Loey, A., Boulenguer, P., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2007). Rapid HPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl-esterification and amidation. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 85-91.

Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., & Morris, V. J. (2009). Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *The FASEB Journal*, 23(2), 415-424.

Gunning, A. P., Pin, C.; Morris, V. J. (2013). Galectin 3- β -galactobiose interactions. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 529-533.

Hamdi Cherif, M., Bouharati, K., Kara, L., Rouabah, H., Hammouda, D., Fouatih, Z. (2015). Les cancers en Algérie Données Épidémiologiques du Réseau National des Registres du Cancer.

Hamdi, D. (2016). Analyse des effets directs de rayonnements ionisants à différents TELs dans un modèle expérimental in vitro de cartilage humain sain et pathologique. Université Paris-Saclay. These de Doctorat.167 p.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *A Cell Press journal*; 144(5): 646– 674.

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

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

Hayashi, A., Gillen, A. C., & Lott, J. R. (2000). Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. *Alternative Medicine Review*, 5(6), 546–552.

Hayashi, A., Gillen, A. C., & Lott, J. R. (2000). Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. *Alternative Medicine Review*, 5(6), 546–552.

Hayashi, A., Gillen, A. C.; Lott, J. R. (2000). Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. *Alternative Medicine Review*, 5(6), 546–552.

Hirano, M., Kiyohara, H., Matsumoto, T., & Yamada, H. (1994). Structural studies of endopolygalacturonase-resistant fragments of an antiulcer pectin from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohydrate research*, 251, 145–162.

Hosseini, G., Halvaei, S., Heidarian, Y., Dehghani-Ghobadi, Z., Hassani, M., Hosseini, H., Naderi, N., Sheikh Hassani, S. (2019). Pectasol-C Modified Citrus Pectin Targets Galectin-3-induced STAT3 activation and synergize paclitaxel cytotoxic effect on ovarian cancer spheroids. *Cancer Medicine*; 8 (9):4315–4329.

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

Hsieh, T. C., & Wu, J. M. (1995). Changes in cell growth, cyclin/kinase, endogenous phosphoproteins and nm23 gene expression in human prostatic JCA-1 cells treated with modified citrus pectin. *Biochemistry and molecular biology international*, 37(5), 833–841.

Hsieh, T. C., & Wu, J. M. (1995). Changes in cell growth, cyclin/kinase, endogenous phosphoproteins and nm23 gene expression in human prostatic JCA-1 cells treated with modified citrus pectin. *Biochemistry and molecular biology international*, 37(5), 833–841.

Hubert-Habart, M., Kokel, B., & Menichi, G. (1987). Réflexions sur la chimiothérapie des cancers. *L'Actualité chimique* (Paris. 1973), (4), 105–114.

Huang CS, Huang AC, Huang PH, Lo D, Wang YT, Wu MC. (2018) Synergistic Antitumor Effect of Oligogalacturonides and Cisplatin on Human Lung Cancer A549 Cells. *Int J Mol Sci*. Jun 14;19(6):1769.

Haton, C. (2005). Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse doctorat de l'université Paris VI, Pierre et Marie Curie. 168 p.

Sia, J., Szmyd, R., Hau, E., & Gee, H. E. (2000). Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer. *Cell Death: A Primer*. *Frontiers in cell and development biology*, 8, 41. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00041>.

Inohara, H., & Raz, A. (1994). Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconjugate journal*, 11(6), 527–532.

Inohara, H., & Raz, A. (1994). Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconjugate journal*, 11(6), 527–532.

Jackson, C. L., Dreaden, T. M., Theobald, L. K., Tran, N. M., Beal, T. L., Eid, M., Mohnen, D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 17(8), 805–819.

Jackson, C. L., Dreaden, T. M., Theobald, L. K., Tran, N. M., Beal, T. L., Eid, M., Gao, M.Y., Shirley, R. B., Stoffel, M. T., Kumar, M. V., Mohnen, D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*;17 :805–819.

Jaspers, N. G., Taylor, A. M., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S. M., Lovett, M., Collins, F. S., Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI3 kinase. *Science*; 268:1749–53.

Jo, C., Kang, H., Lee, N. Y., Kwon, J. H., & Byun, M. W. (2005). Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. *Radiation Physics and Chemistry*, 72(6), 745–750.

Joubert, A., Vogin, G., Devic, C., Granzotto, A., Viau, M., Maalouf, M.; Foray, N. (2011). *Biologie des radiations: avancées majeures et perspectives pour la radiothérapie*. *Cancer/Radiothérapie*, 15(5), 348–354.

Jourdain J.R., Dublineau I; Phan G., (2005). Evaluation de l'emploi de la pectine chez les enfants vivant sur les territoires contaminés par le césium. Rapport de Direction de la Radioprotection de l'Homme. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN). 36p

Kang, H. J., Jo, C., Kwon, J. H., Son, J. H., An, B. J.; Byun, M. W. (2006). Antioxidant and cancer cell proliferation inhibition effect of citrus pectin-oligosaccharide prepared by irradiation. *Journal of medicinal food*, 9(3), 313–320.

Kato, T. A., Okayasu, R., Bedford, J. S. (2008). Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and gamma-H2AX foci after irradiation of chromosomes in G1-phase or in condensed metaphase cells. *Mutation Research*; 639, 108–112.

Kim, S. K., & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate polymers*, 62(4), 357–368.

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

Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M. C., Quémener, B., & Thibault, J. F. (2002). Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 547–550.

Mahé, J. (2019). Modification chimique de la pectine: synthèse, caractérisations et applications en formulation galénique (Doctoral dissertation, Bourgogne Franche-Comté).

Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., Rastall, R. A. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8383–8389.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *nature*, 454(7203), 436–444.

Marathe, R. M., Annapure, U. S., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2002). Gelling behaviour of polyose from tamarind kernel polysaccharide. *Food hydrocolloids*, 16(5), 423–426.

Martin, O. A., Ivashkevich, A., Choo, S., Woodbine, L., Jeggo, P. A., Martin, R. F., Lobachevsky, P. (2013). Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity. *DNA Repair (Amst.)*; 12(10): 844–855

Mastronicola, R. (2015). Étude de la dissémination des cellules tumorales liée à l'acte chirurgical dans les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

May, C.D. (1990). Industrial Pectins: Sources, Productions and applications. *Carbohydrate Polymers*. 12, 79 – 99.

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

Milia, J. (2005). Implication de RhoB dans les mécanismes cellulaires de réponse aux rayonnements ionisants (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III–Paul Sabatier).

- Morris, G. A., Foster, T. J., & Harding, S. E. (2002). A hydrodynamic study of the depolymerisation of a highmethoxy pectin at elevated temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 48(4), 361–367.
- Nangia-Makker, P. V., Hogan, Y., Baccarini, S., Tait, L. (2002). Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *Cancer Inst*; 94:1854–1862.
- Nangia-Makker, P., Hogan, V., Honjo, Y., Baccarini, S., Tait, L., Bresalier, R., Raz, A. (2002). Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(24), 1854–1862.
- Nangia-Makker, P., Nakahara, S., Hogan, V., Raz, A. (2007). Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39(1), 79–84.
- Niture, S. K., Refai, L. (2013). Plant pectin: a potential source for cancer suppression. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 8(1), 9.
- Nocini, R., Molteni, G., Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2020). Updates on larynx cancer epidemiology. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(1), 18.
- Nordsmark, M., Bentzen, S. M., Rudat, V., Brizel, D., Lartigau, E., Stadler, P., Overgaard, J. (2005). Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiotherapy and oncology*, 77(1), 18–24.
- O'Neill A.M., Darvill A.G., Albersheim P., (2001). Pectic Substances *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons (Ed), pp1–11.
- Oakenfull, D. G. (1991). The chemistry of high-methoxylpectins. *The chemistry and technology of pectin*, 87–108.
- O'Brien, S., Kay, N. E. (2011). Maintenance therapy for B-chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*, 9(1), 22–31.
- Patterson C.A, Ph D, PA G; 2008. Polysaccharides (d'origine végétale) Pour la santé de l'intestin. *Agriculture et Agroalimentaire*, Canada.

Pienta, K. J., Naik, H., Akhtar, A. (1995). Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst*; 87: 348–53.

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

Pienta, K. J., Naik, H., Akhtar, A., Yamazaki, K., Replogle, T. S., Lehr, J., Raz, A. (1995). Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 87(5), 348–353.

Platt, D., Raz, A. (1992). Modulation of the lung colonization of B16–F1 melanoma cells by citrus pectin. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 84(6), 438–442.

Platt, D., Raz, A. (1992). Modulation of the lung colonization of B16–F1 melanoma cells by citrus pectin. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 84(6), 438–2.

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

Pointreau, Y., Lafond, C., Legouté, F., Trémolières, P., Servagi–Vernat, S., Giraud, P., Lapeyre, M. (2016). Radiothérapie des cancers du larynx. *Cancer/Radiothérapie*, 20, S131–S135.

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

Rayer, M. (2019). Mécanisme de génération de forces par les cellules apoptotiques lors de la morphogénèse de la drosophile (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier–Toulouse III).

Ryan, J. L. (2012). Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 985–993.

Roch–Lefèvre, S., Mandina, T., Voisin, P., Gaëtan, G., Mesa, J. E. G., Valente, M. Roy, L. (2010). Quantification of γ -H2AX Foci in Human Lymphocytes: A Method for Biological Dosimetry after Ionizing Radiation Exposure. *Radiation Research*, 174(2), 185– 194. doi:10.1667/rr1775.1

Sathisha, U. V., Jayaram, S., Nayaka, M. H., & Dharmesh, S. M. (2007). Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources. *Glycoconjugate journal*, 24(8), 497-507.

Sathisha, U. V., Jayaram, S., Nayaka, M. H., & Dharmesh, S. M. (2007). Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources. *Glycoconjugate journal*, 24(8), 497-507.

Slavin, J. L., Martini, M. C., Jacobs Jr, D. R., & Marquart, L. (1999). Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *The American journal of clinical nutrition*, 70(3), 459s-463s.

Smahi, A. (2008). Contrôle biologique de la Fusariose vasculaire de la Tomate causé par (*Fusariumoxysporum f. splycopersici*) (Thèse de magister, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).

Steuer, C. E., El-Deiry, M., Parks, J. R., Higgins, K. A., & Saba, N. F. (2017). An update on larynx cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(1), 31-50.

Strum, S., Scholz, M., McDermed, J. (1999). Modified citrus pectin slows PSA doubling time. A pilot clinical trial. Presentation : International Conference on Diet and Prevention of Cancer, Tampere, Finland.

Suliman, S., Ha, C. V., Schulze, J., & Tran, L. S. P. (2013). Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *Journal of experimental botany*, 64(10), 2701-2712.

Suzuki, T., Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Hayashi, K., Naka, K., Ono, S., ...& Yasui, W. (2000). Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *International journal of cancer*, 88(6), 992-997.

Tamburini, P. (2015). Prescriptions et précautions en odontologie chez les patients sous traitement anti-cancéreux (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., Rao, M. A. (1997). Chemistry and uses of pectin—a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(1), 47-73.

Turesson, I., Carlsson, J., Brahme, A., Glimelius, B., Zackrisson, B., Stenerlow, B. (2003). Biological response to radiation therapy. *Acta Oncology*; 42(2): 92-106.

Vayssade, M., Sengkhampan, N., Verhoef, R., Delaigue, C., Goundiam, O., Vigneron, P., Nagel, M. D. (2010). Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytotherapy research*, 24(7), 982-989.

Walter, R. H. (1991). Analytical and graphical methods for pectin (pp. 189-225). Academic Press: San Diego, CA.

Wang W., Ma X., Xu Y., et al. 2015. « Ultrasound-Assisted Heating Extraction of Pectin from Grapefruit Peel: Optimization and Comparison with the Conventional Method ». *Food Chemistry* 178: 106-114.

Watters, D. (1999). Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and cell biology*, 77(3), 263-271.

Weber, R. S., Harris, J., Garden, A. S., Trotti, A., Jones, C. U., Carrascosa, L., .sampling, K. K. (2005). Concomitant boost radiation plus concurrent cisplatin for advanced head and neck carcinomas: radiation therapy oncology group phase II trial 99-14. *Journal of Clinical Oncology*, 23(13), 3008-3015.

World Health Organization.(n.d.). Ionizing radiation, health effects and protective measures. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-health-effects-and-protective-measures>.

World Health Organization.(n.d.). Radiation: Ionizing radiation. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/radiation-ionizing-radiation>.

Wang, L., Guo, X. L. (2016). Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression. *Biomed Pharmacother*; 78:165-171.

Yan, J., & Katz, A. (2010). PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and-independent prostate cancer cells. *Integrative cancer therapies*, 9(2), 197-203.

Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food chemistry*, 100(4), 1356-1364.

Yapo, B. M., Wathelet, B., Paquot, M. (2007). Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 245–255.

Yokoi, H., Obita, T., Hirose, J., Hayashi, S., & Takasaki, Y. (2002). Flocculation properties of pectin in various suspensions. *Bioresource Technology*, 84(3), 287–290.

Yashar, C. M. (2018). Basic Principles in Gynecologic Radiotherapy. *Clinical Gynecologic Oncology*, 586–605.e3. doi:10.1016/b978-0-323-40067-1.00023-1.

Annexes

Annexe 1

Appareillage

- ✓ Irradiateur gamma au **Cobalt 60**
- ✓ Cytomètre de flux **BD FACSAria**
- ✓ Balance de précision
- ✓ Etuve
- ✓ pHmètre
- ✓ Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité en microbiologie type II
- ✓ Deux incubateurs à CO₂ et à hygrométrie réglable, thermostatés à **37°C** pour le maintien en culture
- ✓ Réfrigérateur pour le rangement des milieux de culture
- ✓ Congélateur de **-20°C** pour stockage de certains produits, en particulier les sérums et les antibiotiques
- ✓ Congélateur de **-80°C** pour la congélation des cellules
- ✓ Bonbonne de stockage dans l'azote liquide pour la conservation des cellules à – **196°C**
- ✓ Autoclave pour la stérilisation du matériel de culture
- ✓ Bain Marie pour le réchauffement des milieux
- ✓ Microscope photonique inversé
- ✓ Haemocytomètre (cellule de Malassez)
- ✓ Matériel de culture (Tubes falcons, Flasks T25 et Flasks T75, plaques multipuits, aid-pipette, pipettes, verreries)

Matériel

- ✓ Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).
- ✓ Sérum SVF (Sérum de Veau Fœtal) à 10%
- ✓ Antibiotiques et antifongiques : Les solutions de pénicilline G/ streptomycine à 1%, et d'amphotéricine à 0,1%
- ✓ Acides aminés: La glutamine (source de carbone) à 1%.
- ✓ Enzymes: solution de trypsine à 0,25%.

Matériel non biologique

Solution tampon Binding Buffer, Solution de Na OH à 0,1M, Solution d'acide citrique à 40%, Eau distillée, l'alcool (70°, 90° et 100°)

Annexe 2

Préparation des solutions

- **Solution Tampon PBS:** (Phosphate Bufferd Saline) Conserver à 4°C

Nacl	8g
Kcl	0,2g
NaH₂PO₄	1,44g
KH₂PO₄	0,24g
Eau distillée	800 ml

Ajuster le **pH** à 7,4 avec du **HCl** et filtrer la solution.

- **Préparation du milieu de culture DMEM 20%**

Dans un flacon de 1L de **DMEM** ajouter :

Tryptose phosphate	100ml
Pénicilline-streptomycine	2 ml
SVF	200 ml de

- **Préparation d'une solution de 250ml de NaOH 0.1 :**

1. Calcul de la masse **NaOH** pour préparer 250 ml de 0.1N



$$n = (m_{\text{NaOH}} / M_{\text{NaOH}}) \times Z (\text{eq}) / V (\text{l})$$

donc $m_{\text{NaOH}} = n \times M_{\text{NaOH}} \times V (\text{l}) / Z (\text{eq})$

2. La masse Molaire :

$$M = 23 + 16 + 1 = 40 \text{ g/mole}$$

$$Z = 1$$

Alors $m_{\text{NaOH}} = 0.1 \times 40 \times 0.25 / 1 = 1 \text{ g}$

- **Solutions pour le double marquage**

le kit d'**AnnexinBinding Buffer DNA QC** Particles

- **Solution de fixation : Ethanol à 70%**

Annexe 3

Culture cellulaire



Bonbonne d'azote liquide



Rack avec Cryoboites



Cryotube

Figure A: Le système de cryogénie pour la conservation des cellules dans l'azote liquide

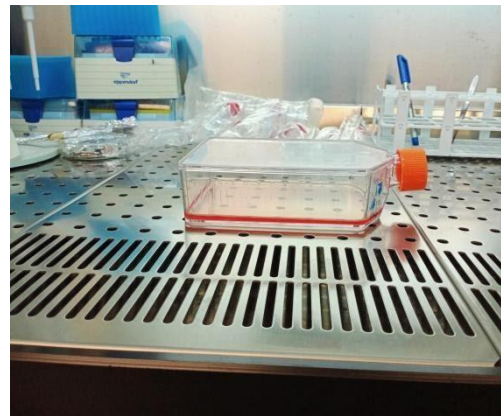
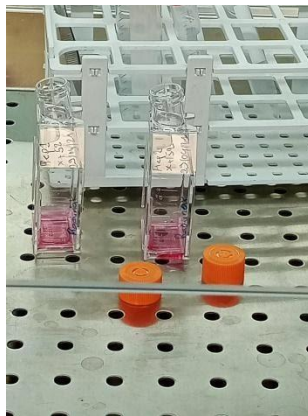


Figure B: Flask T 25 et T75 (ensemencement des cellules HEp2 décongelées)

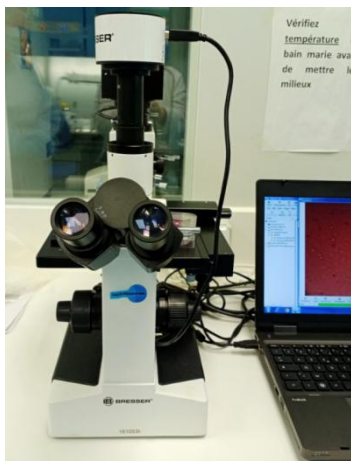


Figure C: Le contrôle de la culture cellulaire par microscope inversé (EVOS XL)