

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

INSERM U866 / UFR SVTE / Ecole doctorale Environnement-Santé-STIC

# THESE

Pour l'obtention du grade de

## Docteur de l'Université de Bourgogne

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenance de thèse par

**Frédéric MAZUE**

19 décembre 2011

EFFETS DES POLYPHENOLS DE VIN ROUGE SUR  
LA PROLIFERATION CELLULAIRE ET SUR LE  
METABOLISME DU RESVERATROL

Membres du jury :

<b>M. Philippe JEANDET</b> , Pr., Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims.	Rapporteur
<b>M. Gilbert KIRSCH</b> , Pr., Université Paul Verlaine, Metz.	Rapporteur
<b>M. Bernard WALTER</b> , Pr., Université de Haute-Alsace, Colmar.	Examineur
<b>M. André SEGALA</b> , Dir. BIVB, Beaune.	Examineur
<b>M. Dominique DELMAS</b> , M.C.U., Université de Bourgogne, Dijon.	Co-directeur de thèse
<b>M. Norbert LATRUFFE</b> , Pr., Université de Bourgogne, Dijon.	Directeur de thèse

## Thèse financée avec l'aide

- Du Conseil Régional de Bourgogne



- Du Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne



- De l'Université de Bourgogne



- De l'INSERM



- Et de la Ligue contre le cancer



## Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes directeurs de thèse et initiateurs de ce projet sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour : Norbert Latruffe et Dominique Delmas.

Un grand merci également aux financeurs de cette étude car il est bien connu que l'argent est le nerf de la guerre : le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne et le Conseil Régional de Bourgogne. Doublement merci à Monsieur André Ségala, Madame Christine Monamy et Monsieur Jean-Philippe Gervais qui nous ont également permis de produire les vins.

Mon comité de suivi de thèse fut également d'une grande aide, merci donc à Madame Michelle Guilloux-Bénatier et Monsieur Eric Solary pour leurs conseils tout au long de ces années.

Merci aussi bien évidemment aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer cette thèse. Monsieur Bernard Walter, président de ce jury et Messieurs Philippe Jeandet et Gilbert Kirsch, rapporteurs. Merci à vous d'avoir pris du temps à consacrer à mon travail.

Je remercie également tous ceux qui ont collaboré aux expérimentations :

Concernant les vins, merci à l'unité expérimentale INRA de Pech Rouge à Gruissan, et plus particulièrement à Monsieur Michel Mikolajczak pour la concentration des vins de 2008. Merci aussi à Madame Dominique Champion de l'ex-ENSBANA pour les tentatives de lyophilisation, même si on ne peut pas gagner à tous les coups. Une fois les vins et concentrés produit, il a bien fallu les analyser, l'aide de CESEO à été déterminante. Merci donc à Monsieur David Chassagne qui nous a quitté trop tôt, merci à Madame Laurence Noret pour tous les conseils et le soutien technique lors de l'analyse des vins par HPLC.

Thank you very much à ceux qui ont permis les tests *in vivo* : Monsieur Nitin Telang de la société Palindrome Liaisons, ainsi que Monsieur Rajendra G. Mehta de l'IIT Research institute de Chicago.

Enfin pour toute la partie chimie, un grand merci aux équipes de chimistes de Monsieur Corrado Tringali à Catane et de Monsieur Philippe Meunier à l'ICMUB voisin. Merci en particulier à Madame Dominique Vervandier-Fasseur et Malik Chalal pour nos diverses collaborations.

La recherche, ça ne se fait pas tout seul isolé loin de tous, donc je tiens également à remercier mes collègues étudiants et assimilés : Didier Colin, Virginie Aires, Emeric Limagne, Sylvie Jeanningros, Sira Macalou, Jessica Gobbo, Sarah Mombelli, Maÿliss Lahaye, Audrey Membrilla, Marion Eirich, Lucie Desmoulins, Alexia Cotte, Benjamin Tournier, et Alexandre Schilling ; mes voisins de bureau, Julie, Manue, Flore, Momo ; et des autres bureaux : Allan, Jacques, Soeli, Kévin, Hammam, Ségo, Zillal, Arnaud, Thomas, Aurore, Sijo et tous les stagiaires.

Merci également aux statutaires du labo : Gérard, Franck, Nathalie, Catherine, Marie Geneviève, Stéphan M, Stéphane S, Doriane, Anne, Pierre, Mouss, Patrick, Jean, Françoise ; merci à tous les membres du LBMN et de l'insermU866.

Merci à tous les membres de l'association Edifice, passés, présents et futurs.

En dehors du boulot, ceux qui ne comprennent pas toujours ce que je leur raconte sur le labo mais dont le soutien m'a été nécessaire : Timmy, Masie et leurs proches, Tsétsé et sa famille, mes amis numériques, Ptit Chérubin, Chouchou, Yann et sa chup, Nico, Mike, mon cousin Gérald, mes cousins de Milly, ma famille en général, et en particulier ceux à qui je dédie cette thèse : mes parents.

Enfin je ressens le besoin de remercier la thèse en elle-même. Car grâce à toi j'ai grandi. J'ai appris beaucoup de la vie en général, du travail en particulier, et des contacts humains.

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES TABLES .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....</b>	<b>17</b>
Préambule.....	18
Objectifs.....	19
Optimiser les effets protecteurs des polyphénols de vin rouge par des combinaisons et comprendre les mécanismes .....	19
Optimiser les effets protecteurs des polyphénols de vin rouge par des modifications structurales et comprendre les relations structures-fonctions du resvératrol.....	20
<b>PARTIE I : ASPECTS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>21</b>
A.    Le vin .....	22
1.    La vinification en rouge .....	24
2.    Composition du vin rouge .....	25
a.    Eau.....	25
b.    Alcools.....	25
c.    Sucres .....	26
d.    Minéraux : ions et métaux .....	26
e.    Acides.....	27
f.    Matières azotées.....	27
g.    Composés phénoliques.....	27
h.    Microorganismes .....	27

B.	Effets du vin sur la santé .....	29
1.	Effets négatifs d'une consommation excessive de vin.....	30
2.	Le French Paradox et effets positifs d'une consommation modérée de vin .....	32
C.	Le cancer .....	34
1.	Cancérogenèse, tumorigenèse, et invasion métastatique.....	37
2.	L'apoptose .....	38
3.	Le cycle cellulaire .....	39
4.	Le métabolisme de détoxification des xénobiotiques.....	40
5.	Le cancer colorectal.....	42
a.	Données épidémiologiques .....	42
b.	Anatomopathologie colorectale .....	43
c.	Prise en charge médicale .....	46
6.	Prévention des cancers colorectaux.....	48
D.	Les composés phénoliques du vin .....	49
1.	Effets antioxydants des polyphénols du vin rouge.....	51
2.	Effets des polyphénols du vin rouge contre le cancer .....	51
3.	Le resvératrol.....	52
a.	Les autres stilbènes du vin rouge.....	55
b.	Biodisponibilité et métabolisme du resvératrol .....	55
c.	Resvératrol et santé (hors cancer).....	57
d.	Resvératrol et cancer, études <i>in vitro</i> .....	60
e.	Resvératrol et cancer, études <i>in vivo</i> .....	63
f.	Resvératrol et cancer, études cliniques .....	63
4.	Les acides phénols .....	64
5.	Les flavonoïdes .....	65
a.	La quercétine .....	66
b.	Catéchines.....	67
c.	Les anthocyanidines.....	67
d.	Les anthocyanes.....	69
6.	Les Tanins.....	69
a.	Tanins condensés .....	69
b.	Les autres tanins .....	70

7.	Effets spécifiques sur la santé des combinaisons de polyphénols du vin .....	71
E.	Les analogues du resvératrol.....	72
1.	Analogues naturels du resvératrol .....	73
a.	Le ptérostilbène .....	73
b.	Le picéatannol.....	74
c.	La pinosylvine.....	74
d.	La combretastatine A4 .....	74
e.	Les oligomères de resvératrol.....	74
2.	Analogues synthétiques du resvératrol.....	75
a.	Dérivés hydroxylés .....	75
b.	Dérivés méthylés/acétylés .....	76
c.	Autres dérivés .....	76

## **PARTIE II : MATERIELS ET METHODES ..... 77**

A.	Solutions de polyphénols .....	78
1.	Solvants.....	78
2.	Traitements.....	78
B.	Culture cellulaire.....	79
C.	Mesure de la prolifération cellulaire et du cycle cellulaire .....	80
1.	Dénombrement cellulaire par comptage manuel .....	80
2.	Cristal violet .....	81
3.	Evaluation du pourcentage d'apoptose avec le Hoechst 33342 .....	81
4.	Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux .....	82
D.	Mesure du contenu en polyphénols dans les différentes solutions.....	82
1.	Polyphénols totaux.....	82
2.	HPLC.....	83

E.	Etude du transport cellulaire du resvératrol et de son métabolisme .....	85
1.	Influx de resvératrol .....	85
2.	Efflux du resvératrol .....	85
3.	Recherche de production de métabolites du resvératrol par les cellules .....	86
F.	Etude des effets <i>in vivo</i> d'un concentré de vin sur la néoplasie des polypes induits par l'azoxyméthane .....	86

## **PARTIE III : RESULTATS ..... 89**

### **Chapitre 1 : Préparation et bioactivité d'extraits polyphénoliques de vins ..... 90**

A.	Production et choix des vins .....	91
1.	Extrait de vin de Corbières .....	91
2.	Vins expérimentaux de Bourgogne .....	92
a.	Production des vins.....	92
b.	Concentration des vins (vins de 2008) en deux étapes .....	93
c.	Extraction de polyphénols sur colonne .....	94
B.	Caractérisation des vins expérimentaux de Bourgogne .....	95
1.	Contenu polyphénolique total.....	95
2.	Profils polyphénoliques des vins et des concentrés en fonction du temps de macération et du millésime .....	96
a.	Identification des pics en fonction du temps de rétention .....	96
b.	Acide gallique .....	98
c.	Catéchines.....	98
d.	Resvératrol.....	99
e.	Acides caftarique, coutarique et caféique.....	100
f.	Quercétine .....	101



g. Anthocyanidines.....	101
C. Effets antiprolifératifs .....	103
1. Effets antiprolifératifs des extraits de vin de Corbières .....	103
2. Effets antiprolifératifs des concentrés Cx et C'x des vins de Bourgogne de 2008 ..	104
3. Effets antiprolifératifs des extraits Ex10 et E15g des vins de Bourgogne de 2008 et de 2009 .....	105
a. Effets antiprolifératifs des extraits de vins Ex10.....	107
b. Effets antiprolifératifs des extraits de vins E15g .....	108
c. Analyse semi-quantitative des effets antiprolifératifs des différents extraits de vin de Bourgogne .....	109
D. Recherche de synergies des polyphénols du vin avec le resvératrol sur la prolifération cellulaire et le transport du resvératrol .....	110
1. Effets antiprolifératifs du vin enrichi en resvératrol .....	110
2. Effets antiprolifératifs de traitements binaires / ternaires de polyphénols .....	112
3. Inhibition du cycle cellulaire .....	116
4. Effets de traitements binaires sur la mort cellulaire .....	116
5. Transports du resvératrol en présence de concentré de vin .....	119
6. Transports du resvératrol en présence d'autres polyphénols .....	121
7. Métabolisme de détoxification du resvératrol en présence de concentré de vin de Bourgogne.....	124
a. Méthodologie de détection .....	124
b. Résultats préliminaires .....	125
c. Métabolisme du resvératrol dans les cellules colorectales SW480 .....	126
d. Métabolisme du resvératrol dans les cellules hépatiques HepG2 .....	126
e. Détails des métabolites.....	127
E. Effets <i>in vivo</i> d'un concentré de vin sur la néoplasie des polypes intestinaux induits par un cancérigène, l'azoxyméthane, chez la souris.....	129
1. Approche méthodologique.....	129
2. Résultats bruts .....	129

F. Discussion du chapitre 1 .....	131
1. Les différents vins, concentrés et extraits.....	131
2. Inhibition de la prolifération cellulaire.....	132
3. Métabolisme et transports membranaires du resvératrol .....	133
4. Effets <i>in vivo</i> des polyphénols de vin rouge sur la néoplasie colorectale chimio-induite .....	133

## **Chapitre 2 : Etude de relations structure-activité du resvératrol par l'emploi d'analogues structuraux..... 135**

A. Présentation de l'article : Les déterminants structuraux du resvératrol pour l'activité d'inhibition de la prolifération cellulaire : études expérimentales et de docking de nouveaux analogues. ....	136
1. Etat des lieux.....	136
2. Présentation des travaux.....	137
3. Résultats .....	138
B. Article .....	139
C. Discussion sur l'article et les nouveaux travaux parus depuis notre publication .....	148

## **PARTIE IV : DISCUSSION, CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES ..... 149**

A. Le vin, un aliment à part ou une part de l'alimentation ?.....	150
1. L'intérêt d'un apport en vin.....	150
2. Contexte nutritionnel .....	150
3. Le vin, boisson alcoolisée .....	151
4. Apport de nos résultats dans cette problématique .....	153

B.	La chimioprévention du cancer par les composés phénoliques du vin	153
1.	Combinaisons de molécules bioactives .....	154
2.	Modifications chimiques des composés phénoliques.....	155
C.	Conclusion générale et perspectives .....	156

**BIBLIOGRAPHIE ..... 158**

**ANNEXES..... 185**

Liste des publications et communications réalisées au cours de l'étude .....	186
Publications en premier auteur .....	186
Articles dans des journaux à comité de lecture.....	186
Livres .....	186
Présentations de posters lors de congrès.....	187
Valorisation des travaux .....	187

# LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Le monument au marchand de vin de Til-Châtel, conservé au musée archéologique de Dijon. © F. Perrodin. Musée archéologique de Dijon..... 23
- Figure 2 :** Types de cancers les plus fréquents, tous pays confondus. (Source : GLOBOCAN 2008)..... 35
- Figure 3 :** Types de cancers les plus fréquents, tous pays européens confondus. (Source : GLOBOCAN 2008)..... 35
- Figure 4 :** Types de cancers les plus fréquents en France Métropolitaine. (Source : GLOBOCAN 2008)..... 36
- Figure 5 :** Représentation schématique des événements et étapes pouvant intervenir dans les mécanismes de la cancérogenèse. .... 37
- Figure 6 :** Métabolisme des xénobiotiques au niveau cellulaire. Localisation cellulaire des CYPs, GSTs, UGTs, SULTs, MDRs et MRPs..... 41
- Figure 7 :** Incidence et mortalité du cancer colorectal selon les zones géographiques. (Source : GLOBOCAN 2008)..... 43
- Figure 8 :** Prolifération cellulaire anormale de l'épithélium colique aboutissant à la formation de cryptes aberrantes. A : Crypte normale, les cellules ne prolifèrent qu'au fond de la crypte. B : Les cellules épithéliales présentent une prolifération accrue. C : Les cellules s'accumulent sur le pourtour de la crypte. D : Crypte aberrante. Adapté d'après Lipkin (Lipkin, 1974). .... 44
- Figure 9 :** Stades de développement du cancer colorectal suivant la séquence adénome-cancer. Une lésion dysplasique (stade 0) évolue en polype adénomateux ou adénome (stade I), puis en carcinome (stade II) qui envahit les tissus avoisinants (stade III) puis les autres organes par des métastases (stade IV). © 2005 Terese Winslow (pour le compte du NIH, institut national américain de la santé). .... 46
- Figure 10 :** Voie de biosynthèse du resvératrol d'après Jeandet (Jeandet et coll., 2002). La phénylalanine est convertie successivement en Acide cinnamique, Acide para-coumarique, Para-coumaryl-CoA et Resvératrol, par l'action des enzymes Phénylalanine ammonia-lyase, Cinnamate-4-hydroxylase, CoA Ligase et Stilbène synthase. .... 54
- Figure 11 :** Formules chimiques de certains des principaux acides-phénols présents dans le vin rouge..... 65
- Figure 12 :** Formules chimiques de certains des principaux flavonoïdes présents dans le vin rouge. .... 66

<b>Figure 13</b> : Formules chimiques de certaines des principales anthocyanidines présentes dans le vin rouge.....	68
<b>Figure 14</b> : Formule chimique des principaux dérivés naturels du resvératrol et numérotation des carbones de la structure des stilbènes. ....	73
<b>Figure 15</b> : Echelle de temps et procédure expérimentale pour l'évaluation de l'efficacité de concentrés de vin rouge de Bourgogne à inhiber l'apparition de foyers de cryptes aberrantes (FCA) chez les souris CF-1. ....	87
<b>Figure 16</b> : Photographie microscopique (x40) de foyers de cryptes aberrantes (FCA) de côlons de souris traitées à l'AOM après coloration au bleu de méthylène. ....	88
<b>Figure 17</b> : Chromatogrammes HPLC du vin V2009-1 à 280, 320, 360 et 520 nm et en fluorescence (excitation 330 nm / émission 374 nm) avec identification des pics de plusieurs polyphénols en fonction de leur temps de rétention (comparé à des standards, Tableau 7) et du maximum d'absorbance qui leur est associé. ....	97
<b>Figure 18</b> : Concentrations en mg/L de l'acide gallique dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC. ....	98
<b>Figure 19</b> : Concentrations en mg/L de catéchine et concentration en mg/L équivalent de catéchine de l'épicatéchine dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC. ....	98
<b>Figure 20</b> : Concentrations en mg/L du resvératrol et du picéide ou du resvératrol total (calculé en additionnant le resvératrol aglycone et le picéide) dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC. ....	99
<b>Figure 21</b> : Concentrations en mg/L équivalent d'acide caféique des acides caftarique, cis-coutarique, trans-coutarique et caféique dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.....	100
<b>Figure 22</b> : Concentrations en mg/L équivalent de quercétine de la quercétine-3-glucoside dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC. ....	101
<b>Figure 23</b> : Concentrations en mg/L équivalent d'oenine (malvidine-3-glucoside) de la delphinidine, cyanidine et pétunidine dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.....	101
<b>Figure 24</b> : Concentrations en mg/L équivalent d'oenine de la péonidine et malvidine dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC. ....	102
<b>Figure 25</b> : Nombre de cellules SW480 après 48 heures de traitement par l'extrait de vin de Corbières, de 0,6 à 5,7 µg/mL de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique). Le resvératrol est utilisé comme contrôle positif à 30 µM. La concentration finale d'éthanol dans tous les traitements est de 0,1%. ....	104
<b>Figure 26</b> : Pourcentages d'inhibition de la prolifération de cellules SW480 après 48 heures de traitement par les concentrés de vins de Bourgogne de 2008 (Cx pour les concentrés	

étape 1, C'x pour les concentrés étape 2) à 100 µg/mL de polyphénols totaux équivalent d'acide gallique..... 105

**Figure 27** : Pourcentages de cellules SW480 adhérentes évalués par coloration au cristal violet après 48 heures de traitement par les extraits de vins de 2008 et 2009 contenant 10 fois plus de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) que les vins originaux (les valeurs sont notifiées dans le Tableau 8). (n=3). ..... 107

**Figure 28** : Pourcentages de cellules SW480 adhérentes évalués par coloration au cristal violet après 48 heures de traitement par les extraits de vins de 2008 et 2009 contenant 15 g/L de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) (les concentrations finales utilisées pour les traitements sont notifiées dans le Tableau 8). (n=3). ..... 108

**Figure 29** : Effets antiprolifératifs du resvératrol (10, 30 et 100 µM), du concentré de vin C'3 (100 mg/L équivalent d'acide gallique) et de leur combinaison (10 µM de resvératrol + 100 mg/L de C'3) sur les cellules de cancer colorectal SW480, mesurés par coloration des cellules adhérentes au cristal violet après 48 heures de traitement. (n=4). ..... 111

**Figure 30** : Effets antiprolifératifs du resvératrol (10 et 30 µM), du concentré de vin C'3 (100 mg/L équivalent d'acide gallique) et de leur combinaison (10 µM de resvératrol + 100 mg/L de C'3) sur les cellules tumorales hépatiques HepG2, mesurés par coloration des cellules adhérentes au cristal violet après 48 heures de traitement. (n=4). ..... 111

**Figure 31** : Effets antiprolifératifs du resvératrol (5 µM) et de la quercétine (5 µM) seuls ou en combinaison pendant 48 heures contre les cellules de cancer colorectal SW480, mesurés par comptage manuel sur cellule de Mallassez avec exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan. (n=3). ..... 113

**Figure 32** : Effets antiprolifératifs du resvératrol (5 µM) et de la catéchine (5 µM) seuls ou en combinaison pendant 48 heures contre les cellules de cancer colorectal SW480, mesurés par comptage manuel sur cellule de Mallassez avec exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan. (n=3). ..... 114

**Figure 33** : Effets antiprolifératifs du resvératrol (5 µM), de la catéchine (5 µM) et de la quercétine (5 µM) seuls ou en combinaison pendant 48 heures contre les cellules SW480, mesurés par comptage manuel sur cellule de Mallassez avec exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan. (n=3). ..... 115

**Figure 34** : Effets antiprolifératifs du resvératrol (5 µM), de la catéchine (5 µM) et de la quercétine (5 µM) seuls ou en combinaison pendant 48 heures contre les cellules de cancer colorectal HCT116, mesurés par comptage manuel sur cellule de Mallassez avec exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan. (n=3). ..... 115

**Figure 35** : Cycle cellulaire analysé par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium de cellules SW480 traitées pendant 48 heures par 5 µM de resvératrol (Res, B), 5 µM de catéchine (Cat, C), 5 µM de quercétine (Qrc, D), ou 5 µM de chacun de ces trois polyphénols par paires (resvératrol et catéchine : E, resvératrol et quercétine : F) ou les trois simultanément (G), comparativement au témoin (A). ..... 117

<b>Figure 36</b> : Pourcentage de cellules de cancer colorectal SW620 présentant un phénotype apoptotique après 48 heures de traitement par le resvératrol (5 µM), la catéchine (5 µM) et la quercétine (5 µM) seuls ou en combinaisons binaires ou ternaires. (n=3). .....	118
<b>Figure 37</b> : Photographies microscopiques des noyaux de cellules SW620 colorées au Hoechst 33342 après 48 heures de traitement par le resvératrol (r) ou les combinaisons resvératrol + quercétine (rq) ou resvératrol +catéchine + quercétine. Les noyaux présentant des phénotypes apoptotiques sont indiqués par des flèches.....	118
<b>Figure 38</b> : Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-resvératrol en fonction du temps dans les cellules SW480 traitées 6 heures par 100 mg/L de concentré de vin C'3 ou par une quantité d'éthanol équivalente (témoin). (n=3). .....	120
<b>Figure 39</b> : Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-resvératrol pendant 10 et 15 minutes dans les cellules SW480 traitées 6 heures par 100 mg/L de concentré de vin C'3 ou par une quantité d'éthanol équivalente (témoin). (n=6). .....	120
<b>Figure 40</b> : Efflux de [ <sup>3</sup> H]-resvératrol en fonction du temps dans les cellules SW480 traitées 6 heures par 100 mg/L de concentré de vin C'3 ou par une quantité d'éthanol équivalente (témoin) après une incubation de 10 minutes avec une solution de [ <sup>3</sup> H]-resvératrol. (n=3). .....	121
<b>Figure 41</b> : Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-resvératrol (10 µM) en fonction du temps dans les cellules SW480 en présence ou non de quercétine (10 µM). (n=3). .....	122
<b>Figure 42</b> : Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-resvératrol (10 µM) en fonction de la concentration en quercétine dans les cellules SW480. (n=3). .....	123
<b>Figure 43</b> : Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-resvératrol (10 µM) pendant 10 minutes dans les cellules SW480 en présence de quercétine (10 µM) (colonne 2) ou seul après un traitement de 20 heures par 10 µM ou 50 µM de quercétine (colonnes 3 et 4). (n=3). .....	124
<b>Figure 44</b> : Identification des pics correspondant au resvératrol et trois de ses métabolites dans les milieux de culture cellulaires en fonction de leurs temps de rétention spécifiques par HPLC à 320 nm. Ici est présenté à titre d'exemple le milieu de culture cellulaire enrichi en resvératrol 30 µM ayant été 48 heures au contact des cellules hépatiques HepG2. En encarts sont également représentés l'identification des pics dans les milieux enrichis en concentré de vin C'3 100 µg/mL et C'3 100 µg/mL + resvératrol 10 µM après 48 heures au contact des cellules coliques SW480. ....	125
<b>Figure 45</b> : Evaluation par HPLC du pourcentage de resvératrol métabolisé dans le milieu de culture cellulaire après 48 heures de mise en contact avec les cellules SW480. (n=1). Influence du concentré de vin C'3.....	127
<b>Figure 46</b> : Evaluation par HPLC du pourcentage de resvératrol métabolisé dans le milieu de culture cellulaire après 48 heures de mise en contact avec les cellules HepG2. (n=1). Influence du concentré de vin C'3.....	127

**Figure 47** : Aires des pics détectés en HPLC correspondant au resvératrol et à ses métabolites après 48 heures de mise au contact des cellules SW480 et HepG2 avec un milieu de culture cellulaire contenant soit 10 µM de resvératrol, 30 µM de resvératrol, 100 mg/L de concentré de vin C'3 ou une combinaison de 100 µg/mL de C'3 et de 10 µM de resvératrol. .... 128

**Figure 48** : Poids moyen des animaux des groupes contrôle (◆) (n=9) et ayant reçu un régime enrichi en concentré de vin C'3 (□) (n=10) en fonction de l'âge des animaux (semaines).. 130

**Figure 49** : Nombre moyen de foyers de cryptes aberrantes (FCA) dans les côlons de souris contrôle (n=6) ou ayant reçu un régime enrichi en concentré de vin C'3 (n=7). Les colonnes représentent le nombre total de FCA par animal, le nombre de foyers contenant plus de 4 cryptes aberrantes, et le nombre de foyers dans les sections proximale, médiane et distale. Les pourcentages de variations entre contrôle et traités sont représentés au dessus de colonnes. .... 130



# LISTE DES TABLES

- Tableau 1 :** Composition chimique du vin, à l'exception des composés phénoliques qui sont présentés dans le Tableau 2 (page 48). \*Les valeurs minimales et maximales présentées le sont à titre indicatif et proviennent d'un panel de treize publications, d'autres dosages montrent que des vins peuvent avoir une teneur allant jusqu'à 4 g/L (Rifler et coll., 2011). Adapté d'après German (German et Walzem, 2000). ..... 29
- Tableau 2 :** Principaux composés phénoliques présents dans un panel de 13 vins rouges. \*Les valeurs minimales et maximales présentées le sont à titre indicatif et proviennent d'un panel de treize publications, d'autres dosages montrent que des vins peuvent avoir une teneur allant jusqu'à 4000 mg/L (Rifler et coll., 2011). Adapté d'après German (German et Walzem, 2000)..... 50
- Tableau 3 :** Composition de la phase mobile pour l'étude des polyphénols par HPLC en fonction du temps. .... 84
- Tableau 4 :** Composition de la phase mobile pour l'analyse rapide de polyphénols par HPLC en fonction du temps. .... 84
- Tableau 5 :** Concentrations de polyphénols totaux et de certains polyphénols particuliers dans des extraits de vin rouge du Languedoc (Corbières A.O.C., Carignan N majoritaire). Les concentrations sont exprimées en milligrammes de polyphénols par litre de vin. Ces valeurs sont fournies par le Pr. P. L. Teissedre à partir de résultats de dosages par HPLC..... 92
- Tableau 6 :** Concentration en polyphénols totaux exprimée en milligrammes de polyphénols par litres de produit équivalents d'acide gallique. Vins de 2008 et 2009 et concentrés de 2008 sont utilisés tels quels ou en solution dilués dans l'eau. La colonne  $\Delta$  représente le rapport entre la concentration de polyphénols dans le vin (ou le concentré) et la concentration dans le vin (ou le concentré) 1. .... 96
- Tableau 7 :** Temps de rétention théoriques (en minutes) de certains polyphénols présents dans le vin rouge, selon le protocole d'HPLC décrit précédemment..... 97
- Tableau 8 :** Récapitulatif de la composition qualitative et quantitative des différents composés phénoliques analysés dans les vins expérimentaux de Bourgogne de 2008 et 2009. .... 103
- Tableau 9 :** Concentration (g/L) de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) dans les différents traitements appliqués aux cellules SW480 avec les extraits de vins de 2008 et 2009. Les lignes représentent les différentes solutions utilisées, les colonnes les dilutions dans le milieu de culture cellulaire. Les valeurs sont données en grammes de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) par litre de milieu de culture cellulaire..... 106
- Tableau 10 :** IC<sub>50</sub> approchés des différents extraits de vins expérimentaux de Bourgogne de 2008 et 2009, calculés à partir des tests de prolifération cellulaire sur les cellules coliques

SW480 avec les solutions à concentration identique en polyphénols (E15g) ou à volume égal de vin (Ex10). ..... 109

# LISTE DES ABBREVIATIONS

ABC	« ATP-Binding Cassette »
ABCC2	« ATP-Binding Cassette sub-family C member 2 »
ABCG2	« ATP-Binding Cassette sub-family G member 2 »
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
AOM	AzOxyMéthane
ARN	Acide RiboNucléique
ATCC	« American Type Culture Collection »
Bcl-2	« B-cell leukemia/lymphoma-2 »
BCRP	« Breast Cancer Resistance Protein »
BIVB	Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne
Caspases	« CysteinyI-aspartate-cleaving proteases »
Cdc25	« Cell Division Cycle »
Cdks	« Cycline-dependent kinase »
CESEO	Cellule d'Expertise Scientifique En Œnologie
CF-1	« Carworth Farms 1 »
CIRC	Centre international de Recherche sur le Cancer
CoA	COenzyme A
CKI	« Cdk Inhibitor »
CYP	CYtochrome P450
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DISC	« Death Inducing Signaling Complex »
DMEM	« Dulbecco's Modified Eagle's Medium »
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DPBS	« Dulbecco's Phosphate Buffered Saline »
EDTA	« Ethylene Diamine Tetraacetic Acid »
ENSBANA	Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation
FasL	« Fas Ligand »
FCA	Foyers de Cryptes Aberrantes
GLOBOCAN	« GLObal Burden Of CANcer »
GSTs	Glutathion-S-Transférases
HPLC	« High-Performance / High-Pressure Liquid Chromatography »

HTLV-1	« Human T-lymphotropic virus 1 »
IAPs	« Inhibitor of Apoptosis Proteins »
iNOS	« Inductible Nitric Oxide Synthase »
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IUPAC	« International Union of Pure and Applied Chemistry »
IUVV	Institut Universitaire de la Vigne et du Vin
LDL	« Low Density Lipoproteins »
MAPK	« Mitogen-Activated Protein Kinase »
MONICA	« MONitoring trends and determinants In Cardiovascular disease »
MRP	« Multidrug Resistance-associated Protein »
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	« Phosphate Buffered Saline »
P-gp	P-Glycoprotéine
qPCR	« Quantitative Polymerase Chain Reaction »
RPMI	« Roswell Park Memorial Institute medium »
SDS	« Sodium DodecylSulfate »
SIRT1	SIRTuine 1
SGLT	Sodium/Glucose coTransporteur
SULTs	SULfoTransférases
TNF	« Tumor Necrosis Factor »
TNM	« Tumor Node Metastasis »
TRAIL	« TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand »
UGTs	UDP GlucuronosylTransférases
WHO	« World Health Organisation »

# **INTRODUCTION ET OBJECTIFS**

## Préambule

Aujourd'hui, le Français moyen consomme environ 50 litres de vin par an, ce qui le classe parmi les premiers consommateurs mondiaux. Il est donc logique de se demander quels sont les effets que la consommation de vin peut avoir sur la santé de la population. Dans le cas des gros buveurs (au-delà de trois verres de vin par jour), des effets néfastes principalement dus à l'éthanol sont clairement observés (cirrhose du foie, cancer, infarctus, ...). En revanche, il est généralement admis qu'une consommation modérée (un ou deux verres de vin par jour) est bonne pour la santé lorsqu'elle est accompagnée d'une alimentation saine et variée. Cet effet bénéfique est avéré par de nombreuses études épidémiologiques. Ces études concernent principalement l'espérance de vie globale ou les maladies coronariennes, mais quelques travaux suggèrent des effets bénéfiques vis-à-vis du cancer. La consommation de vin pourrait donc s'avérer une piste intéressante dans une optique de prévention nutritionnelle des cancers.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude bibliographique du sujet qui s'efforcera d'établir un état des lieux des effets des polyphénols de vin rouge contre le cancer, en passant par une présentation des différents acteurs et en particulier le resvératrol.

La deuxième partie traitera des matériels et méthodes employés durant cette étude.

La troisième partie regroupera les résultats des différentes approches, incluant un article publié en 2010 dans « European Journal of Medicinal Chemistry ».

Enfin, la quatrième partie discutera des résultats de cette étude sous forme d'une synthèse critique et conclura ces travaux en proposant des perspectives.

## Objectifs

Si les effets protecteurs de polyphénols purifiés (en particulier le resvératrol) sur les modèles *in vitro* voire animaux ne sont plus à démontrer, il n'en est pas de même pour les mélanges de polyphénols (naturels ou non) pour lesquels seules quelques études ont été consacrées. Malgré tout, elles reflètent des effets notables, en particulier nos travaux sur les effets anti tumoraux de polyphénols totaux du vin rouge de Bourgogne semblent prometteurs.

C'est dans l'optique de comprendre les mécanismes de ces effets protecteurs et chercher à les optimiser que se situe mon travail de thèse.

### **Optimiser les effets protecteurs des polyphénols de vin rouge par des combinaisons et comprendre les mécanismes**

A l'aide de tests effectués avec des extraits polyphénoliques naturels ou des combinaisons de polyphénols, nous nous sommes employés à chercher des effets synergiques entre plusieurs polyphénols purifiés et ceux présents dans des vins rouges expérimentaux de Bourgogne (en collaboration avec le BIVB) sur des lignées cellulaires d'origine colorectale. Notre étude a utilisé d'une part, des mélanges de 2 ou 3 polyphénols purifiés (resvératrol, quercétine, catéchine), et d'autre part, des extraits et concentrés de vins, mélanges naturels d'un grand nombre de polyphénols dans des proportions variables. Après avoir caractérisé nos extraits et concentrés de vins, nous avons étudié leurs effets sur le fonctionnement des cellules cancéreuses :

- Prolifération et cycle cellulaire
- Influx et efflux du resvératrol à travers la membrane cellulaire, dont les efficacités pourraient être modulées par des facteurs nutritionnels (tels que d'autres polyphénols) intervenant sur le métabolisme
- Modulation de la cancérogenèse *in vivo* chez la souris CF-1 (en collaboration avec Monsieur Nitin Telang de la société Palindrome Liaisons, ainsi que Monsieur Rajendra G. Mehta de l'IIT Research institute de Chicago)

Il ressort que, concernant la prolifération, tous nos différents extraits et concentrés de vins sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire, les polyphénols pouvant agir sur le cycle cellulaire en induisant des blocages à différents niveaux.

Concernant les transports membranaires de resvératrol, certains polyphénols du vin tels que la quercétine sont capables de moduler l'influx de resvératrol dans la cellule dans certaines conditions, vraisemblablement au niveau transcriptionnel principalement.

Concernant les animaux, le traitement diminue le nombre global de lésions pré-néoplasiques, et surtout le nombre de lésions de grande taille.

### **Optimiser les effets protecteurs des polyphénols de vin rouge par des modifications structurales et comprendre les relations structures-fonctions du resvératrol**

L'autre partie de ce travail a consisté à comprendre les relations structure-fonction du resvératrol en ce qui concerne ses capacités anticancéreuses. Pour ce faire, nous avons effectué divers tests avec des analogues non naturels du resvératrol synthétisés par les chimistes de Catane (Professeur Corrado Tringali) et Dijon (Professeur Philippe Meunier). Ces molécules diffèrent du resvératrol par des substitutions (hydroxylation/méthoxylation) au niveau des deux cycles benzéniques. Systématiquement, les molécules synthétisées avaient leurs structures correspondantes dans les configurations *trans*- et *cis*-. Nous avons étudié les effets de ces différentes molécules sur la prolifération des cellules cancéreuses coliques et sur leur cycle cellulaire.

Cette approche a montré que les analogues méthoxylés du *cis*-resvératrol sont également de puissants anticancéreux, mais qu'ils utilisent des mécanismes d'action différents de ceux du *trans*-resvératrol.



# **PARTIE I : ASPECTS BIBLIOGRAPHIQUES**

## A. Le vin

Le vin est produit depuis les débuts de la civilisation (Barnard et coll., 2011). Vraisemblablement originaire du Proche-Orient, on retrouve ses traces dans les hiéroglyphes égyptiens, le code du roi babylonien Hammourabi, ou encore des bas-reliefs assyriens. L'ancien testament présente la vigne comme un cadeau de Dieu à Noé pour le soulager dans sa solitude. L'influence du vin sur le développement de la plupart des sociétés eurasiennes est considérable, au point qu'on lui consacre de nombreuses divinités (Shesmou, Dionysos, Bacchus, le sang du Christ, ...). Il est le seul aliment pour lequel un tel caractère sacré et symbolique s'est répandu.

Depuis l'Antiquité, le vin se trouve au centre du régime alimentaire de la plupart des pays du pourtour méditerranéen. Il est alors consommé sous plusieurs formes, parmi lesquelles le moretum (vin aromatisé à la mûre, framboise, myrtille et fleur d'oranger) et la saugée (vin blanc parfumé à la sauge, miel, citron, cardamome, girofle). Il y représente également une activité commerciale de premier ordre. Aujourd'hui, la consommation de vin, même si elle ne cesse de diminuer depuis quelques décennies, reste importante dans les pays du bassin méditerranéen, et le vin perdure sur nos tables en restant un élément central de notre alimentation et de notre culture. A noter que la consommation augmente dans les pays émergents (Chine, Brésil, Argentine) et dans d'autres pays industrialisés (USA, Japon).

La Bourgogne en particulier est une région viticole de premier ordre. Même si par le volume de production de vin elle ne se place pas en tête des principales régions viticoles, la Bourgogne est réputée pour la qualité de ses vins. La viticulture en Bourgogne daterait d'au moins 2000 ans comme en attestent des vestiges archéologiques de vignes à Gevrey-Chambertin (Garcia et coll., 2010). Les fouilles sur la villa gallo-romaine des Tuillières à Selongey (Ruellet et Ruellet, 1985) révèlent de nombreux indices qui tendraient à prouver une production de vin en Bourgogne à l'époque gallo-romaine. Le commerce de vin à cette époque est également révélé par la stèle de Til-Châtel (Figure 1) représentant un marchand de vin dans son échoppe servant un client à l'aide d'amphores. Le vin de Bourgogne est donc vraisemblablement consommé depuis plusieurs siècles.



*Figure 1 : Le monument au marchand de vin de Til-Châtel, conservé au musée archéologique de Dijon. © F. Perrodin. Musée archéologique de Dijon.*

L'œnologie, science étudiant le vin, est sans équivalent pour d'autres aliments en matière d'investissement humains et financiers. Avec environ 20% de la production mondiale, la France est un des principaux producteurs de vin. Le commerce de vin représente donc encore aujourd'hui des intérêts économiques importants pour la France.

Le vin est produit à partir du raisin, fruit de la vigne. Plusieurs espèces de vignes ont par le passé été utilisées, mais aujourd'hui la production de vin utilise presque exclusivement les baies de *Vitis vinifera (sativa)*. De cette unique espèce, de nombreux cépages peuvent être distingués. Un même cépage peut renfermer une grande variabilité génétique. Les plants génétiquement identiques sont des clones. L'utilisation de clones permet une production mieux contrôlée. Néanmoins la qualité du vin produit dépend également en grande partie du terroir. Des facteurs tels que le climat, le sol, l'ensoleillement, l'exposition au vent et

l'environnement général de la vigne sont tous à prendre en considération dans le choix du cépage/clone planté.

Dans cette étude, nous avons principalement utilisé du Pinot Noir (clone 115) cultivé en Bourgogne. La plupart des clones de Pinot Noir proviennent du quart nord-est de la France, principalement Dijon et Colmar. Il est également cultivé dans le Languedoc, en Allemagne, en Suisse et a été exporté dans l'Oregon (USA), l'Ontario (Canada) et en Nouvelle-Zélande. Suite à l'évincement du « vil et déloyal gamay » par Philippe le Hardi, le Pinot Noir s'imposa en Bourgogne, tirant parti d'un terroir qui lui est particulièrement propice. Le Pinot Noir semble en effet particulièrement bien adapté aux sols argilo-calcaires et au climat océanique à tendance semi-continentale que l'on retrouve entre Dijon et Mâcon. Ces vins de Bourgogne ont gagné leurs lettres de noblesse grâce à leur grande complexité d'arômes et leur alliance subtile de finesse, puissance et intensité. Ils ont également la réputation d'être de très bons vins de garde.

### **1. La vinification en rouge**

Même si les procédés ont évolué, le principe de production du vin reste fondamentalement le même. Le vin est ainsi obtenu par fermentation alcoolique de raisin. Ce procédé est appelé vinification.

Les baies de raisin noir foulées sont enfermées plusieurs jours dans des cuves, c'est durant cette étape que les levures produisent l'éthanol du futur vin par fermentation alcoolique à partir des sucres du raisin. L'éthanol produit solubilise alors de nombreux composés phénoliques hydrophobes contenus dans la peau du raisin et les diffuse dans le moût en macération. Ensuite, l'écoulage permet de séparer le vin de goutte du marc. Le pressurage permet d'extraire du marc le vin de presse renfermant la majeure partie des composés phénoliques. Vin de goutte et vin de presse sont ensuite généralement mélangés avant de subir la fermentation malolactique, transformation de l'acide malique en acide lactique par des bactéries lactiques.

## 2. Composition du vin rouge

Le vin rouge est, de toutes les boissons, celle qui est la plus étudiée. Sa composition est également l'une des plus complexes connues à ce jour. En effet, même si la majorité des constituants du vin est répertoriée (Tableau 1, page 29), il serait présomptueux de dire que tout est parfaitement identifié. De plus, la plupart des constituants, de part la nature particulière de la production de vin, se retrouvent à des concentrations plus ou moins variables. Les principaux facteurs de variabilité sont le cépage, le climat, le terroir, et l'année. Chaque vin a ses spécificités. De part la présence/absence de certains éléments dans le vin, et les conséquences que cela implique sur les qualités organoleptiques, les œnologues sont capables de retracer son histoire, depuis la présence de microorganismes sur la baie de raisin, jusqu'aux processus de vinification. Cette diversité de composition rend les études sur le vin complexes à généraliser.

### a. Eau

Le composant majoritaire du vin est l'eau qui représente entre 80 et 90% du volume total (Wanklyn, 1873). C'est donc en solution ou en suspension que se trouvent la plupart des autres constituants.

### b. Alcools

L'éthanol est un composant déterminant du vin, il est d'ailleurs parfois appelé « esprit du vin ». On peut retrouver entre 8% et 16% d'éthanol dans le vin. Sa production par les levures à partir des sucres du raisin permet d'extraire de la peau du raisin de nombreux autres composés lors de la vinification en rouge. Au delà de 16%, l'éthanol devient toxique pour les levures, ceci limitant le degré alcoolique maximal obtenu par fermentation.

Troisième constituant le plus abondant dans le vin, le glycérol qui est un polyol. Il est également produit par la fermentation des sucres par les levures, principalement en début de la fermentation alcoolique du moût. Il apporte une légère saveur sucrée (comparable au glucose) et participe au moelleux du vin.

Le vin contient également de faibles quantités de méthanol, produit de l'hydrolyse des pectines du raisin. Etant fortement minoritaire par rapport à l'éthanol, sa toxicité dans le vin est généralement négligeable. La teneur en méthanol peut néanmoins se révéler

significative pour certains cépages. C'est le cas par exemple du noah dont il est aujourd'hui interdit de produire le vin. On trouve également d'autres alcools dans le vin, tels que le mannitol (qu'on cherche à éviter), le sorbitol, le butane-2,3-diol, le méso-inositol, l'arabitol, l'érythritol, l'isobutanol, l'isopentanol et le *tert*-pentanol qui influencent le bouquet directement ou sous leurs formes estérifiées.

### c. Sucres

La teneur en sucres des vins est très variable. Le jus de raisin est très riche en hexoses (glucose et fructose) qui sont convertis en éthanol dans leur grande majorité. Certains vins en conservent néanmoins une teneur résiduelle. A l'origine des vins blancs doux et liquoreux, ce phénomène est plus rare avec les vins rouges qui en France sont presque toujours « secs ». Plusieurs techniques sont possibles pour conserver ces sucres : l'ajout d'éthanol qui tue les levures, ou d'anhydride sulfureux  $\text{SO}_2$  qui inhibe leur activité. Dans les vins rouges on peut aussi trouver des pentoses et hexoses infermentescibles impliqués dans l'impression de goût sucré. C'est le cas du L-arabinose, D-xylose, D-ribose et L-rhamnose. Des polysaccharides et oligosaccharides sont également présents dans le vin, différents de ceux du moût, car modifiés durant la macération (Nunan et coll., 1998; Ducasse et coll., 2011).

### d. Minéraux : ions et métaux

Les différentes étapes de la vinification peuvent extraire des matières solides, différentes matières minérales, ou au contraire en faire précipiter sous forme de sels. C'est l'une des raisons pour lesquelles les teneurs des vins en minéraux sont très variables mais néanmoins faibles, l'autre raison étant que la teneur en minéraux du raisin lui-même est également très variable. Parmi ces éléments minéraux on retrouve les ions suivants : chlore ( $\text{Cl}^-$ ), sodium ( $\text{Na}^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), phosphore ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) et soufre ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). On trouve aussi de l'iode (I), du fluor (F), du brome (Br), et de l'oxyde de silice ( $\text{SiO}_2$ ). Le vin contient également des métaux tels que le cuivre (Cu), le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l'aluminium (Al), le chrome (Cr), le nickel (Ni), l'argent (Ag) et le manganèse (Mn).

#### **e. Acides**

La composition en acides du vin est très complexe. L'acidité du vin est la résultante de la somme de l'acidité volatile et de l'acidité fixe. Certains de ces acides, en réagissant avec les alcools, donnent des esters (esters neutres ou acides).

L'acide acétique est le principal acide volatil du vin, son taux est faible dans le vin final mais peut être élevé durant la fermentation. Il n'est en revanche pas responsable des phénomènes d'acescence. En effet le responsable est surtout l'acétate d'éthyle, produit par des bactéries et levures acétiques. De ces acides volatils dépend la qualité de la vinification, ainsi que le vieillissement du vin.

Parmi les acides organiques, on trouve les acides tartrique, malique, citrique, oxalique, ascorbique, galacturonique, glyurique, mucique, succinique, lactique, citramalique, diméthylglycérique, glyoxylique, glycérique, pyruvique et oxaloacétique.

Le vin contient également des acides minéraux comme l'acide borique  $\text{BO}_3\text{H}_3$  et des traces d'acides gras tels que les acides palmitique, myristique et laurique (Yunoki et coll., 2004).

#### **f. Matières azotées**

Outre la forme ionique  $\text{NH}_4^+$ , on retrouve l'azote sous plusieurs formes : acides aminés, hexosamines, purines et polypeptides. Parmi les polypeptides, on trouve dans le vin des protéines. Les protéines contenues dans le vin rouge sont assez mal connues (Smith et coll., 2011). Elles sont impliquées dans diverses interactions avec les tanins en particulier.

#### **g. Composés phénoliques**

Ils peuvent influencer certains arômes du vin et de manière générale toutes ses caractéristiques organoleptiques, les composés phénoliques sont classés en 4 familles : les acides-phénols, les flavones, les anthocyanes et les tanins. Ils seront détaillés plus loin dans ce manuscrit (Section D. Les composés phénoliques du vin, page 49 ; Tableau 2, page 50).

#### **h. Microorganismes**

On peut distinguer trois types de microorganismes dans la microflore du vin : bactéries, levures, moisissures. Cépage, climat et terroir ont là encore un rôle prépondérant dans les répartitions de ces différentes populations.

On trouve tout au long de la vinification, dans le vin en devenir, une grande variété de levures et en particulier *Saccharomyces cerevisiae* qui n'est pas forcément majoritaire, mais qui joue un rôle majeur dans la fermentation alcoolique. La plupart de ces levures disparaissent normalement dans le vin après fermentation alcoolique du fait de la disparition des sucres, mais il peut arriver que certaines subsistent dans les vins en bouteille. Selon les levures présentes, les qualités organoleptiques du vin peuvent être grandement influencées, en bien ou en mal. Certaines de ces levures (comme *Brettanomyces*) étant capables de passer dans un état viable non cultivable, il peut être difficile de les identifier précocement (Serpaggi et coll., 2010).

On trouve également des bactéries comme *Oenococcus oeni*, ou les bactéries acétiques entraînant des difficultés de stabilisation des vins (Barbe et coll., 2001). La majeure partie de ces bactéries est éliminée par sulfitage effectué dès la fin de la fermentation malolactique. Les méthodes de soutirage, collage et filtration peuvent également s'avérer utiles pour limiter le nombre de germes.

De nombreuses moisissures (*Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*...) peuvent pousser sur la baie et ainsi contaminer le vin par des composés tels que par exemple la géosmine, responsable du goût moisi terreux.



*Tableau 1 : Composition chimique du vin, à l'exception des composés phénoliques qui sont présentés dans le Tableau 2 (page 50). \*Les valeurs minimales et maximales présentées le sont à titre indicatif et proviennent d'un panel de treize publications, d'autres dosages montrent que des vins peuvent avoir une teneur allant jusqu'à 4 g/L (Rifler et coll., 2011). Adapté d'après German (German et Walzem, 2000).*

Composé		Concentration (g/L)	
		Minimum*	Maximum*
Eau		800	900
Carbohydrates	Glucose	0,5	1
	Fructose	0,5	1
	Pentoses (Arabinose, rhamnose, xylose)	0,8	2
	Pectine	0	traces
	Inositol	0,3	0,5
	Fucose	0	0,005
Ethanol		80	150
Méthanol et autres alcools		3	1,9
Glycérol		3	14
Aldéhydes		0,01	0,5
Acides organiques	Acides tartarique, lactique, succinique, acétique, malique, citrique, fumarique	3	11
Composés azotés		0,1	0,9
Composés phénoliques (voir Tableau 2 page 50)		0,9*	2,5*
Composés minéraux	Potassium, magnésium, dioxyde de carbone, phosphate, soufre, calcium, chlore, silice, fluor, aluminium, manganèse, sodium, fer, brome, iode, cuivre, rubidium, oxygène	1,5	4

## B. Effets du vin sur la santé

Les relations entre le vin et la santé sont diverses et variées. La culture populaire en a vanté les mérites au travers notamment de nombreux dictons. Certains vins furent même par le passé administrés en tant que médicament ou désinfectant. D'ailleurs, pour l'anecdote, en 1693 le médecin et botaniste Guy-Crescent Fagon prescrivait des vins de Bourgogne pour soigner la goutte à Louis XIV. Le vin était également la boisson de choix pour faire des

décoctions de plantes médicinales. Par exemple, jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, les médecins français prescrivent la « potion cordiale », stimulant contre l'asthénie, composée de vin de Banyuls, de sirop d'écorce d'orange amère, et de teinture de cannelle.

### **1. Effets négatifs d'une consommation excessive de vin**

Le vin fut également (et l'est toujours parfois) diabolisé par de nombreux œnophobes. Du fait de sa teneur en alcool, une consommation non modérée peut avoir des effets néfastes importants, surtout si elle est accompagnée d'autres boissons alcoolisées. Il est classé selon la réglementation française dans les boissons alcoolisées du 2<sup>ème</sup> groupe, ce qui en limite la vente aux personnes de plus de 18 ans.

L'effet négatif le plus visible du vin est qu'il enivre. L'éthanol pris à forte dose agit défavorablement sur le système nerveux central pendant plusieurs heures. Outre la sensation d'euphorie, la plupart des fonctions cérébrales sont altérées. Ceci engendre des prises de risques qui, cumulées à des fonctions motrices et d'équilibre déficientes, augmentent considérablement les survenues d'accidents. Le système nerveux peut également souffrir de manière plus chronique de la prise d'éthanol. En effet, l'alcool est une drogue facilement accessible, qui est responsable d'une accoutumance forte qui peut prendre deux formes : l'alcoolisme ou le binge drinking (alcoolisme périodique). L'alcoolisme est la forme d'addiction à l'alcool la plus courante. Il se caractérise par l'absence du sentiment de satiété lors de la prise d'éthanol. L'alcoolisme pourrait concerner une part relativement importante de la population française, mais l'estimation est très complexe du fait de la diversité des facteurs psychologiques impliqués. Le vin est l'un des responsables d'une grande partie de ces cas, notamment en France (surtout dans les régions viticoles) où il est traditionnellement la boisson alcoolisée la plus répandue (Beck et coll., 2007). Le binge drinking est assez rarement associé au vin, l'état d'hyper alcoolisation recherché étant plus rapidement atteint avec d'autres boissons alcoolisées de plus forte teneur en alcool. Longtemps considéré comme une simple ivresse occasionnelle, il est aujourd'hui admis que ce comportement est la résultante d'une réelle addiction à l'alcool. Dans ces deux cas de consommation abusive, les effets de l'éthanol sur le cerveau peuvent être irréversibles, avec des pertes de connexions neuronales et la destruction (progressive ou brutale) de neurones.

Les troubles neurologiques peuvent ainsi entraîner des dépressions (Boden et Fergusson, 2011), et une plus forte tendance aux suicides.

La consommation d'alcool pendant la grossesse peut engendrer de graves conséquences sur le développement de l'enfant. Une prise d'alcool, même occasionnelle, entraîne des effets fœtaux de l'alcoolisation et des retards de croissance. Dans les cas les plus graves, l'enfant peut même souffrir de syndrome d'alcoolisation fœtale, provoquant des malformations et des déficiences intellectuelles.

Une étude prospective de cohorte (Sadr Azodi et coll., 2011) a montré une association dose-réponse entre la quantité de boisson spiritueuse consommée ponctuellement (mais pas chroniquement) et l'accroissement du risque de pancréatite aiguë. Cet effet néfaste ne semble pas pouvoir découler significativement d'une consommation de boissons telles que le vin ou la bière.

L'éthanol est un cancérigène du groupe 1 du CIRC (Centre international de Recherche sur le Cancer). A ce titre, lorsqu'il est présent dans une boisson, il est reconnu comme étant un inducteur certain de cancers. La dose minimale pouvant favoriser les cancers est toujours soumise à débats (Narod, 2011). En particulier, l'éthanol contribue au développement des cancers des voies aéro-digestives. Cancers de la cavité buccale, du pharynx, du larynx et de l'œsophage sont tous clairement liés à la consommation de boissons alcoolisées (Secretan et coll., 2009). Il est suggéré par certains auteurs que l'éthanol ne serait pas directement le principal responsable des cancers dus à la consommation de boissons alcoolisées, mais que ce serait l'acétaldéhyde (Salaspuro, 2011). L'acétaldéhyde peut être directement présent dans les aliments/boissons ou être produit à partir de l'éthanol, par l'action de l'enzyme alcool déshydrogénase hépatique, ou par des bactéries telles que *Helicobacter pylori* présentes dans l'estomac et la salive de près de la moitié de la population. L'acétaldéhyde peut ainsi agir à plusieurs niveaux, allant même jusqu'à causer des dommages à l'ADN au niveau des glandes mammaires (Abraham et coll., 2011) augmentant de ce fait les risques de cancer. Pour le cancer du côlon, l'éthanol et son métabolite l'acétaldéhyde sont également mis en cause (Baan et coll., 2007). L'éthanol (ou l'acétaldéhyde) même s'il n'est pas ingéré peut également avoir des effets pro-carcinogènes par contact. De simple bains de bouche alcoolisés contribuent au développement de cancer buccaux (McCullough et Farah, 2008).

Au niveau cellulaire, l'éthanol est métabolisé en acétaldéhyde, puis en acide acétique, et enfin en acétyl-coenzyme A, impliqué notamment dans le cycle de l'acide citrique permettant à la cellule d'exploiter l'énergie ainsi fournie.

L'organe qui est le plus souvent associé à la consommation d'alcool est le foie. En effet les lésions causées par l'éthanol consommé de manière régulière et exagérée peuvent induire des cirrhoses et, à fortiori, des hépatocarcinomes (Nalpas et coll., 1995).

De manière générale, la plupart des études tendent à faire l'amalgame entre la consommation de vin (modérée ou excessive), de boissons alcoolisées sans distinctions, et la prise d'éthanol sans tenir compte des autres constituants du vin. En résulte une grande confusion (Stockley, 1998) et des messages vulgarisés affirmant tout et son contraire.

## **2. Le French Paradox et effets positifs d'une consommation modérée de vin**

Ce nom de « French Paradox » ou paradoxe français désigne la remarque contradictoire que les français (principalement du sud-ouest de la France), malgré une alimentation riche en graisses, présentent un taux d'infarctus plus faible que les habitants d'autres pays industrialisés. Il a rapidement été avancé que ce paradoxe pouvait être dû aux effets protecteurs de certains aliments particuliers consommés par cette population. Le principal suspect avancé pour ces effets est le vin.

Les études épidémiologiques telles que le projet WHO-MONICA (World Health Organisation - MONitoring trends and determinants In CARDiovascular disease) (Tunstall-Pedoe et coll., 1994), et les travaux de Serge Renaud (Renaud et de Lorgeril, 1992) révèlent des bienfaits de la consommation de vin sur la santé, et plus particulièrement sur les maladies cardiovasculaires. Ces études épidémiologiques se sont révélées en partie biaisées par les différences de critères de détermination des fréquences. D'autres études prospectives (Ducimetiere et coll., 1980) ont été menées de manière plus uniforme avec des grandes cohortes. Ces études ont révélé que les populations les moins touchées étaient en réalité celles du sud de l'Europe (dont la moitié sud de la France) pour lesquelles l'hypothèse du « vin protecteur » peut également s'appliquer, mais également l'hypothèse d'un régime alimentaire riche en fruits, légumes et huile d'olive. Ces deux hypothèses ne sont pas antinomiques et peuvent se compléter (Hu, 2003).

Concernant le vin seul, des effets bénéfiques sont clairement mis en évidence pour des consommations modérées (courbe en J) (Goldberg et coll., 1995; Renaud et coll., 1998). Une consommation régulière de vin rouge semble donc être corrélée à une diminution de problèmes cardiovasculaires. Il est même avancé que la prise de deux ou trois verres de vin par jour réduit le risque de maladies cardiovasculaires (0,68) (Huxley et Neil, 2003).

Des extraits de vins rouges désalcoolisés ont été montrés *in vitro* comme inhibiteurs de la synthèse d'endothéline-1 au niveau transcriptionnel (Corder et coll., 2001). L'endothéline-1 est un vasoconstricteur impliqué dans les maladies cardiovasculaires. Il est donc légitime de penser que le vin rouge peut prévenir les maladies coronariennes. De nombreuses études convergent également vers cette hypothèse en démontrant des effets bénéfiques à différents niveaux (Das et coll., 2007). Cet effet protecteur est encore plus marqué associé à une activité physique comme le montre une étude sur des rat hypertendus (Soares Filho et coll., 2011).

Notre laboratoire a récemment montré que chez des patients post-opérés d'un infarctus du myocarde, une consommation modérée de vin rouge de Bourgogne permettait de diminuer la production de LDL circulants, d'augmenter le statut antioxydant, et d'améliorer la fluidité membranaire des hématies (Rifler et coll., 2011), ce qui suggère là encore des effets protecteurs.

Des effets protecteurs sur les pathologies neuro-dégénératives sont également attribués à une consommation modérée de vin. Une étude a mis en évidence un effet bénéfique sur un model murin de la maladie d'Alzheimer (Wang et coll., 2006).

Enfin, les relations entre vin et cancer sont souvent critiquées et dissonantes. Des études sur l'Homme montrent parfois des effets protecteurs, mais pas contre tous les cancers. Il n'y a, par exemple, pas d'évidence concernant les cancers de la prostate (Chao et coll., 2010), mais en revanche la consommation modérée de vin se révèle efficace contre les cancers du rectum et du côlon distal (Crockett et coll., 2011).

Les premières études concernant les effets du vin sur la santé ouvrent donc des perspectives dans la prévention de nombreuses pathologies. Vers la fin des années 1990, notre laboratoire travaillait sur les relations entre les proliférateurs de peroxysomes et les cancers.

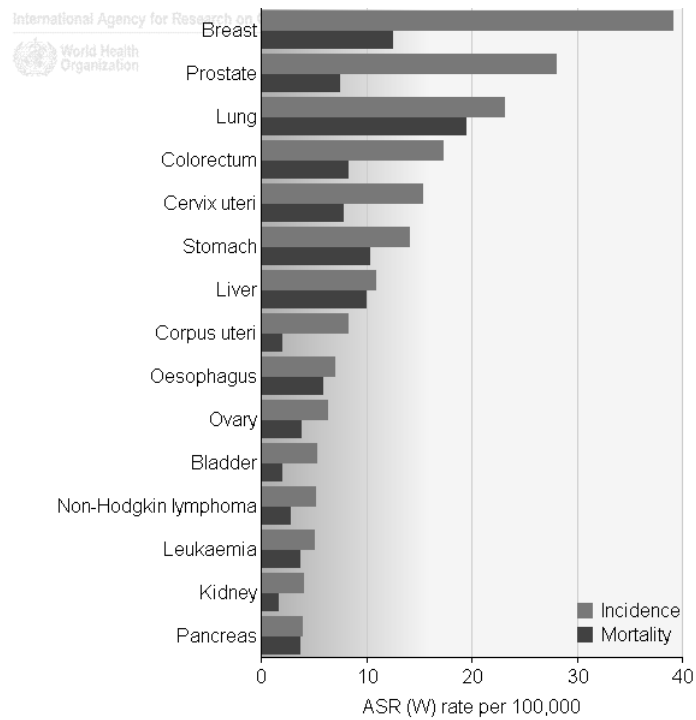
Etant situé en Bourgogne, où l'industrie viticole est particulièrement active, il semblait utile d'effectuer un rapprochement avec la thématique vigne, vin et santé. C'est donc tout naturellement que nous avons décidé d'orienter nos travaux sur les relations entre le vin (et son composant « phare » le resvératrol) et les cancers (en particulier le cancer colorectal).

## C. Le cancer

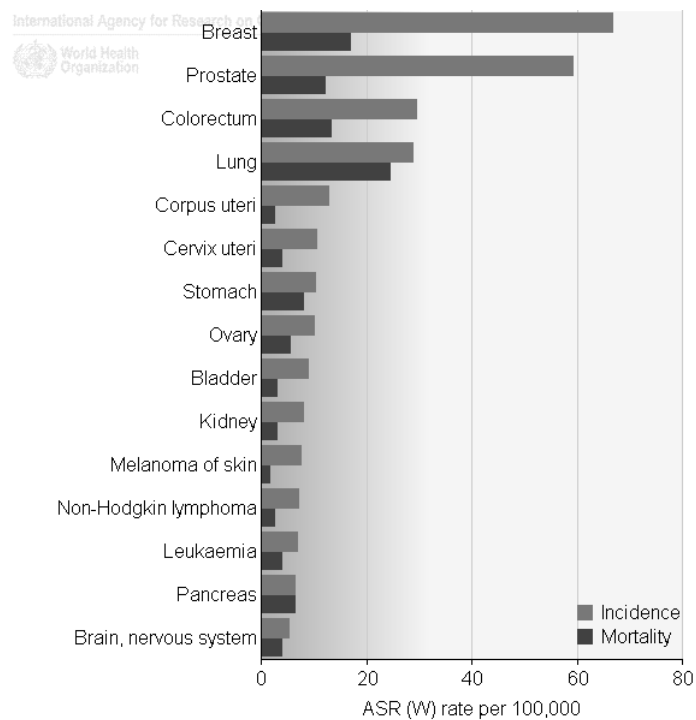
Le cancer est devenu, depuis 2004, la première cause de mortalité dans les pays industrialisés, devant les maladies cardiovasculaires. Les données suivantes sont issues du projet GLOBOCAN 2008 (Ferlay et coll., 2010), initié par le CIRC (Centre international de Recherche sur le Cancer – International Agency for Research on Cancer) sous l'égide de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé – World Health Organization).

Dans le monde (Figure 2), environ 13 millions de nouveaux cas et 8 millions de décès dus aux cancers sont diagnostiqués chaque année selon l'OMS. En Europe (Figure 3), 3 422 811 nouveaux cas et 1 861 096 décès ont été comptabilisés pour l'année 2008. En France (Figure 4), 332 701 nouveaux cas et 145 527 décès ont été comptabilisés pour l'année 2008.

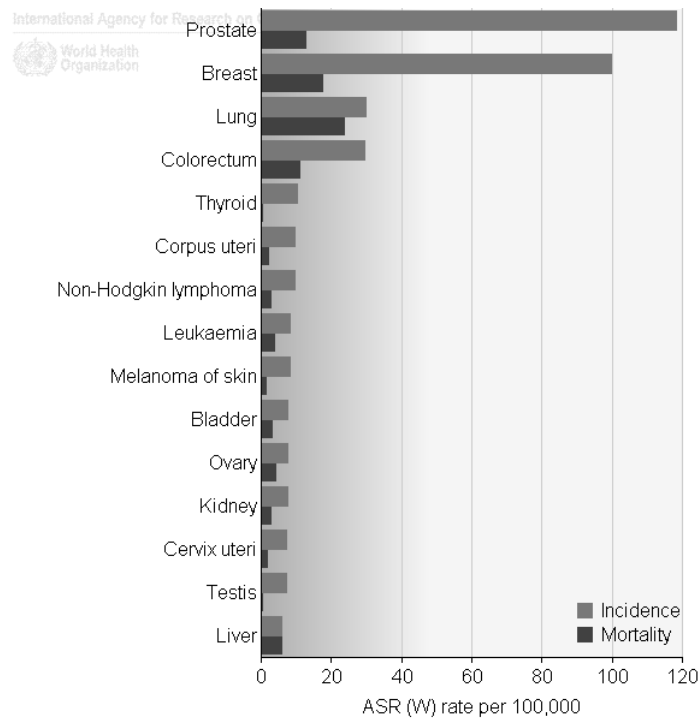
Ces nombres, bien que déjà très importants, sont en constante augmentation. L'augmentation des incidences de cancers dans les pays industrialisés est principalement le fait de modifications des facteurs exogènes de risque. Mais il ne faut pas non plus minimiser l'évolution des méthodes de diagnostics qui permettent de meilleurs dépistages et qui augmentent artificiellement les mesures d'incidence.



**Figure 2 : Types de cancers les plus fréquents, tous pays confondus. (Source : GLOBOCAN 2008).**



**Figure 3 : Types de cancers les plus fréquents, tous pays européens confondus. (Source : GLOBOCAN 2008).**



**Figure 4 : Types de cancers les plus fréquents en France Métropolitaine. (Source : GLOBOCAN 2008).**

Parmi les facteurs environnementaux, on peut noter une évolution des modes de vie, avec une urbanisation grandissante, des modifications d'ordre alimentaire, et un vieillissement de la population. Les sociétés industrialisées favorisent une vie plus sédentaire, avec une activité physique amoindrie. L'urbanisation augmente également les contacts avec divers polluants chimiques et perturbateurs endocriniens.

Les sociétés modernes actuelles présentent également des modifications profondes des habitudes alimentaires, avec une augmentation de l'incidence du surpoids et de l'obésité, facteurs de risque majeurs pour de nombreux types de cancers. Entre 30 et 40 % des cancers pourraient être imputables à l'alimentation (Gardner et Halweil, 2000). Ceci est particulièrement vrai pour les cancers des voies digestives.

On peut remarquer une diminution de la consommation de vin rouge chez les populations jeunes, remplacé par des alcools forts. Les bénéfices santé de la consommation de vin disparaissent donc au profit des effets néfastes de l'éthanol.



## 1. Cancérogénèse, tumorigénèse, et invasion métastatique

La cancérogénèse est un processus multi-événementiel complexe (Figure 5) aboutissant à l'apparition d'un cancer. Elle peut durer plus de 20 ans dans certains cas. La survenue de chacune de ces étapes dépend en grande partie du tissu touché.

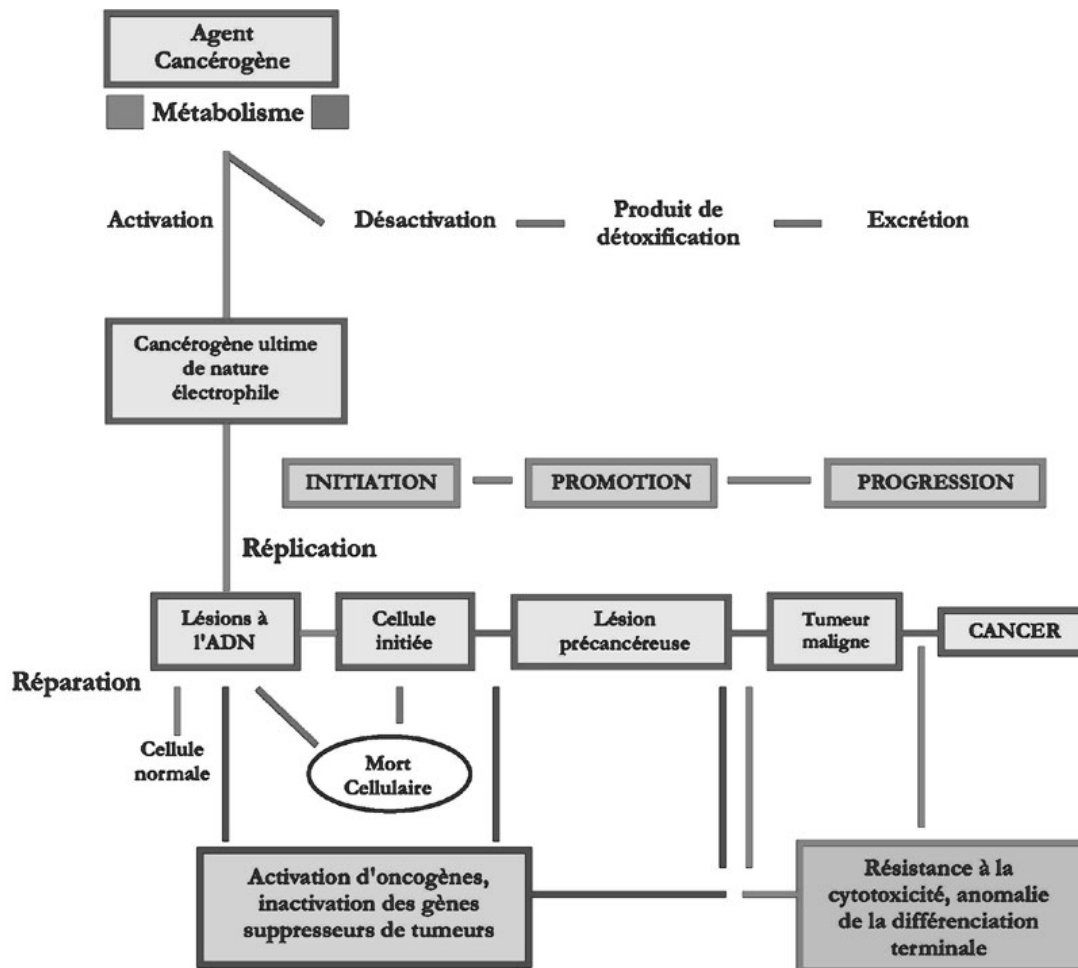


Figure 5 : Représentation schématique des événements et étapes pouvant intervenir dans les mécanismes de la cancérogénèse.

L'étape dite d'initiation consiste en une accumulation d'anomalies génétiques touchant des gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité et des caractéristiques propres à la cellule. C'est le cas des proto-oncogènes régulant la croissance et la différenciation cellulaire (les formes mutées sont appelés oncogènes) et des gènes suppresseurs de tumeurs qui, comme leur nom l'indique, bloquent l'apparition des tumeurs tant qu'ils ne sont pas inactivés ou réprimés par une mutation initiatrice de cancérogénèse. La cellule initiée devient alors

immortelle et insensible aux signaux extérieurs pro-apoptotiques et inhibiteurs de prolifération.

La promotion consiste en une dérégulation du cycle cellulaire (« gate keeper genes ») et perte des mécanismes de réparation des mutations (« care taker genes »). Les cellules peuvent alors se multiplier de manière autonome et former des lésions précancéreuses par expansion clonale. L'étape de promotion peut être réversible mais les cellules initiées le demeurent.

La progression permet alors de transformer les lésions précancéreuses en tumeurs. Les cellules tumorales évoluent alors de manière instable (phénotypiquement et génétiquement) et incontrôlable. Ces tumeurs peuvent aboutir à une compression des organes voisins, voire un envahissement et une destruction des tissus adjacents, ayant pour conséquence des dysfonctionnements physiologiques. Les tumeurs peuvent déployer des mécanismes de néoangiogenèse afin d'assurer une irrigation sanguine et un apport de nutriments à toutes les cellules du cœur de la tumeur.

L'invasion métastatique est l'apparition de métastases. Les cellules tumorales quittent leur localisation initiale et migrent vers d'autres tissus ou organes *via* le système circulatoire et lymphatique. Un tel développement peut parfois rester régional s'il ne résulte d'un envahissement que des ganglions lymphatiques proches de la tumeur, mais devient encore plus difficile à traiter si des organes distants et/ou les ganglions lymphatiques centraux sont touchés.

## 2. L'apoptose

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est un processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction (Reed, 1999). Ce processus de mort cellulaire se différencie de la nécrose par un maintien de l'homéostasie cellulaire et par l'absence de phénomènes inflammatoires. L'apoptose se caractérise par une condensation puis une fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques. La plupart des phénomènes d'apoptose impliquent des protéases appelées caspases. Les caspases (« cysteinyl-aspartate-cleaving proteases ») initiateuses et effectrices sont activées par un clivage en cascade des procaspases, induisant la mort de la cellule. Ces cascades

d'activations de caspases peuvent être initiées *via* les voies extrinsèque (récepteurs de mort) et intrinsèque (mitochondries).

La voie extrinsèque consiste en la liaison de cytokines telles que FasL (ligand de Fas/CD95), TNF (« Tumor Necrosis Factor ») et TRAIL (« TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand ») à des récepteurs de mort. Ces récepteurs s'agrègent et forment le DISC (« Death Inducing Signaling Complex »), ce qui active la caspase 8 (caspase initiatrice) qui clive les procaspases effectrices 3, 6 et 7 qui exécutent le programme de destruction cellulaire (Igney et Krammer, 2002).

La voie intrinsèque permet également d'activer l'apoptose, en réponse à un stress cellulaire (rayonnements ultraviolets, irradiations  $\gamma$ , chaleur, virus, dommages à l'ADN et activation de facteurs oncogènes). La voie intrinsèque consiste en une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale permettant l'activation de la caspase 9 par le cytochrome c. Cette voie est régulée par les protéines de la famille de Bcl-2 (« B-cell leukemia/lymphoma-2 ») qui peuvent être soit pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid et Bim), soit anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Nr13). Les protéines de la famille des IAPs (« Inhibitor of Apoptosis Proteins ») peuvent également intervenir dans cette régulation.

Il existe également d'autres voies de mort cellulaire telles que la sénescence répllicative (augmentation globale du volume cellulaire et de la granulosité, enrichissement du cytoplasme en vacuoles), la catastrophe mitotique (mitose aberrante, cellules géantes plurinucléées) et l'autophagie (formation d'autophagosomes). Les cellules cancéreuses présentent le plus souvent la particularité de pouvoir éviter ces processus de mort cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000). Par exemple, elles peuvent présenter des taux élevés d'IAPs, et des taux faibles de récepteurs de mort et caspases.

### **3. Le cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire est l'ensemble des phases par lesquelles une cellule passe entre deux divisions successives. Ces quatre phases sont M, G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, S et G<sub>2</sub>. La régulation du cycle cellulaire passe par des points de contrôles impliquant les Cdks (« Cycline-dependent kinase ») et les cyclines associées en complexes protéiques hétérodimériques.

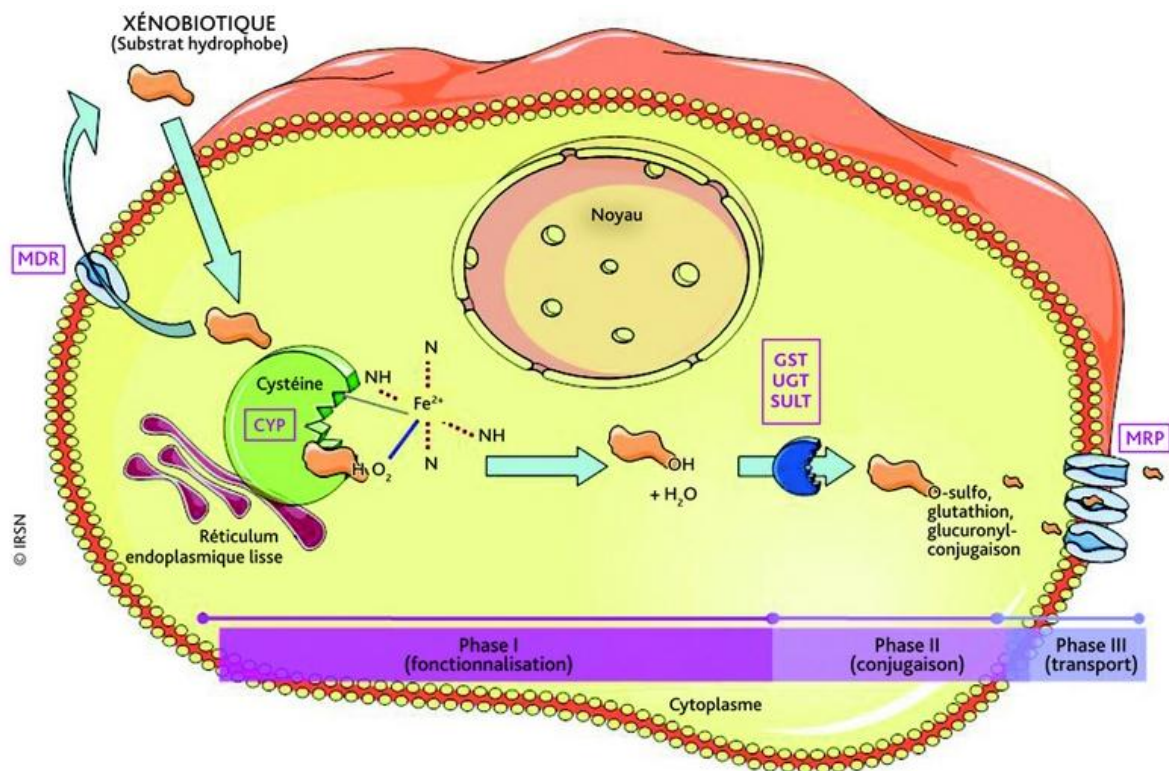
La phase M correspond à la mitose, division de la cellule mère en deux cellules filles ayant le même matériel génétique. Cette phase est divisée en prophase, métaphase, anaphase, télophase. La phase G<sub>1</sub> correspond à la croissance de la cellule. Pendant cette phase, la synthèse protéique est particulièrement active. La progression en phase G<sub>1</sub> est assurée par les complexes cycline D/Cdk4 et cycline D/Cdk6 qui phosphorylent et inactivent la protéine Rb (protéine Rétinoblastome), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent entre autres l'expression de gènes des cyclines E et A. Le point de contrôle du passage en phase S est appelé point R et est sous le contrôle du complexe cycline E/Cdk2. Lorsque ces points de contrôle ne sont pas passés avec succès, la cellule entre en phase G<sub>0</sub> de manière temporaire ou permanente. Les cellules en phase G<sub>0</sub> sont dites quiescentes, c'est-à-dire qu'elles ne se divisent plus. La phase G<sub>0</sub> est souvent induite par des conditions défavorables mais peut être tout à fait normale pour certains types de cellules (neurones, myocytes, pneumocytes). En phase S, le matériel chromosomique est doublé par réplication de l'ADN sous le contrôle du complexe cycline A/Cdk2. La transition en G<sub>2</sub> est quant à elle dépendante du complexe cycline A/Cdk1. La phase G<sub>2</sub> est la dernière étape avant l'entrée en mitose. Cette transition en phase M est contrôlée par le complexe cycline B/Cdk1. La régulation de ces phases passe par la synthèse/dégradation des cyclines, les phosphorylations/déphosphorylations des Cdks (Cdc25, CAK, Wee 1) et l'action des les CKI (« Cdk Inhibitor ») telles que p16, p21 et p27 (Morgan, 1995).

Les cancers sont caractérisés par une prolifération anarchique due au dérèglement du système de contrôle du cycle cellulaire. On notera que les oncogènes sont souvent des gènes codant des protéines responsables du contrôle du cycle cellulaire. Ainsi de nombreux cancers surexpriment Cdc25. L'inhibition de Cdc25 permet d'en ralentir la progression comme c'est le cas avec certains tétrasulfides naturels (Viry et coll., 2011) présents dans de nombreux légumes de type *Allium* (poireau, oignon, ail, échalote, ciboulette).

#### **4. Le métabolisme de détoxification des xénobiotiques**

Les xénobiotiques sont des molécules non synthétisées par l'organisme, il peut s'agir de médicaments, de drogues ou de composés chimiques provenant de l'environnement ou de l'alimentation, c'est le cas des polyphénols. Certains de ces composés peuvent être toxiques pour l'organisme qui cherche alors à s'en débarrasser. On distingue trois phases (Figure 6)

dans ce métabolisme : la fonctionnalisation (phase I), la conjugaison (phase II) et le transport (phase III).



*Figure 6 : Métabolisme des xénobiotiques au niveau cellulaire. Localisation cellulaire des CYPs, GSTs, UGTs, SULTs, MDRs et MRPs.*

Les enzymes de phase I oxydent, réduisent ou hydrolysent les drogues afin de les rendre moins polaires et de faciliter leur excrétion. Néanmoins, ces réactions ont souvent pour effet d'activer les carcinogènes et de rendre inactives certaines substances médicamenteuses. Ce sont essentiellement les cytochromes P450 (CYP), présents sur la face interne du réticulum endoplasmique lisse, qui assurent ces fonctions. Au niveau de l'organisme, ces réactions sont majoritairement effectuées dans le foie.

Les réactions de conjugaison (phase II) préparent les xénobiotiques en vue de leur excrétion. Les xénobiotiques (ou leurs dérivés issus de la phase I) sont conjugués avec des molécules comme l'acide glucuronique, le sulfate ou le glutathion. Les enzymes responsables de ces réactions sont les GSTs (glutathion-S-transférases), UGTs (UDP glucuronosyltransférases) et SULTs (sulfotransférases).

La phase III consiste à excréter ces différentes molécules. Les protéines impliquées sont des transporteurs unidirectionnels de la famille ABC (ATP-Binding Cassette). On trouve principalement des ABC transporteurs au niveau des barrières naturelles de l'organisme (intestin, foie, rein et barrière hémato-encéphalique). Quatre sous-familles, parmi les sept décrites (A à G), prennent part au métabolisme des xénobiotiques, ce sont les ABC de type A, B, C et G (Szakacs et coll., 2006). Certains de ces transporteurs possèdent plusieurs dénominations, comme par exemple MDR1/P-gp/ABCB1 (« MultiDrug Resistant protein 1/P-Glycoprotéine »), MRP1/ABCC1 (« Multidrug Resistance Related Protein 1 »), MRP2/ABCC2 ou BCRP/ABCG2 (« Breast Cancer Resistance Protein »). Chaque sous-famille présente des affinités pour différents types de molécules. Les ABCB prennent surtout en charge des substrats hydrophobes ou amphiphiles neutres ou chargés positivement. Les ABCC prennent en charge des anions organiques et des produits du métabolisme de phase II (glucurono-, sulfo- et glutathion-conjugués). Les ABCG semblent moins spécifiques et prennent en charge une grande variété de substrats tels que des drogues cytotoxiques, des toxines, des carcinogènes alimentaires et d'autres composés endogènes.

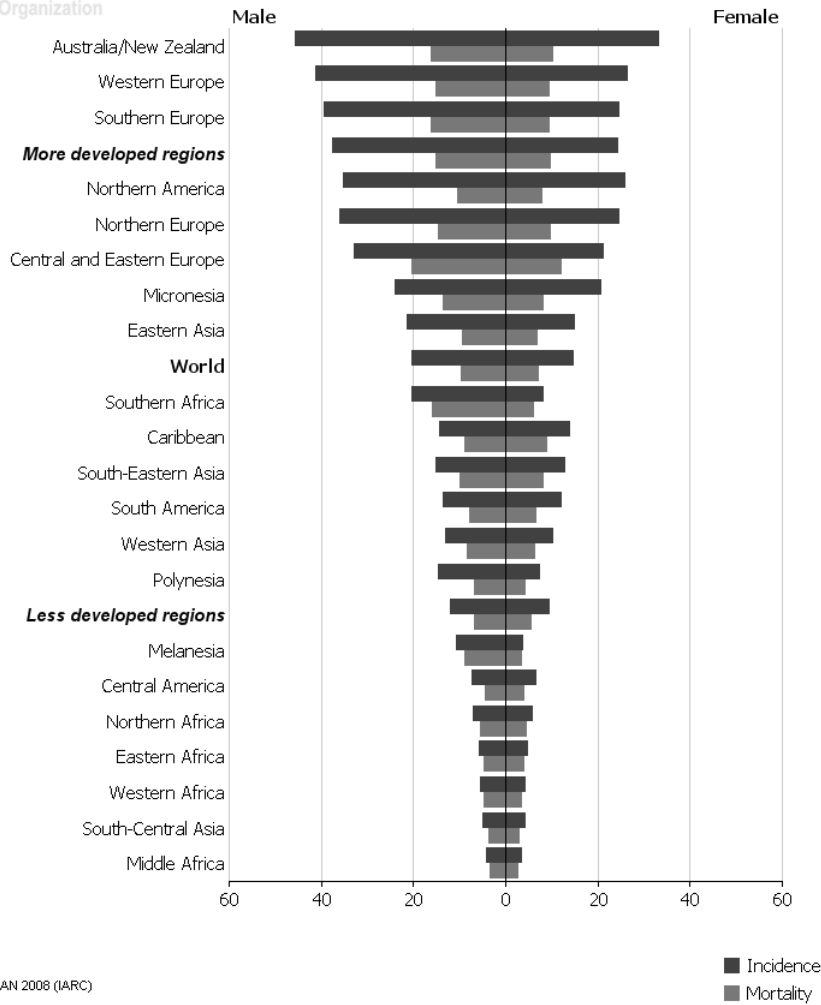
Les cellules cancéreuses tirent parti de ces différentes enzymes afin de se prémunir contre les agents chimio thérapeutiques.

## **5. Le cancer colorectal**

### **a. Données épidémiologiques**

Selon l'OMS (Cancer Mortality Database 2008), le cancer colorectal est l'un des trois cancers les plus fréquents en France avec près de 39 000 nouveaux cas par an (18422 femmes et 20502 hommes). En France en 2008, 6079 femmes et 6419 hommes sont morts du cancer du côlon, et 1945 femmes et 2503 hommes sont morts du cancer du rectum ou de l'anus. L'incidence de ce type de cancer est en revanche très faible dans les pays pauvres (Figure 7), ce qui tendrait à montrer un rôle majeur des facteurs environnementaux dans la survenue de ces cancers.

La plupart des cancers colorectaux survient chez des individus âgés, l'initiation de ces tumeurs étant un processus lent.



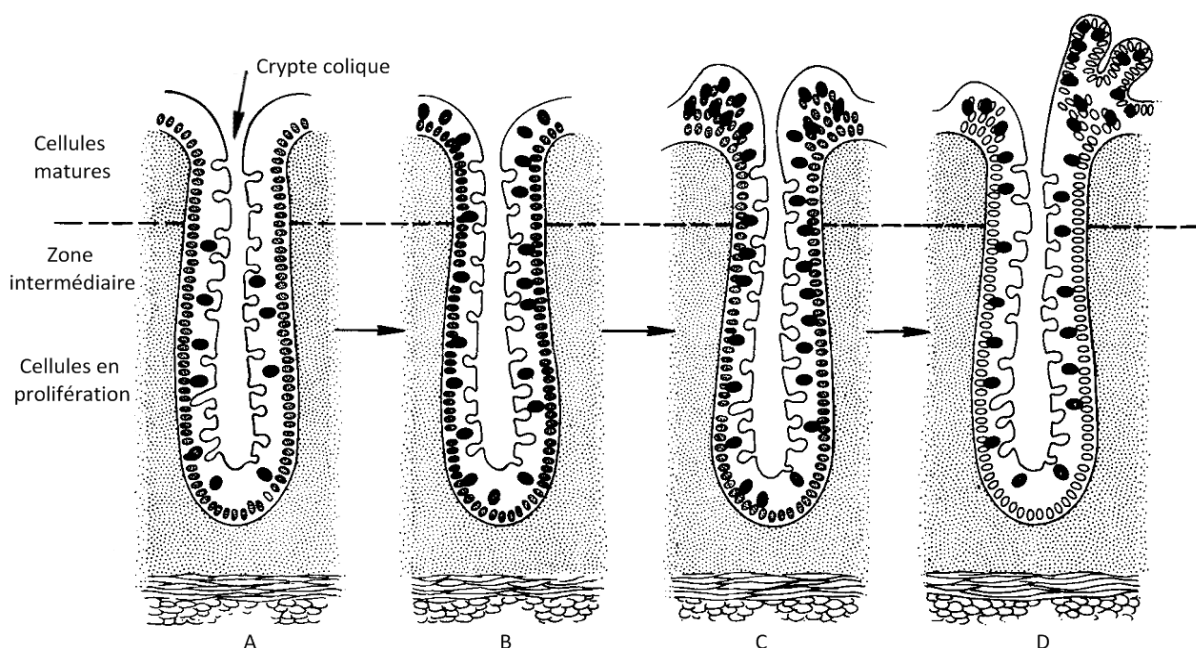
**Figure 7 : Incidence et mortalité du cancer colorectal selon les zones géographiques. (Source : GLOBOCAN 2008).**

### b. Anatomopathologie colorectale

Chez l'Homme, le côlon mesure environ 1,5 m et se divise en quatre segments définis selon leur position dans la cavité abdominale : le côlon ascendant ou côlon droit, le côlon transverse, le côlon descendant ou côlon gauche et le côlon sigmoïde. Ce dernier rejoint le rectum au niveau de la jonction recto-sigmoïdienne. Le rectum constitue les 15 derniers centimètres du tube digestif avant le canal anal. Le tiers distal du rectum représente l'ampoule rectale.

Certaines formes héréditaires de cancer colorectal (polypose recto-colique familiale, syndrome de Lynch) existent mais restent minoritaires. Les adénocarcinomes représentent

ainsi la majeure partie des cancers colorectaux. Ils suivent une séquence de progression cancéreuse de type adénome-carcinome (Hill et coll., 1978) dont la durée est généralement de plusieurs années. Le cycle le plus courant présente en premier lieu une hyperprolifération de l'épithélium de la muqueuse intestinale colorectale. Certaines cryptes de Lieberkühn augmentent de diamètre et l'épithélium qui les entoure se trouve épaissi (Figure 8). Ces foyers de cryptes aberrantes (FCA) sont assez difficiles à déceler et nécessitent d'effectuer une chromoendoscopie au bleu de méthylène. Une corrélation (établie chez le rat) entre le nombre de FCA et l'incidence tumorale tend à prouver leur caractère pré-tumoral (Pretlow et coll., 1992). A côté de ces formes hyperplasiques, il existe aussi une faible proportion (environ 5%) de FCA de type dysplasique (FCAD) (Shpitz et coll., 1998). Ces foyers dysplasiques correspondent aux micro-adénomes. Les autres anomalies précoces pouvant être considérées comme signes pré-cancéreux sont les foyers déplétés en mucine (Caderni et coll., 2003), les cryptes accumulant le bêta-caténine (Takahashi et coll., 2000) et les FCA plats (Paulsen et coll., 2005), chaque anomalie nécessitant une méthode de détection spécifique (McGinley et coll., 2010).



**Figure 8 : Prolifération cellulaire anormale de l'épithélium colique aboutissant à la formation de cryptes aberrantes. A : Crypte normale, les cellules ne prolifèrent qu'au fond de la crypte. B : Les cellules épithéliales présentent une prolifération accrue. C : Les cellules s'accumulent sur le pourtour de la crypte. D : Crypte aberrante. Adapté d'après Lipkin (Lipkin, 1974).**

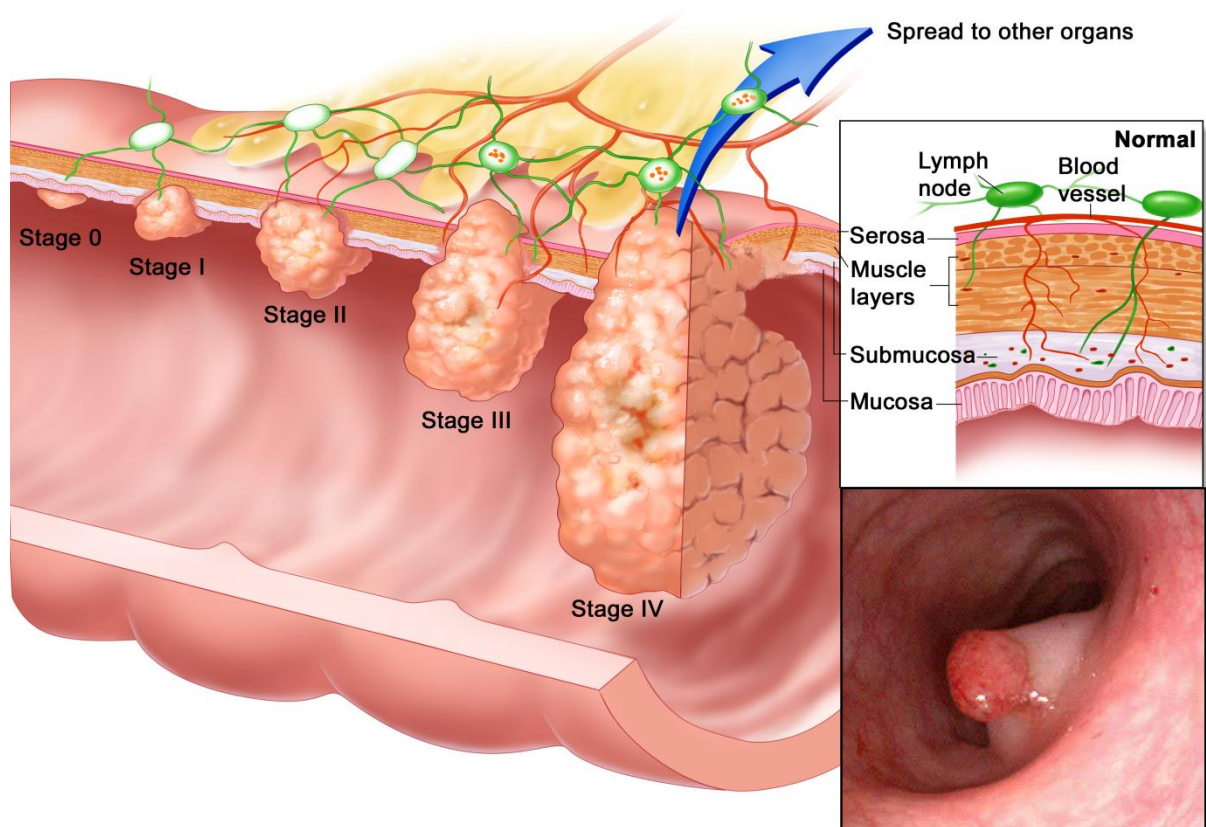


Dans un second temps, des polypes adénomateux bénins apparaissent. Ces lésions précancéreuses résultent de l'accumulation dans et au-dessus de la muqueuse de cellules à prolifération anormale (hyperplasie). Ils peuvent présenter deux aspects différents : polypes sessiles (plats) ou pédiculés. Malgré leur caractère bénin, leur risque de se transformer en lésion cancéreuse est important, ils sont donc retirés autant que faire se peut. Certains de ces polypes se transforment donc en réelles dysplasies.

La dysplasie est une lésion néoplasique strictement intra-épithéliale. Les dysplasies de haut grade (présentant les anomalies les plus sévères) sont les plus à même d'évoluer vers un cancer (Toll et coll., 2011). Tant que la membrane basale n'est pas franchie, on parle de cancer intra-épithélial, cancer *in situ* ou cancer stade 0 (appellation dérivée de la norme TNM décrite plus loin).

L'étape suivante est alors le cancer en tant que tel, ou plus précisément l'adénocarcinome. Cette étape survient lorsque la tumeur envahit le chorion.

Les cancers colorectaux sont alors classés selon leur stade. La stadification (Figure 9) est établie en fonction de la norme TNM (« Tumor Node Metastasis ») d'examen des tumeurs, ganglions et métastases (Sobin, 2001). Les tumeurs de stade I sont situées en surface de la paroi intestinale (épithélium, chorion, sous-muqueuse et musculuse) et ne présentent pas de métastases ou de ganglions. Les tumeurs de stade II sont plus profondes, elles atteignent la sous-séreuse ou les tissus péricoliques non péritonéalisés pour le stade IIA et au delà du péritoine viscérale pour le stade IIB. Le stade III présente en plus des ganglions métastatiques régionaux (IIIA = IIA + quelques ganglions, IIIB = IIB + quelques ganglions, IIIC = plus de quatre ganglions). Le stade IV est le plus avancé, il présente des métastases à distance.



*Figure 9 : Stades de développement du cancer colorectal suivant la séquence adénome-cancer. Une lésion dysplasique (stade 0) évolue en polype adénomateux ou adénome (stade I), puis en carcinome (stade II) qui envahit les tissus avoisinants (stade III) puis les autres organes par des métastases (stade IV). © 2005 Terese Winslow (pour le compte du NIH, institut national américain de la santé).*

### c. Prise en charge médicale

Les symptômes d'un cancer colorectal sont souvent discrets, c'est pourquoi il est nécessaire de pratiquer des dépistages systématiques chez les personnes à risques telles que les personnes âgées de plus de 50 ans ou les personnes souffrant de maladies inflammatoires chroniques intestinales. Les tests reposent principalement sur la détection de sang fécal, apparent ou occulte. Anémie, amaigrissement et alternance de constipation et diarrhées sont des signes pouvant révéler la présence de ces hémorragies intestinales. Les tests comme « Hemocult » permettent alors de confirmer la présence de sang dans les selles. En cas de tests positifs et/ou d'autres signes suspects, l'examen clinique vient parfaire le diagnostic. Pour les tumeurs les plus distales de cancers du rectum, un toucher ou une rectoscopie permettent de chercher de possibles anomalies rectales. Pour les tumeurs proximales du côlon, ce sont les coloscopies, coloscanners, vidéocapsules et lavements

barytés qui sont employés. Les métastases sont recherchées par scanner, IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou tomographie par émission de positons. Ces examens permettent d'identifier le stade du cancer et ainsi d'adapter le traitement.

Le traitement de première intention est généralement d'ordre chirurgical. Selon le nombre et la taille des polypes, diverses approches peuvent être mises en place. Pour les polypes suspects mais à des stades relativement peu avancés, une simple polypectomie endoscopique peut suffire, accompagnée de tests histologiques. S'il s'avère que le polype est malin, une colectomie peut s'imposer. Les colectomies consistent à enlever une partie du côlon par exérèse et les ganglions voisins par curage. Il convient alors d'enlever au moins 5 cm de côlon de part et d'autre du cancer, et au moins 12 ganglions dans le curage. L'hémi-colectomie droite consiste en l'ablation du côlon ascendant (jusqu'au bord droit de l'artère mésentérique supérieure). Il en résulte une connexion directe entre l'iléon et le côlon transverse. L'hémi-colectomie gauche est une ablation du côlon descendant formant une anastomose entre le côlon transverse et le haut rectum. La sigmoïdectomie est l'ablation du côlon sigmoïde et d'une partie du côlon descendant dont la portion restante est reliée au rectum, voir directement à l'ampoule rectale.

Ces techniques ne peuvent être utiles que si l'invasion métastatique n'est pas commencée. Dans le cas contraire on peut néanmoins effectuer une exérèse palliative, c'est-à-dire une résection de la tumeur primaire afin d'éviter les occlusions et soulager la douleur du patient en lui assurant des conditions de vie convenable. L'ablation des métastases hépatique et pulmonaire est également préconisée.

Ces chirurgies sont presque toujours associées à des traitements adjuvants chimiothérapeutiques. Le plus couramment utilisé est le 5-fluorouracile, combiné à l'oxaliplatine en cas de cancer du côlon de stade III ou de métastases (protocole FOLFOX ou FOLFOX-Avastin). Ces traitements peuvent également être administrés à des fins néo-adjuvantes ou palliatives. Une radiothérapie peut également être administrée, principalement pour les cancers du rectum. Dans tous les cas, aucun traitement n'est sans conséquences et de nombreuses complications s'ensuivent. Le transit intestinal en particulier est bien évidemment altéré de manière significative, obligeant le patient à suivre un régime généralement très restrictif.

## 6. Prévention des cancers colorectaux

Afin d'éviter les désagréments de ces thérapeutiques dont l'issue reste encore incertaine, la seule solution est une prise en charge de la maladie la plus précoce possible. La prévention s'impose donc comme la meilleure approche dans la lutte contre le cancer. De là est né le concept de chimioprévention (Sporn, 1976). On trouve par exemple des résultats probants de chimioprévention du cancer du côlon par l'aspirine (Benamouzig et coll., 2003) ou du calcium (Baron et coll., 1999).

Plusieurs approches de prévention sont possibles et complémentaires. La prévention primaire consiste à empêcher l'apparition d'une maladie chez une personne saine. Elle s'applique avec d'autant plus de soin s'il y a des facteurs de risques particulièrement élevés (âge, environnement, prédispositions génétiques). Lorsque la maladie est déclarée, c'est la prévention secondaire qui est mise en place afin de bloquer l'évolution des adénomes, voir même essayer de les faire régresser. Après chirurgie, la stratégie qui s'applique est celle de la prévention tertiaire. Là, il convient d'éviter les rechutes ou les complications, le patient étant alors considéré comme très enclin à développer de nouveaux adénomes. Enfin la prévention quaternaire est là pour éviter une surmédicalisation à tous les stades de cette stratégie.

Néanmoins, la plupart des traitements prophylactiques médicamenteux présentent des effets secondaires inhérents. D'un côté on a donc les effets protecteurs qui peuvent s'avérer utiles, et de l'autre côté les effets néfastes qui se retrouvent appliqués à des personnes généralement saines. Il n'est donc pas envisageable de suivre une telle stratégie sur une population à risque modéré. Ces effets secondaires représentent une limite importante à la chimio prévention. Il est donc nécessaire de chercher des molécules chimio préventives dont les effets secondaires sont faibles voir nuls.

La meilleure solution pourrait donc se trouver dans la consommation de composés chimio préventifs naturellement présents dans l'alimentation (Surh, 2003). Les aliments en effet, même s'ils sont le vecteur de très nombreuses substances pro-carcinogènes, sont également la principale source d'anticarcinogènes (Goldman et Shields, 2003). Une alimentation saine permet en effet de diminuer l'incidence des cancers de manière franche et significative (Manson, 2003). Les molécules en question peuvent être de différents types et agir à

différents niveaux de la carcinogenèse (initiation, promotion, progression) ou simplement empêcher l'action des carcinogènes sur les cellules.

Parmi les éléments protecteurs de l'alimentation, les molécules ayant un pouvoir antioxydant semblent particulièrement efficaces car capables d'agir à plusieurs niveaux simultanément.

## D. Les composés phénoliques du vin

(Tableau 2) L'origine des effets protecteurs du vin contre le cancer est principalement recherchée dans sa composition en composés phénoliques et polyphénols en particulier (Cordova et coll., 2005). En effet les polyphénols, en règle générale, agissent positivement sur la santé à travers notamment leur pouvoir antioxydant. Le vin est en général une boisson très riche en polyphénols. La composition phénolique d'un vin peut être extrêmement variable, à titre d'exemple, sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous, les teneurs minimales et maximales de certains polyphénols observées dans un panel de 13 vins différents. Ces valeurs ne sont pas des normes fixes et des concentrations n'étant pas incluses dans cette fourchette peuvent être retrouvées dans d'autres vins, comme ce fut le cas pour certain de nos vins expérimentaux. Ces polyphénols sont issus du raisin (jus, pellicule, pulpe et pépins) pour la plupart, mais pas uniquement. En effet certains polyphénols proviennent de levures ou de bois.

Les levures en question vivent principalement dans la pruine, couche cireuse qui recouvre la pellicule des raisins, mais sont parfois ajoutées artificiellement pour un meilleur contrôle de la vinification. Les deux principales sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces bayanus*. Elles sont responsables de la fermentation alcoolique mais libèrent également dans le vin (vin blanc surtout) du tyrosol, produit à partir de tyrosine (Sentheshanmuganathan et Elsdén, 1958). Les polyphénols du bois peuvent être retrouvés dans le vin dans le cas où l'élevage est effectué en barriques de bois (généralement en chêne) ou lorsque des copeaux sont ajoutés dans le vin pour le boiser. C'est du bois que proviennent notamment certains

tanins et certains arômes parmi les plus recherchés. Ainsi les ellagitanins participent à donner au vin de la dureté et de l'astringence, et les mélanges aromatiques provenant du bois peuvent donner au vin des parfums de bois frais, noix de coco, fruits frais ou champignon.

**Tableau 2 : Principaux composés phénoliques présents dans un panel de 13 vins rouges. \*Les valeurs minimales et maximales présentées le sont à titre indicatif et proviennent d'un panel de treize publications, d'autres dosages montrent que des vins peuvent avoir une teneur allant jusqu'à 4000 mg/L (Rifler et coll., 2011). Adapté d'après German (German et Walzem, 2000).**

Composé	Concentration (mg/L)	
	Minimum*	Maximum*
Non-flavonoïdes	240	500
Acides hydroxybenzoïques	0	260
Acide <i>para</i> -hydroxybenzoïque	20	20
Acide gallique	26	320
Gallates	30	59
Acide salicylique	N/D	N/D
Acide syningique	4,2	5,9
Acide protocatéchurique	88	88
Acides hydroxycinnamiques	62	334
Acide <i>cis/trans</i> -coutarique	16	24
Acide <i>cis/trans</i> -caftarique	11	47
Acide caféique	3	18
Acide coumarique	7,5	22
Acide férulique	19	19
Stilbènes	4	19
<i>Trans</i> -resvératrol	0,1	2,3
Picéide	N/D	N/D
Flavonoïdes	750	1060
Flavonols	10	203
Quercétine	5	53
Myricétine	2	45
Kamempférol	18	18
Rutine	0,5	10,8
Flavanols	48	440
Catéchine	27	191
Epicatéchine	21,4	128
Procyanidines	29	333
Anthocyanines	20	500
Delphinidine 3-monoglucoside	22	22
Cyanidine 3-monoglucoside	2,8	38
Pétunidine 3-monoglucoside	18	18
Péonidine 3-monoglucoside	32	32
Malvidin 3-monoglucoside	24	170
Total des composés phénoliques	900*	2500*

## 1. Effets antioxydants des polyphénols du vin rouge

Les polyphénols du vin rouge sont une source importante et variée (plus de 200 polyphénols différents) d'antioxydants (Paganga et coll., 1999). La consommation de vin rouge permet donc d'augmenter le taux d'antioxydants dans le plasma (Maxwell et coll., 1994; Serafini et coll., 1998). On a déjà pu voir que les suppléments en antioxydants ne sont pas forcément bénéfiques (Bjelakovic et coll., 2007), néanmoins, il apparaît qu'elles permettent généralement de diminuer l'incidence des cancers (Hercberg et coll., 2004) de part leur action contre le stress oxydant.

En ce qui concerne les polyphénols du vin, il semble que leurs effets antioxydants les plus importants ne soient pas directs, mais impliquent des modulations du système antioxydant endogène (Rodrigo et coll., 2011). La combinaison de nombreuses disciplines (biochimie, biologie cellulaire, physiologie, épidémiologie, et chimie des aliments) sera nécessaire à la compréhension de ces mécanismes divers et variés (Scalbert et coll., 2005).

## 2. Effets des polyphénols du vin rouge contre le cancer

Les polyphénols de vin rouge sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération de cellules issues de divers cancers, parmi lesquelles les cellules Hela issues de métastases d'un cancer du col de l'utérus, les cellules MDA-MB-453 (Matic et coll., 2010) issues de cancer du sein et les cellules melan-a issues de mélanomes humains (Gomez-Cordoves et coll., 2001). Les fractions d'anthocyanines, flavonoïdes et acides phénols, même séparément, présentent toutes cette capacité d'inhibition, par des mécanismes vraisemblablement différents. *In vivo*, des souris transgéniques HTLV-1 présentent plus tardivement des tumeurs lorsqu'elles reçoivent des extraits polyphénoliques de vin rouge (Clifford et coll., 1996). Sur ces souris développant spontanément des neurofibromes, la consommation d'extraits secs de vin rouge permet de retarder significativement l'apparition de ces tumeurs.

Concernant plus spécifiquement le cancer du côlon, les polyphénols du vin rouge sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération de cellules cancéreuses coliques humaines (Briviba et coll., 2002) en modulant la voie des MAPK. D'autres tests *in vitro* (Kim et coll., 2006) ont montré un effet pro apoptotique des polyphénols du vin contre des cellules de cancer

colorectal humaines. La combinaison de ces deux effets tend à présenter les composés phénoliques du vin rouge comme une piste prometteuse dans la prévention des cancers colorectaux. *In vivo*, des rats F344 recevant un régime enrichi en extrait polyphénolique de vin rouge semblent protégés contre la formation d'adénomes et de tumeurs coliques induits par l'azoxyméthane (AOM) (Caderni et coll., 2000), cet effet impliquant vraisemblablement une réduction des dommages oxydatifs, une modulation de la microflore du côlon et une variation de l'expression de certains gènes (Dolara et coll., 2005). Plus récemment, des extraits de vin ont été montrés comme pouvant bloquer l'angiogenèse, inhiber la prolifération des cellules tumorales et favoriser leur apoptose dans des tumeurs xénogreffées chez la souris (Walter et coll., 2010).

### 3. Le resvératrol

En premier lieu, le resvératrol, longtemps associé au paradoxe français (French Paradox), a été étudié par de nombreuses équipes de recherche de part le monde. Ces nombreuses études ont mis en avant pléthore d'effets bénéfiques, notamment contre les maladies cardiovasculaires, et le cancer. Aucun effet néfaste ni aucune toxicité n'est pour l'heure associée au resvératrol (Cottart et coll., 2010). Historiquement, c'est d'ailleurs au resvératrol que sont attribuées la plupart des vertus du vin rouge. Notre laboratoire travaille depuis plusieurs années sur le resvératrol, dont nous étudions l'effet bénéfique contre la prolifération de cellules cancéreuses, par blocage du cycle cellulaire (Delmas et coll., 2002), et par stimulation des voies apoptotiques de mort cellulaire (Delmas et coll., 2003).

De la famille des stilbènes, le resvératrol peut également être appelé 3,5,4'-trihydroxystilbène dans la nomenclature de chimie organique ou 5-[2-(4-hydroxyphényl)-éthényl] benzène-1,3-diol dans la nomenclature IUPAC. C'est à la molécule de configuration *trans*- que l'on fait généralement référence en parlant de resvératrol du fait de sa prépondérance habituellement retrouvée dans les plantes, mais il existe aussi du *cis*-resvératrol, apparemment moins abondant dans la nature. Une conversion de *trans*- en *cis*-resvératrol peut être induite par les rayonnements ultra-violets (Delmas et coll., 2011a).

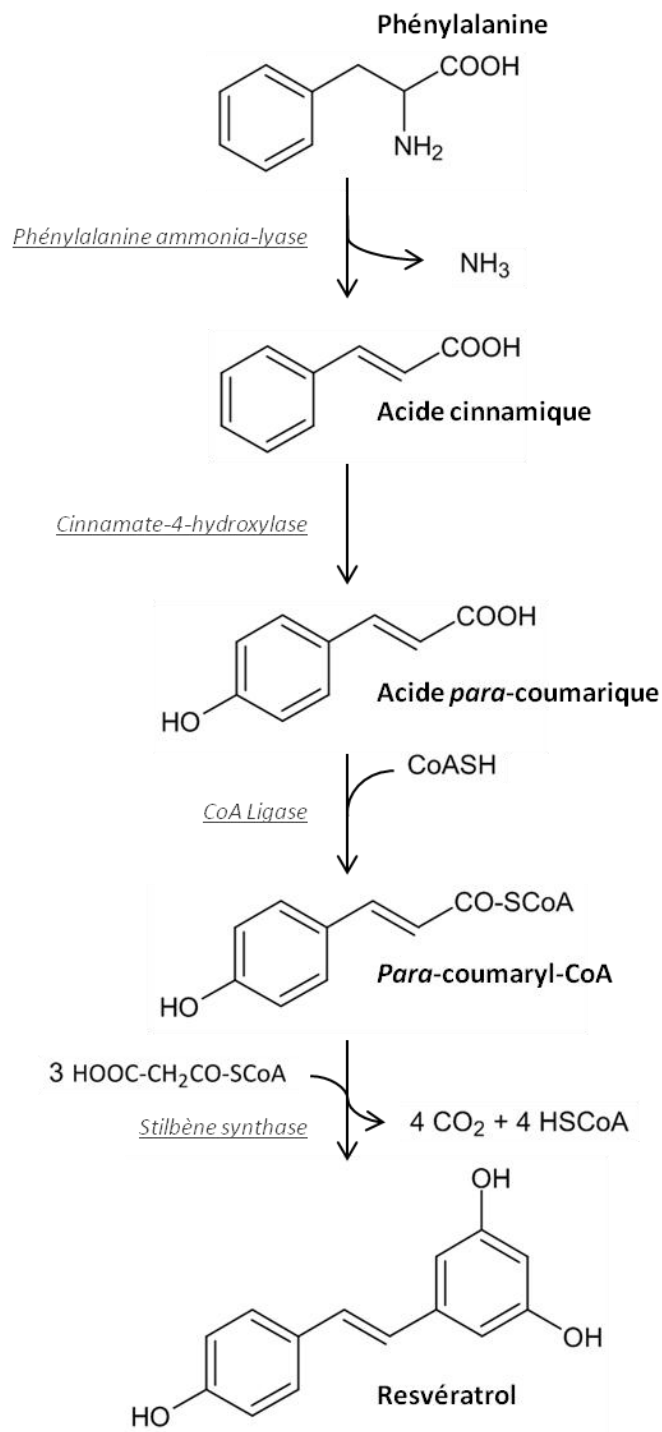
Le resvératrol est une phytoalexine (Dixon, 2001) produite par la vigne (*Vitis vinifera*), en particulier au niveau de la pellicule du raisin, mais aussi présente dans d'autres plantes telles



que certaines baies (framboises, mûres, myrtilles, cassis, canneberges, ...) dans le but de se protéger des agressions extérieures. De même les cacahuètes (fruits d'*Arachis hypogaea*), ou la renouée du Japon (*Fallopia japonica* ou *Polygonum cuspidatum* ou *Reynoutria japonica*), en contiennent des quantités importantes.

De manière générale, le resvératrol est produit en réponse à un stress. Ce stress peut être d'origine chimique, physique suite à une irradiation par les rayonnements ultra-violets (Douillet-Breuil et coll., 1999) ou les déficits en eau (Deluc et coll., 2011), ou biologique comme lors de la réponse à une infection par le champignon *Botrytis cinerea* (Keller et coll., 2003) également appelé pourriture noble ou pourriture grise. Dans le raisin, cette réponse peut être immédiatement au niveau de la baie touchée ou dans les baies voisines (Jeandet et coll., 1995). C'est sa capacité à inhiber la progression fongique qui a valu au resvératrol d'être classé comme phytoalexine (Langcake et Pryce, 1977) tout comme un autre stilbène naturellement présent dans la vigne, le ptérostilbène (*trans*-3,5-Dimethoxy-4'-hydroxystilbene) (Langcake et coll., 1979) dérivé diméthylé du resvératrol, produit par une méthyltransférase. La production de resvératrol par la vigne est donc très variable car dépendant de nombreux facteurs environnementaux.

D'un point de vue biochimique, le resvératrol est formé à partir de phénylalanine (Figure 10). Cette biosynthèse est le résultat d'une cascade enzymatique en quatre étapes. Tout d'abord la phénylalanine subit une désamination oxydative par l'action de la phénylalanine ammonium lyase, produisant de l'acide cinnamique et libérant un groupe amino. L'acide cinnamique est hydroxylé par la cinnamate-4-hydroxylase pour donner de l'acide paracoumarique, lui-même converti en *para*-coumaryl-CoA, par l'adjonction d'un coenzyme A sous l'action de la CoA ligase. La dernière étape consiste en une condensation de ce *para*-coumaryl-CoA avec trois molécules de malonyl-CoA grâce à la stilbène synthase. De ce resvératrol ainsi synthétisé, dérivent vraisemblablement tous les autres stilbènes de la vigne.



*Figure 10 : Voie de biosynthèse du resvératrol d'après Jeandet (Jeandet et coll., 2002). La phénylalanine est convertie successivement en Acide cinnamique, Acide *para*-coumarique, *Para*-coumaryl-CoA et Resvératrol, par l'action des enzymes Phénylalanine ammonia-lyase, Cinnamate-4-hydroxylase, CoA Ligase et Stilbène synthase.*

Parmi les vins rouges, c'est globalement dans les vins issus de vignes du cépage « Pinot Noir » qu'on retrouve les taux les plus importants de resvératrol, avec des valeurs allant généralement de 1 à 8 mg/L (isomères et glucosides inclus), avec une moyenne de 4,4 mg/L pour le Pinot Noir de Bourgogne (Opie et Lecour, 2007) et jusqu'à des valeurs maximales proches de 20 mg/L. Ces taux sont très variables selon le cépage, l'année et le terroir. Différents vins provenant d'une même région peuvent présenter des différences très importantes (Sato et coll., 1997), ainsi on peut trouver de 0,53 mg/L à 5,08 mg/L de *trans*-resvératrol dans différents vins de Bourgogne du même cépage (pinot noir) et de la même année (2008) n'ayant pour seule différence que le terroir (Boutegrabet et coll., 2011).

#### a. Les autres stilbènes du vin rouge

Outre le resvératrol et le pterostilbène, on trouve dans le vin d'autres stilbènes. En premier lieu, le picéide est le dérivé glucosidé du resvératrol synthétisé par une enzyme de type glucosyl-transférase (Krasnow et Murphy, 2004). C'est le principal dérivé du resvératrol présent dans le jus de raisin (Romero-Perez et coll., 1999), a des taux généralement supérieurs à ceux du resvératrol. L'action des  $\beta$ -D-glucosidase cytosolique et lactase phlorizine hydrolase permet de séparer le glucose du resvératrol. Le picéide pourrait ainsi être considéré comme une réserve de resvératrol faisant partie d'un même pool. Enfin, toujours parmi les molécules à un seul squelette de 1,2-diphényléthylène, le vin contient également du picéatannol (3',4',3,5-tétrahydroxystilbène) et son glucoside l'astringine.

En plus de ces stilbènes simples, on trouve des oligomères de resvératrol tels que l' $\epsilon$ -viniférine (dimère de resvératrol), l' $\alpha$ -viniférine (trimère de resvératrol), la  $\gamma$ -viniférine (dimère de resvératrol) (Langcake et Pryce, 1977), le pallidol (dimère de resvératrol), et l'hoephénol (tétramère de resvératrol). D'autres dimères de resvératrol peuvent aussi être produits par *Botrytis cinerea* afin d'en réduire l'activité antifongique et s'en protéger (Cichewicz et coll., 2000). Néanmoins, leur présence dans le vin reste négligeable.

#### b. Biodisponibilité et métabolisme du resvératrol

La biodisponibilité du resvératrol, c'est-à-dire la proportion qui va effectivement agir dans l'organisme par rapport à la quantité absorbée, est relativement faible après ingestion orale, comme c'est d'ailleurs le cas de plusieurs autres polyphénols (Goldberg et coll., 2003). Il est néanmoins assez bien absorbé au niveau intestinal. Il semble que l'absorption soit

néanmoins saturante à partir d'une dose assez faible (Das et coll., 2008). Une ingestion d'une quantité plus importante que cette dose ne semble pas pouvoir augmenter l'absorption ou la biodisponibilité du resvératrol.

Le picéide étant sa forme majoritaire dans le vin rouge, il convient donc de tenir compte de son absorption. Une partie du picéide est déglycosylé dans la lumière intestinale par la lactase phlorizine hydrolase, le reste traverse la membrane apicale *via* des cotransporteurs sodium/glucose SGLT1. Le picéide incorporé est également déglycosylé en majeure partie par la  $\beta$ -D-glucosidase cytosolique dans les cellules de l'épithélium intestinal, comme le montrent des tests effectués sur cellules Caco-2 (Henry-Vitrac et coll., 2006). Resvératrol et picéide sont, en parallèle de ces mécanismes, ré-efflués vers la lumière intestinale *via* des transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) : MRP2/ABCC2 (Multidrug Resistance-associated Protein 2) et BCRP/ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein) (Juan et coll., 2009). Ces deux enzymes sont impliquées dans la phase III du métabolisme de détoxification des xénobiotiques.

Dans le sang ce sont principalement les formes monoglucuronides (resvératrol-4'-O-D-glucuronide, resvératrol-3'-O-D-glucuronide) et monosulfates (resvératrol-3-sulfate) que l'on retrouve (Walle et coll., 2004; Boocock et coll., 2007). En effet le resvératrol est rapidement métabolisé par les enzymes de détoxification des xénobiotiques phase II. Cet effet est retrouvé partiellement dès l'intestin grêle pour les glucuronides (Kuhnle et coll., 2000) et le sulfate (De Santi et coll., 2000b).

Le resvératrol est ensuite distribué dans l'organisme (Vitrac et coll., 2003) *via* le réseau artériel où il est fixé à l'albumine (Jannin et coll., 2004). Les organes accumulant le resvératrol ou ses métabolites sont préférentiellement des organes impliqués soit dans l'absorption (système digestif), soit dans l'excrétion (foie, reins) (Vitaglione et coll., 2009). L'accumulation dans le foie est particulièrement rapide et marquée, y compris sous forme aglycone. On retrouve donc du resvératrol dans différents liquides tels que la bile (et *a fortiori* les fèces) et l'urine, sa présence dans le sang n'étant que de courte durée.

L'entrée du resvératrol dans les cellules (hépatiques notamment) implique des processus de diffusion passive et des transporteurs actifs (Lancon et coll., 2004). Au niveau hépatique, le resvératrol aglycone est métabolisé en resvératrol-4'-O-D-glucuronide, resvératrol-3'-O-D-

glucuronide (De Santi et coll., 2000a) et resvératrol-3-sulfate (De Santi et coll., 2000b). Ceci est dû à l'action des enzymes de phase II du métabolisme de détoxification des xénobiotiques telles que certaines UGTs (UDP-GlucosylTransférase) et SULT (SULfoTransférases). L'expression de ces enzymes est d'ailleurs plus importante lorsque les cellules ont été mises en contact avec du resvératrol (Lancon et coll., 2007), suggérant une induction dépendante du resvératrol. Les métabolites ainsi produits sont ensuite expulsés de la cellule par des transporteurs/enzymes de phase III du métabolisme de détoxification des xénobiotiques (BCRP, MRPs, MDR1). La modulation des cinétiques d'influx et d'efflux du resvératrol peut donc se révéler être une piste intéressante pour en améliorer l'effet au niveau cellulaire.

A moins qu'au niveau des cellules des tissus cibles ces métabolites soient clivés grâce à l'action d'une glucuronidase, le resvératrol aglycone apparaît comme étant très peu en contact avec les tissus (Yu et coll., 2002). Le taux de resvératrol circulant pourrait être augmenté artificiellement par l'administration de resvératrol en injection intraveineuse ou en hydrogels dermiques, le métabolisme étant relativement faible au niveau de la peau (Hung et coll., 2008), mais étant donné la vitesse de métabolisation hépatique, des prises fréquentes seraient nécessaires pour maintenir un taux circulant suffisant pour induire des effets biologiques. Ces faibles expositions tissulaires ne concernent que le resvératrol libre, ses métabolites présentant une pharmacocinétique plus apte à agir sur les cellules. L'efficacité biologique des métabolites du resvératrol (resvératrol-3-sulfate, resvératrol-4'-O-D-glucuronide, resvératrol-3'-O-D-glucuronide) doit être testée sur des lignées cancéreuses afin d'établir leur potentiel chimiopréventif de ceux-ci.

### c. Resvératrol et santé (hors cancer)

Le resvératrol est retrouvé en grande quantité dans la renouée du Japon qui est utilisée dans plusieurs médecines traditionnelles asiatiques. Au Japon, les rhizomes séchés de renouée forment le *ko-jo-kon* (ou *koji-jon* ou *kojôkon*) utilisé pour soigner les maladies digestives et urinaires. Les feuilles sont également utilisées pour soigner les petites plaies sous la dénomination *itadori* (イタドリ ôte-douleur). On utilise aussi des feuilles pour une décoction appelée thé d'*itadori* (Burns et coll., 2002). Les Chinois également utilisent des extraits de ces racines sous le nom *huzhang* (虎杖 racine de canne de tigre) en tant qu'analgésique, antipyrétique, diurétique, expectorant, dans le traitement de la bronchite

chronique, l'hépatite, la diarrhée, le cancer, l'hypertension, l'athérosclérose, la leucorrhée, une brûlure, une piqure de serpent (selon le comité chinois de pharmacopée).

Le resvératrol est depuis considéré comme le principal responsable de ces vertus qui ne sont pas encore toute avérées avec certitude. Globalement, le resvératrol aurait des effets bénéfiques qui permettraient :

- la protection contre les maladies cardiovasculaires
- la prévention des maladies neurodégénératives
- la prévention des cancers et le ralentissement de la progression tumorale
- la lutte contre les infections fongiques ou virales
- le ralentissement du vieillissement
- la lutte contre l'inflammation et les problèmes liés à l'immunité
- des effets antioxydants

En ce qui concerne les effets du resvératrol contre les maladies cardiovasculaires, des effets protecteurs de la consommation de vin rouge ont été mis en évidence dès 1992 (Renaud et de Lorgeril, 1992) avant d'être associés au resvératrol (Ray et coll., 1999). L'agrégation plaquettaire, source de thrombus, ischémies et infarctus, est inhibée par le resvératrol (Wang et coll., 2002). Le resvératrol a également un effet pro-apoptotique sur les plaquettes (Lin et coll., 2009) permettant là encore de dégager les parois vasculaires. Des effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs contre les cellules musculaires lisses vasculaires (Poussier et coll., 2005) permettent au resvératrol de réduire encore l'athérosclérose et la resténose post-angioplastique. Enfin, le resvératrol produit une vasorelaxation par la stimulation de la production de monoxyde d'azote et l'inhibition de la norépinephrine (Chen et Pace-Asciak, 1996). La combinaison de ces différents effets fait du resvératrol un puissant élément protecteur contre les maladies cardiovasculaires (Delmas et coll., 2005; Wu et Hsieh, 2011) et un acteur majeur du « french paradox ».

Des mécanismes liés à des maladies neurodégénératives ont été reliés au resvératrol. Les relations entre le resvératrol et la maladie d'Alzheimer en particulier ont été mises en évidence (Vingtdeux et coll., 2008), révélant un pouvoir neuroprotecteur supérieur pour ses métabolites. L'action du resvératrol sur le système nerveux ne se limite pas aux maladies neurodégénératives (Dore, 2005), il est également impliqué dans les phénomènes de

douleur. Au niveau du cerveau, il est capable de diminuer la sensibilité à la douleur, par un effet analgésique impliquant l'inhibition des cyclo-oxygénases I et II (Bertelli et coll., 2008).

Les capacités antifongiques du resvératrol sont la raison même de sa production par la vigne. Néanmoins cet effet ne semble pas pouvoir s'appliquer à tous les champignons, en effet un traitement par le resvératrol ne semble pas pouvoir lutter *in vitro* contre la progression des levures telles que *Candida albicans*, responsable d'infections fongiques (candidiase ou candidose) (Weber et coll., 2011). Le bénéfice pour la santé de cet effet antifongique est donc soumis à discussion.

Le resvératrol est capable de lutter efficacement contre certains virus (Docherty et coll., 1999) de divers types (ADN ou ARN) (Campagna et Rivas, 2010). Les mécanismes impliqués restent pour l'heure non élucidés.

Les capacités anti-âge du resvératrol sont depuis plusieurs années le sujet de nombreuses études. Cette propriété lui est attribuée du fait de sa capacité à activer les sirtuines (Howitz et coll., 2003), enzymes à fonction histone désacétylase. La restriction calorique a été montrée comme un moyen d'augmenter l'espérance de vie (Fernandes et coll., 1976). Ce processus passe également par l'activation des sirtuines et en particulier SIRT1 (Lin et coll., 2000). L'effet du resvératrol sur l'accroissement de la durée de vie est néanmoins aujourd'hui remis en question (Pearson et coll., 2008; Lombard et coll., 2011). L'action des sirtuines étant depuis plusieurs années d'un intérêt croissant, les études se sont multipliées et de nombreux autres mécanismes se sont révélés être modulés par la restriction calorique ou le resvératrol. C'est le cas de la chorée de Huntington (Parker et coll., 2005; Sinclair, 2005), les maladies métaboliques (Lagouge et coll., 2006), et sûrement de nombreux autres dans les années à venir (Finkel et coll., 2009).

Le resvératrol est également capable d'agir positivement sur le système immunitaire et l'inflammation. Selon le contexte, il peut être bénéfique de stimuler ou inhiber ces deux processus. En effet immunité et inflammation servent à l'organisme à se protéger des agressions extérieures mais peuvent provoquer des effets néfastes tels que les inflammations chroniques et maladies auto-immunes (sclérose en plaques, diabète de type 1, lupus, polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, maladie de Crohn). Le resvératrol peut lutter contre certains de ces dérèglements. Cette modulation à double

tranchant est observée sur la production de cytokines par les lymphocytes T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> et CD<sub>8</sub><sup>+</sup> (Falchetti et coll., 2001; Gao et coll., 2001). Cet effet, bien que nettement démontré *in vitro*, s'avère marginal sur la souris (Gao et coll., 2003). *In vivo*, la prise orale de resvératrol atténue l'inflammation chronique du côlon artificiellement induite (Sanchez-Fidalgo et coll., 2010) en inhibant l'expression protéique de la prostaglandine synthase-1, la cyclooxygénase-2 et iNOS (inductible Nitric Oxide Synthase – oxyde nitrique synthétase inductible). Il peut en revanche activer le système immunitaire pour protéger l'organisme d'une infection virale (Feng et coll., 2002). L'âge du sujet est également un facteur qui influence l'action du resvératrol. Les souris âgées sont plus enclines à souffrir des effets néfastes d'inflammations, et c'est sur elles que le resvératrol présente les effets anti-inflammatoires les plus importants comparativement aux souris plus jeunes (Abraham et Johnson, 2009).

La structure du resvératrol et ses fonctions phénoliques tendent à suggérer une activité anti-oxydante et une aptitude à piéger les radicaux libres. Néanmoins, ses effets antioxydants sur les cellules vivantes se révèlent plus forts que ce que sa structure ne laisse présager. Il semble logique de penser que le resvératrol est également capable d'activer les voies de défense naturelles des cellules (Baur et Sinclair, 2006). Le resvératrol est notamment capable d'inhiber *in vitro* la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> délétères induite par des lipides peroxydés (Kaindl et coll., 2008). Ces capacités anti-oxydantes, qu'elles soient directes ou indirectes, contribuent également à plusieurs des bénéfices du resvératrol sur la santé déjà cités. Ainsi en inhibant l'oxydation des LDL (Frankel et coll., 1993) le resvératrol protège contre l'athérosclérose et les dommages artériels. Les capacités anti-oxydantes du resvératrol sont contrebalancées par ses capacités pro-oxydantes (de la Lastra et Villegas, 2007).

#### **d. Resvératrol et cancer, études *in vitro***

Une grande partie des voies impliquées dans les effets du resvératrol cités précédemment se trouve être liée de près ou de loin aux cancers. L'aptitude du resvératrol à exercer des effets pro/antioxydants, pro/anti-apoptotiques, pro/anti-inflammatoires, etc, en fait un candidat parfait pour la chimioprévention (Jang et coll., 1997).

Le premier point sur lequel le resvératrol peut agir contre le cancer est d'en empêcher la survenue. Pour cela la première stratégie est d'empêcher les carcinogènes d'atteindre les



tissus. Le resvératrol, de part ses propriétés antioxydantes, permet de diminuer le nombre de radicaux libres et la peroxydation lipidique (Fremont, 2000).

En ce qui concerne les enzymes de phase I, le resvératrol agit notamment sur l'inhibition de certains cytochromes P450 (Frotschl et coll., 1998) tels que CYP1A1, CYP3A4 et CYP2C19 (Yu et coll., 2003). Ces mécanismes d'inhibition passent par une compétition avec l'Ahr (Aryl hydrocarbon Receptor) (Delmas et coll., 2006). Notons qu'un autre de ces cytochromes P450, le CYP1B1, est capable de prendre en charge la molécule de resvératrol et de la convertir en picéatannol (Potter et coll., 2002) ayant également une activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses.

Des enzymes de phase II peuvent également être modulées par l'action du resvératrol. De manière générale, le resvératrol a plutôt un effet stimulateur sur cette phase du métabolisme des xénobiotiques. Il stimule ainsi les UGTs (Szaefer et coll., 2004) et les GSTs (Yen et coll., 2003). Néanmoins, il présente des effets inhibiteurs contre les SULTs (Dubuisson et coll., 2002). Dans ces deux cas, il est difficile de dire si ces modulations sont bénéfiques ou néfastes. Ainsi le resvératrol aide à l'élimination de substances carcinogènes, il limite également l'effet de substances protectrices ou thérapeutiques.

Les rares données concernant les effets du resvératrol sur la phase III du métabolisme des xénobiotiques suggère des effets inhibiteurs sur les différents transporteurs (BCRP (Cooray et coll., 2004), MRP1 (Bobrowska-Hagerstrand et coll., 2006), MDR1 (Quan et coll., 2008)) qui sont en général surexprimées par les cellules cancéreuses. Ce mécanisme permet de limiter l'efflux des drogues chimio thérapeutiques et ainsi de lutter contre la chimiorésistance développée par certaines cellules cancéreuses.

Le resvératrol agit également sur des carcinogènes intrinsèques. Ainsi, l'inhibition des cyclo-oxygénases par le resvératrol réduit le risque de développement de cancers en empêchant la production de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires tels que les prostaglandines impliquées dans la promotion de la cancérogenèse (Martinez et Moreno, 2000).

Bloquer le cycle cellulaire est un moyen d'empêcher la prolifération des cellules cancéreuses. Le resvératrol est, sur les cellules cancéreuses, un agent cytostatique, induisant notamment un blocage du cycle variable selon le type cellulaire, la dose de resvératrol et la

durée du traitement. Ce blocage n'est pas irréversible, et l'arrêt de l'apport de resvératrol relance le cycle cellulaire (Delmas et coll., 2000).

Dans les lignées de cancer colorectal, le resvératrol induit un blocage en phase S dans les SW480 (Joe et coll., 2002), HCT-116 et Caco-2 (Wolter et coll., 2001). En revanche, sur des cellules HT29, également issues de cancer colorectal, le resvératrol peut induire un blocage du cycle non pas en phase S, mais en phase G<sub>2</sub> (Liang et coll., 2003). Ces effets sont dus à l'action du resvératrol sur les cyclines, les Cdks et les diverses molécules impliquées dans leurs régulations (Delmas et coll., 2006).

Le resvératrol est capable d'induire la mort cellulaire chez les cellules tumorales par différentes voies (Delmas et coll., 2011b). Tout d'abord, le resvératrol peut agir sur la voie intrinsèque d'apoptose. En effet, le resvératrol peut induire une dépolarisation de la membrane mitochondriale, activant ainsi la caspase 9 comme c'est le cas, par exemple, dans des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë (Dorrie et coll., 2001). p53 est l'un des plus importants suppresseurs de tumeur, son gène est d'ailleurs muté dans près de la moitié des cas de cancers humains. Une augmentation d'expression du gène codant p53 induite par le resvératrol (Huang et coll., 1999; Soleas et coll., 2001) permet donc d'induire l'apoptose. Mais le resvératrol peut aussi induire l'apoptose indépendamment de p53 (Bernhard et coll., 2000). Le resvératrol a également des effets inhibiteurs sur l'expression de gènes et de protéines de la famille Bcl-2, favorisant là encore l'apoptose *via* la voie intrinsèque.

Concernant la voie extrinsèque d'apoptose, le resvératrol se montre également pro-apoptotique en favorisant l'action des récepteurs de mort. En premier lieu, le resvératrol induit une relocalisation de ces récepteurs de mort dans les rafts (Delmas et coll., 2003). Là il est endocyté, ce qui active les voies pro-apoptotiques (Colin et coll., 2011). Pour certaines lignées cellulaires, l'apoptose induite par le resvératrol passe par la voie des sphingomyélines/céramides (Scarlatti et coll., 2003).

D'autres voies conduisant à la mort des cellules cancéreuses peuvent trouver des liens avec le resvératrol. C'est le cas de la sénescence (Heiss et coll., 2007), de l'autophagie (Puissant et coll., 2010), et peut-être de la catastrophe mitotique (Young et Martin, 2006).

#### **e. Resvératrol et cancer, études *in vivo***

De nombreuses études ont démontré des effets chimiopréventifs du resvératrol chez le rongeur. Les divers résultats présentent une grande variabilité du fait du rôle prépondérant de l'environnement pour le développement des tumeurs.

La carcinogenèse *in vivo* est inhibée par le resvératrol. Même à des doses de 200 µg/kg rat/jour (Tessitore et coll., 2000) le resvératrol arrive à limiter l'apparition de lésions précancéreuses dans un modèle de cancérogenèse colorectale chimio-induite. Ceci suggère que de tels effets sont envisageables par l'alimentation dans un environnement propice.

La croissance tumorale requiert un processus d'angiogenèse afin d'irriguer le centre des tumeurs solides de plus de deux ou trois millimètres de diamètre. Le resvératrol inhibe cette néo-vascularisation comme l'on montré des tests sur des tumeurs pulmonaires (Kimura et Okuda, 2001), des gliomes (Tseng et coll., 2004), ou des fibrosarcomes (Brakenhielm et coll., 2001). Les doses utilisées dans ces études sont néanmoins largement supérieures à ce qui peut être atteint par une alimentation normale et relèvent donc du domaine de la pharmacologie.

#### **f. Resvératrol et cancer, études cliniques**

Le resvératrol en tant que composé pharmaceutique en est actuellement à des essais de phase I. Les études cliniques de phase I impliquant la prise de resvératrol ne sont pas légions (Patel et coll., 2011). Ces études se focalisent pour l'instant principalement sur la pharmacocinétique, la pharmacodynamique et les doses acceptables de resvératrol chez l'Homme. Il apparaît au vu des différents essais qu'une dose de cinq grammes par jour est bien acceptée malgré quelques désordres digestifs mineurs chez certains sujets.

A ce jour, seulement trois études cliniques relatent réellement de l'efficacité clinique du resvératrol sur le cancer.

La première de ces études (Patel et coll., 2010) révèle une accumulation de resvératrol et resvératrol-3-O-glucuronide dans le côlon ascendant. Le traitement montre également une diminution de 5% de la prolifération des cellules tumorales. Ces résultats montrent qu'envisager le resvératrol en tant qu'agent chimiopréventif est une piste prometteuse.

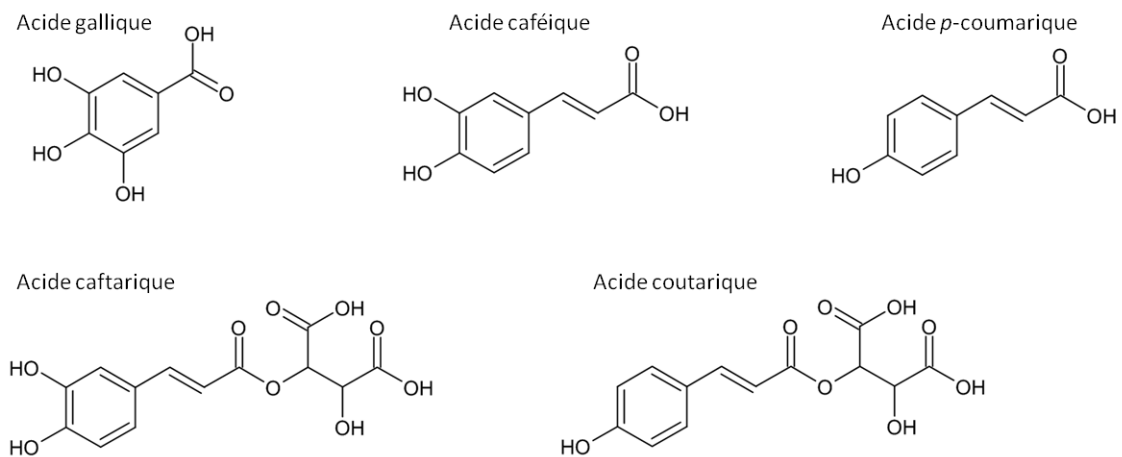
La deuxième de ces études (Chow et coll., 2010) révèle que le resvératrol est capable d'inhiber l'activité de certaines enzymes de détoxification, et d'en stimuler d'autres chez des patients sains. Ces modulations seraient liées à l'activité anti-carcinogène du resvératrol, mais pourrait également nuire à l'efficacité de certaines substances pharmacologiques. Des doses plus faibles et proches de celles atteintes par l'alimentation et la consommation modérée de vin rouge pourraient s'avérer un meilleur compromis.

Enfin la dernière étude en date (Howells et coll., 2011) utilise un mode d'administration de resvératrol sous forme micronisée destinée à accroître son absorption et sa biodisponibilité. Des patients atteints de cancer colorectaux avec métastases hépatiques présentent les signes d'une stimulation de l'apoptose dans les tissus métastatiques corrélée à la présence de resvératrol dans ces tissus.

D'autres essais de phase I (en cours) sont encore nécessaires afin d'élucider les données pharmacocinétique et pharmacodynamique du resvératrol et de ses métabolites chez l'Homme, notamment en ce qui concerne les interactions possibles entre le resvératrol et d'autres médicaments. Dans le futur envisageable, la phase II consistera à déterminer la dose optimale du médicament et ses éventuels effets secondaires sur quelques centaines de malades. La phase III produira l'étude comparative d'efficacité proprement dite sur plusieurs milliers de patients.

#### 4. Les acides phénols

Les acides phénols ne sont pas à proprement parler des polyphénols. Ils sont composés d'un seul noyau phénolique et d'au moins une fonction carboxylique (Figure 11). L'acide gallique est un acide hydroxybenzoïque dérivé, par hydroxylation, de l'acide benzoïque. Les acides caféique et *para*-coumarique dérivent de l'acide cinnamique (Figure 10). Les acides caftarique et coutarique dérivent des acides caféique et *para*-coumarique respectivement par estérification avec l'acide tartarique.

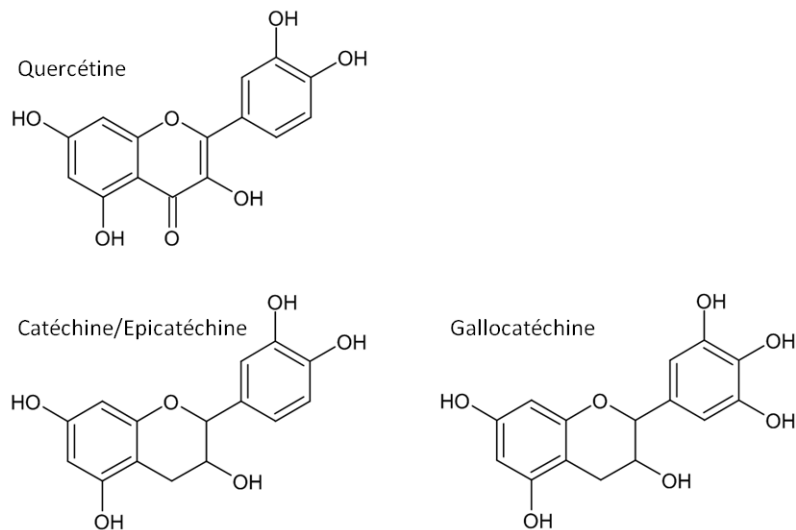


**Figure 11 : Formules chimiques de certains des principaux acides-phénols présents dans le vin rouge.**

Certains de ces acides phénoliques sont capables d’agir positivement contre les cancers. L’acide gallique présente des effets chimio préventifs contre le cancer du côlon chimiquement induit chez le rat (Giftson et coll., 2010; Giftson Senapathy et coll., 2011). L’acide caféique est capable d’inhiber de moitié les capacités d’invasion des cellules PC3 issues de cancer humain de la prostate (Lansky et coll., 2005). L’acide *para*-coumarique en revanche ne semble pas capable *in vivo* d’empêcher la carcinogénèse (Femia et coll., 2005).

## 5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une grande famille de polyphénols ayant de nombreuses sous-classes. Chimiquement, ils sont formés d’un squelette à 15 atomes de carbone, comprenant deux cycles benzéniques reliés par une chaîne à 3 carbones (Figure 12). Très présents dans de nombreux fruits et légumes, les flavonoïdes seraient des acteurs majeurs dans les effets bénéfiques du régime méditerranéen. Le vin rouge en est une source particulièrement riche. Les effets sur la santé des flavonoïdes sont étudiés de longue date (Clark et Geissman, 1949). En particulier, leur pouvoir antioxydant est généralement mis en avant (Miyagi et coll., 1997). Il est souvent avancé que leur faible biodisponibilité limite leur activité. Il semble néanmoins que leur consommation sous forme de vin rouge permette tout de même de bénéficier de leurs effets.



**Figure 12 : Formules chimiques de certains des principaux flavonoïdes présents dans le vin rouge.**

#### a. La quercétine

La quercétine est un flavonol que l'on trouve dans de nombreux végétaux, parmi lesquels le raisin (pellicule de la baie principalement), mais aussi plusieurs autres baies comme la myrtille et le cassis, et qui est présent en grande quantité dans les piments, câpres et oignons. De couleur jaune vif, la quercétine fait tendre la couleur de certains vins vers le jaune.

C'est une molécule avec de très puissantes capacités anti oxydantes et anti inflammatoires (Boots et coll., 2008). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence des effets anticancéreux de la quercétine. Des tests *in vitro* ont révélé que la quercétine est capable d'induire une apoptose de cellules leucémiques (HPB-ALL, Jurkat, K-562, U-937) (Russo et coll., 2007) et inhiber la transformation cancéreuse de cellules (JB6 P+, cellules d'épiderme de souris) en se fixant à MEK1 (« MAP kinase or ERK kinase ») (Lee et coll., 2008). Des études chez les rongeurs montrent des effets bénéfiques contre le cancer du sein (Verma et coll., 1988), les mélanomes (Caltagirone et coll., 2000), et le cancer du pancréas (Mouria et coll., 2002). En ce qui concerne le cancer du côlon, la quercétine est également capable d'inhiber la néoplasie induite par l'azoxyméthane (Deschner et coll., 1991). Ces propriétés anticancéreuses pourraient s'avérer encore plus importantes lorsque la quercétine est employée en combinaison avec d'autres molécules, notamment avec le resvératrol.

Les cellules intestinales absorbent la quercétine en majeure partie sous une forme non conjuguée (Murota et coll., 2000). La présence d'éthanol dans le vin semble améliorer cette absorption (Dragoni et coll., 2006). La quercétine aglycone ainsi absorbée est rapidement métabolisée. Les différents métabolites de la quercétine ont une activité anti-inflammatoire moins importante (Loke et coll., 2008). Ces métabolites pourraient ensuite retourner, de manière sporadique, sous la forme aglycone lors d'inflammations, comme c'est le cas pour d'autres flavonoïdes (Shimoi et coll., 2001), et ainsi retrouver tout leur pouvoir antioxydant de manière locale.

#### **b. Catéchines**

Les catéchines sont des flavanols présents dans la vigne, le thé, le chocolat, les fruits en général, et de très nombreuses plantes. On en trouve généralement des quantités relativement importantes dans le vin rouge. La famille des catéchines regroupe les catéchines *stricto sensu*, les épicatechines, les gallocatéchines, les épigallocatéchines et leurs dérivés galloylés. Les plus fréquents sont les stéréoisomères (+)-catéchine (généralement désignée en tant que catéchine) et (-)-épicatechine.

La (+)-catéchine est principalement réputée pour ses capacités antioxydantes efficaces contre de nombreuses pathologies, et en particulier les maladies cardiovasculaires et la cancérogenèse. Le vin en est une source particulièrement riche, surtout en combinaison avec une consommation de fruits (Ruidavets et coll., 2000). Des tests *in vivo* ont mis en évidence une protection vis-à-vis du cancer. Des souris transgéniques HTLV-1 présentent plus tardivement des tumeurs de type neurofibromes (qu'elles développent spontanément) lorsqu'elles reçoivent un régime enrichi en catéchine (Ebeler et coll., 2002).

Dans le plasma, la catéchine est presque exclusivement présente sous forme conjuguée. La présence d'éthanol dans le vin ne semble pas déterminante quant à son absorption (Donovan et coll., 1999).

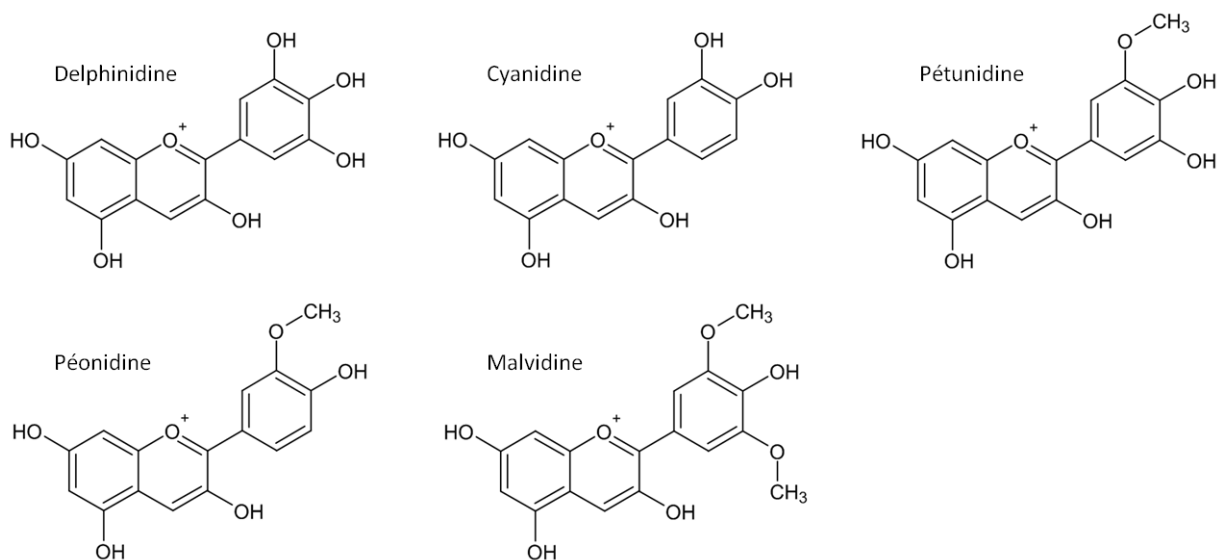
#### **c. Les anthocyanidines**

Les anthocyanidines sont une sous-classe de flavonoïdes (Figure 13). Ce sont à ces molécules que le vin rouge doit ses teintes rouge et parfois bleutée.

La delphinidine est capable d'induire *in vitro* et *in vivo* l'apoptose de cellules PC3 issues de cancer humain de la prostate (Hafeez et coll., 2008). Elle agit également positivement dans la lutte contre les stress oxydatifs et l'apoptose induite par les rayonnements ultraviolets (Afaq et coll., 2007). La delphinidine protège également les cellules endothéliales contre l'apoptose (Martin et coll., 2003).

La delphinidine et la cyanidine ont montré des effets cytotoxiques contre des cellules métastatiques (LoVo et LoVo/ADR) de cancer du côlon (Cvorovic et coll., 2010). Ces 2 composés se montrent également capables d'induire ou inhiber le stress oxydant selon la malignité du type cellulaire.

*In vivo*, des souris  $Apc^{Min}$  (qui développent spontanément des tumeurs intestinales en raison d'une mutation dans le gène suppresseur de tumeur *Apc*, les prédisposant au développement de multiples adénomes intestinaux et représentant un modèle de la polypose adénomateuse familiale humaine) recevant un régime enrichi en cyanidine présentent une diminution significative du nombre et de la taille des adénomes au niveau du cæcum (Kang et coll., 2003) mais pas au niveau du côlon. Ceci pourrait s'expliquer par la relative fragilité des anthocyanidines qui seraient dégradées par soit les bactéries coliques, soit les variations de pH.



**Figure 13 :** Formules chimiques de certaines des principales anthocyanidines présentes dans le vin rouge.



#### d. Les anthocyanes

Des anthocyanes (également appelés anthocyanosides ou anthocyanines), dérivés glucosidés des anthocyanidines, sont également présents dans le vin rouge. La microflore intestinale les dégrade complètement en quelques heures, produisant des métabolites (Forester et Waterhouse, 2008).

La cyanidine-3-glucoside permet de réduire le nombre d'adénomes intestinaux (au niveau de l'intestin grêle médian et distal principalement) des souris *Apc<sup>Min</sup>* (Cooke et coll., 2006). Même si l'efficacité antiproliférative *in vitro* des anthocyanes contre les cellules coliques (HT 29 et HCT 116) se révèle légèrement plus faible que celle des anthocyanidines (Kang et coll., 2003), leur stabilité plus grande en fait de meilleurs potentiels composés chimiopréventifs (Thomasset et coll., 2009).

### 6. Les Tanins

Le terme de tanin désigne des composés phénoliques ayant la capacité de précipiter les protéines (Atkinson et Hazleton, 1922). On distingue dans le vin rouge des tanins condensés et des ellagitanins principalement.

#### a. Tanins condensés

Les tanins condensés (ou proanthocyanidines) sont formés par des unités flavaniques de type catéchol et épicatechol. Elles peuvent être sous forme de dimères (procyanidines, prodelphinidines, propélarгонidines, profisetinidines, ...) ou d'oligomères et polymères plus complexes. Ainsi, les pépins et la pellicule de raisins contiennent des proanthocyanidines pouvant être formées de 30 unités de flavanol. Ils sont notamment responsables de l'astringence des vins rouges que l'on qualifie de « tanniques ». Ceci est dû aux interactions entre ces proanthocyanidines et les protéines de la salive, en particulier les protéines riches en proline (Hagerman et Butler, 1981). Leur concentration dans le vin augmente avec le temps de macération (Aron et Kennedy, 2007).

La consommation de vins riches en oligomères de procyanidines (tétra-épicatechine, procyanidine trimérique-gallate, procyanidine tétramérique et pentamérique-gallate) semble corrélée avec les effets protecteurs des vins rouges contre les maladies

cardiovasculaires par leur action sur l'endothéline-1 (Fitzpatrick et coll., 2002; Corder et coll., 2006).

Des dimères de procyanidines ont été montrés comme capables d'inhiber la biosynthèse d'œstrogènes *in vitro* et *in vivo* (Eng et coll., 2003), ce qui suggère des effets protecteurs contre le cancer du sein. Les proanthocyanidines, associées à des fibres, pourraient aussi permettre de réduire les risques de cancer du côlon (Lizarraga et coll., 2011). D'autres études n'ont en revanche pas montré d'effets significatifs de mélanges riches en proanthocyanidines sur l'apparition de cryptes aberrantes chez le rat (Caderni et coll., 1999).

#### **b. Les autres tanins**

L'ancienne classification des tanins opposait seulement deux classes de tanins sur le critère de leur possible hydrolyse. Cette classification n'a plus cours et aujourd'hui, en plus des tanins condensés, on trouve les gallotanins, les ellagitanins ainsi que leurs dérivés complexifiés à la catéchine. Le vin rouge contient surtout des ellagitanins (principalement vescalagine, castalagine, roburine et grandinine) lorsqu'il est élevé en futs de chêne (*Quercus*) ou de châtaignier (*Castanea*). En effet, les ellagitanins ne proviennent pas du raisin, mais du bois. Ils ont un impact sur certaines qualités organoleptiques du vin, telles que sa rondeur et son amplitude (Michel et coll., 2011). Les gallotanins proviennent quant à eux de la noix de galle (tumeur du chêne) et sont présents dans le vin en quantités minimes.

Les ellagitanins, principalement extraits de jus de grenade, sont activement étudiés pour leurs effets contre le cancer, et en particulier le cancer de la prostate (Heber, 2008). Leur présence dans certains vins, même si elle n'est pas déterminante dans les effets bénéfiques du vin, pourrait y contribuer.

Les gallotanins ont montré des effets bénéfiques contre des xénogreffes de cellules HCT 116 issues de cancer colorectal humain chez la souris (Al-Halabi et coll., 2011). Néanmoins leur absence dans la plupart des vins, et le faible taux qu'ils atteignent lorsqu'ils sont présents ne permettent pas réellement de profiter de leurs effets par une consommation de vin.

## 7. Effets spécifiques sur la santé des combinaisons de polyphénols du vin

Si la contribution du vin aux bénéfices santé observés dans les populations consommatrices (régime méditerranéen) est parfois remis en cause par certaines études épidémiologiques que l'on peut suspecter d'être à dessein (Latino-Martel et coll., 2011), il apparaît désormais incontestable que certaines molécules issues du vin présentent, de manière isolée, des vertus contre divers types de maladies. Les combinaisons des molécules dans le vin pourraient donc être bien plus bénéfiques que leur consommation individuelle. Très peu d'études se sont pour l'instant focalisées sur la compréhension des interactions de ces molécules au niveau cellulaire ou *in vivo*.

Parmi les interactions les plus étudiées, celles entre le resvératrol et la quercétine semblent très prometteuses. *In vitro*, la combinaison de resvératrol et de quercétine inhibe l'adipogenèse et induit l'apoptose de cellules préadipocytaires 3T3-L1 (Yang et coll., 2008), ce qui pourrait suggérer des effets anti-obésité.

En ce qui concerne les cancers, des effets synergiques entre le resvératrol et la quercétine ont été mis en évidence dans le blocage du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose de cellules leucémiques humaines (Mertens-Talcott et Percival, 2005). Cette combinaison de resvératrol et de quercétine présente également une forte synergie contre la prolifération de cellules C6 issues de gliomes murins (Zamin et coll., 2009). Cet effet passe par un arrêt de croissance similaire à une sénescence.

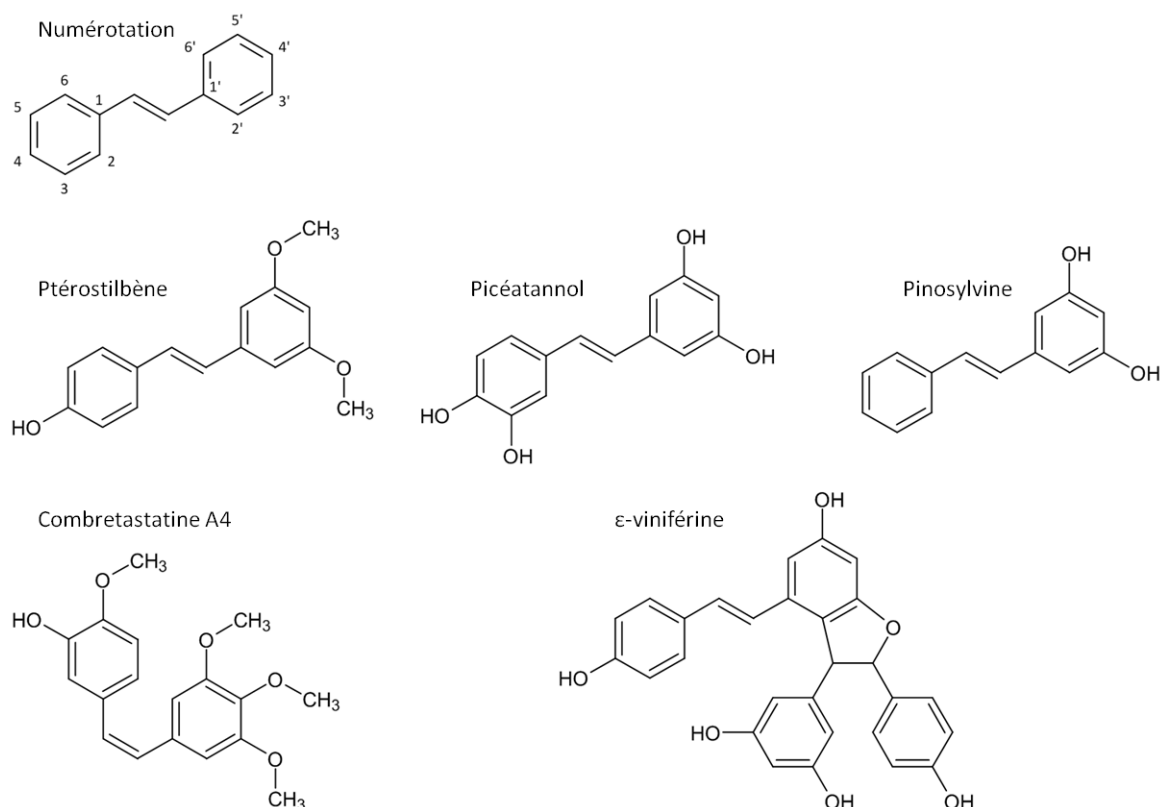
*In vivo*, certains flavonoïdes pourraient également permettre d'inhiber les métabolismes de sulphotation (De Santi et coll., 2000b) et de glucuronidation (De Santi et coll., 2000a) qui limitent la biodisponibilité des polyphénols. Ceci pourrait donc contribuer à augmenter globalement leurs effets en ralentissant l'élimination. Ainsi le ptérostilbène, analogue naturel du resvératrol, présente des effets bénéfiques en synergie avec la quercétine contre des métastases hépatiques de mélanomes (Ferrer et coll., 2005). Des tests *ex vivo* impliquant la quercétine et la catéchine ont montré des effets synergiques dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Pignatelli et coll., 2000) suggérant une protection contre les maladies cardiovasculaires.

Resvératrol, quercétine et catéchine, en traitement ternaire, à des concentrations physiologiquement atteignables par l'alimentation, montrent également des effets synergiques *in vivo* contre le cancer du sein. Ainsi, deux lignées cellulaires issues de cancer du sein ont été injectées à des souris nude. Ces tests ont montré la capacité d'un tel traitement à inhiber la prolifération, la progression du cycle cellulaire et la croissance tumorale contre des cellules MDA-MB-231 (Schlachterman et coll., 2008), ainsi que la migration métastatique (osseuse et hépatique) des cellules MDA-MB-435 (Castillo-Pichardo et coll., 2009).

Paradoxalement, il semble que l'éthanol présent dans le vin ne soit pas non plus inactif en ce qui concerne les effets cardioprotecteurs du vin rouge (Das et coll., 2007). En effet, l'éthanol présente des effets synergiques avec le resvératrol ou la quercétine dans l'inhibition de iNOS (« inductible Nitric Oxide Synthase » – oxyde nitrique synthétase inductible), enzyme impliquée dans l'athérosclérose mais également dans l'initiation tumorale (Chan et coll., 2000).

## E. Les analogues du resvératrol

Le resvératrol présente de nombreux effets sur la santé, en particulier contre les cellules cancéreuses. Néanmoins, *in vivo*, du fait de son élimination rapide par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, ces effets sont très variables et ne sont pas optimaux. La recherche d'analogues structuraux du resvératrol peut permettre, d'une part, d'en comprendre les mécanismes au travers des relations structure-fonction, d'autre part, de développer des molécules pharmacologiques plus efficaces et/ou plus ciblées.



**Figure 14 : Formule chimique des principaux dérivés naturels du resvératrol et numérotation des carbones de la structure des stilbènes.**

## 1. Analogues naturels du resvératrol

Il existe déjà dans la nature plusieurs stilbènes analogues du resvératrol présentant des différences en terme d'hydroxylation, de méthylation, ou des dimérisations (Figure 14). Des études ont permis d'étudier leurs effets biologiques et de mettre en avant des mécanismes qui peuvent être semblables à ceux mis en œuvre par le resvératrol, ou complètement différents. Ces différents travaux permettent de se faire une première idée des relations structure-fonction du resvératrol.

### a. Le ptérostilbène

On trouve dans le raisin et les myrtilles une autre phytoalexine de la famille des stilbènes : le ptérostilbène. Sa structure est très proche du *trans*-resvératrol et n'en diffère que par la présence de deux groupements méthoxyles en positions 3 et 5. Ceci contribue à augmenter sa biodisponibilité qui est largement supérieure à celle du resvératrol (Kapetanovic et coll., 2011).

Le ptérostilbène présente, tout comme le resvératrol, de nombreux effets biologiques. Il est ainsi antioxydant, anti-inflammatoire et analgésique (Remsberg et coll., 2008). Il présente également des propriétés contre l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie (Rimando et coll., 2005) et semble être capable de se lier à PPAR $\alpha$  (Mizuno et coll., 2008). Mais c'est son activité anticancéreuse qui est la plus étudiée (Rimando et Suh, 2008). En effet le ptérostilbène est un inducteur d'apoptose (Tolomeo et coll., 2005) et inhibiteur de prolifération cellulaire (Nutakul et coll., 2011).

#### **b. Le picéatannol**

Autre dérivé du resvératrol, le picéatannol ne diffère du resvératrol que par la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire en position 3'. On le trouve également dans le vin en faible quantité mais aussi dans l'épicéa commun (*Picea abies*). Il présente une activité antivirale, notamment contre le virus Epstein-Barr (Geahlen et McLaughlin, 1989), mais aussi une activité anti-tumorale (Wieder et coll., 2001).

#### **c. La pinosylvine**

La pinosylvine est un stilbène qu'on retrouve en particulier dans le bois du pin sylvestre (*Pinus sylvestris*). Sa structure diffère du *trans*-resvératrol par l'absence de groupement hydroxyle en 4'. La pinosylvine présente également des activités antiprolifératives (Mellanen et coll., 1996) et anti-métastatiques (Park et coll., 2011).

#### **d. La combretastatine A4**

La combretastatine A4 est un stilbène de structure proche du *cis*-resvératrol avec un seul groupement hydroxyle et 4 groupements méthoxyles. Dans la nature on la trouve dans un arbuste africain (*Combretum caffrum*). Elle est un agent antimitotique puissant et induit la mort cellulaire par catastrophe mitotique (Nabha et coll., 2002). Des essais cliniques en phase I ont permis de confirmer l'efficacité des traitements par la combretastatine A4-phosphate contre la néoangiogenèse tumorale (Griggs et coll., 2001).

#### **e. Les oligomères de resvératrol**

Les oligomères de resvératrol sont une sous-famille des stilbènes dont la structure générale est assez variable. On peut citer par exemple les viniférines ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ), le pallidol, l'hoephénol. L' $\epsilon$ -viniférine (dimère de resvératrol) présente des effets antiprolifératifs moins puissants que le resvératrol sur les cellules HepG2 (Colin et coll., 2008), et encore

moins sur les cellules de cancer colorectal (Colin et coll., 2009), alors que son effet est comparativement plus important sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Zghonda et coll., 2011).

## 2. Analogues synthétiques du resvératrol

Les analogues naturels sont une source d'information utile pour la compréhension des relations structure-fonction du resvératrol, mais de nombreux éléments demeurent hypothétiques. D'après les premiers tests, ils n'apportent pas non plus de solution idéale quand à leurs propriétés chimio-préventives, conservant certains des défauts du resvératrol (faible biodisponibilité, métabolisation et élimination rapide) ou d'autres défauts inhérents aux modifications de structure (efficacité biologique limitée). Pour ces raisons, des dérivés synthétiques ont été développés.

### a. Dérivés hydroxylés

La première approche consiste à modifier le schéma d'hydroxylation autour des 2 cycles benzéniques. Les molécules naturelles n'étant pas nombreuses (picéatannol et pinosylvine) des équipes de chimistes ont synthétisé d'autres molécules.

Dans un premier temps, une trentaine de dérivés du *trans*-picéatannol ont été synthétisés (Thakkar et coll., 1993) avec des groupes hydroxyles différents ou remplacés par d'autres groupements. Ces différentes molécules ont permis de révéler la nécessité de la double liaison entre les 2 groupements aromatiques dans l'inhibition de l'activité la tyrosine kinase de p56<sup>lck</sup>, enzyme impliquée dans la prolifération cellulaire, et de trouver des molécules biologiquement actives telles que le 3,3'-dihydroxy-*trans*-stilbène.

La capacité du resvératrol à induire des dommages à l'ADN est conservée avec un analogue ne comportant plus qu'un seul groupement hydroxyle en position 4 (Matsuoka et coll., 2008). La présence de deux hydroxyles en position 4 et 4' (4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbène) augmente les effets antiprolifératifs par des mécanismes différents de ceux du *trans*-resvératrol (Savio et coll., 2009).

Une molécule ayant six groupements hydroxyles (3,4,5,3',4',5'-hexahydroxy-*trans*-stilbène = M8) a également été montrée comme très efficace contre la prolifération de plusieurs

lignées tumorales (Murias et coll., 2004; Murias et coll., 2005) et même contre la croissance tumorale *in vivo* (Paulitschke et coll., 2010; Szekeres et coll., 2010).

#### **b. Dérivés méthylés/acétylés**

L'ajout de groupements méthyles permet d'améliorer la biodisponibilité du resvératrol, comme on a pu le voir avec le ptérostilbène. L'idée découlant de ce constat consiste donc à synthétiser des analogues méthoxylés (ou acétoxylés) du resvératrol. Le resvératrol-triacétate, dérivé acétylé du resvératrol, est aussi efficace que le resvératrol dans l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses (Colin et coll., 2009). L'impact des groupements acétyles semble donc minime *in vitro*. De même, le 3,4',5-triméthoxy-*trans*-stilbène (resvératrol-triméthoxy) semble inactif sur la prolifération de cellules PC3 (cancer de la prostate) (Sala et coll., 2003). De plus, certains stilbènes de configuration *cis* se révèlent plus efficaces que les configurations *trans* correspondantes (Roberti et coll., 2003) en tant qu'agents pro-apoptotiques. De tous les stilbènes méthylés synthétisés, c'est le 3,4',5-triméthoxy-*cis*-stilbène (*cis*-resvératrol-triméthoxy) qui semble le plus efficace (Schneider et coll., 2003). Une approche similaire est également mise en œuvre pour augmenter l'efficacité et la spécificité d'autres molécules naturelles anticancéreuses telles que les coumarines (Beillerot et coll., 2008) ou les flavonoïdes (Wen et Walle, 2006).

#### **c. Autres dérivés**

Les oligomères de resvératrol sont peu étudiés car difficiles à extraire en quantités importantes et difficiles à synthétiser chimiquement (Snyder et coll., 2011). On l'a vu, les effets antiprolifératifs de l' $\epsilon$ -viniférine semblent assez peu convaincants sur les cellules cancéreuses d'origine hépatique ou colique, il en est de même pour son dérivé synthétique l' $\epsilon$ -viniférine-pentaacétate (Marel et coll., 2008).

Enfin, des analogues du resvératrol plus atypiques que sont les alcools gras de resvératrol ont été montrés comme pouvant moduler la neuroinflammation (Hauss et coll., 2007).

Les relations structures-activité des analogues du resvératrol demeurent complexes du fait des nombreux mécanismes d'action impliqués et méritent qu'on s'y intéresse étant donné le grand nombre de bénéfices qu'ils semblent pouvoir apporter pour la santé, en particulier dans la lutte contre le cancer. Le développement de nouvelles molécules actives tirant profit de ces études pourrait permettre de mieux lutter contre le cancer (Ulrich et coll., 2005).



## **PARTIE II : MATERIELS ET METHODES**

## A. Solutions de polyphénols

### 1. Solvants

Les solutions mères de polyphénols dans l'éthanol ou le DMSO (diméthylsulfoxyde) sont 1 000 fois plus concentrées que les milieux de traitements afin de se limiter à 0,1% en solvant et ainsi éviter d'éventuels effets annexes. En effet, un milieu de culture cellulaire contenant 0,1% ou 0,2% d'éthanol ne présente pas d'effets différents du milieu de culture sans aucun ajout (données non présentées). Pour certains tests, le pourcentage d'éthanol a dû être augmenté jusqu'à 0,4%, ce qui induit une inhibition de la prolifération de cellules (SW620) de 35%. Des contrôles sont également systématiquement effectués avec la même concentration de solvant. De même d'autres tests n'ont révélé aucune différence significative entre des traitements effectués avec des solutions de polyphénols réalisées dans l'éthanol ou dans le DMSO tant que la concentration finale de ce véhicule ne dépasse pas 0,1% (données non présentées).

En ce qui concerne les concentrés de vins de Bourgogne, les solutions utilisées consistent en un mélange de volumes égaux d'éthanol et de concentré afin de limiter les contaminations du milieu de culture cellulaire par les microorganismes présents dans ces concentrés, tout en permettant une solubilisation satisfaisante des concentrés dans le milieu. Ces mélanges sont utilisés de manière à obtenir en concentration finale soit 0,2% de volume de concentré (et 0,2% d'éthanol), soit 0,4% de volume de concentré (et 0,4% d'éthanol).

### 2. Traitements

Les cellules sont traitées entre 24 et 48 heures après leur mise en culture, de manière à ce qu'elles soient à une confluence d'environ 30 à 40% et en phase exponentielle de croissance cellulaire. Ceci leur permet d'exprimer de façon optimale leurs caractéristiques propres. L'ancien milieu est retiré. Le milieu de traitement, supplémenté en polyphénols, est appliqué directement sur les cellules. Dans le cas d'utilisation d'un milieu de traitement sans rouge de phénol (pour les tests en HPLC), un lavage est appliqué avant le traitement avec ce même milieu afin d'éliminer toutes les traces de rouge de phénol des précédents milieux.

La durée du traitement est de 48 heures pour toutes les expériences de prolifération cellulaire. Les mesures sont faites au minimum en triplicate. Pour tous les tests, les cellules « contrôles » prolifèrent sans être soumises à l'effet d'aucune molécule, si ce n'est l'éthanol ou le DMSO dans des proportions identiques aux traitements.

## B. Culture cellulaire

Les traitements sont effectués sur cellules issues de lignées provenant de l'ATCC (« American Type Culture Collection »). Les milieux de culture cellulaire utilisés sont de marque PAN, et contiennent de la glutamine stabilisée. Le mélange d'antibiotiques de marque PAN (P06-07100) contient 10 000 U/mL de pénicilline et 10 ml/mL de streptomycine. Les cellules sont lavées au DPBS (« Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ») de marque PAN (P04-35500). Afin de rompre les adhésions cellulaires, un mélange de trypsine 0,5% et EDTA (« Ethylene Diamine Tetraacetic Acid » – acide éthylène diamine tétracétique) 0,2% (PAN P10-024100) est dilué au 1/10 dans du DPBS 1X afin d'appliquer sur les cellules 0,05% de trypsine et 0,02% d'EDTA. Le sérum de veau fœtal de marque PAN est issu d'un lot unique P260620 et est garanti sans mycoplasmes. Des tests sont effectués tous les deux mois sur toutes les lignées présentes dans le laboratoire. Toutes les cellules sont incubées à 37°C avec une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Toutes ces cellules étant adhérentes, elles sont cultivées en boîtes de pétri de 10 cm de diamètre (78 cm<sup>2</sup>) de marque BD Falcon. Lorsque les cellules atteignent entre 80 et 90% de confluence dans les boîtes, elles sont repiquées dans de nouvelles boîtes. Pour ce faire, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire lavé de toutes traces de sérum de veau fœtal par 6 mL de DPBS avant l'application de la solution de trypsine/EDTA pendant quelques minutes. Les cellules ainsi en suspension sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes afin d'éliminer un maximum de trypsine. Le réensemencement se fait de la manière suivante : les cellules sont remises en suspension dans du milieu neuf (le sérum de veau fœtal contenu dans le milieu inactive le reste de la trypsine) à raison de 100 000 cellules par mL. 10 mL de cette suspension cellulaire sont alors mis dans de nouvelles boîtes.

Les cellules SW480 sont issues d'un adénocarcinome colique humain (patient de 50 ans de type caucasien). Leur morphologie est assez proche des entérocytes. Elles sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 (« Roswell Park Memorial Institute medium ») avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

Les cellules SW620 sont issues d'un ganglion lymphatique présentant des métastases chez le même patient que les cellules SW480. Leur morphologie est plus différenciée que les SW480. Elles sont cultivées dans un milieu DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle's Medium ») avec 4,5 g/L de glucose, 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

Les cellules HCT116 sont issues d'un adénocarcinome colique humain. Elles sont cultivées dans un milieu DMEM avec 4,5 g/L de glucose, 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

Les cellules HepG2 sont issues d'un hépatocarcinome humain (adolescent de 15 ans de type caucasien). Elles sont cultivées dans un milieu DMEM avec 4,5 g/L de glucose, 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

## C. Mesure de la prolifération cellulaire et du cycle cellulaire

### 1. Dénombrement cellulaire par comptage manuel

La prolifération cellulaire est évaluée par un comptage microscopique des cellules remises en suspension (trypsine puis DPBS) sur cellules de Mallassez en excluant les cellules mortes par coloration au bleu de trypan (3,3'-[(3,3'-diméthyl[1,1'-biphényl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonate] de tétrasodium). Le bleu de trypan permet de colorer les cellules mortes, incapables d'expulser le colorant.

## 2. Cristal violet

La densité de cellules adhérentes dans les puits après traitement est évaluée par coloration au Cristal violet d'après la méthode de Gillies (Gillies et coll., 1986; Kueng et coll., 1989). Le Cristal violet (ou violet de gentiane) colore plus particulièrement les noyaux. La solution de Cristal violet (0,5%) contient également 25% d'éthanol, ce qui permet de fixer les cellules simultanément à leur coloration pendant 5 à 15 minutes à température ambiante. Après plusieurs lavages successifs à l'eau, le Crystal violet incorporé dans les noyaux est dissous par une solution de citrate de sodium 0,1 M et 50% d'éthanol. L'absorbance est ensuite lue à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Dynex MRX-TC Revelation). Cette absorbance est proportionnelle à la quantité de noyaux colorés et donc à la quantité relative de cellules adhérentes dans le puits. Ceci nous donne une idée assez juste de la prolifération cellulaire et une évaluation de son inhibition par les différents traitements.

## 3. Evaluation du pourcentage d'apoptose avec le Hoechst 33342

Le Hoechst 33342 est un colorant spécifique de l'ADN. Il permet d'identifier les cellules apoptotiques dont la chromatine est particulièrement condensée. Afin de marquer les cellules, elles sont préalablement fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes et plaquées sur lame par cytospin (5 minutes à 1500 rpm). La mono couche de cellules ainsi obtenue est recouverte d'une solution de Hoechst 33342 à 1 mg/L. le Hoechst 33342 non fixé à l'ADN des cellules est éliminé par trois lavages successifs au PBS 1X avant que le spot de cellule soit monté sous lamelle avec un milieu de montage Dako Fluorsave. L'observation microscopique est effectuée après 12 heures à 4°C à l'abri de la lumière. Nous utilisons alors un microscope à épifluorescence (Leica) équipé d'un filtre DAPI ( $\lambda_{ex}$  : 365 nm et  $\lambda_{ém}$  : >397 nm). Pour chaque spot, 300 noyaux sont comptés, en incluant les phénotypes apoptotiques observés. Ces phénotypes apoptotiques se différencient des noyaux normaux par une forme morcelée et une fluorescence plus intense (du fait de la condensation de la chromatine). Le pourcentage de cellules apoptotiques est alors calculé en prenant la moyenne des expériences réalisées en triplicate.

#### 4. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Le cycle cellulaire est étudié par cytométrie en flux. Après 48 heures de traitement en plaques 6 puits, les cellules (SW480) sont récupérées par trypsination et leur ADN est marqué par incorporation d'iodure de propidium (50 µg/mL pendant 90 minutes à 37°C sous agitation douce). L'ARN est éliminé par traitement à la RNase A (200 µg/mL simultanément au marquage à l'iodure de propidium). Le contenu en ADN de chaque cellule est ainsi mesuré par un cytomètre en flux (Partec Galaxy) à l'aide du logiciel FloMax v2.0. Pour cela, les cellules passent à une vitesse de 500 +/- 100 cellules par secondes. L'excitation du fluorophore est effectuée à 488 nm. Le canal d'émission FL2 utilisé comporte un filtre à 580 nm (+/- 10 nm). La répartition des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire (subG<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, S et G<sub>2</sub>) est alors évaluée à l'aide du logiciel FlowJo v5.7.2.

## D. Mesure du contenu en polyphénols dans les différentes solutions

Les méthodes décrites dans ce chapitre sont utilisées pour mesurer de manière quantitative ou qualitative les polyphénols dans plusieurs solutions telles que les vins filtrés, les concentrés de vins, les extraits de vins et les milieux de culture cellulaire.

### 1. Polyphénols totaux

La concentration en polyphénols totaux des trois vins expérimentaux étudiés et leurs concentrés, en comparaison avec un extrait de vin de Corbières, est mesurée par une technique colorimétrique (à 765 nm) utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange de phosphomolybdate et de phosphotungstate) en adaptant le protocole de K. Slinkard (Slinkard et Singleton, 1977).

Dans une plaque 96 puits à fond plat et transparent, on place 160 µL de vin ou solution de polyphénols dilués dans l'eau (généralement une dilution au 1/160 ou 1/320 pour les vins),

on ajoute 10 µL de réactif de Folin-Ciocalteu et 30 µL d'une solution de carbonate de sodium 20%. Une gamme étalon est effectuée en parallèle avec de l'acide gallique afin de rapporter les résultats en concentrations massiques. Après deux heures à 37 °C, l'absorbance à 650 nm est lue sur un spectrophotomètre (Dynex MRX-TC Revelation).

## 2. HPLC

Pour doser les polyphénols contenus dans les vins et leurs concentrés, nous avons utilisé la méthode HPLC (« High-Pressure Liquide Chromatography ») avec le soutien technique de l'IUVV (Institut Universitaire de la Vigne et du Vin) et de CESEO (Cellule d'Expertise Scientifique En Œnologie). Cette méthode permet d'identifier certains polyphénols en particulier en fonction de leur temps de rétention sur une colonne de type RP-18 (5 µm, 250-4 mm), et de leur spectre d'absorbance. Les polyphénols détectés sont l'acide gallique, la catéchine, l'épicatéchine, l'acide caftarique, le cis-acide coutarique, le trans-acide coutarique, l'acide caféique, l'acide coumarique, la quercétine-3-O-glucoside, la quercétine, la delphinidine, la cyanidine, la pétunidine, la paeonidine et la malvidine. Nous avons réalisé 4 essais pour les vins, et 2 essais pour les concentrés. En complément du détecteur UV à barrette de diode (250-700 nm) utilisé pour la plupart des polyphénols, le picéide et le resvératrol sont observés grâce au détecteur à fluorescence (excitation 330 nm / émission 374 nm) qui permet une meilleure discrimination. Nous avons réalisé dans un premier temps quatre essais pour les vins de 2008 et deux pour les concentrés, puis trois autres pour chaque vin ou concentré de 2008 après sept mois afin d'en vérifier la stabilité. Pour les vins de 2009, trois tests ont également été effectués. Les tests ont été effectués dans un premier temps sur une HPLC de marque Waters (pompe Waters 626, contrôleur Waters 600S, injecteur Waters 717, colonne RP-18 250-4 mm, détecteur UV à barrette de diode Waters 996, détecteur à fluorescence Waters 474, logiciel Millenium32), puis sur une HPLC de marque VWR-Hitachi LaChrome (pompe L-2130, injecteur L-2200, colonne LiCroCART 250-4 Purospher RP-18, enceinte climatique TEC Jetstream, détecteur UV à barrette de diode L-2455, détecteur à fluorescence L-2485, logiciel EZChrom Elite). Les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'à injection.

La procédure pour l'analyse quantitative des polyphénols présents dans les vins et concentrés consiste en un gradient de méthanol et d'une solution aqueuse d'acide formique à 5% (Tableau 3) à 25°C et 1 mL/min.

**Tableau 3 : Composition de la phase mobile pour l'étude des polyphénols par HPLC en fonction du temps.**

Temps	Acide formique 5%	Méthanol
0	95%	5%
5	92%	8%
50	73%	27%
75	50%	50%
85	0%	100%
95	95%	5%
110	95%	5%

Une détermination rapide de polyphénols isolés est également effectuée par HPLC. Ce protocole est notamment utilisé pour détecter le resvératrol et ses dérivés (picéide et métabolites) dans les solutions simples ou les milieux de culture cellulaire. Ces analyses sont effectuées sur une HPLC de marque VWR-Hitachi LaChrome. Le détecteur UV (305 nm) est couplé au détecteur à fluorescence (excitation 330 nm / émission 374 nm) afin d'optimiser la sélectivité de détection. Pour cela, un gradient est réalisé à 25°C et 1 mL/min avec de l'eau et de l'acétonitrile (Tableau 4).

**Tableau 4 : Composition de la phase mobile pour l'analyse rapide de polyphénols par HPLC en fonction du temps.**

Temps	Eau	Acétonitrile
0	90%	10%
12	0%	100%
15	0%	100%
18	90%	10%
25	90%	10%



## E. Etude du transport cellulaire du resvératrol et de son métabolisme

### 1. Influx de resvératrol

L'influx de resvératrol dans les cellules est mesuré par incorporation de resvératrol radiomarqué au tritium en *ortho* et *para* des cycles benzéniques. La solution éthanolique de [<sup>3</sup>H]-Resvératrol utilisée est produite par GE Healthcare Life Science, à la demande du LBMN. Elle contient 37 MBq/mL – 518 GBq/mmol (code TRQ40413).

Les cellules, en plaques 6 puits et à une confluence d'environ 90 % (1 500 000 cellules par puits environ), sont incubées à 37°C avec 1 mL d'un milieu enrichi en resvératrol. Ce milieu d'incubation est composé de 1 mL de milieu de culture cellulaire complet, 0,2 µL de [<sup>3</sup>H]-Resvératrol et 0,8 µL de solution de resvératrol à 37,5 mM de resvératrol froid. Les cellules restent au contact de ce milieu contenant 30 µM de resvératrol et 7,4 Bq pendant différentes durées de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 30 et 60 minutes.

A la fin du temps d'incubation, les milieux sont prélevés et la radioactivité qu'ils contiennent est comptée avec 4 mL de PICO-FLUOR 40 (Perkin Elmer Liquid Scintillation Counting Cocktails 6013349) dans des pots (Perkin Elmer Miniature 6 mL polyéthylène Pico Prias Vials 6000192) avec un compteur à scintillation (Perkin Elmer Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2900TR). De même les cellules, après avoir été lavées deux fois au PBS 1X refroidi dans la glace, sont lysées par une solution (0,1 M NaOH ; 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ; 0,1% SDS) à raison de 1 mL par puits et la quantité de tritium qu'elles contiennent est mesurée au compteur à scintillation.

### 2. Efflux du resvératrol

L'efflux de resvératrol dans les cellules est mesuré par incorporation du resvératrol radiomarqué. Les cellules, en plaques 6 puits et à une confluence d'environ 90 %, sont incubées à 37°C avec 1 mL d'un milieu enrichi en resvératrol. Ce milieu d'incubation est composé de 1 mL de milieu de culture cellulaire complet, 0,2 µL de [<sup>3</sup>H]-Resvératrol et 0,8 µL de solution de resvératrol à 37,5 mM de resvératrol froid. Les cellules restent au contact de

ce milieu contenant 30  $\mu$ M de resvératrol et 7,4 Bq pendant 10 minutes. Le milieu d'incubation est ensuite éliminé, le tapis cellulaire est lavé au PBS, puis les cellules sont recouvertes d'un milieu d'efflux pendant différentes durées de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 30 et 60 minutes à 37°C. Le traitement des échantillons suit alors la même procédure que pour les mesures d'influx.

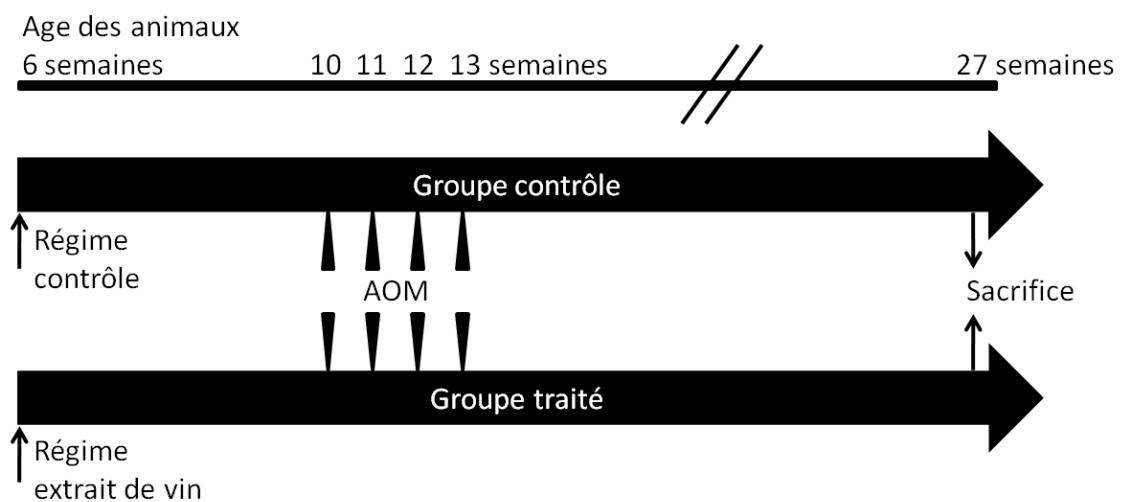
### 3. Recherche de production de métabolites du resvératrol par les cellules

Afin de rechercher *in vitro* les modulations du métabolisme des xénobiotiques dues aux polyphénols, nous avons identifié par HPLC les métabolites du resvératrol (resvératrol 3-sulfate, resvératrol 4'-O-D-glucuronide, resvératrol 3'-O-D-glucuronide, resvératrol 3-O-D-glucoside (picéide) et cis-resvératrol). Les méthodes de détection par HPLC des métabolites du resvératrol ont été mises au point à l'aide de solutions commerciales (Société Spi Bio). Le protocole HPLC est le même que celui utilisé pour les dosages de polyphénols dans le vin (Tableau 3).

## F. Etude des effets *in vivo* d'un concentré de vin sur la néoplasie des polypes induits par l'azoxyméthane

La dernière partie de cette étude consiste à tester *in vivo* l'effet d'un concentré de vin sur l'apparition de cryptes aberrantes. Pour cela, le travail d'animalerie et d'histologie a été sous-traité à la division « Cancer Prevention Research » de la société « Palindrome Liaisons » basée à Montvale (NY, USA), Directeur Dr Nitin Telang. Le choix du modèle animal s'est porté sur les souris CF-1, souche pouvant développer assez facilement des cancers colorectaux comparativement à d'autres souches. Les animaux sont achetés chez Charles River (Raleigh, NC) à l'âge de cinq semaines et subissent une quarantaine de sept jours avant le début de l'expérience. Deux groupes de souris sont constitués de manière aléatoire : 10 souris contrôles, 10 souris traitées. Ils sont soumis à un cycle 12 heures jour / 12 heures nuit, dans une atmosphère contrôlée à 50% d'humidité, à raison de cinq animaux par cage avec eau de

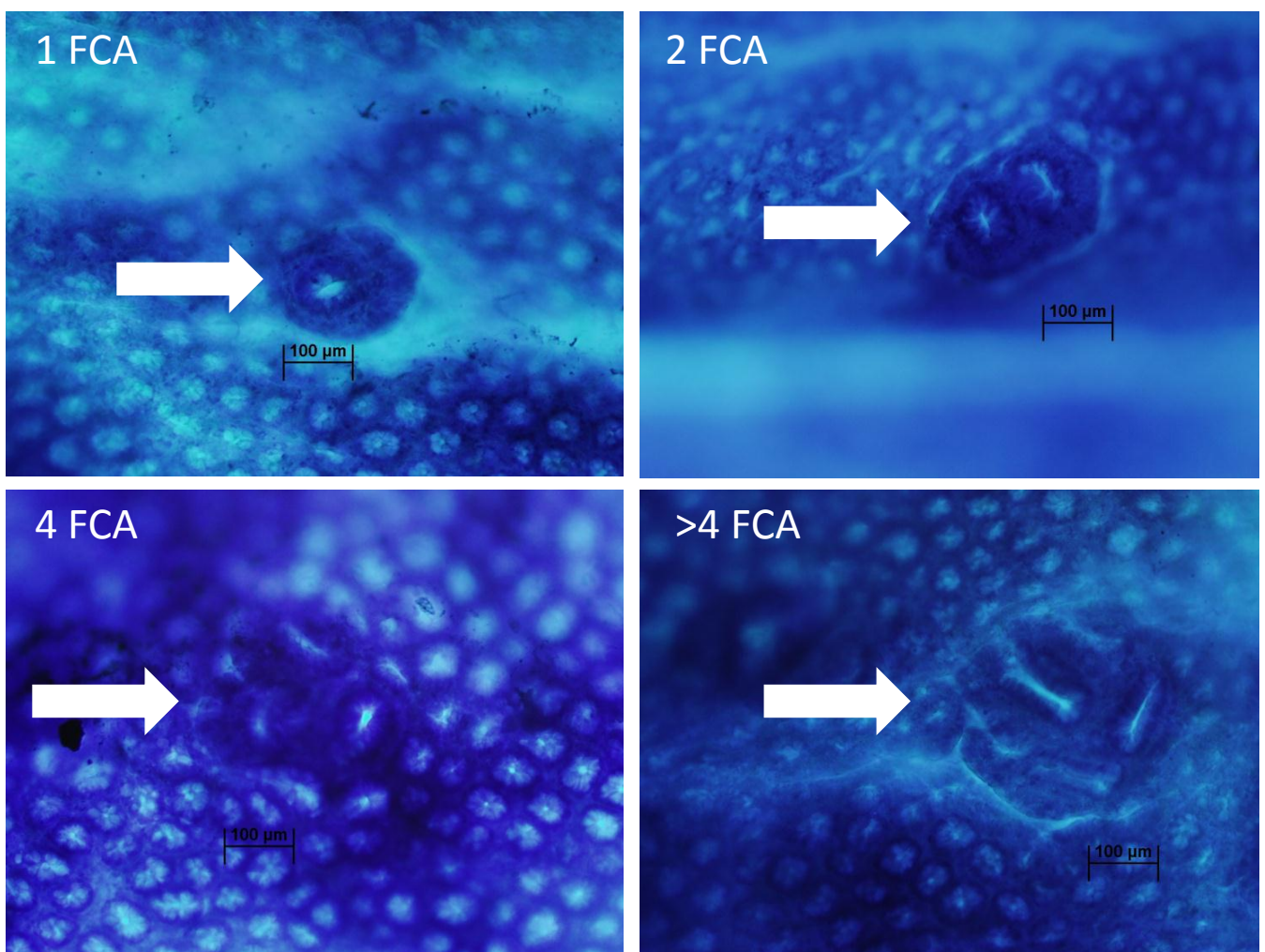
boisson *ad libitum*. Le régime expérimental du groupe traité consiste en une supplémentation d'un extrait de polyphénols de vin (concentré 2008-3) à raison de 500 mg/kg de nourriture (Teklad 4% Mouse/Rat Diet 7001, Harland-Teklad, Madison, WI). Le régime contrôle, quand à lui, consiste en l'adjonction de glycérol et d'eau dans les mêmes proportions que le régime expérimental. Chaque animal est nourri *ad libitum* et consomme environ 6 g de nourriture par jour, soit l'équivalent de 50 mg/kg/jour environ pour le groupe soumis au régime « extrait de vin » (Figure 15).



**Figure 15 : Echelle de temps et procédure expérimentale pour l'évaluation de l'efficacité de concentrés de vin rouge de Bourgogne à inhiber l'apparition de foyers de cryptes aberrantes (FCA) chez les souris CF-1.**

A la fin d'une première période de quatre semaines où les animaux sont uniquement soumis aux régimes expérimentaux, les souris sont traitées à l'azoxyméthane (AOM), agent pharmacologique pro-carcinogène capable d'induire spécifiquement des tumeurs colorectales. Les souris reçoivent une injection par jour d'AOM (10 mg/kg de masse corporelle de l'animal, en solution de NaCl) pendant quatre jours. Le régime expérimental continue pendant le traitement à l'AOM, et pendant 21 semaines. A la fin de cette période, les souris sont euthanasiées par asphyxie au dioxyde de carbone et leurs côlons prélevés. Un dénombrement et des tests histopathologiques ont été menés sur cinq souris de chaque groupe afin de comptabiliser et analyser les cryptes aberrantes apparues dans le côlon. Brièvement, les côlons sont excisés, coupés le long de l'axe longitudinal, lavés avec une solution saline et fixés à plat avec un tampon phosphate 0,1 M à 10% de formalin pendant

24 heures. Les côlons sont transférés dans une solution d'éthanol à 70% puis colorés par une solution de bleu de méthylène à 0,2% dans du PBS pendant trois minutes. Les foyers de cryptes aberrantes (Figure 16) sont distingués des cryptes normales par leur taille augmentée, une ouverture luminale allongée, un allongement des cellules dans le sens luminal-basal, une épaisseur accrue de l'épithélium et une zone péri-cryptique élargie par rapport aux cryptes normales. Les foies, côlons et sérums des cinq autres souris de chaque groupe ont été également collectés en vue d'autres tests et stockés à -80°C.



*Figure 16 : Photographie microscopique (x40) de foyers de cryptes aberrantes (FCA) de côlons de souris traitées à l'AOM après coloration au bleu de méthylène.*

## **PARTIE III : RESULTATS**

# **Chapitre 1 : Préparation et bioactivité d'extraits polyphénoliques de vins**

## A. Production et choix des vins

### 1. Extrait de vin de Corbières

Au début de cette étude, dans l'attente de produire des extraits de vin de Bourgogne, nous avons utilisé un extrait de vin rouge du Languedoc (Corbières A.O.C., cépage Carignan N majoritaire) qui est utilisé par de nombreuses équipes de recherche. Nous l'utiliserons également comme référence dans plusieurs tests. Ces extraits ont été réalisés au sein du Laboratoire des polymères et des techniques physico-chimiques de l'institut des produits de la vigne de l'INRA de Montpellier à Pech rouge par le Professeur Michel Moutounet par des techniques de chromatographie préparative avec élution alcoolique et évaporation/lyophilisation.

Cet extrait de vin se présente donc sous la forme d'une poudre que l'on dissout dans l'éthanol absolu à raison de 10 mg/mL. Les traitements sont effectués comme précédemment par supplémentation des milieux de culture avec la solution d'extrait de vin. La concentration finale d'éthanol est de 0,1% pour tous les traitements et contrôles.

L'analyse par HPLC de cet extrait de vin nous a été fournie par le Professeur P. L. Teissedre (Tableau 5). La quantité de resvératrol total libre ou glycoconjugué (picéide) de cet extrait est de 3,5 mg/L, valeur plus faible que celle du Pinot Noir qui peut en contenir près de quatre fois plus, comme précisé précédemment. La quantité de quercétine contenue dans l'extrait de vin n'a pas permis sa quantification par HPLC. En revanche l'extrait de vin est riche en catéchine et épicatechine, avec des valeurs de 23,11 mg/L et 23,36 mg/L respectivement.

Un dosage au Folin-Ciocalteu nous a permis de mesurer un taux de 5,7 mg/mL de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) dans la solution à 10 mg/mL. Le vin initialement utilisé devait donc contenir environ 1,5 g/L de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique).

**Tableau 5 : Concentrations de polyphénols totaux et de certains polyphénols particuliers dans des extraits de vin rouge du Languedoc (Corbières A.O.C., Carignan N majoritaire). Les concentrations sont exprimées en milligrammes de polyphénols par litre de vin. Ces valeurs sont fournies par le Pr. P. L. Teissedre à partir de résultats de dosages par HPLC.**

	mg/L de vin	
extrait total de polyphénols de vin	2700	
composés phénoliques mesurés	1271	
catéchine	23,11	
quercétine	ND	
<i>trans</i> -resvératrol	1,137	
<i>trans</i> -picéide	2,387	
épicatéchine	23,36	
dimères B1	18,55	
dimères B2	21,57	
dimères B3	55,86	
dimères B4	1,809	
anthocyanines	malvidine-3-glucoside	31,56
	péonidine-3-glucoside	1,782
	cyanidine-3-glucoside	0,162
acides phénoliques	acide gallique	13,66
	acide caféique	6,642
	acide caftarique	33,75
<i>trans</i> -astringine	0,338	

## 2. Vins expérimentaux de Bourgogne

### a. Production des vins

Le BIVB nous a fourni 3 vins expérimentaux issus de la vendange de 2008, et 3 autres de celle de 2009. Ils sont produits à partir de Pinot Noir clone 115 / SO<sub>4</sub>, et proviennent des mêmes vignes situées sur la commune de Savigny-lès-Beaune, lieu dit Mont Battois.

Les vins V2008-1, V2008-2, V2008-3, de même que les vins V2009-1, V2009-2 et V2009-3 diffèrent par leur temps de macération : 4 jours pour V2008-1 et V2009-1, 8 jours pour V2008-2 et V2009-2, et 14 jours pour V2008-3 et V2009-3. Les volumes de productions sont d'environ 17 litres pour chacun des vins.

Deux approches différentes ont été employées afin d'utiliser ces vins pour les divers tests *in vivo* et *in vitro*.



- Une concentration avec évaporation partielle de l'eau et totale de l'éthanol (vins de 2008 uniquement).
- Une extraction sur colonne Sep-Pak (vins de 2008 et 2009).

#### **b. Concentration des vins (vins de 2008) en deux étapes**

##### Etape 1 :

Quinze litres et demi de chacun des trois vins de 2008 (V2008-1, V2008-2 et V2008-3) ont été concentrés par Monsieur Michel Mikolajczak de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Pech Rouge. Le procédé consiste en une évaporation simple des vins dans une boule de cuisson (Ghizzoni Dante et Figlio GDF 400) chauffée par de la vapeur à 49°C pendant 24 minutes sous une pression de 120 mbars absolus au maximum.

Les solutions ainsi obtenues sont environ 30 fois plus concentrées que les vins de départ. Ces solutions n'étaient pas totalement homogènes et contenaient une petite part de solide de consistance proche du caramel (environ 5 à 10% du volume total). Nous avons choisi de ne pas utiliser les éléments solides et ne continuer qu'avec la partie liquide.

##### Etape 2 :

Afin de simplifier les tests, uniformiser les procédés et limiter l'oxydation des polyphénols, nous avons cherché à transformer ces solutions concentrées en poudres par lyophilisation. Malgré l'aide de Madame Dominique Champion de l'ENSBANA (Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation, aujourd'hui Agrosup-Dijon), tous nos essais sont restés infructueux du fait de la teneur en glycérol des concentrés. Ces derniers ont donc été réhydratés partiellement pour réobtenir des solutions les plus proches possible de ce qu'elles étaient en sortie de concentration. Des tests ultérieurs nous ont permis de confirmer que les tentatives de lyophilisation n'avaient pas eu d'impact sur le contenu (quantitatif et qualitatif) en polyphénols. Toutes ces solutions semblent contenir des microorganismes, vraisemblablement dans un état viable et pouvant se développer dans le milieu de culture cellulaire.

Dans les résultats de ce manuscrit, ces différentes solutions seront désignées :

- C1, C2 et C3 pour les concentrés n'ayant pas subi de tentatives de lyophilisation (étape 1).

- C'1, C'2 et C'3 pour les concentrés ayant subi les tentatives de lyophilisation (étape 2).

### c. Extraction de polyphénols sur colonne

Pour certains tests nous avons choisi d'appliquer un procédé plus classique de transformation en extrayant manuellement les polyphénols des vins (les 3 vins de 2008 et les 3 vins de 2009). Pour cela nous avons utilisé des colonnes de type Sep-Pak C18 (Waters corporation Milford, Mass U.S.A. Sep-Pak<sup>®</sup> Plus C18 environmental cartridges WAT023635).

Les colonnes sont activées par 5 mL de méthanol puis lavées par 6 mL de tampon acétate 10 mM (10,2 mM acide acétique, 9,8 mM acétate de sodium, pH 4,6). Le vin est lentement injecté à l'aide d'une seringue dans la colonne qui est à nouveau lavée par 6 mL de tampon acétate 10 mM. La colonne est séchée à l'air comprimé. Les polyphénols retenus dans la colonne sont élués par 2 mL d'éthanol. La procédure est répétée sept fois. L'éthanol est partiellement évaporé à 45°C sous flux d'azote, de manière à n'avoir plus qu'environ 1 mL de liquide.

Après dosage des polyphénols totaux, deux séries d'aliquots sont préparés et stockés à -20°C en vue des tests :

- Extraits dont la concentration en polyphénols est 10 fois plus importante qu'elle ne l'était dans les vins correspondants avant extraction. Ces extraits seront identifiés comme Ex10-2008-1, Ex10-2008-2, Ex10-2008-3, Ex10-2009-1, Ex10-2009-2 et Ex10-2009-3. Ils serviront à évaluer les effets biologiques des polyphénols de ces vins d'un point de vue quantitatif.
- Extraits dont la concentration en polyphénols est de 15 g/L. Ces extraits seront identifiés comme E15g-2008-1, E15g-2008-2, E15g-2008-3, E15g-2009-1, E15g-2009-2 et E15g-2009-3. Ils serviront à évaluer les effets biologiques des polyphénols de ces vins d'un point de vue qualitatif.

## B. Caractérisation des vins expérimentaux de Bourgogne

### 1. Contenu polyphénolique total

La teneur en polyphénols totaux des différents concentrés, extraits et vins est obtenue par dosage au Folin-Ciocalteu (Tableau 6). La différence de concentration par rapport au vin le moins concentré (colonne  $\Delta$ ) permet de faire ressortir les variations entre ces différents vins.

En ce qui concerne les vins de 2008, les vins V2008-1 et V2008-2 ont des teneurs assez similaires en polyphénols totaux, alors que le vin V2008-3 est plus riche de 18%. Pour les vins de 2009, ces écarts sont moins marqués et c'est le vin V2009-1, à plus faible temps de macération, qui présente le plus de polyphénols. Le temps de macération influence donc la teneur en polyphénols totaux, mais pas de manière linéaire. On notera que les vins de 2009 sont globalement plus riches en polyphénols totaux que ceux de 2008.

Suite au procédé de concentration utilisé par l'INRA de Pech Rouge (étape 1), les écarts de concentration entre les trois vins sont plus marqués. Ces variations peuvent néanmoins être pour partie imputables à des imprécisions quant aux procédés utilisés. La matière solide exclue des tests doit certainement contenir des polyphénols qui ne sont pas pris en compte.

Les concentrés de l'ENSBANA (aujourd'hui Agrosup Dijon) (étape 2) montrent une teneur en polyphénols également différente. Les diverses tentatives de lyophilisation ont aussi dû affecter de manière importante la concentration malgré les diverses précautions prises.

Les différentes extractions sur Sep-Pak ne reflètent en rien la perte potentielle de polyphénols, la phase influençant le plus la concentration finale étant l'évaporation partielle de l'éthanol, cette étape ayant une précision médiocre (température inconstante, flux d'azote réglé manuellement, évaluation visuelle de la quantité de liquide restant).

**Tableau 6 : Concentration en polyphénols totaux exprimée en milligrammes de polyphénols par litres de produit équivalents d'acide gallique. Vins de 2008 et 2009 et concentrés de 2008 sont utilisés tels quels ou en solution dilués dans l'eau. La colonne  $\Delta$  représente le rapport entre la concentration de polyphénols dans le vin (ou le concentré) et la concentration dans le vin (ou le concentré) 1.**

Echantillons		Concentration en polyphénols (mg/L)	$\Delta$	Concentration en glycérol (g/L)
Vins	V2008-1	1369 +/- 56	100%	6,62 +/- 0,1
	V2008-2	1373 +/- 27	100%	6,08 +/- 0,1
	V2008-3	1620 +/- 45	118%	6,00 +/- 0,1
	V2009-1	1779 +/- 66	100%	N/D
	V2009-2	1593 +/- 33	90%	N/D
	V2009-3	1627 +/- 66	91%	N/D
Concentrés 2008 étape 1	C1	25037 +/- 387	100%	
	C2	33570 +/- 453	134%	
	C3	37326 +/- 164	149%	
Concentrés 2008 étape 2	C'1	32293 +/- 1673	100%	
	C'2	39564 +/- 856	123%	
	C'3	38034 +/- 811	118%	

## 2. Profils polyphénoliques des vins et des concentrés en fonction du temps de macération et du millésime

### a. Identification des pics en fonction du temps de rétention

A l'aide des spectres HPLC (Figure 17) et des temps de rétention théoriques fournis par Monsieur David Chassagne et Madame Laurence Noret de la société CESEO (Tableau 7), des profils de concentrations relatifs en différents polyphénols remarquables ont été réalisés sur les trois vins de 2008 et de 2009 ainsi que sur les concentrés C1, C2, C3, C'1, C'2 et C'3.

A partir de ces profils et avec l'aide de gammes étalons d'acide gallique, d'acide caféique, de resvératrol, de picéide, de quercétine et d'oenine (malvidine-3-glucoside), nous avons pu

déterminer les concentrations de ces polyphénols dans les différents vins et concentrés. Ces concentrations pour les six vins sont présentées dans les figures 18 à 24 et dans le tableau 8.

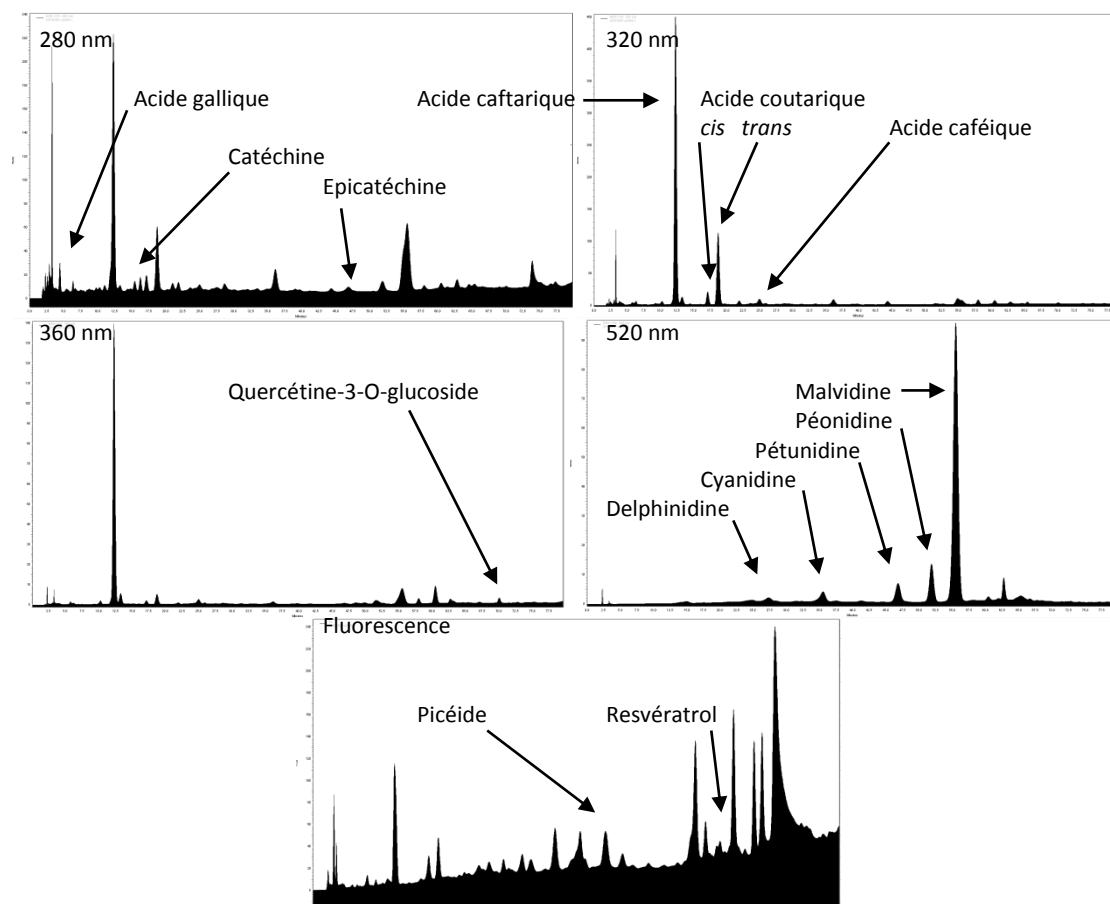


Figure 17 : Chromatogrammes HPLC du vin V2009-1 à 280, 320, 360 et 520 nm et en fluorescence (excitation 330 nm / émission 374 nm) avec identification des pics de plusieurs polyphénols en fonction de leur temps de rétention (comparé à des standards, Tableau 7) et du maximum d'absorbance qui leur est associé.

Tableau 7 : Temps de rétention théoriques (en minutes) de certains polyphénols présents dans le vin rouge, selon le protocole d'HPLC décrit précédemment.

Composés	Acide gallique	Acide caftarique	Catéchine	Acide <i>cis</i> -coutarique	Acide <i>trans</i> -coutarique	Acide caféique	Delphinidine	Cyanidine	Picéide	Pétunidine	Epicatéchine	Péonidine	Malvidine	Resvératrol	Quercétine-3-O-glucoside
Temps de rétention (min)	3,35	12,4	15,5	17,3	18,5	25	27,5	35,8	44,8	46,6	47,1	52	55,8	61,1	70

## b. Acide gallique

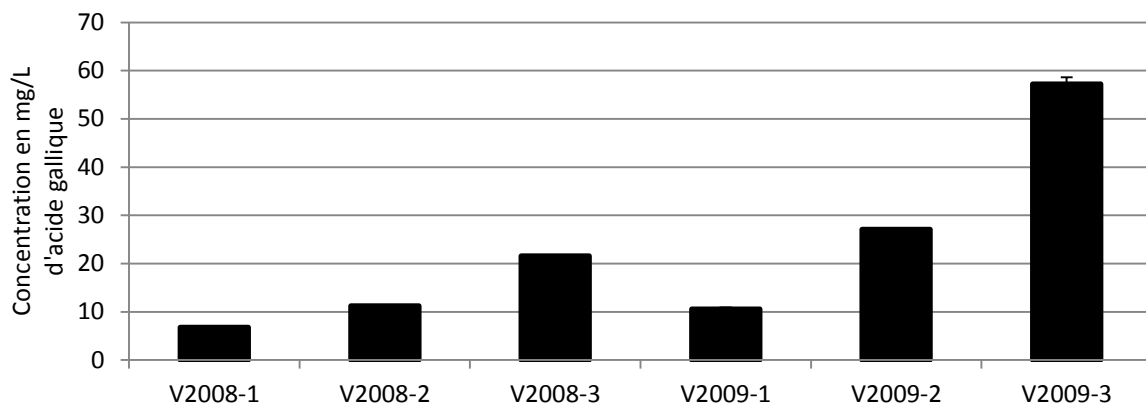


Figure 18 : Concentrations en mg/L de l'acide gallique dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.

La concentration en acide gallique augmente nettement avec le temps de macération des différents vins, qu'ils soient issus des vendanges de 2008 ou de 2009. Les taux sont globalement plus importants pour les vins de 2009 à temps de macération équivalents.

## c. Catéchines

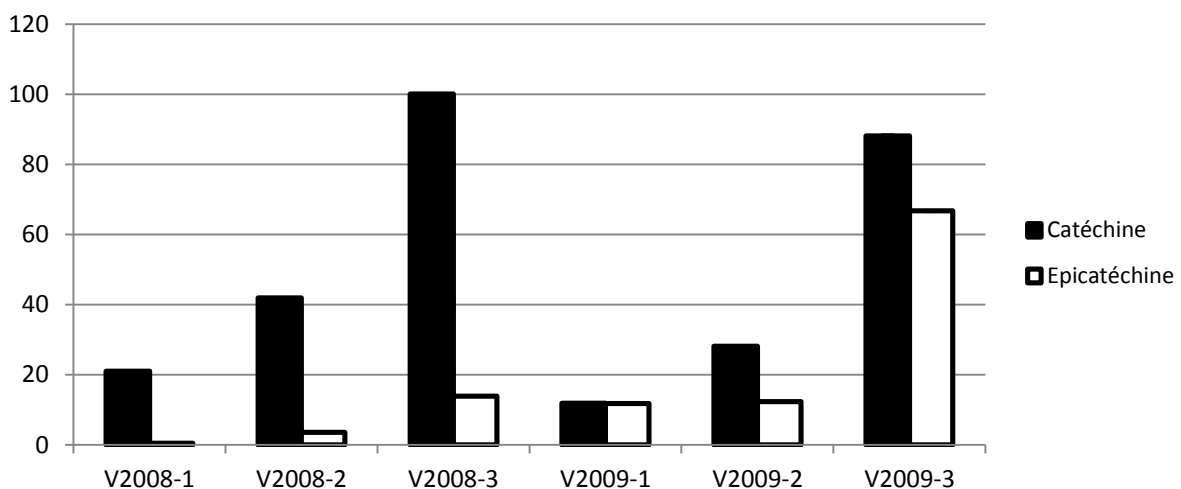
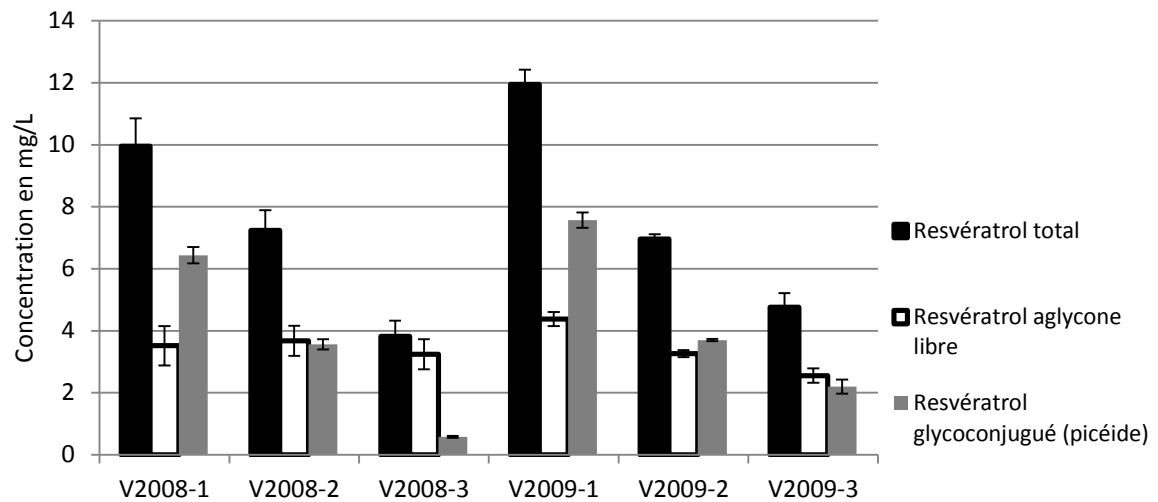


Figure 19 : Concentrations en mg/L de catéchine et concentration en mg/L équivalent de catéchine de l'épicatéchine dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.

Les concentrations en catéchine et épicatechine augmentent nettement avec le temps de macération des différents vins, qu'ils soient issus des vendanges de 2008 ou de 2009. Le ratio catéchine/épicatechine est globalement plus important pour les vins de 2008. Ces augmentations peuvent s'expliquer par la libération de catéchine et épicatechine lors de la dégradation des proanthocyanidines.

#### d. Resvératrol



*Figure 20 : Concentrations en mg/L du resvératrol et du picéide ou du resvératrol total (calculé en additionnant le resvératrol aglycone et le picéide) dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.*

Les concentrations en resvératrol total (formes aglycone et glycoconjuguée confondues) diminuent avec le temps de macération. Le taux de resvératrol aglycone libre varie peu, avec une tendance à diminuer avec le temps de macération, mais c'est principalement le taux de picéide qui évolue. Les microorganismes présents durant la macération pourraient être responsables de cette disparition en métabolisant le resvératrol et le picéide ou en les complexant en viniférines par exemple.

e. Acides caftarique, coutarique et caféique

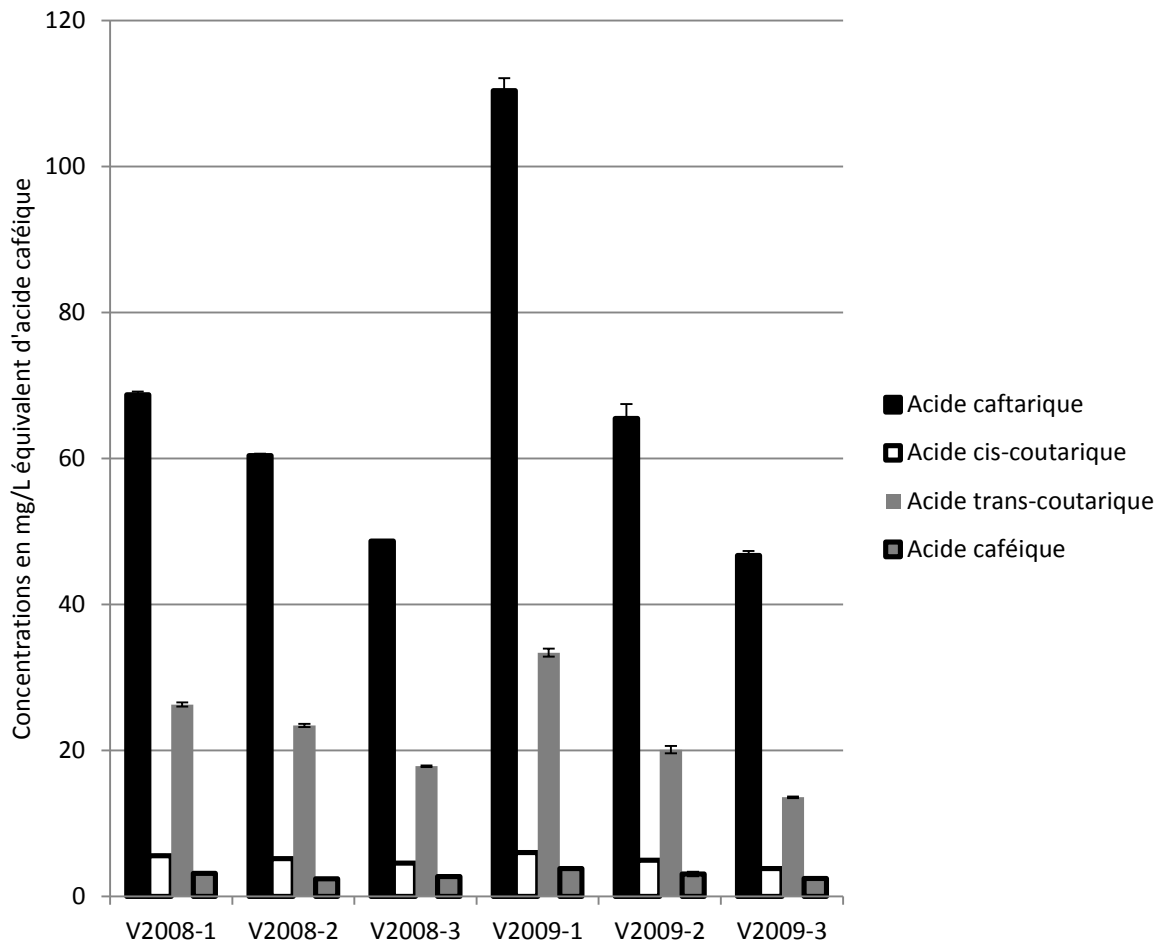
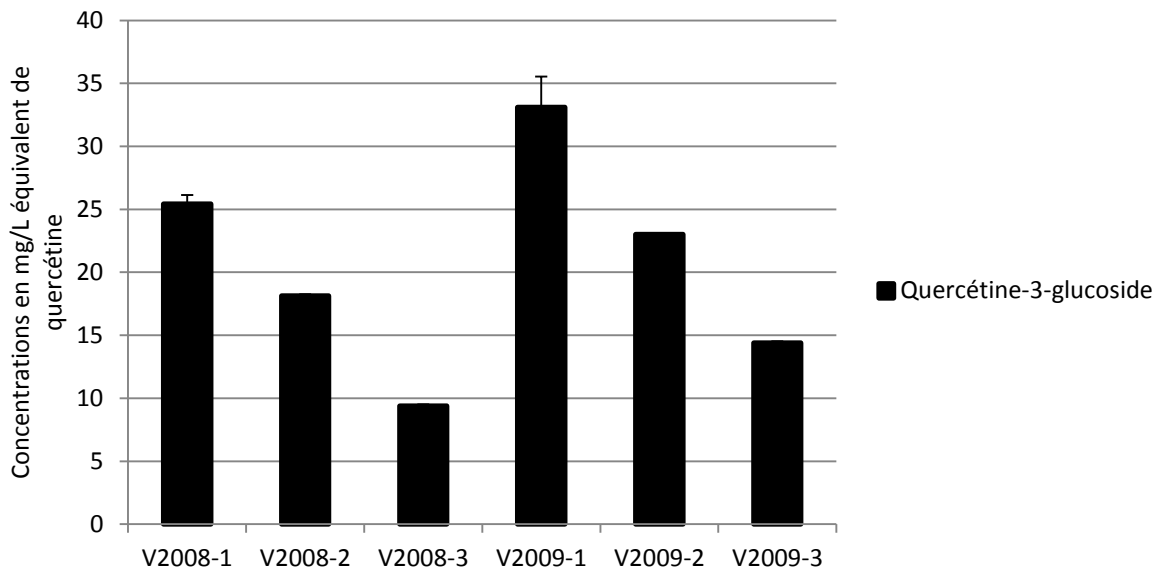


Figure 21 : Concentrations en mg/L équivalent d'acide caféique des acides caftarique, cis-coutarique, trans-coutarique et caféique dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.

Les concentrations en acides caftarique, cis-coutarique et trans-coutarique diminuent avec le temps de macération des différents vins, qu'ils soient issus des vendanges de 2008 ou de 2009. Les taux d'acide caféique diminuent également avec le temps de macération dans les vins de 2009, mais pas dans les vins de 2008 pour lesquels la concentration la plus faible est celle du vin V2008-2.



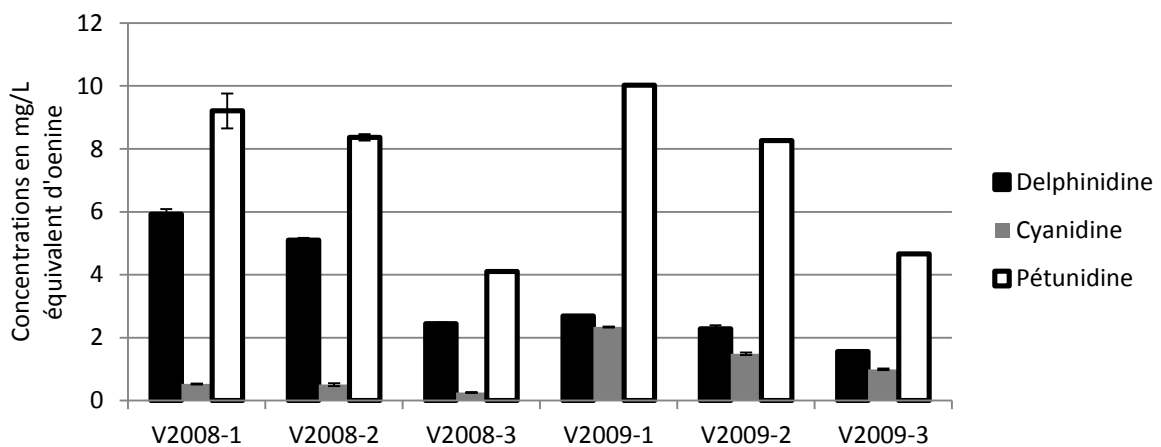
#### f. Quercétine



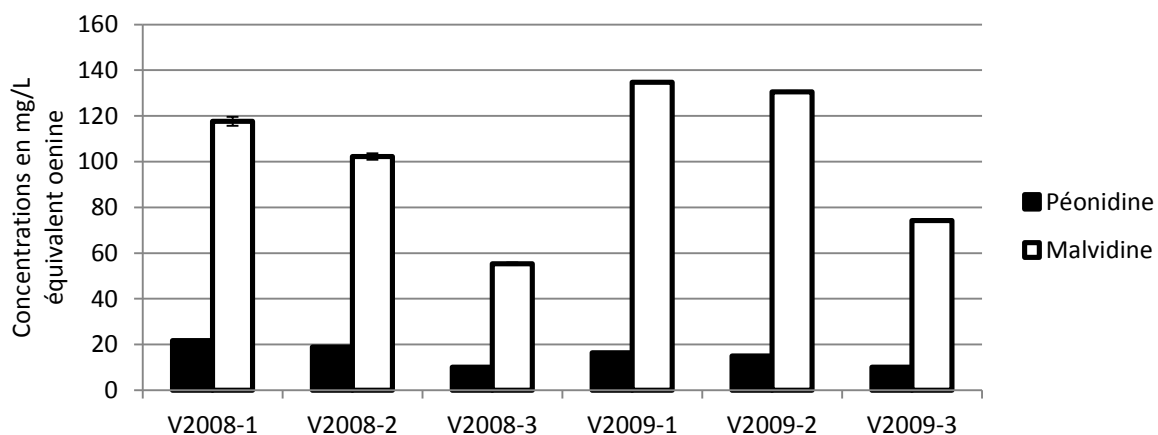
*Figure 22 : Concentrations en mg/L équivalent de quercétine de la quercétine-3-glucoside dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.*

Les concentrations en quercétine aglycone étaient trop faibles pour pouvoir être mesurées avec précision. Seule la quercétine-3-glucoside est retrouvée en concentrations détectables. Les concentrations en quercétine-3-glucoside diminuent avec le temps de macération des différents vins, qu'ils soient issus des vendanges de 2008 ou de 2009. Les taux sont globalement un peu plus importants pour les vins de 2009 à temps de macération équivalents.

#### g. Anthocyanidines



*Figure 23 : Concentrations en mg/L équivalent d'oenine (malvidine-3-glucoside) de la delphinidine, cyanidine et pétunidine dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.*



*Figure 24 : Concentrations en mg/L équivalent d'oenine de la péonidine et malvidine dans les différents vins de 2008 (n=4) et 2009 (n=3) mesurées par HPLC.*

Les concentrations en anthocyanidines (delphinidine, cyanidine, pétunidine, péonidine et malvidine) diminuent avec le temps de macération des vins, qu'ils soient issus des vendanges de 2008 ou de 2009. Les taux de cyanidine, pétunidine et malvidine sont globalement plus importants pour les vins de 2009 à temps de macération équivalents, alors que les taux de delphinidine et péonidine sont plus faibles.

Ces profils révèlent des différences similaires que ce soit dans le vin ou dans le concentré correspondant. On remarque dans tous les vins des concentrations importantes d'acide caftarique et de malvidine. Les quantités de quercétine libre et d'acide *para*-coumarique se sont révélées inférieures au seuil de détection de l'HPLC. Les profils des différents concentrés (données non présentées) ne diffèrent pas beaucoup de ceux des vins correspondant, ne révélant ainsi aucune altération notable de la qualité des composés phénoliques lors des étapes de concentration.

Que ce soit pour les vins de 2008 ou pour ceux de 2009 (ainsi que pour les concentrés de 2008) on observe une évolution des concentrations en fonction du temps de macération. Comparativement aux vins V2008-1 et V2009-1, les vins V2008-3 et V2009-3 respectivement, sont plus riches en acide gallique, catéchine, et épicatechine, alors que tous les autres polyphénols analysés sont moins représentés. De manière relativement régulière, les vins V2008-2 et V2009-2 présentent des concentrations intermédiaires.

**Tableau 8 : Récapitulatif de la composition qualitative et quantitative des différents composés phénoliques analysés dans les vins expérimentaux de Bourgogne de 2008 et 2009.**

Composés phénoliques (mg/L)	Vins de 2008			Vins de 2009		
	V2008-1	V2008-2	V2008-3	V2009-1	V2009-2	V2009-3
Acide gallique	6,77	11,25	21,62	10,57	27,09	57,25
Catéchine	21,06	41,90	100,03	11,87	28,12	88,13
Epicatéchine	0,54	3,59	13,87	11,85	12,38	66,71
Picéide	6,44	3,56	0,58	7,57	3,70	2,20
Resvératrol	3,52	3,68	3,24	4,38	3,26	2,56
Acide caftarique	68,72	60,36	48,67	110,39	65,47	46,68
Acide <i>cis</i> -coutarique	5,58	5,16	4,56	5,97	4,94	3,79
Acide <i>trans</i> -coutarique	26,28	23,40	17,83	33,37	20,09	13,57
Acide caféique	3,17	2,39	2,69	3,81	3,06	2,44
Quercétine-3-glucoside	25,42	18,14	9,39	33,10	23,01	14,40
Delphinidine	5,93	5,10	2,44	2,69	2,29	1,56
Cyanidine	0,53	0,51	0,26	2,34	1,49	1,00
Pétunidine	9,20	8,36	4,11	10,02	8,27	4,66
Péonidine	21,65	18,91	10,02	16,32	15,05	10,08
Malvidine	117,66	102,27	55,31	134,70	130,56	74,15
Total	322,47	308,58	294,63	398,95	348,77	389,18

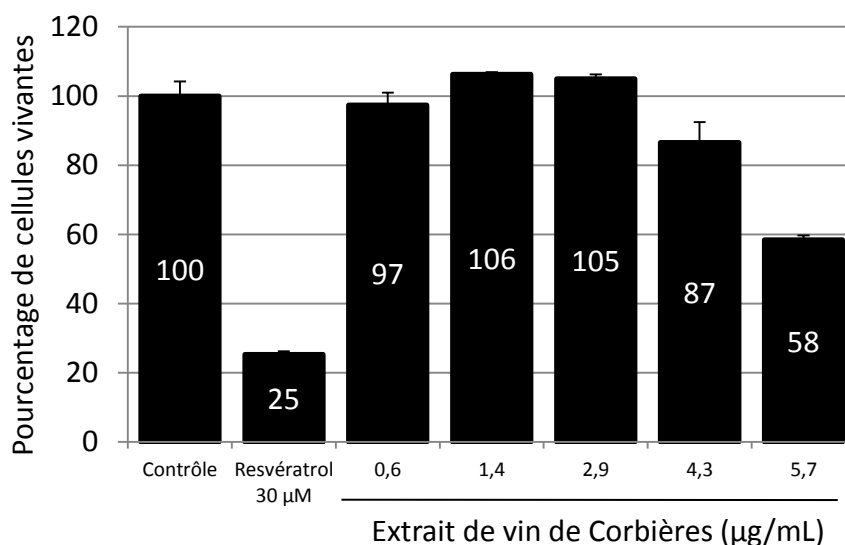
## C. Effets antiprolifératifs

### 1. Effets antiprolifératifs des extraits de vin de Corbières

Une gamme de concentration de l'extrait de vin de Corbières (Figure 25) révèle un effet inhibiteur de la croissance de cellules cancéreuses coliques SW480 à des concentrations supérieures ou égales à 7,5 µg/mL d'extrait de vin en poudre. Ainsi à 7,5 µg/mL (4,3 µg/mL de polyphénols totaux équivalent d'acide gallique) on mesure 13% d'inhibition et à 10 µg/mL (5,7 µg/mL de polyphénols totaux équivalent d'acide gallique), 42% d'inhibition.

A titre indicatif, les concentrations calculées de resvératrol et de catéchine sont respectivement de 18 nM et 295 nM dans une solution à 5,7 µg/mL de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) de cet extrait de vin. Des traitements simultanés par 4,3 µg/mL

(équivalent d'acide gallique) d'extrait de vin et de 1  $\mu\text{M}$  à 15  $\mu\text{M}$  de resvératrol n'ont pas montré d'effets additifs entre l'extrait de vin et le resvératrol (non montrés).

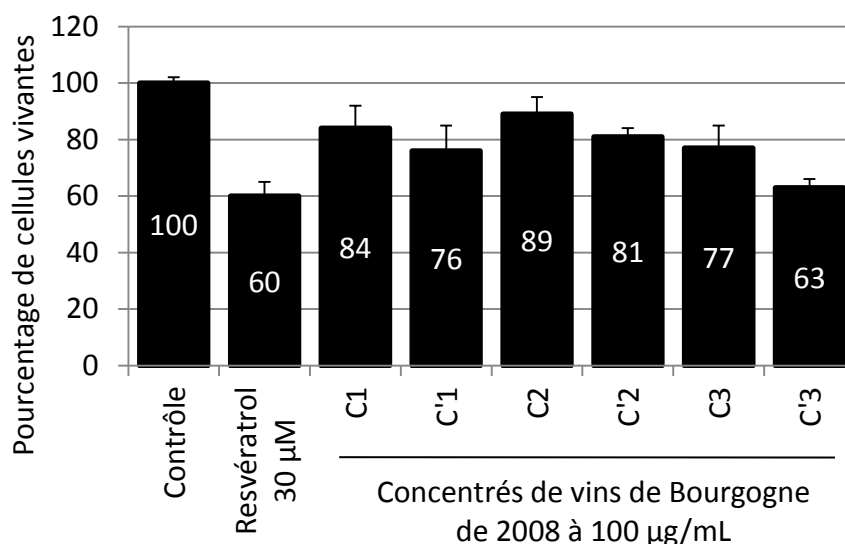


*Figure 25 : Nombre de cellules SW480 après 48 heures de traitement par l'extrait de vin de Corbières, de 0,6 à 5,7  $\mu\text{g/mL}$  de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique). Le resvératrol est utilisé comme contrôle positif à 30  $\mu\text{M}$ . La concentration finale d'éthanol dans tous les traitements est de 0,1%.*

L'efficacité d'inhibition de la prolifération cellulaire mesurée dans ce test sur les cellules SW480 ne peut pas être prise comme référence pour les autres tests, les cellules montrant ici une sensibilité plus importante au resvératrol 30  $\mu\text{M}$  pris comme contrôle positif (l'inhibition est ici de 75% contre 40% dans la figure 25 par exemple). Une telle sensibilité peut être due à une dérive du phénotype cancéreux des cellules. Ce test méritera d'être refait avec des cellules ayant une sensibilité plus en conformité avec le reste des expériences.

## 2. Effets antiprolifératifs des concentrés Cx et C'x des vins de Bourgogne de 2008

Les concentrés, qu'ils soient de Pech Rouge (Cx étape 1) ou de l'ENSBANA (C'x étape 2), permettent tous d'inhiber la prolifération cellulaire. A concentration égale (Figure 26) les variations d'efficacité antiproliférative sont relativement faibles. Le plus efficace est le C'3 (concentré étape 2 du vin V2008-3), c'est celui que nous utiliserons pour la plupart des tests suivants.



*Figure 26 : Pourcentages d'inhibition de la prolifération de cellules SW480 après 48 heures de traitement par les concentrés de vins de Bourgogne de 2008 (Cx pour les concentrés étape 1, C'x pour les concentrés étape 2) à 100 µg/mL de polyphénols totaux équivalent d'acide gallique.*

Les variations d'efficacité antiproliférative entre Cx et C'x semblent systématiquement être meilleures avec les concentrés étape 2. Ceci peut résulter d'un léger biais dans le dosage de polyphénols par la méthode au Folin-Ciocalteu.

### 3. Effets antiprolifératifs des extraits Ex10 et E15g des vins de Bourgogne de 2008 et de 2009

Les solutions mères contiennent : Ex10-2008-1 : 13,69 g/L ; Ex10-2008-2 : 13,73 g/L ; Ex10-2008-3 : 16,20 g/L ; Ex10-2009-1 : 17,79 g/L ; Ex10-2009-2 : 15,93 g/L ; Ex10-2009-3 : 16,27 g/L ; E15g-2008/9-1/2/3 : 15 g/L de polyphénols équivalent d'acide gallique. Les concentrations dans les traitements sont notifiées dans le Tableau 9.

*Tableau 9 : Concentration (g/L) de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) dans les différents traitements appliqués aux cellules SW480 avec les extraits de vins de 2008 et 2009. Les lignes représentent les différentes solutions utilisées, les colonnes les dilutions dans le milieu de culture cellulaire. Les valeurs sont données en grammes de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) par litre de milieu de culture cellulaire.*

g/L	1/800	1/400	1/200
Ex10-2008-1	17,11	34,23	68,45
Ex10-2008-2	17,16	34,33	68,65
Ex10-2008-3	20,25	40,50	81,00
Ex10-2009-1	22,23	44,47	88,93
Ex10-2009-2	19,91	39,82	79,64
Ex10-2009-3	20,34	40,67	81,34
E15g-2008-1	18,75	37,50	75,00
E15g-2008-2	18,75	37,50	75,00
E15g-2008-3	18,75	37,50	75,00
E15g-2009-1	18,75	37,50	75,00
E15g-2009-2	18,75	37,50	75,00
E15g-2009-3	18,75	37,50	75,00

Les tests utilisant des solutions 10 fois plus riches en polyphénols que les vins de départ (Figure 27) révèlent que tous ces extraits sont capables d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses en fonction de la concentration. Il n'y a pas de différence franche entre les différentes solutions. On notera tout de même une tendance à obtenir une inhibition légèrement plus importante avec les solutions issues des vins de 2009 (dont la concentration en polyphénols est globalement plus élevée). Il semblerait en effet qu'il y ait une corrélation entre la quantité globale de polyphénols totaux et l'inhibition de prolifération. La différence d'efficacité entre les solutions Ex10-2008-1 et Ex10-2008-2 montre en revanche que si corrélation il y a, elle n'est pas directe et que la quantité seule des polyphénols n'est pas une explication suffisante pour expliquer les inhibitions de prolifération cellulaire.

Les tests utilisant des solutions à 15 g/L de polyphénols (Figure 28) ne révèlent aucune différence significative dans le pouvoir antiprolifératif des différentes solutions, si ce n'est une efficacité d'inhibition de prolifération plus faible avec la solution E15g-2009-1 à faible concentration, cette différence n'étant plus observée à forte concentration.

a. Effets antiprolifératifs des extraits de vins Ex10

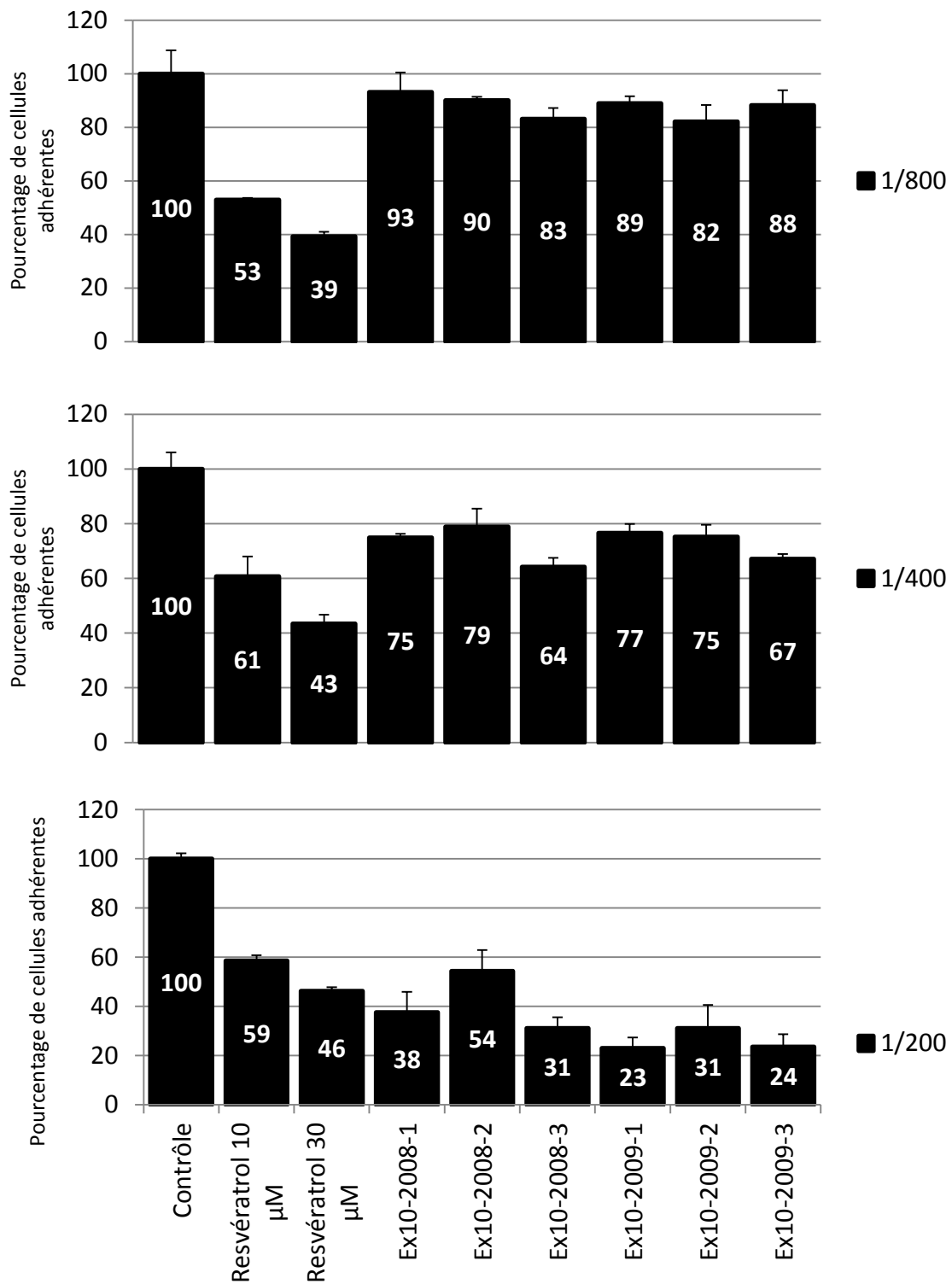
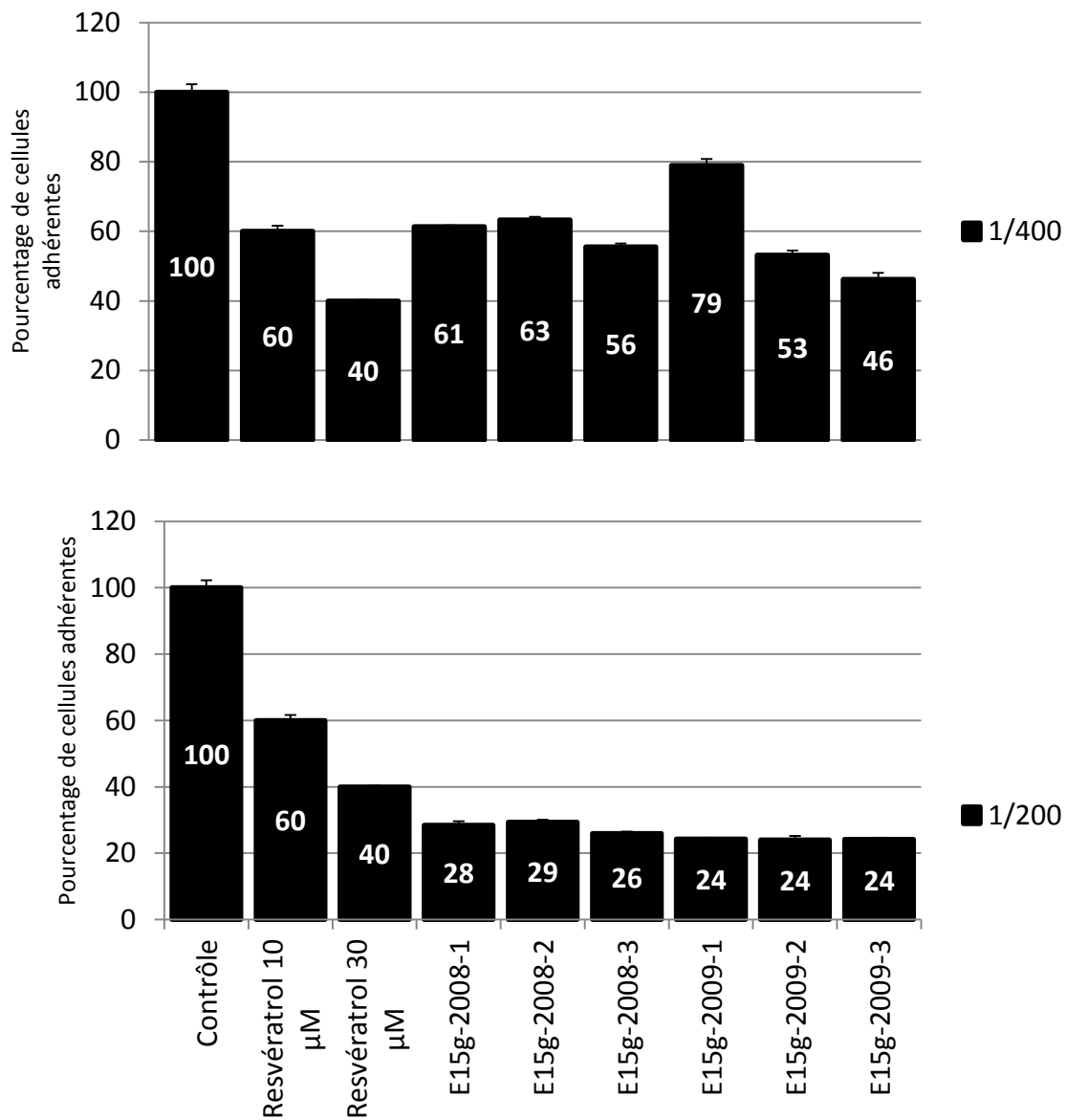


Figure 27 : Pourcentages de cellules SW480 adhérentes évalués par coloration au cristal violet après 48 heures de traitement par les extraits de vins de 2008 et 2009 contenant 10 fois plus de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) que les vins originaux (les valeurs sont notifiées dans le Tableau 9). (n=3).

**b. Effets antiprolifératifs des extraits de vins E15g**



*Figure 28 : Pourcentages de cellules SW480 adhérentes évalués par coloration au cristal violet après 48 heures de traitement par les extraits de vins de 2008 et 2009 contenant 15 g/L de polyphénols totaux (équivalent d'acide gallique) (les concentrations finales utilisées pour les traitements sont notifiées dans le Tableau 9). (n=3).*



**c. Analyse semi-quantitative des effets antiprolifératifs des différents extraits de vin de Bourgogne**

A l'aide des résultats des tests de prolifération cellulaires sur cellules coliques SW480 avec les extraits de vins Ex10 et E15g pour les vins expérimentaux de Bourgogne de 2008 et 2009, nous avons tracés des courbes de pourcentages de cellules adhérentes en fonction de la concentration en polyphénols des milieux de traitements. De là nous avons calculé des IC<sub>50</sub> approximatifs (Tableau 10).

**Tableau 10 : IC<sub>50</sub> approchés des différents extraits de vins expérimentaux de Bourgogne de 2008 et 2009, calculés à partir des tests de prolifération cellulaire sur les cellules coliques SW480 avec les solutions à concentration identique en polyphénols (E15g) ou à volume égal de vin (Ex10).**

Vin	Millésime					
	2008			2009		
	IC <sub>50</sub> approché (µg/mL)*		IC <sub>50</sub> moyen (µg/mL)*	IC <sub>50</sub> approché (µg/mL)*		IC <sub>50</sub> moyen (µg/mL)*
	E15g	Ex10		E15g	Ex10	
Extrait de vin 1	50	à 57	<b>53,5</b>	60	à 70	<b>65</b>
Extrait de vin 2	52	à 72	<b>62</b>	44	à 66	<b>55</b>
Extrait de vin 3	45	à 56	<b>50,5</b>	38	à 56	<b>47</b>

\* équivalent d'acide gallique

On observe une tendance générale à la diminution des IC<sub>50</sub> en fonction du temps de macération, suggérant une variabilité du potentiel antiprolifératif des polyphénols des vins en fonction non pas de leur teneur globale en polyphénols, mais de leur composition qualitative. Pour les extraits de vins de 2008, on peut noter une similarité avec les concentrés de ces mêmes vins qui présentaient des schémas d'efficacité comparables. En effet l'extrait 2 de 2008 est le moins efficace alors que le 3 est le plus antiprolifératif. On retrouvait des résultats similaires avec les concentrés C2 et C3 (ou C'2 et C'3). En ce qui concerne les vins de 2009, l'augmentation du pouvoir antiprolifératif semble bien corrélée au temps de macération. Ainsi l'extrait du vin V2009-3 est celui qui présente l'IC<sub>50</sub> le plus faible.

## D. Recherche de synergies des polyphénols du vin avec le resvératrol sur la prolifération cellulaire et le transport du resvératrol

### 1. Effets antiprolifératifs du vin enrichi en resvératrol

Afin de rechercher de possibles effets synergiques ou cumulatifs, il convenait d'utiliser des doses de resvératrol à la limite de l'effet antiprolifératif et donc inférieures à 30  $\mu\text{M}$ . Sur les cellules d'origine colorectale SW480, nous avons testé les effets de différentes doses de resvératrol et combiné la plus faible dose efficace à un traitement avec le concentré de vin C'3 (Figure 29). A 10  $\mu\text{M}$  le resvératrol est capable d'inhiber de 19% (A) la prolifération des cellules cancéreuses. Le concentré de vin C'3 seul à 100 mg/L inhibe la prolifération de 41% (B). La combinaison des deux montre une inhibition de 54% (C). La combinaison est donc plus efficace que les traitements seuls, mais pas de manière synergique, l'inhibition due à la combinaison étant inférieure à la somme virtuelle des inhibitions du resvératrol ou du concentré seuls.

Sur les cellules HepG2, issues d'hépatoblastome, le resvératrol à 30  $\mu\text{M}$  présente une inhibition de prolifération cellulaire plus faible que sur les SW480 (18% pour les HepG2 contre 41% pour les SW480) et ne présente même aucun effet antiprolifératif à 10  $\mu\text{M}$  (A) (Figure 30). Le concentré C'3 inhibe la prolifération des cellules HepG2 de 40% (B). La combinaison des deux (resvératrol 10  $\mu\text{M}$  et C'3 100 mg/L : C), là encore, ne montre pas d'effet synergique.

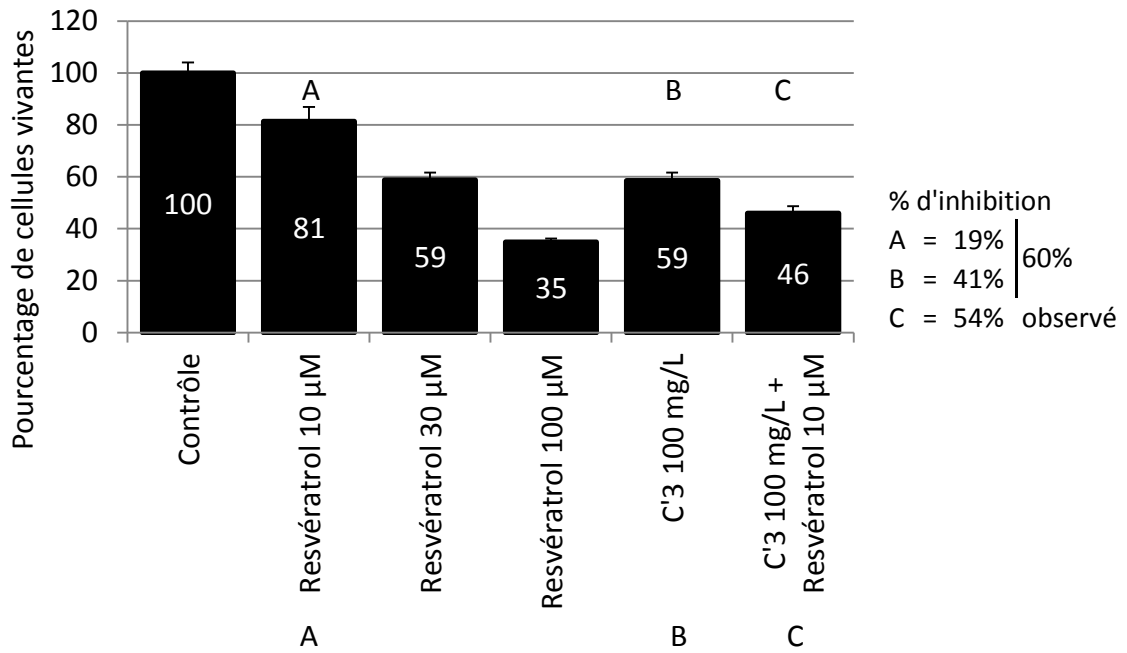


Figure 29 : Effets antiprolifératifs du resvératrol (10, 30 et 100 µM), du concentré de vin C'3 (100 mg/L équivalent d'acide gallique) et de leur combinaison (10 µM de resvératrol + 100 mg/L de C'3) sur les cellules de cancer colorectal SW480, mesurés par coloration des cellules adhérentes au cristal violet après 48 heures de traitement. (n=4).

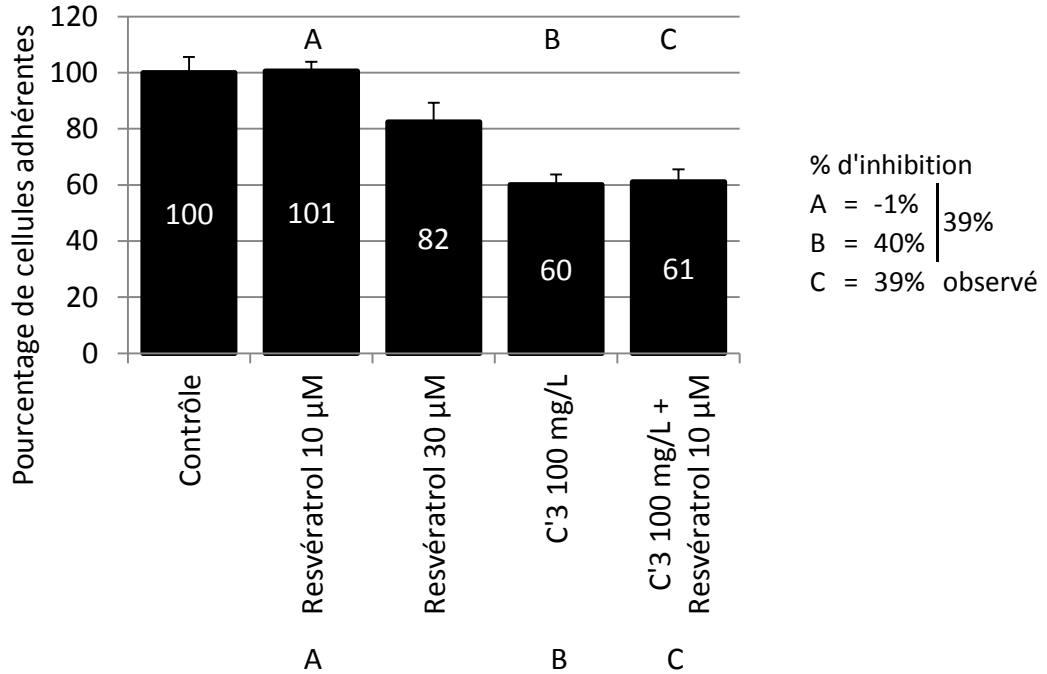


Figure 30 : Effets antiprolifératifs du resvératrol (10 et 30 µM), du concentré de vin C'3 (100 mg/L équivalent d'acide gallique) et de leur combinaison (10 µM de resvératrol + 100 mg/L de C'3) sur les cellules tumorales hépatiques HepG2, mesurés par coloration des cellules adhérentes au cristal violet après 48 heures de traitement. (n=4).

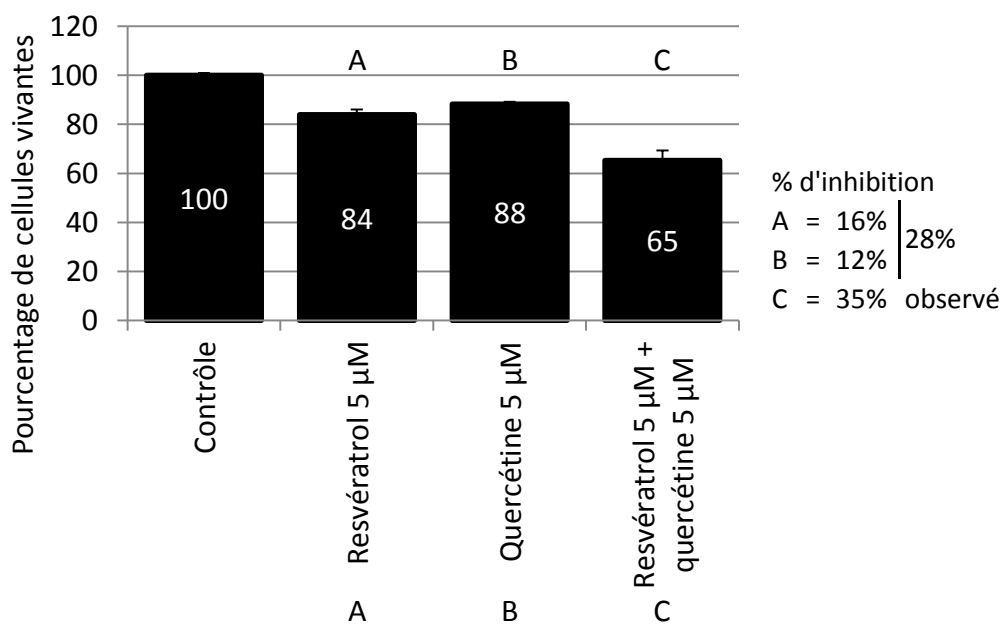
Pourcentages d'inhibition de combinaisons (C) resvératrol (A) et C'3 (B) :

- Pour les SW480 (Figure 29) : A= 19 % ; B= 41 % ; A+B= 60 %  $\leadsto$  C= 54 % ; il y a donc une additivité partielle des effets antiprolifératifs du resvératrol 10  $\mu$ M et du concentré C'3 à 100 mg/L.
- Pour les HepG2 (Figure 30) : A= -1 % ; B= 40 % ; A+B= 39 % = C= 39 % ; aucun effet synergique ne peut être observé.

## 2. Effets antiprolifératifs de traitements binaires / ternaires de polyphénols

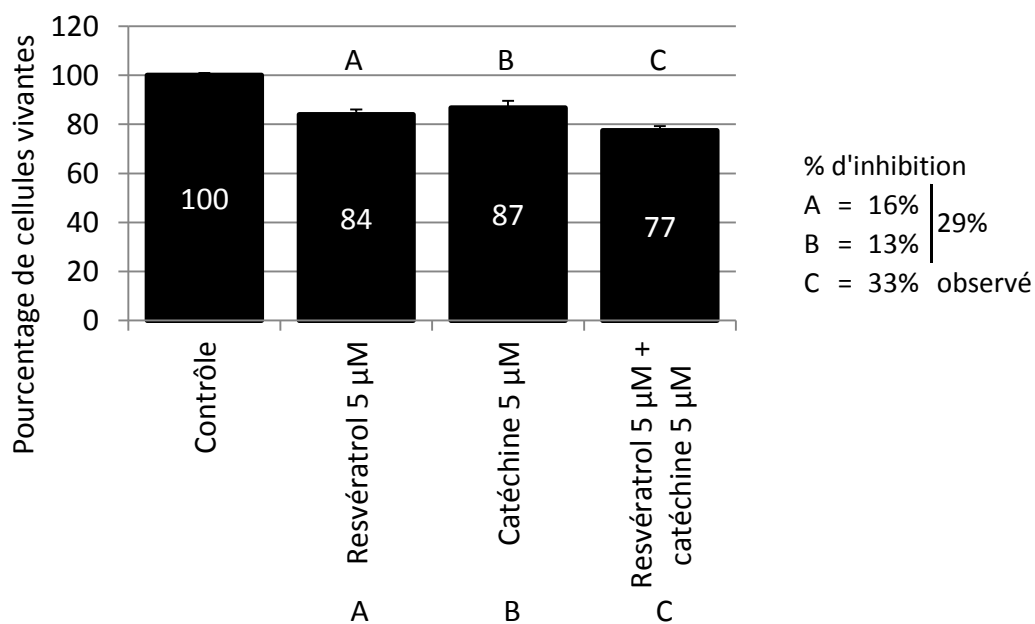
Il a été montré dans la littérature (Schlachterman et coll., 2008) que des co-traitements par le resvératrol, la quercétine et la catéchine peuvent avoir des effets plus qu'additifs sur certains modèles. Ces trois polyphénols étant présents dans le vin rouge, nous avons testé différentes combinaisons binaires et ternaires avec ces molécules. Nous avons délibérément choisi des concentrations faibles pour ces traitements, les faibles concentrations se prêtant plus à des effets synergiques, et se rapprochant plus des concentrations qu'il est possible d'atteindre chez l'homme.

La combinaison de resvératrol et de quercétine à 5  $\mu$ M chacun sur les cellules SW480 (Figure 31) est celle qui présente les effets les plus intéressants. La prolifération cellulaire est inhibée de 16% (A) par un traitement avec 5  $\mu$ M de resvératrol, par 12% (B) pour 5  $\mu$ M de quercétine, et par 35% (C) pour la combinaison des deux. La combinaison présente donc un effet antiprolifératif légèrement supérieur à ce que l'on pourrait attendre d'un simple effet additif (qui serait de 28% théoriquement). Ceci suggère qu'à faibles concentration, on peut observer un effet additif entre le resvératrol et la quercétine dans notre modèle de cellules tumorales colorectales.



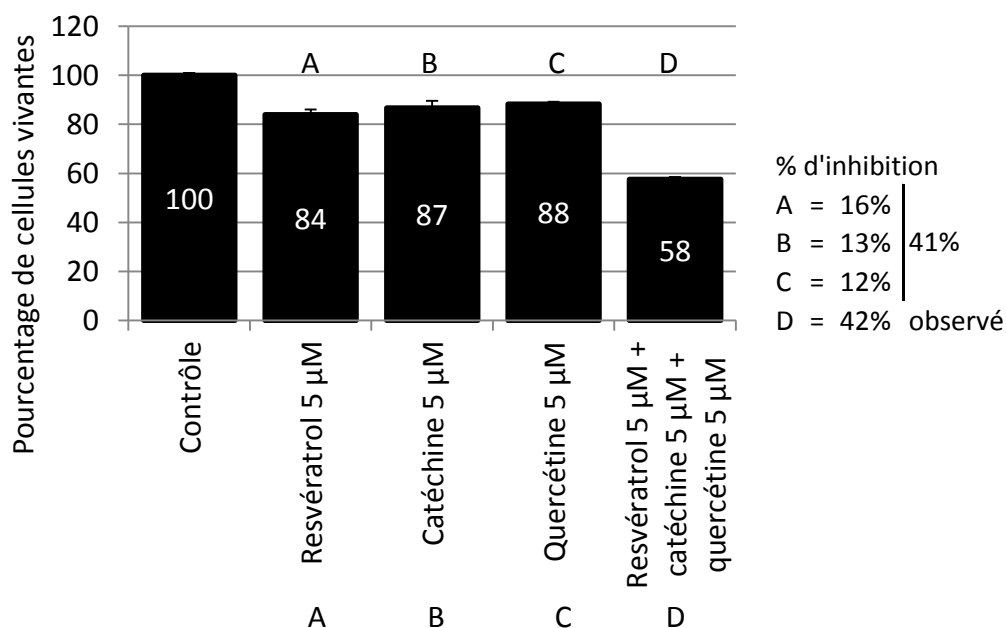
**Figure 31 : Effets antiprolifératifs du resvératrol (5  $\mu$ M) et de la quercétine (5  $\mu$ M) seuls ou en combinaison pendant 48 heures contre les cellules de cancer colorectal SW480, mesurés par comptage manuel sur cellule de Mallassez avec exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan. (n=3).**

En ce qui concerne la combinaison de resvératrol et de catéchine à 5  $\mu$ M chacun sur les cellules SW480 (Figure 32), la prolifération cellulaire est inhibée de 16% par un traitement avec 5  $\mu$ M de resvératrol, par 13% pour 5  $\mu$ M de catéchine, et par 23% pour la combinaison des deux. La combinaison présente donc un effet antiprolifératif plus important que chacun séparément, mais inférieur à ce que l'on pourrait attendre d'un effet additif complet.

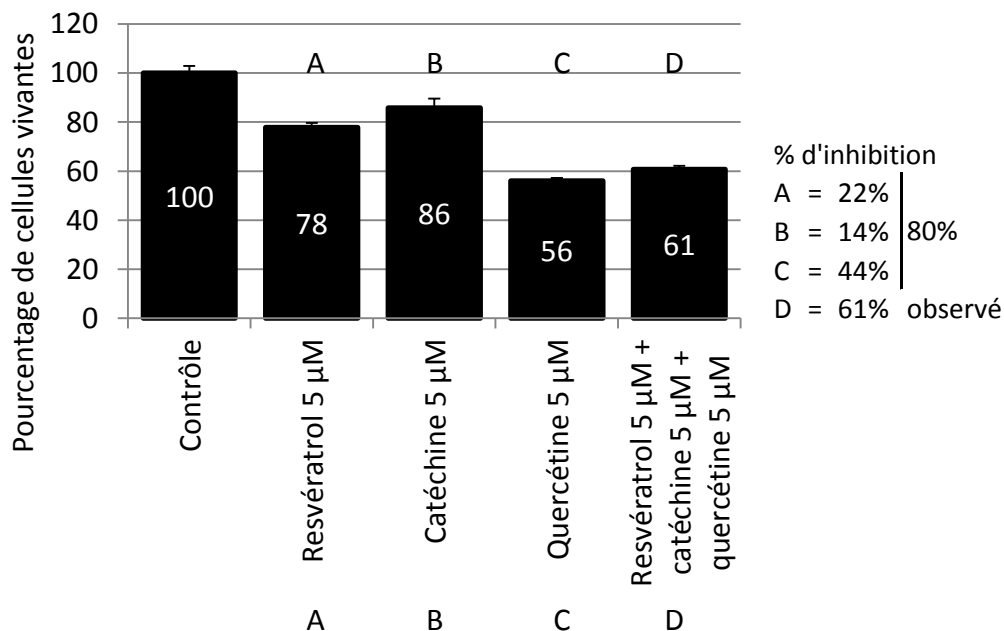


**Figure 32 : Effets antiprolifératifs du resvératrol (5  $\mu$ M) et de la catéchine (5  $\mu$ M) seuls ou en combinaison pendant 48 heures contre les cellules de cancer colorectal SW480, mesurés par comptage manuel sur cellule de Mallassez avec exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan. (n=3).**

La combinaison de ces trois molécules à 5  $\mu$ M chacune sur les cellules SW480 (Figure 33) inhibe la prolifération de 42%, ce qui est plus que ce que l'inhibition due à des traitements simples ou binaires. En revanche, sur un autre modèle cellulaire (HCT116) également issu d'un adénocarcinome colorectal (Figure 34), les effets sont différents. Le traitement le plus efficace contre la prolifération des cellules HCT116 s'avère être la quercétine seule avec 44% contre 39% pour la combinaison des trois molécules. Dans ce modèle, le resvératrol et la catéchine semblent plutôt protéger les cellules des effets de la quercétine. Le mécanisme d'action de ces combinaisons s'avère donc plus complexe que de simples effets additifs avec une très forte variabilité entre les modèles cellulaires.



**Figure 33 :** Effets antiprolifératifs du resvératrol (5  $\mu$ M), de la catéchine (5  $\mu$ M) et de la quercétine (5  $\mu$ M) seuls ou en combinaison pendant 48 heures contre les cellules SW480, mesurés par comptage manuel sur cellule de Mallassez avec exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan. (n=3).



**Figure 34 :** Effets antiprolifératifs du resvératrol (5  $\mu$ M), de la catéchine (5  $\mu$ M) et de la quercétine (5  $\mu$ M) seuls ou en combinaison pendant 48 heures contre les cellules de cancer colorectal HCT116, mesurés par comptage manuel sur cellule de Mallassez avec exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan. (n=3).

### **3. Inhibition du cycle cellulaire**

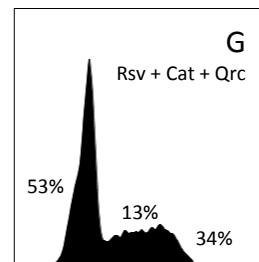
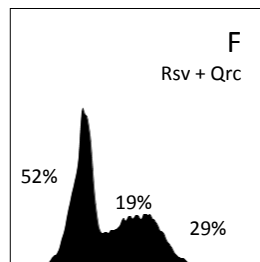
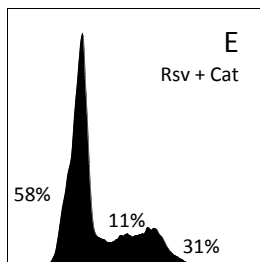
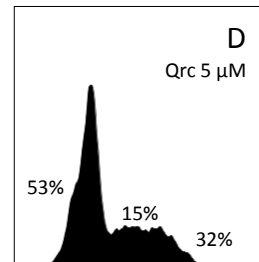
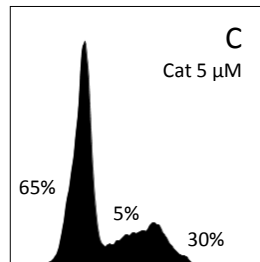
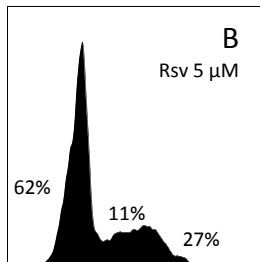
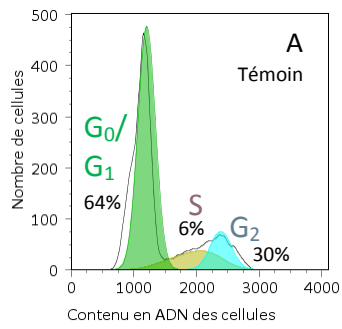
L'inhibition de prolifération cellulaire peut être due à plusieurs phénomènes intracellulaires, parmi lesquels le blocage du cycle cellulaire ou l'apoptose (mort cellulaire programmée). Nous avons donc exploré ces deux voies sur les cellules SW480. Nous observons que la combinaison de quercétine et de resvératrol entraîne un effet additif sur le blocage du cycle cellulaire en phase S (Figure 35F), ce qui n'est pas le cas de la combinaison de resvératrol et de catéchine (Figure 35E). La combinaison des trois polyphénols (resvératrol, quercétine et catéchine) présente également un effet additif sur le blocage du cycle mais de manière moins prononcée. Les cellules traitées par les extraits de vin de Corbières (données non rapportées) présentent un profil comparable à celui des cellules contrôles.

### **4. Effets de traitements binaires sur la mort cellulaire**

Les comptages de viabilité cellulaire ne révèlent pas de nécrose induite par chacun des traitements (données non rapportées).

En ce qui concerne la mort par apoptose (Figure 36 et Figure 37) sur les cellules SW620 (cellules généralement plus sensibles à l'apoptose que les SW480), le resvératrol seul, aussi bien que sa combinaison avec la quercétine, n'ont pas révélé d'apoptose importantes aux concentrations de 5  $\mu$ M. Une légère tendance à stimuler l'apoptose se dégage du traitement par la combinaison de resvératrol et de quercétine mais dans des proportions toujours très faibles. On ne peut pas conclure à un effet proapoptotique de ces différents traitements à ces concentrations.





**Figure 35 :** Cycle cellulaire analysé par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium de cellules SW480 traitées pendant 48 heures par 5 μM de resvératrol (Res, B), 5 μM de catéchine (Cat, C), 5 μM de quercétine (Qrc, D), ou 5 μM de chacun de ces trois polyphénols par paires (resvératrol et catéchine : E, resvératrol et quercétine : F) ou les trois simultanément (G), comparativement au témoin (A).

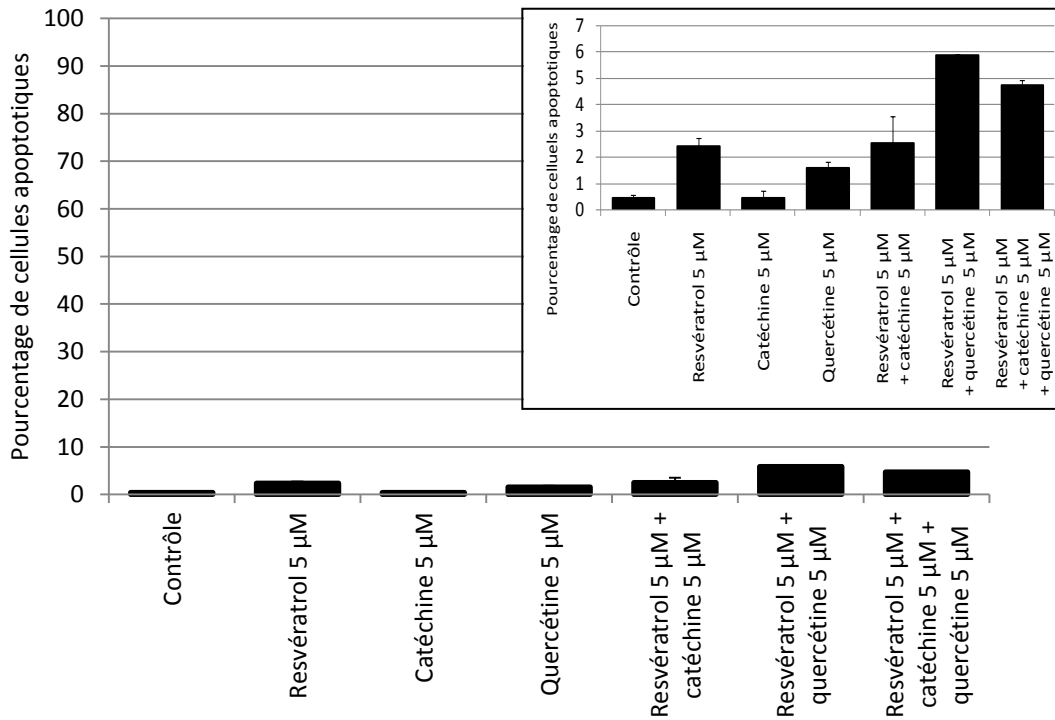


Figure 36 : Pourcentage de cellules de cancer colorectal SW620 présentant un phénotype apoptotique après 48 heures de traitement par le resvératrol (5  $\mu$ M), la catéchine (5  $\mu$ M) et la quercétine (5  $\mu$ M) seuls ou en combinaisons binaires ou ternaires. (n=3).

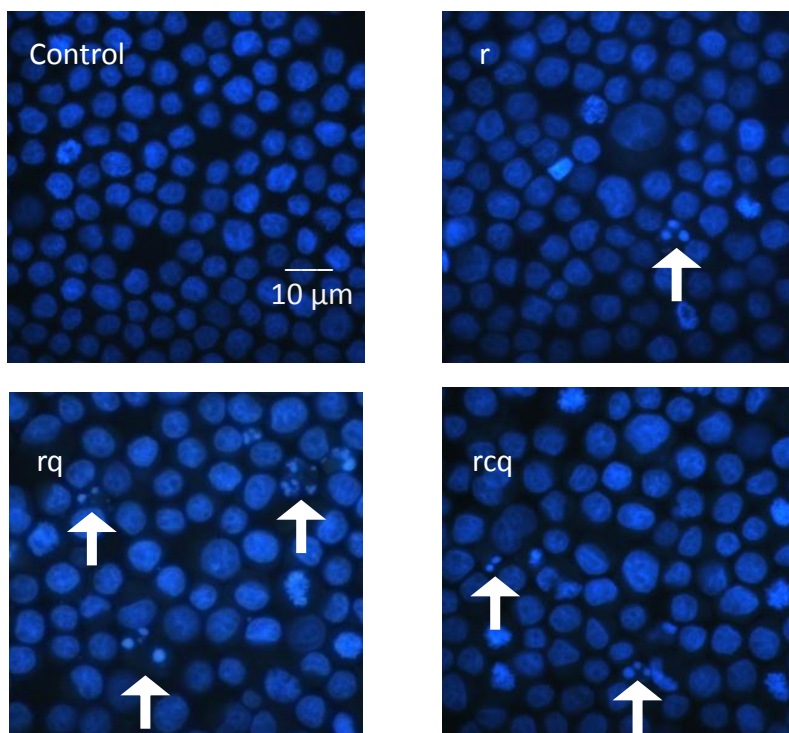
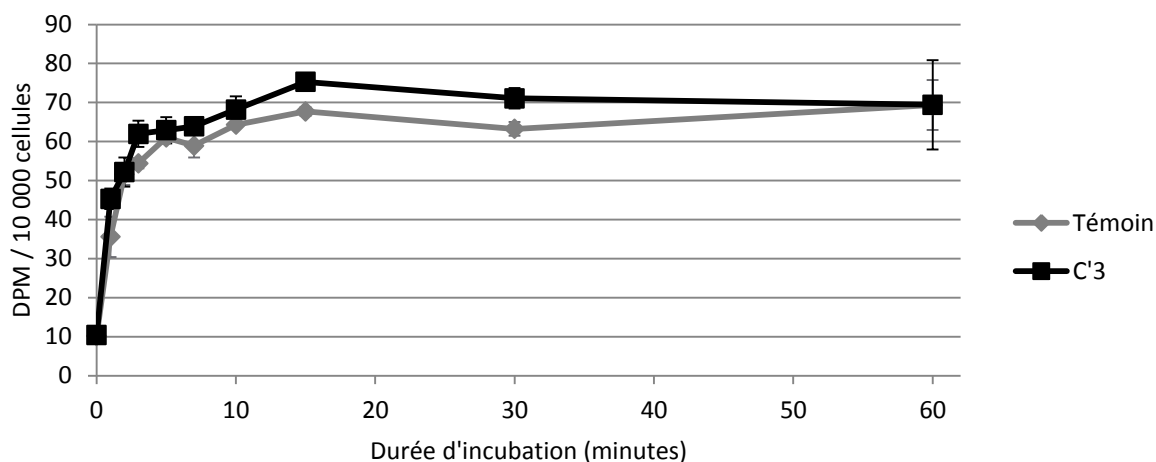


Figure 37 : Photographies microscopiques des noyaux de cellules SW620 colorées au Hoechst 33342 après 48 heures de traitement par le resvératrol (r) ou les

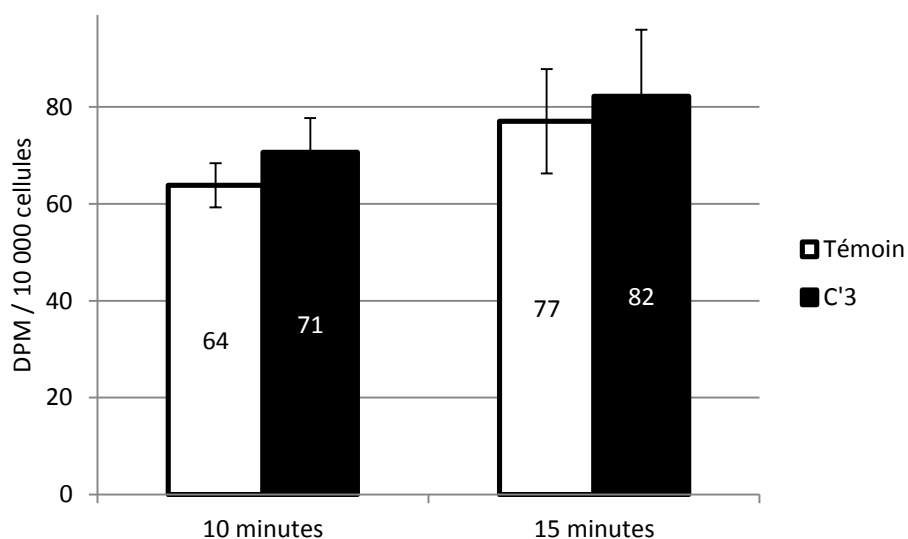
*combinaisons resvératrol + quercétine (rq) ou resvératrol +catéchine + quercétine.  
Les noyaux présentant des phénotypes apoptotiques sont indiqués par des flèches.*

## 5. Transports du resvératrol en présence de concentré de vin

Une technique permettant de suivre l'incorporation de resvératrol tritié a été mise au point dans notre laboratoire. Concernant la captation du resvératrol par les cellules, plusieurs mécanismes ont pu être mis en évidence (Lancon et coll., 2004). Ainsi, le resvératrol est capté par les cellules selon une diffusion passive mais également une voie impliquant des transporteurs, en particulier permettant une endocytose au niveau des radeaux lipidiques membranaires (Colin et coll., 2011). Dans un premier temps, nous avons donc étudié l'influx de resvératrol dans les cellules SW480. Les effets sur le nombre de cellules du concentré de vin étant importants à 48 heures, la durée de traitement a été limitée à 6 heures pour tous les tests, cette durée étant suffisante pour induire des modulations des mécanismes de transports. Les mesures concernent le resvératrol incorporé dans les cellules. Ces mêmes cellules ayant également des mécanismes d'efflux du resvératrol (et de ses métabolites), on ne mesure pas de manière absolue uniquement l'influx mais une quantité incorporée. En l'absence d'inhibiteurs efficaces d'efflux, c'est néanmoins le meilleur indicateur de l'activité d'incorporation du resvératrol. Ces tests d'incorporation (Figure 38) ont montré une légère tendance à améliorer l'influx après un traitement par le concentré de vin, mais cette tendance ne s'est pas révélée significative même en augmentant le nombre de mesures effectuées au temps correspondants aux maximums d'incorporation (Figure 39).



**Figure 38 :** Incorporation de [<sup>3</sup>H]-resvératrol en fonction du temps dans les cellules SW480 traitées 6 heures par 100 mg/L de concentré de vin C'3 ou par une quantité d'éthanol équivalente (témoin). (n=3).

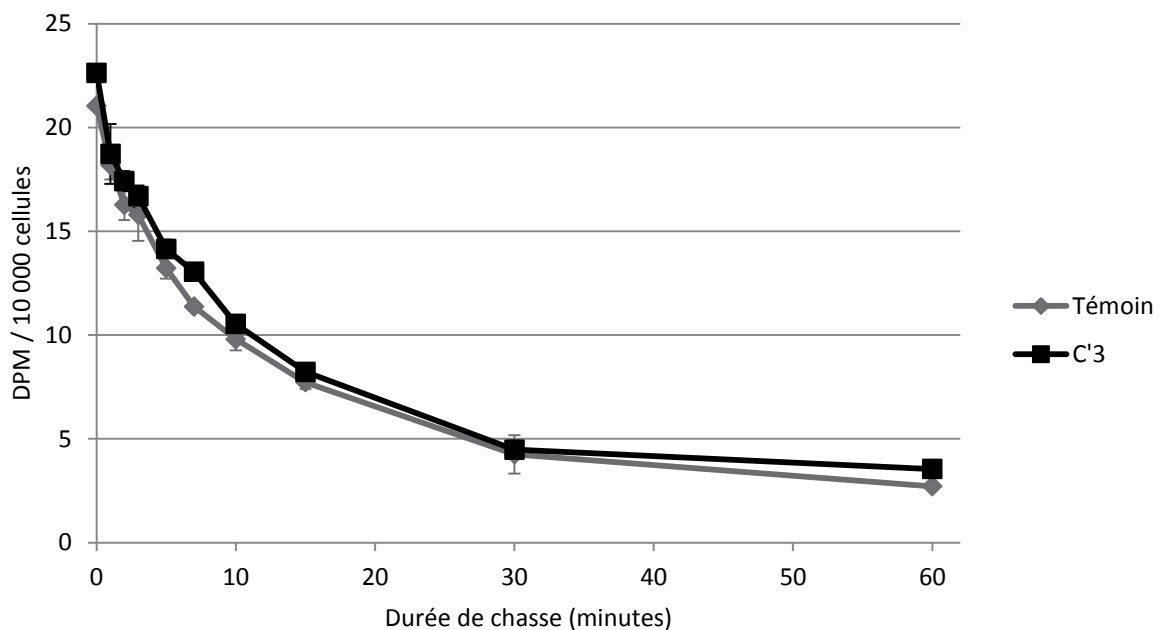


**Figure 39 :** Incorporation de [<sup>3</sup>H]-resvératrol pendant 10 et 15 minutes dans les cellules SW480 traitées 6 heures par 100 mg/L de concentré de vin C'3 ou par une quantité d'éthanol équivalente (témoin). (n=6).

Dans un deuxième temps nous avons étudié l'efflux de resvératrol. Un ralentissement de l'efflux de resvératrol pourrait lui permettre d'agir plus longtemps au sein de chaque cellule et ainsi amplifier son effet antiprolifératif. Des travaux antérieurs du laboratoire nous ont permis de révéler l'implication de transporteurs de type ABC dans l'efflux du resvératrol et de ses métabolites (Lancon et coll., 2007). Ces transporteurs pourraient être modulés par

l'action d'autres polyphénols. Afin d'étudier les cinétiques d'efflux, nous avons donc pré-incubé les cellules avec du [<sup>3</sup>H]-resvératrol pendant 10 minutes (temps pour lequel le taux de resvératrol dans la cellule est proche de son maximum) avant de remplacer le milieu de culture cellulaire par un milieu dépourvu de resvératrol. Là encore cette méthode n'est pas capable de mesurer uniquement l'efflux du resvératrol mais le taux de resvératrol présent dans les cellules. En effet le resvératrol expulsé des cellules se retrouve dans le milieu de culture et est donc potentiellement réincorporé dans les cellules, les mécanismes d'incorporation n'étant pas inhibés. Néanmoins ce biais reste minime pour les temps courts, la concentration dans le milieu étant encore relativement faible.

L'efflux du [<sup>3</sup>H]-resvératrol ne semble pas non plus être influencé par un traitement par le concentré de vin (Figure 40), les deux courbes étant presque superposées.



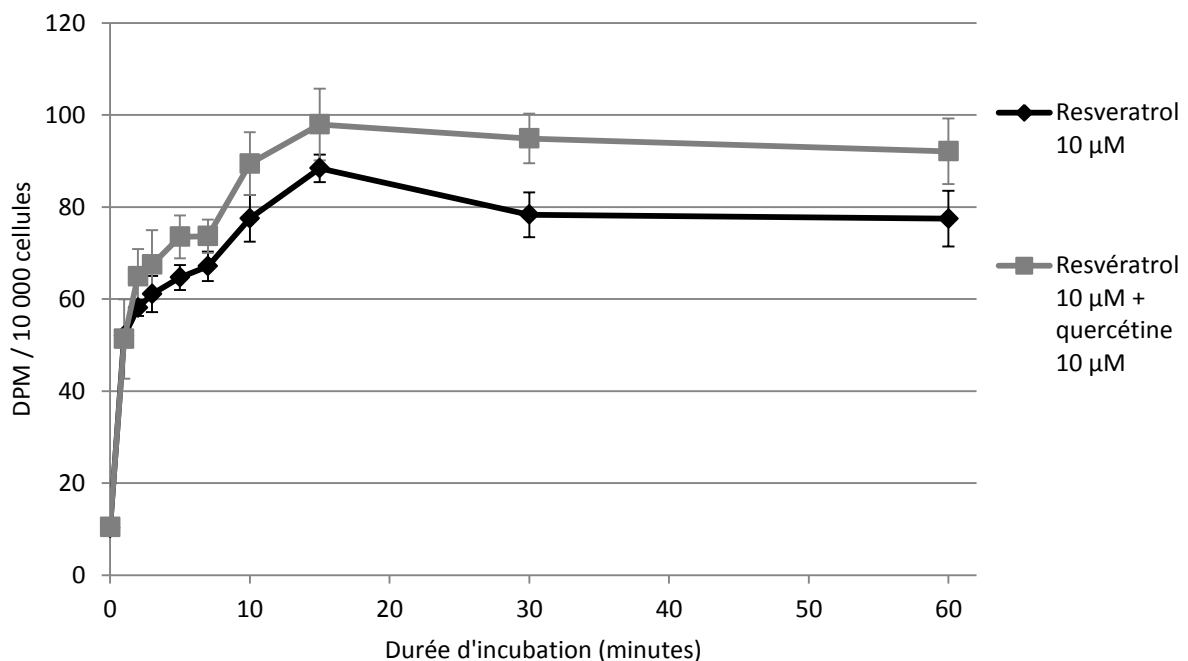
*Figure 40 : Efflux de [<sup>3</sup>H]-resvératrol en fonction du temps dans les cellules SW480 traitées 6 heures par 100 mg/L de concentré de vin C'3 ou par une quantité d'éthanol équivalente (témoin) après une incubation de 10 minutes avec une solution de [<sup>3</sup>H]-resvératrol. (n=3).*

## 6. Transports du resvératrol en présence d'autres polyphénols

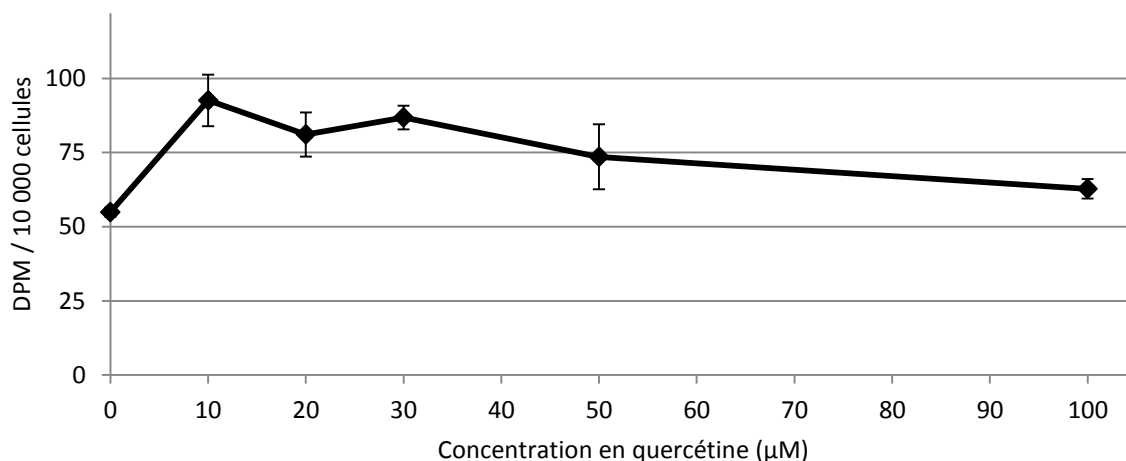
Des tests préalablement réalisés au laboratoire (par Allan Lançon, travaux non publiés) avaient suggéré une capacité de la quercétine à moduler les mécanismes de transport du

resvératrol dans les cellules. Nos résultats d'incorporation ayant suggéré une possible amélioration de l'influx par les polyphénols du vin, nous avons exploré l'effet de la quercétine sur l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-resvératrol dans les cellules SW480. Les premiers tests d'incorporation de resvératrol en présence de quercétine (données non présentées) montraient une diminution du contenu en [<sup>3</sup>H]-resvératrol dans les cellules SW480 avec des concentrations en quercétine de 30 et 50 μM, mais pas à des concentrations plus faibles, ceci suggérant une inhibition compétitive de l'influx. Un prétraitement de 48 heures par la quercétine en revanche semblait pouvoir augmenter légèrement cette incorporation. Nous avons donc poussé plus avant ces tests.

Une mesure d'incorporation en fonction du temps, avec une faible concentration en quercétine (Figure 41) suggère une amélioration de l'influx relativement modeste. Les tests faisant varier la concentration en quercétine (Figure 42) permettent de montrer que cet effet est maximal avec 10 μM de quercétine. Néanmoins lorsque cette concentration augmente, cet effet apparaît moins évident sur des temps courts (10 minutes) suggérant une inhibition compétitive.

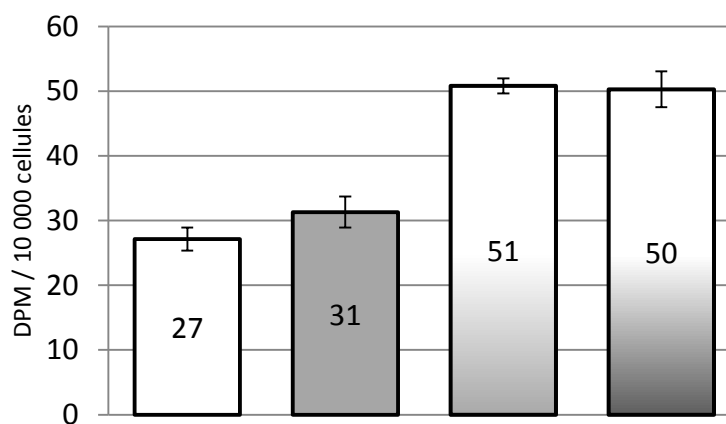


**Figure 41 : Incorporation de [<sup>3</sup>H]-resvératrol (10 μM) en fonction du temps dans les cellules SW480 en présence ou non de quercétine (10 μM). (n=3).**



**Figure 42 : Incorporation de [<sup>3</sup>H]-resvératrol (10 μM) en fonction de la concentration en quercétine dans les cellules SW480. (n=3).**

Afin de vérifier la première observation suggérant un effet favorable d'un prétraitement en quercétine sur l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-resvératrol, nous avons effectué une autre série de tests avec des concentrations de 10 et 50 μM de quercétine pendant 20 heures avant l'incubation de 10 minutes avec le [<sup>3</sup>H]-resvératrol (Figure 43). L'incorporation dans ce test est quasiment doublée avec le prétraitement par la quercétine, que ce soit à 10 μM ou à 50 μM.



Prétraitement 20 heures	Quercétine	0	0	10 μM	50 μM
	Resvératrol	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM
Incubation 10 minutes	Quercétine	0	10 μM	0	0

*Figure 43 : Incorporation de [<sup>3</sup>H]-resvératrol (10 μM) pendant 10 minutes dans les cellules SW480 en présence de quercétine (10 μM) (colonne 2) ou seul après un traitement de 20 heures par 10 μM ou 50 μM de quercétine (colonnes 3 et 4). (n=3).*

## **7. Métabolisme de détoxification du resvératrol en présence de concentré de vin de Bourgogne**

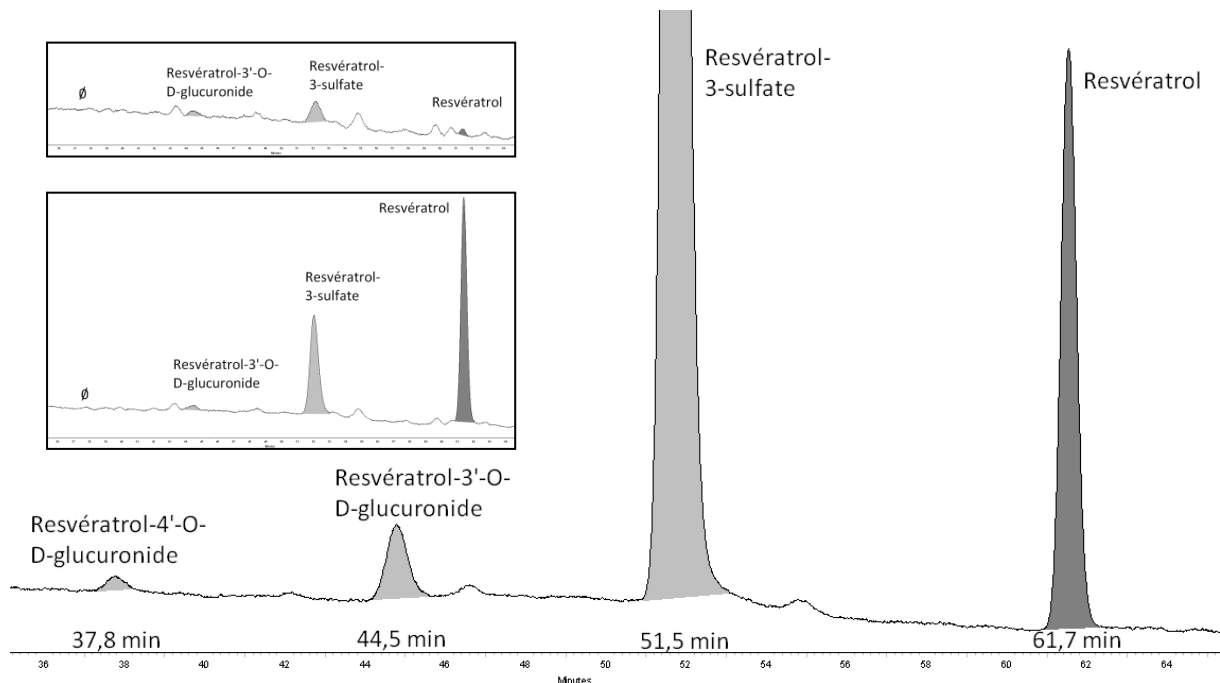
Des travaux précédents effectués dans notre laboratoire ont permis de montrer que le resvératrol est métabolisé par les cellules d'hépatocarcinome HepG2 (Lancon et coll., 2007), ces mécanismes enzymatiques pouvant eux-mêmes être modulés par le resvératrol. Le resvératrol est donc métabolisé par les tissus, ce qui pourrait contribuer à limiter son activité, les métabolites étant plus facilement éliminés. Nous avons donc entrepris d'étudier la capacité des cellules à métaboliser le resvératrol en présence d'autres polyphénols de vin. Pour ce faire, des cellules SW480 et HepG2 ont été traitées pendant 48 heures par du resvératrol, du concentré de vin C'3, ou les deux. Nous avons ensuite recherché la présence de métabolites du resvératrol dans le milieu de culture cellulaire.

### **a. Méthodologie de détection**

Les métabolites que nous avons recherchés sont les formes monoglucuronides (resvératrol-4'-O-D-glucuronide, resvératrol-3'-O-D-glucuronide) et monosulfates (resvératrol-3-sulfate) du resvératrol, ces formes étant les plus couramment rencontrées d'après la littérature. Des standards de ces métabolites ont été injectés, avec le même protocole HPLC, afin de déterminer leurs temps de rétention ainsi que leurs spectres d'absorbances spécifiques permettant une identification plus discriminante que le temps de rétention seul. Tous les milieux de traitements, RPMI ou DMEM, enrichis en différents composés (resvératrol 10 μM, 30 μM, C'3 100 mg/L équivalent d'acide gallique), ont également été analysés par HPLC avant d'être mis au contact de cellules afin de vérifier qu'aucun métabolite (ou autre molécule pouvant être identifiée comme métabolite) ne s'y trouve. Les mesures ont été effectuées à 320 nm, cette longueur d'onde étant bien adaptée à la détection du resvératrol et de ses métabolites tout en évitant les interférences avec d'autres composés présents dans le concentré de vin C'3 ou dans le milieu de culture cellulaire (Figure 44). Il aurait également été possible de détecter le resvératrol et ses métabolites à 305 nm (leur maximum



d'absorbance) ou en fluorescence (excitation 330 nm / émission 374 nm), mais au cours de l'analyse, c'est pour les chromatogrammes à 320 nm que la détection s'est révélée la plus aisée.



**Figure 44 :** Identification des pics correspondant au resvératrol et trois de ses métabolites dans les milieux de culture cellulaires en fonction de leurs temps de rétention spécifiques par HPLC à 320 nm. Ici est présenté à titre d'exemple le milieu de culture cellulaire enrichi en resvératrol 30  $\mu\text{M}$  ayant été 48 heures au contact des cellules hépatiques HepG2. En encarts sont également représentés l'identification des pics dans les milieux enrichis en concentré de vin C'3 100  $\mu\text{g/mL}$  et C'3 100  $\mu\text{g/mL}$  + resvératrol 10  $\mu\text{M}$  après 48 heures au contact des cellules coliques SW480.

### b. Résultats préliminaires

Les premiers résultats montrent tout d'abord une variabilité du niveau de détection du resvératrol et de ses métabolites entre les différentes injections, empêchant toute quantification absolue précise. Nous limiterons donc l'analyse des résultats à une quantification relative des aires de pics du resvératrol et de ses métabolites. Des gammes de concentrations des différents métabolites devraient pouvoir permettre de quantifier précisément chacun des composés étudiés. De plus l'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois et nécessitera plusieurs essais pour que les résultats puissent être validés. En l'état actuel, les résultats sont donc à prendre avec beaucoup de précautions.

Nous pouvons pour l'heure uniquement présenter les variations d'aires des pics représentant le resvératrol natif ou ses métabolites après 48 heures de contact avec les cellules SW480 (Figure 45) et HepG2 (Figure 46). Pour ces deux figures, les aires de pics de trois métabolites étudiés sont additionnées sans distinction afin de mettre en évidence la capacité globale de métabolisation des cellules.

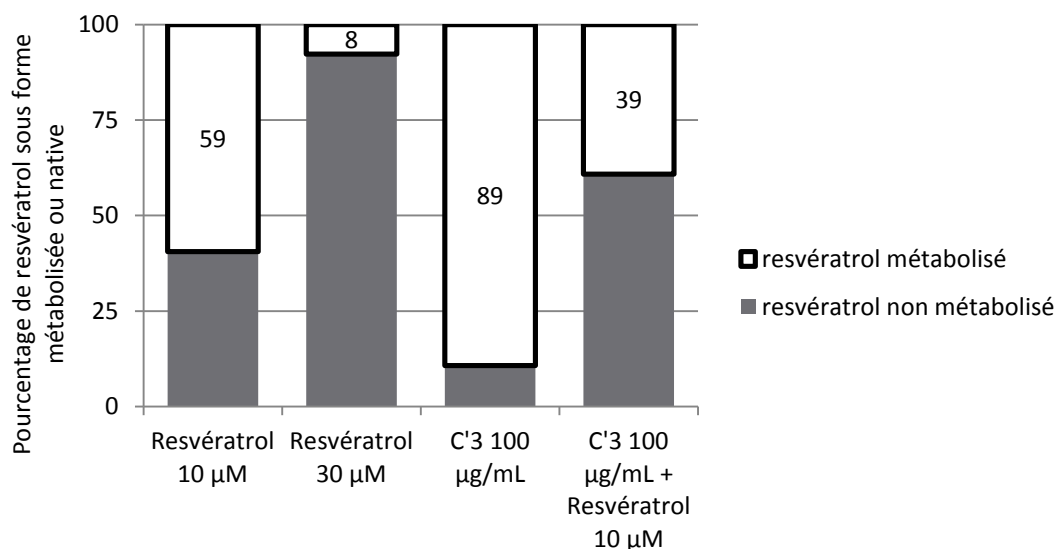
#### **c. Métabolisme du resvératrol dans les cellules colorectales SW480**

Les cellules SW480 se montrent capables de métaboliser une partie du resvératrol présent dans le milieu (Figure 45). Le resvératrol seul n'est pas métabolisé de la même manière qu'il soit à 10 ou à 30  $\mu\text{M}$ , les capacités de métabolisation des cellules semblant arriver à saturation. Du resvératrol est naturellement présent dans le concentré de vin C'3. Bien que présent en faible quantité (comparativement aux milieux enrichis en resvératrol 10 ou 30  $\mu\text{M}$ ), le resvératrol a pu être mis en évidence dans les milieux enrichis en C'3 n'ayant pas encore été mis au contact des cellules, et les métabolites en découlant dans les milieux après 48 heures de traitement. Là encore même en très faible proportion, le resvératrol naturellement présent dans le concentré de vin n'est pas totalement métabolisé par les cellules. Les valeurs mesurées sont néanmoins très proches de la limite de détection et doivent être considérées avec beaucoup de précautions.

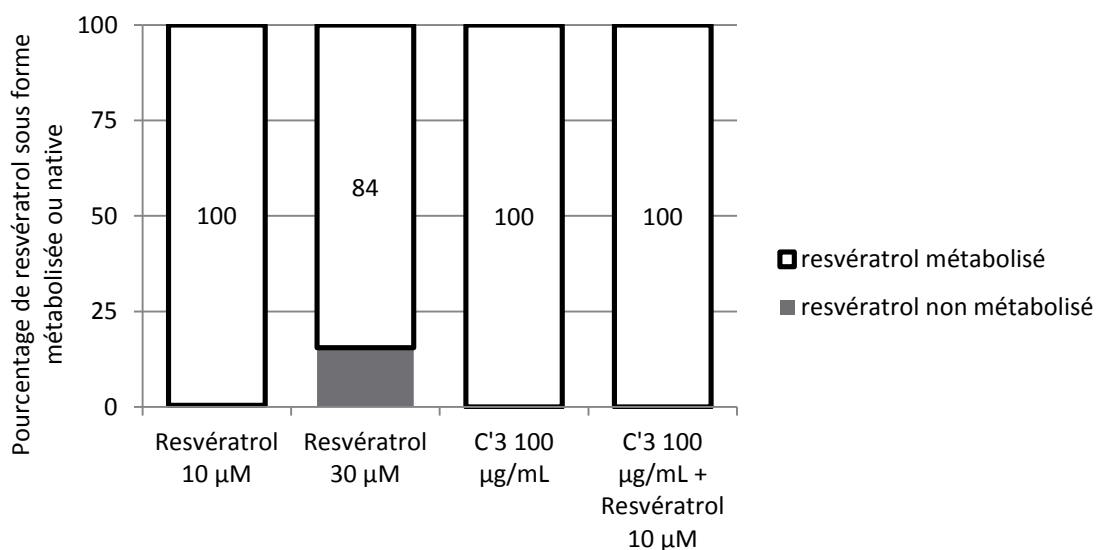
En ce qui concerne la combinaison de resvératrol et de concentré de vin, la présence de C'3 dans le milieu semble capable de diminuer le métabolisme du resvératrol dans les cellules SW480.

#### **d. Métabolisme du resvératrol dans les cellules hépatiques HepG2**

Nous avons également étudié le métabolisme du resvératrol dans les cellules HepG2, connues pour avoir de fortes capacités métaboliques. Nos résultats le confirment (Figure 46), le resvératrol à 10  $\mu\text{M}$  étant presque totalement métabolisé voire totalement en présence de concentré de vin. De même, le resvératrol naturellement présent dans le concentré de vin est également métabolisé en totalité par les cellules HepG2. En revanche le resvératrol à 30  $\mu\text{M}$  n'est pas totalement métabolisé.



**Figure 45 :** Evaluation par HPLC du pourcentage de resvératrol métabolisé dans le milieu de culture cellulaire après 48 heures de mise en contact avec les cellules SW480. (n=1). Influence du concentré de vin C'3.



**Figure 46 :** Evaluation par HPLC du pourcentage de resvératrol métabolisé dans le milieu de culture cellulaire après 48 heures de mise en contact avec les cellules HepG2. (n=1). Influence du concentré de vin C'3.

#### e. Détails des métabolites

Dans les cellules SW480 et HepG2 exposées au resvératrol (solution de resvératrol purifié ou resvératrol naturellement présent dans le concentré de vin), le métabolite majoritaire (voir parfois exclusif) que l'on détecte dans les milieux est le resvératrol-3-sulfate (Figure 47). Les milieux contenant également le concentré de vin C'3 semblent néanmoins, après contact

avec les cellules, présenter des taux non négligeables de resvératrol-3'-O-D-glucuronide, de même que le milieu enrichi en resvératrol 30  $\mu$ M avec les HepG2.

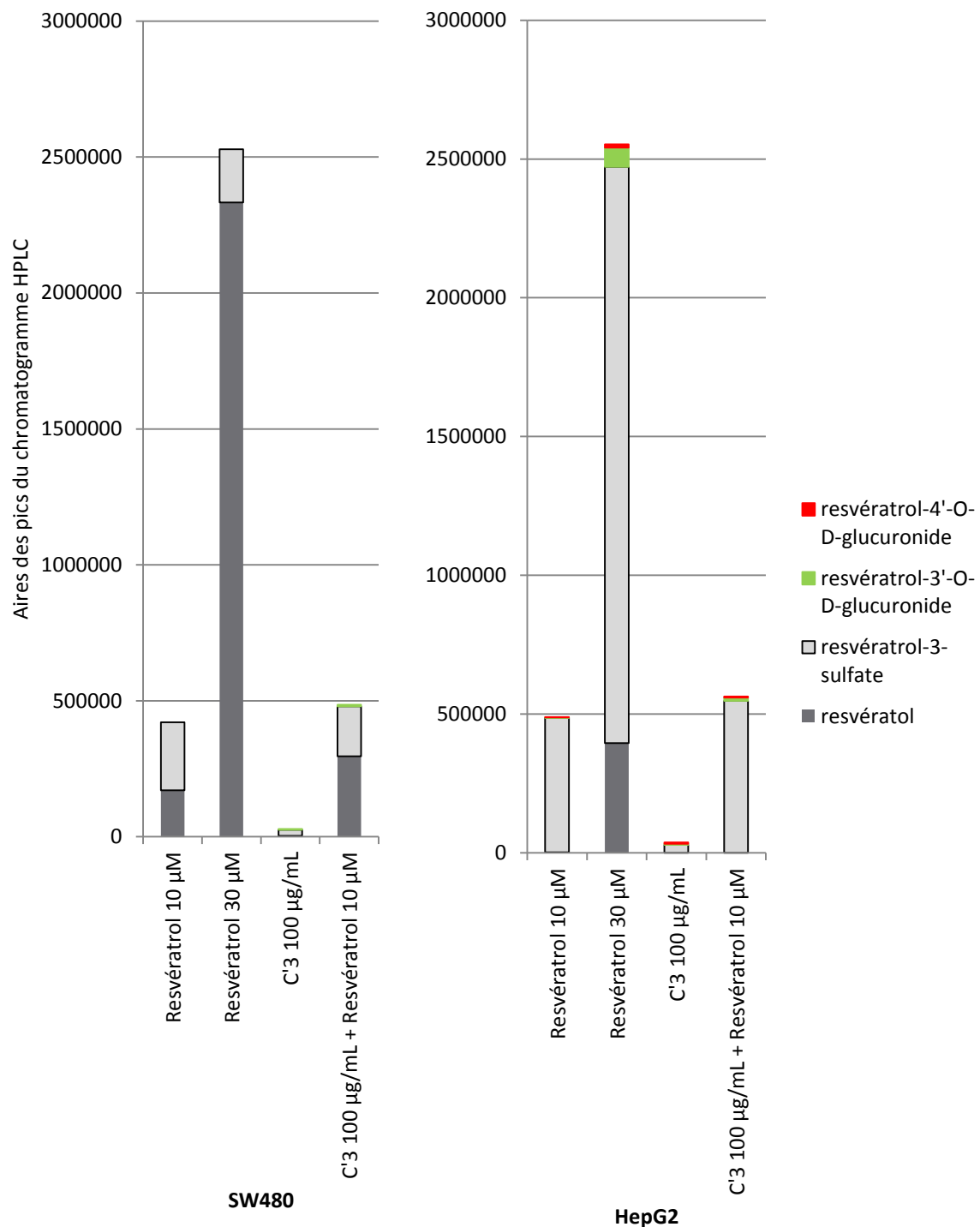


Figure 47 : Aires des pics détectés en HPLC correspondant au resvératrol et à ses métabolites après 48 heures de mise au contact des cellules SW480 et HepG2 avec un milieu de culture cellulaire contenant soit 10  $\mu$ M de resvératrol, 30  $\mu$ M de resvératrol, 100 mg/L de concentré de vin C'3 ou une combinaison de 100  $\mu$ g/mL de C'3 et de 10  $\mu$ M de resvératrol.

## E. Effets *in vivo* d'un concentré de vin sur la néoplasie des polypes intestinaux induits par un cancérigène, l'azoxyméthane, chez la souris

### 1. Approche méthodologique

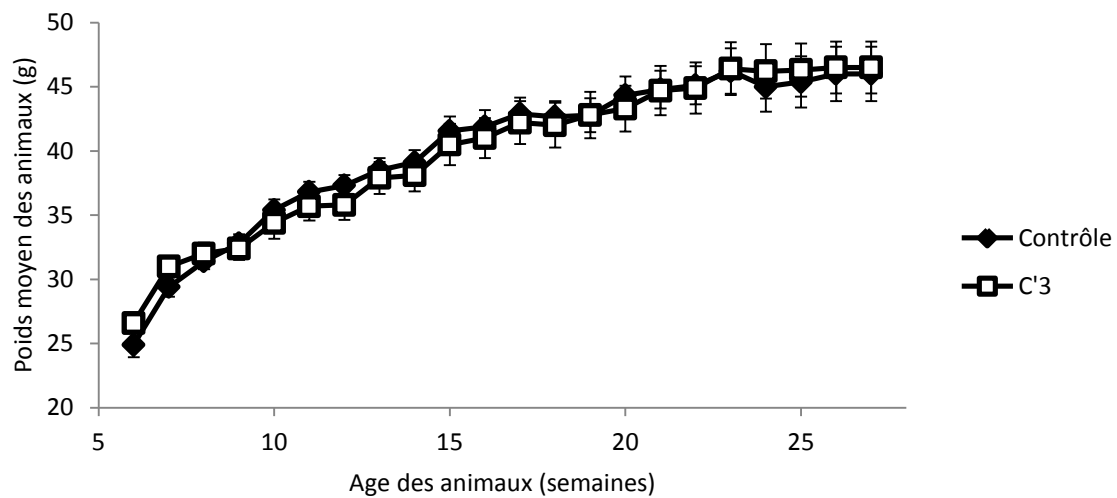
Nous avons choisi de nous intéresser à l'apparition des foyers de cryptes aberrantes (FCA) dans les côlons de souris, ces lésions pouvant être un indicateur de néoplasie. L'azoxyméthane est un puissant cancérigène, inducteur spécifique de tumeurs intestinales. Les tumeurs mettent néanmoins du temps à apparaître et nous nous sommes limités à étudier l'apparition de lésions pré-néoplasiques que sont les FCA. Deux groupes randomisés de souris CF-1 ont été constitués, tous recevant un traitement à l'azoxyméthane. L'un des deux groupes a reçu un régime spécial enrichi en concentré de vin de Bourgogne C'3.

Le régime enrichi en concentré de vin ne modifie pas la prise de poids des animaux (Figure 48). L'un des animaux du groupe contrôle est mort au cours de l'expérience, à la suite du traitement à l'azoxyméthane (AOM). Les effectifs des groupes sont donc de 9 animaux pour le groupe contrôle (1 décès) contre 10 pour le groupe ayant reçu un régime enrichi en concentré de vin C'3. Les animaux soumis au régime enrichi en concentré de vin ne présentent aucun signe pouvant suggérer une quelconque toxicité. Le traitement à l'AOM à induit des FCA chez tous les animaux (Figure 49).

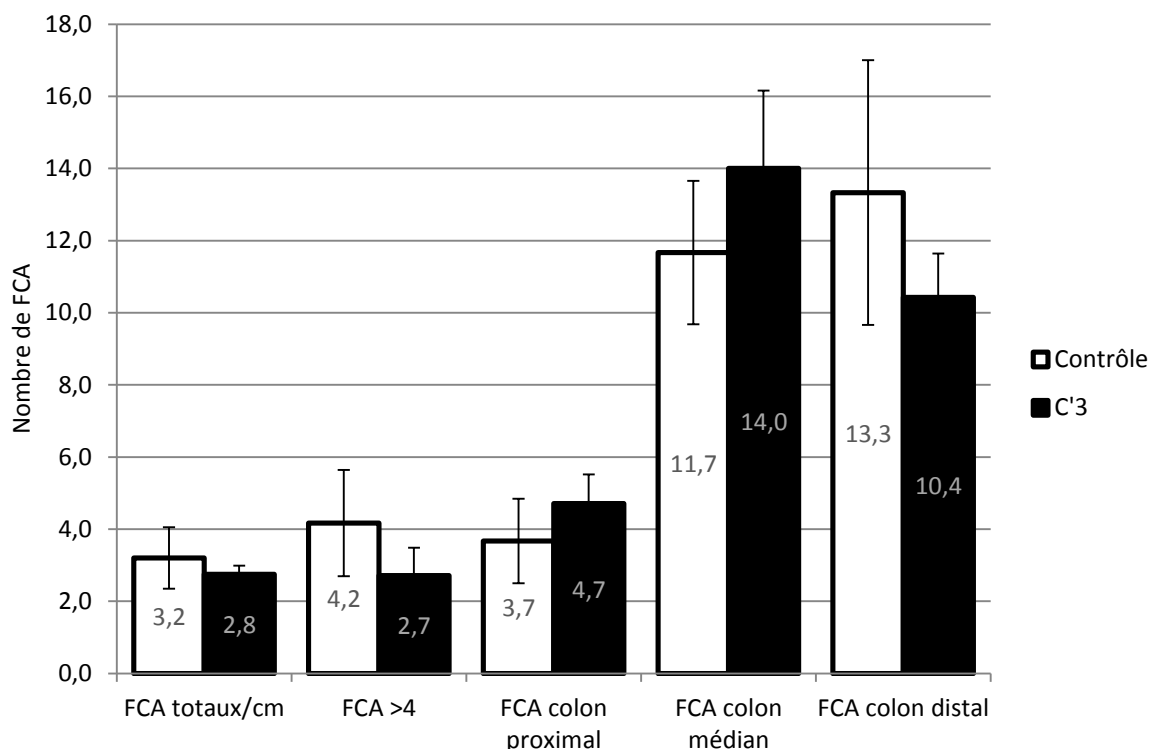
### 2. Résultats bruts

Le nombre total de foyers de cryptes aberrantes n'est pas modifié significativement ( $p = 0,2978$ ) par le régime. Néanmoins, le nombre de foyers contenant plus de 4 cryptes aberrantes révèle une tendance à diminuer avec la prise de concentré de vin (Figure 49). Ces foyers riches en cryptes ( $>4$ ) sont un indicateur de lésions précancéreuses plus fin que le nombre total de FCA et sont plus à même de former des adénocarcinomes. La répartition des FCA entre les différentes sections coliques semble également suivre une tendance à se

déplacer du côlon distal vers le côlon proximal (les traitements statistiques sont en cours avec la société palindrome USA).



**Figure 48 :** Poids moyen des animaux des groupes contrôle (◆) (n=9) et ayant reçu un régime enrichi en concentré de vin C'3 (□) (n=10) en fonction de l'âge des animaux (semaines).



**Figure 49 :** Nombre moyen de foyers de cryptes aberrantes (FCA) dans les côlons de souris contrôle (n=6) ou ayant reçu un régime enrichi en concentré de vin C'3 (n=7). Les colonnes représentent le nombre total de FCA par animal, le nombre de foyers contenant plus de 4 cryptes aberrantes, et le nombre de foyers dans les sections proximale, médiane et distale. Les pourcentages de variations entre contrôle et traités sont représentés au dessus de colonnes.

## F. Discussion du chapitre 1

Les mélanges naturels complexes de polyphénols de vin rouge montrent leur capacité à freiner la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro*. Or ce ralentissement semble moins spécifiquement lié à un blocage particulier dans une seule phase du cycle cellulaire, comme on peut l'observer avec le resvératrol ou la quercétine par exemple, mais plutôt un ralentissement global de toutes les phases du cycle cellulaire. La diversité des composés phénoliques présents dans le vin et leurs diversités d'actions sont également un argument en faveur de cette hypothèse. Chacune de ces molécules utilisant plusieurs voies et chaque voie étant utilisée par plusieurs molécules, les polyphénols du vin rouge tous ensemble pourraient ainsi former un maillage de voies biologiques d'une très grande complexité. Des effets synergiques peuvent exister entre certaines molécules sur certaines voies, mais également des effets antinomiques, comme on a pu le voir avec les combinaisons de resvératrol, quercétine et catéchine sur les cellules HCT116. Nous n'avons pas clairement mis en évidence de synergies d'actions fortes des polyphénols du vin sur un mécanisme en particulier, mais cette étude nous a permis de révéler un ensemble d'effets (telle que la synergie antiproliférative entre le resvératrol et la quercétine) qui individuellement pourraient être considérés comme minimes, mais qui tous ensemble concourent à inhiber l'activité prolifératrice des cellules tumorales.

### 1. Les différents vins, concentrés et extraits

Les différents vins expérimentaux utilisés dans cette étude présentent des variations dans leur contenu polyphénolique tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif. Leurs taux de polyphénols totaux sont influencés par l'année de production (les vins de 2009 sont globalement plus riches que ceux de 2008) et par le temps de macération. Ainsi, pour les vins de 2008, c'est le vin dont le temps de macération est le plus élevé qui présente de loin les taux les plus importants de polyphénols totaux, les deux premiers vins ayant des taux voisins. En revanche, pour les vins de 2009, c'est le premier vin qui est le plus riche. On voit donc que le temps de macération joue un rôle important sur la quantité totale de polyphénols des vins, mais de manière non linéaire.

Qualitativement, le temps de macération modifie également profondément les profils polyphénoliques des vins. Là le schéma semble plus clair, les teneurs spécifiques des polyphénols suivant les mêmes évolutions dans les vins de 2008 et 2009. L'augmentation de la concentration en acide gallique et en catéchine/épicatéchine, avec le temps de macération, s'accompagne d'une diminution du resvératrol, des acides phénoliques, de la quercétine et des anthocyanidines.

Les étapes de concentration des vins de 2008 entraînent une diminution quantitative des composés phénoliques, mais pas de modifications de leur profil. Les tests ayant été effectués avec des teneurs polyphénoliques équivalentes pour tous les concentrés, il n'y a pas de raison de penser que les capacités antiprolifératives soient altérées par ces procédés.

## **2. Inhibition de la prolifération cellulaire**

Les concentrés et extraits présentent tous des capacités antiprolifératives sur les cellules SW480 issues de cancer humain colique. L'inhibition de prolifération est corrélée à la concentration totale en polyphénols pour un même vin. L'extrait de vin de Corbières semble pouvoir agir efficacement à des doses relativement faibles. Bien que les variations de sensibilité des cellules entre les différents tests rendent impossible une comparaison directe avec les vins expérimentaux de Bourgogne, il semble que cet extrait de vin de Corbières soit bien plus efficace du point de vue de l'inhibition de la prolifération cellulaire. Il conviendra de refaire les tests dans des conditions similaires pour préciser ce point.

De plus, les extraits de vins de Bourgogne de 2008 et 2009 ne présentent pas les mêmes capacités antiprolifératives à concentrations de polyphénols égales. Les vins ayant subis les macérations les plus longues présentent un pouvoir inhibiteur plus important. Si l'IC<sub>50</sub> n'est pas corrélé parfaitement avec le temps de macération, ces variations indiquent tout de même que la qualité des polyphénols est un élément primordial dans leur efficacité. Ainsi les vins les plus efficaces sont ceux dont les teneurs en acide gallique, catéchine et épicatéchine sont les plus importantes.

Les cellules cancéreuses sont sensibles au resvératrol et à la quercétine qui peuvent agir en synergie en limitant leur prolifération. Cette inhibition est au moins en partie due à un blocage en phase S du cycle cellulaire, mais les études du cycle cellulaire n'expliquent pas les



effets synergiques. Les faibles concentrations utilisées dans ces tests n'induisent pas de réelle mort cellulaire que ce soit par nécrose ou apoptose, ce mécanisme ne semble donc pas pouvoir être pris en compte pour expliquer la diminution du nombre de cellules.

Paradoxalement, les vins ayant les teneurs les plus faibles en quercétine et resvératrol sont ceux pour lesquels nous avons observés les meilleures efficacités antiprolifératives contre les cellules SW480.

### **3. Métabolisme et transports membranaires du resvératrol**

Nous avons donc supposé qu'il devait aussi y avoir des effets au niveau du métabolisme et/ou des transports membranaires du resvératrol. En effet de telles modifications pourraient faire varier l'efficacité du resvératrol en permettant à chaque molécule d'agir plus efficacement sur la cellule. Si l'ensemble des polyphénols du vin n'a pas influencé significativement le transport du resvératrol dans les cellules, la quercétine a montré des effets à double tranchant. Un prétraitement par la quercétine améliore ainsi l'incorporation du resvératrol, mais en co-traitement cet effet est moins important et se trouve même inhibé lorsque la concentration en quercétine augmente.

Même s'ils ne peuvent pas pour l'instant permettre de tirer de conclusions, les premiers résultats de l'activation de la métabolisation du resvératrol par les cellules colorectales SW480 en présence de polyphénols de vin rouge paraissent refléter l'activité d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques (phase II). Ces tests préliminaires nous ont tout du moins permis de valider notre protocole de détection des métabolites du resvératrol dans le milieu de culture cellulaire.

### **4. Effets *in vivo* des polyphénols de vin rouge sur la néoplasie colorectale chimio-induite**

Dans l'état actuel de l'analyse des résultats, les tests *in vivo* sur les souris traitées à l'azoxyméthane montrent une tendance à diminuer le nombre de FCA, et surtout de FCA de grande taille qui sont à un stade précancéreux plus avancé. Le long du côlon, les effets sont contrastés selon la position proximale, médiane ou distale des FCA. Un effet protecteur *in vivo* des polyphénols du vin rouge de Bourgogne contre la néoplasie colorectale n'est donc

pas exclu. Des tests impliquant un plus grand nombre d'animaux, sur une durée plus longue permettant l'apparition d'adénomes pourrait être plus révélateur.

**Chapitre 2 : Etude de relations structure-  
activité du resvératrol par l'emploi  
d'analogues structuraux**

## A. Présentation de l'article : Les déterminants structuraux du resvératrol pour l'activité d'inhibition de la prolifération cellulaire : études expérimentales et de docking de nouveaux analogues.

« Structural determinants of resveratrol for cell proliferation inhibition potency: Experimental and docking studies of new analogs »

Dans « European Journal of Medicinal Chemistry »

2010, numéro 45, pages 2972 à 2980

Par Frédéric MAZUE, Didier COLIN, Jessica GOBBO, Maria WEGNER, Antonio RESCIFINA, Carmela SPATAFORA, Dominique FASSEUR, Dominique DELMAS, Philippe MEUNIER, Corrado TRINGALI et Norbert LATRUFFE

### 1. Etat des lieux

Les effets chimiopréventifs du resvératrol sont limités, mais prouvés *in vivo* en dépit de sa faible biodisponibilité due à sa forte métabolisation. Une modification de sa structure pourrait s'avérer être une approche prometteuse. Des analogues structuraux du resvératrol ont déjà permis de mettre en évidence certains schémas d'hydroxylations/méthoxylations présentant des propriétés similaires, amoindries, ou améliorées mais pouvant exploiter des mécanismes d'action différents. C'est le cas en particulier du *cis*-3,5,4'-triméthoxystilbène (Schneider et coll., 2003). Lorsque nous avons commencé ce travail, la chimiothèque n'était pas complète quant aux dérivés substitués hydroxyles et méthoxyles. Ce travail a fait l'objet de la synthèse de plusieurs nouveaux dérivés de configuration *cis*- et *trans*- non décrits

jusqu'alors dans la littérature. Les effets antiprolifératifs de ceux-ci ont été comparés à d'autres déjà connus (Spatafora et coll., 2009).

## 2. Présentation des travaux

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration internationale initiée par les laboratoires de Philippe MEUNIER, Corrado TRINGALI et Norbert LATRUFFE. Le but était de comprendre les relations structures-activités de la molécule de resvératrol. En effet, le *trans*-resvératrol est capable d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses, notamment par blocage en phase S du cycle cellulaire.

Pour ce faire, les équipes de Philippe MEUNIER (Dominique FASSEUR et Maria WEGNER) et Corrado TRINGALI (Antonio RESCIFINA et Carmela SPATAFORA) ont mis en commun leurs compétences en matière de synthèse chimique des stilbènes pour produire des analogues du *trans*- et *cis*-resvératrol. Certaines de ces molécules n'avaient jamais été décrites dans la littérature. Ces analogues diffèrent du resvératrol par des modifications du schéma d'hydroxylation et/ou l'ajout de groupements méthoxy-. Nous avons également inclus dans cette étude le *cis*-3,5,4'-triméthoxystilbène, analogue du resvératrol le plus puissant connu à ce jour contre les cellules cancéreuses. Nous l'utilisons comme référence.

Notre équipe (Jessica GOBBO, Dominique DELMAS, Didier COLIN, Norbert LATRUFFE et moi-même) a mené des tests de prolifération cellulaire sur des cellules SW480 (lignée de cellules colorectales tumorales humaines) afin de déterminer les activités antiprolifératives de chacune de ces molécules. Nous avons également effectué des évaluations du blocage du cycle cellulaire en cytométrie en flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium.

Enfin des expériences de docking moléculaire (étude des processus de liaison sur sites spécifiques) par l'équipe de Corrado TRINGALI ont permis de comparer les structures de ces différents analogues avec celles d'une chimiothèque par criblage virtuel.

### 3. Résultats

Au vu des tests de prolifération cellulaire, il apparaît que, pour le *cis*-3,5,4'-triméthoxystilbène, la méthylation est la substitution déterminante dans l'inhibition de l'efficacité anticancéreuse, mais seulement dans les molécules de configuration *cis*-.

La plupart des dérivés synthétiques méthylés, qu'ils soient de configuration *trans*- ou *cis*-, présentent une aptitude à bloquer la mitose en phase M (contrairement au *trans*-resvératrol qui induit un blocage en phase S). Ceci conduit à la formation de cellules polyploïdes.

Le criblage des banques de données de docking montre que presque toutes les structures des isomères polyméthoxy de configuration *cis*- se superposent nettement à la structure de la combretastatine A-4. La combretastatine A-4 est le ligand de référence sur le site de liaison à la colchicine-tubuline. Dans sa forme phosphatée, cette molécule naturelle présente des propriétés anti-angiogéniques particulièrement fortes. Cette analogie structurale avec la combretastatine A-4 n'est pas vraie pour les isomères polyméthoxylés de configuration *trans*-.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

## Structural determinants of resveratrol for cell proliferation inhibition potency: Experimental and docking studies of new analogs

Frédéric Mazué<sup>a</sup>, Didier Colin<sup>a</sup>, Jessica Gobbo<sup>a</sup>, Maria Wegner<sup>a</sup>, Antonio Rescifina<sup>c</sup>, Carmela Spatafora<sup>c</sup>, Dominique Fasseur<sup>b</sup>, Dominique Delmas<sup>a</sup>, Philippe Meunier<sup>b</sup>, Corrado Tringali<sup>c</sup>, Norbert Latruffe<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>INSERM U 866; University of Burgundy, Laboratory of Biochemistry of Metabolism and Nutrition, 6, Bd Gabriel, F-21000 Dijon, France<sup>b</sup>JCMUB-UMR CNRS 5260, University of Burgundy, Institute of Molecular Chemistry, Ave Savary, F-21000 Dijon, France<sup>c</sup>Università degli Studi di Catania, Dipartimento di Scienze Chimiche, Viale Andrea Doria 6, I-95125 Catania, Italy

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 November 2009

Received in revised form

15 March 2010

Accepted 16 March 2010

Available online 25 March 2010

## Keywords:

Resveratrol

Polymethoxy-stilbenes

Tubulin polymerization

Colon cancer

Docking studies

## ABSTRACT

Resveratrol is the subject of intense research because of the abundance of this compound in the human diet and as one of the most valuable natural chemopreventive agents. Further advances require new resveratrol analogs be used to identify the structural determinants of resveratrol for the inhibition potency of cell proliferation by comparing experimental and docking studies. Therefore, we synthesized new *trans*/(*E*)- and *cis*/(*Z*)-resveratrol – analogs not reported to date – by modifying the hydroxylation pattern of resveratrol and a double bond geometry. We included them in a larger panel of 14 molecules, including (*Z*)-3,5,4'-trimethoxystilbene, the most powerful molecule that is used as reference. Using a docking model complementary to experimental studies on the proliferation inhibition of the human colorectal tumor SW480 cell line, we show that methylation is the determinant substitution in inhibition efficacy, but only in molecules bearing a *Z* configuration. Most of the synthetic methylated derivatives (*E* or *Z*) stop mitosis at the M phase and lead to polyploid cells, while (*E*)-resveratrol inhibits cells at the S phase. Docking studies show that almost all of the docked structures of (*Z*)-polymethoxy isomers, but not most of the (*E*)-polymethoxy isomers substantially overlap the docked structure of combretastatin A-4, taken as reference ligand at the colchicine–tubulin binding site.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

Recent evidence suggests that the use of resveratrol, a well-known polyphenol that is abundant in the human diet, in combination with drugs, ionizing radiation, or cytokines can be effective in the sensitization to apoptosis. Natural *trans*-resveratrol [(*E*)-3,5,4'-trihydroxystilbene] targets a wide variety of intracellular mechanisms involved in the pathways leading to malignancy. In various *in vitro* and *in vivo* models, this polyphenolic compound has proven to be capable of retarding or preventing the various steps of carcinogenesis [1]. This protective effect could be related to the ability of resveratrol to arrest cell cycle progression [2,3] or to trigger tumor cell death by apoptosis [4,5]. Recently, resveratrol has been shown to behave also as a sensitizer of anticancer drugs such as 5-fluoro-uracil [6] and paclitaxel [7], radiation [8], and cytokines such as TRAIL [5].

Nevertheless, various studies have documented that stilbenes and flavonoids, despite efficient absorption by the organism, unfortunately have low bioavailability, glucuronidation and sulfation being limiting factors [9–11]. We have recently developed acetylated forms of resveratrol and oligomers, showing that acetylation of resveratrol inhibits cancer cell proliferation in the same manner as resveratrol [12–14]. In contrast, the isomerization of molecules and the methylation of hydroxyl groups change the cell molecular targets and are essential to strengthen the efficiency of resveratrol derivatives for blocking the cell cycle [15–17], suggesting that polymethoxy-stilbenes and related compounds are a subgroup of resveratrol analogs showing promising antitumor properties (see for review [18]). In addition, *in vivo* studies indicate that polymethoxy-stilbenes undergo a different metabolic conversion and have a higher bioavailability than resveratrol.

While previous studies already reported the synthesis of polymethoxy-stilbene analogs [18], especially highlighting (*Z*)-3,5,4'-trimethoxystilbene, which exhibits strong antiproliferative activity by acting as an inhibitor of tubulin polymerization [19], the structure–activity relationship remains unclear, for example, the methyl

\* Corresponding author.

E-mail address: [latruffe@u-bourgogne.fr](mailto:latruffe@u-bourgogne.fr) (N. Latruffe).

position and number, double bond configuration, or the additional hydroxyl group. The originality of our work is based on two strategies: synthesis of three new resveratrol analogs as yet unpublished (compounds **6**, **10** and **14**) and the use of docking modeling studies and their comparison with experimental data from the human colorectal tumor SW480 cell line to identify biological targets. For a coherent approach to critical methylation resveratrol analogs and for a better understanding, we tested a larger panel of molecules from already published resveratrol analogs including (*Z*)-3,5,4'-trimethoxystilbene (compound **4**), the most powerful molecule. Thus, with a proper synthetic methodology, previously employed for some of the compounds reported here [20] and exemplified in Fig. 1, a library of resveratrol analogs was obtained from (*E*)- and (*Z*)-resveratrol (Fig. 1, compounds **1** and **2**). Both (*E*)- and (*Z*)-isomers for each substrate were prepared. In the first group, the 3,5,4'-hydroxyl groups of resveratrol were replaced with methoxy groups (compounds **3** and **4**) and a further hydroxyl group was inserted at position 2 (compounds **5** and **6**); a second group was represented by 3,5,3',5'-tetramethoxy-stilbenes (compounds **7** and **8**) also bearing a hydroxyl group in C-2 (compounds **9** and **10**); in a third group of 3,5,3',4'-tetramethoxy-stilbenes, the two rings were asymmetrically substituted (compounds **11** and **12**), and also in this case the 2-hydroxy analogs were prepared (compounds **13** and **14**). We established that the number of methyl groups of resveratrol is crucial for determining the inhibitory properties of colorectal cancer cell proliferation and in cell cycle arrest. The strongest effect

depends on *Z*-stereochemistry. The presence of a supplementary hydroxyl group decreases the efficiency of the antiproliferative properties of resveratrol analogs. Interestingly, (*Z*)-isomer treatments lead to a polyploidy phenomenon in colon cancer cells. Using a computational docking approach, we show that *Z*-isomers, apart from (*Z*)-resveratrol and (*Z*)-tetramethoxy-stilbene, can be incorporated into the colchicine site of tubulin. All (*Z*)-isomers substantially overlap the docked structure of combretastatin A-4 (**15**), taken as reference.

## 2. Material and methods

### 2.1. General

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were run on a Varian Unity Inova spectrometer at 500 and 125 MHz, respectively, in  $\text{CDCl}_3$  or  $\text{C}_6\text{D}_6$  solutions with TMS as internal standard. Mass spectra were recorded in ESI positive mode on a Micromass ZQ2000 spectrometer (Waters). All reactions were monitored by TLC on commercially available precoated plates (silica gel 60 F254) and the products were visualized with cerium sulfate solution. A silica gel 60 was employed for column chromatography. Resveratrol (**1**) was purchased from Sigma; *m*-chloroperbenzoic acid (*m*-CPBA) 99% assay was obtained by washing the commercial 77% material (Aldrich) with a phosphate buffer at pH 7.5 and drying the residue under reduced pressure.

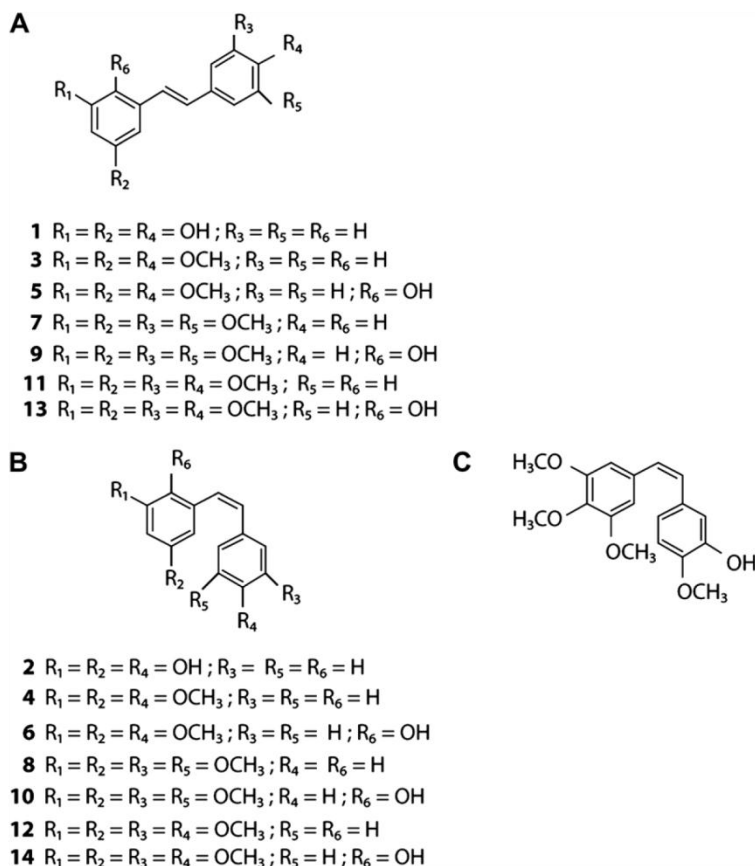


Fig. 1. Structure of (*E*)/trans-resveratrol (A), (*Z*)/cis-resveratrol (B) related analogs and combretastatin A-4 (C).



The known compounds **3**, **5**, **7**, **9**, **11**, and **13** were synthesized as previously reported, based on an Arbusov rearrangement followed by the Horner–Emmons–Wadsworth reaction [20]. Compound **4** was prepared by the classic Wittig reaction: 4-methoxybenzyl-triphosfonium chloride was reacted with 3,5-dimethoxybenzaldehyde and BuLi in THF to afford **4**. Spectral data of the known compounds are in perfect agreement with those obtained previously [20]. Calculated log *D* values were obtained with ACD/labs Log *D* program version 11.

## 2.2. Photo-isomerization

Irradiation experiments were conducted in a 200-mL quartz vessel using a Rayonet photochemical reactor equipped with a variable number of “black light” phosphor lamps with emission in the 310 to 390 nm range and a maximum at 350 nm. The fluence rate at the irradiation position was measured to be 5 mW·cm<sup>-2</sup>. A 2 × 10<sup>-4</sup> M solution (200 mL) of each compound (**1**, **3**, **7**, and **11**) in ethanol was irradiated in the reactor for 10 min under nitrogen bubbling. The irradiated solution was then reduced to a small volume under vacuum and charged onto the appropriate silica gel column to separate the (*Z*)-product from the residual (*E*)-isomer. All photo-isomerizations were obtained with 78–82% conversion, based on <sup>1</sup>H NMR measurements. Spectral data of the **2**, **4**, **8**, and **12** compounds obtained are in perfect agreement with those previously reported [17,21–23].

## 2.3. Chemical procedure of hydroxylation

The compounds **6**, **10**, and **14** were synthesized as follows: a solution of *m*-CPBA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.150 mmol/mL) was added to a stirred solution of the substrate in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.105 mmol/mL) at room temperature. The reaction mixtures were then washed with a NaHSO<sub>3</sub> solution and subsequently with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered, and concentrated *in vacuo*; the residues were submitted to flash-chromatography on a 3 × 25 cm silica gel column, eluted with EtOAc in *n*-hexane (from 0% to 30%).

**(Z)-2-Hydroxy-3,5,4'-trimethoxystilbene (6):** EI-MS *m/z* 285 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.53 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3.77 (s, 3H, 5-OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3H, 3-OCH<sub>3</sub>); 5.35 (s, 1H, OH); 6.33 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-4); 6.38 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-6); 6.57 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz, H- $\alpha$ ); 6.61 (d, 1H, *J* = 12 Hz, H- $\beta$ ); 6.75 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-3' and H-5'); 7.23 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-2' and H-6'). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 158.7, 152.4, 147.0, 137.6, 130.4, 128.6, 127.4, 123.5, 122.9, 114.2, 100.5, 98.8, 56.2, 55.9, 55.5.

**(Z)-2-Hydroxy-3,5,3',5'-tetramethoxystilbene (10):** EI-MS *m/z* 315 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.52 (s, 3H, 5-OCH<sub>3</sub>); 3.65 (s, 6H, 3',5'-OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3H, 3-OCH<sub>3</sub>); 5.38 (s, 1H, OH); 6.31 (s, 1H, H-4'); 6.33 (s, 1H, H-6); 6.37 (s, 1H, H-4); 6.47 (s, 2H, H-2' and H-6'); 6.60 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz, H- $\alpha$ ); 6.71 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz, H- $\beta$ ). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 159.8, 153.9, 146.9, 139.2, 137.2, 131.0, 123.9, 122.5, 104.2, 100.0, 99.1, 56.1, 55.7, 55.4.

**(Z)-2-Hydroxy-3,5,3',4'-tetramethoxystilbene (14):** EI-MS *m/z* 315 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.35 (s, 3H, 4'OCH<sub>3</sub>); 3.63 (s, 3H, 3'-OCH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 6H, 3,5-OCH<sub>3</sub>); 5.36 (s, 1H, OH); 6.35 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H-4); 6.38 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H-6); 6.59 (bs, 2H, H- $\alpha$  and H- $\beta$ ); 6.74 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-3); 6.85 (d, 1H, *J* = 8.5, H-2') overlapped with 6.74 (d, 1H, *J* = 2 Hz, H-6'). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 151.9, 150.1, 149.8, 148.2, 137.6, 130.6, 129.9, 123.7, 122.1, 121.1, 111.7, 110.7, 104.3, 98.9, 56.2, 55.7, 55.5, 55.4.

The spectral data of already published resveratrol analogs are in agreement with those reported in the literature [24].

## 2.4. Biological methods

### 2.4.1. Proliferation and cytotoxicity assays

The human colon carcinoma cell line SW480 was cultured in RPMI-Medium with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics. Proliferation inhibition assays were performed in 24-well plates in triplicate, and each experiment was conducted three times. In all, 30,000 cells were seeded per well and after 24 h were treated with media containing either 0.1% dimethylsulfoxide with (*E*)-resveratrol, or with resveratrol derivatives, or with 0.1% dimethylsulfoxide as control. After 24, 48, and 72 h, adherent cells collected by trypsinization and detached cells were labeled in 1 mL medium containing 1 μg/mL of propidium iodide. Cells were counted using a Cyflow green flow cytometer (Partec, Münster). Dead cells were distinguished from viable cells by incorporation of propidium iodide. Subsequently, 48h IC<sub>50</sub> values were determined by performing 1 nM–100 μM treatments and the IC<sub>50</sub> values were obtained after parametric regressions on the percentages of viable cells versus the control.

### 2.4.2. Cell cycle and DNA content analysis and microscopic examination of cell nuclei morphology

See the techniques previously used in [12–14].

## 2.5. Computational docking studies

In view of the structural similarities of (*Z*)-polymethoxy stilbenes with combretastatin, we also investigated the binding model of all (*E*- and (*Z*)-isomers **1–14** in comparison with combretastatin A-4 to delineate their structure–activity relationships (SARs). Thus, given that the cytotoxicity mechanism of combretastatin and related structures has been shown to involve the inhibition of tubulin polymerization by binding tubulin at the colchicine binding site [25], we conducted molecular docking simulations of all stilbene analogs into this pocket [26]. The reported 3D structure of the tubulin–DAMA–colchicine–stathmin-like domain complex was retrieved from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/PDB; code 1SAO>), but it has a resolution of only 3.58 Å and therefore requires considerable computational effort before models derived from it can be considered “all-atom” [27]. Thus, the stathmin-like domain, the C and D subunits, and the DAMA–colchicine were removed from the model, the missing atoms on chain A residues Gln 35, Asp 47, Thr 51, Glu 55, Thr 56, Glu 77, Arg 221, Gln 285, Arg 308, Ile 335, Lys 336, Lys 338, Arg 339, Gln 342, and chain B residues His 37, Asn 59, Lys 124, Ser 126, Arg 215, Lys 218, Leu 219, Arg 322, Lys 326, Lys 338, Arg 369, Lys 372, Asp 437 were added and locally optimized. Then, using the MolProbity Web server [28], the hydrogen atoms were added and the orientations of the hydroxyl hydrogens from the Ser, Thr, and Tyr, the sulfhydryl orientations of Cys, and the methyls of Met amino acids were optimized; at the same time the positions of hydrogens on histidine, asparagine, and glutamine residues were assigned, ensuring suitable ionization states. Finally, the Gasteiger–Marsili charges [29] were assigned and the whole protein, with the combretastatin A-4 positioned in the place of the DAMA–colchicine ligand and aligned with the A-ring, and the three methoxyl groups were optimized to an energy gradient of 0.005 kcal·Å/mol with amber 96 force field [30].

## 3. Results

We compared the potency of resveratrol synthetic analogs toward the human colorectal tumor cell line SW480 by comparing two reference natural molecules, i.e., (*E*)-3,5,4'-Trihydroxystilbene (**1**) and (*Z*)-3,5,4'-Trihydroxystilbene (**2**) (Fig. 1); the (*E*- and (*Z*)-isomers of the 3,5,4'-Trimethoxystilbene (**3** and **4**, respectively),

permethylated analogs of resveratrol, were also included in view of their previously reported high antiproliferative activity.

### 3.1. Antiproliferative activity toward SW480 colon cancer cell line

To compare the effect of resveratrol analogs on cell growth, SW480 cells were treated with molecules from our library and the antiproliferative activity of compounds **1**–**14** was determined as  $IC_{50}$  (in  $\mu M$ ) and is reported in Table 1. The most active compounds, in order of decreasing potency, were the following: (*Z*)-3,5,4'-Trimethoxystilbene (**4**),  $0.3 \mu M >$  (*Z*)-2-Hydroxy-3,5,3',5'-Tetramethoxystilbene (**10**),  $7 \mu M >$  (*Z*)-3,5,3',4'-Tetramethoxystilbene (**12**),  $9.5 \mu M >$  (*Z*)-2-Hydroxy-3,5,3',4'-Tetramethoxystilbene (**14**),  $10 \mu M >$  (*Z*)-3,5,3',5'-Tetramethoxystilbene (**8**),  $13 \mu M >$  (*E*)-2-Hydroxy-3,5,3',5'-Tetramethoxystilbene (**9**),  $17 \mu M >$  (*E*)-Resveratrol (**1**),  $20 \mu M$ .

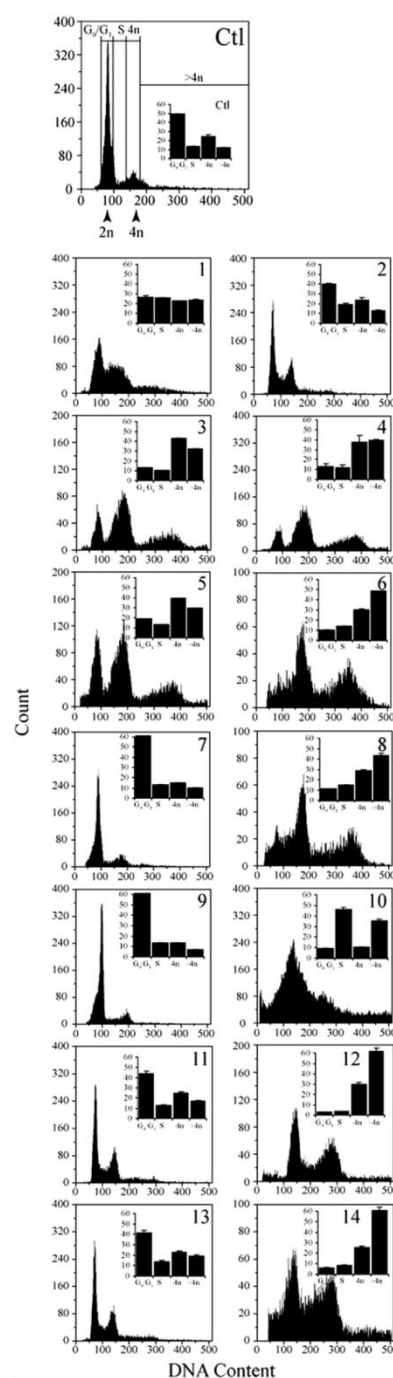
When compound **11** was compared with **7** (which is only different in the position of one methoxy group) it appeared to be less active. The same tendency was observed between (*E*)-tetramethoxy derivatives, i.e., **13** compared with **9**. For the derivatives with *trans* configuration, too, a slightly higher effect was seen with a methoxy group in another position (**12**  $>$  **8**, **10**  $>$  **14**). (*Z*)-3,5,3',4'-Tetramethoxystilbene (**12**) and (*Z*)-2-Hydroxy-3,5,3',4'-tetramethoxystilbene (**14**), two (*Z*)-tetramethoxystilbenes, were potent but they appeared to be less effective than the (*Z*)-trimethoxy analog **4** as a reference of the most potent resveratrol analog.

### 3.2. Cell cycle and DNA content

To further explore the mechanisms by which all these polyphenols exert their antiproliferative potencies, we studied their effects on the cell cycle distribution of SW480 cells. As shown in the top panel of Fig. 2A, percentages of cells were determined by electronic gating on cell populations according to their DNA content: the diploid cell cycle was divided into a  $2n G_0/G_1$  phase, a S phase of DNA replication ( $2 < n < 4$ ), and a  $4n G_2/M$  phase. Moreover, it should be noted that cancer cells, mainly colon cancer cells, are usually unstable and display  $>4n$  DNA content associated with polyploidy. Fig. 2A shows the flow cytometry diagrams obtained after 48h treatments of SW480 cells with all the compounds from our library at  $30 \mu M$ , a common concentration used to evaluate (*E*)-resveratrol anticancer potencies *in vitro*. Only compound **4**, which is highly toxic at  $30 \mu M$ , was used at  $1 \mu M$  for comparison. The synthetic histograms of the cell distribution in the different phases of the cell cycle are also shown in Fig. 2B.

**Table 1**  
Potencies of resveratrol derivatives antiproliferative activities toward SW480 human colorectal cells after 48 h of treatment.

Compound	Number	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
A. $IC_{50}$ of ( <i>E</i> )-resveratrol derivatives		
( <i>E</i> )-Resveratrol	<b>1</b>	$20 \pm 3$
( <i>E</i> )-3,5,4'-Trimethoxystilbene	<b>3</b>	$54 \pm 8$
( <i>E</i> )-2-Hydroxy-3,5,4'-trimethoxystilbene	<b>5</b>	$43 \pm 6$
( <i>E</i> )-3,5,3',5'-Tetramethoxystilbene	<b>7</b>	$48 \pm 7$
( <i>E</i> )-2-Hydroxy-3,5,3',5'-tetramethoxystilbene	<b>9</b>	$17 \pm 2$
( <i>E</i> )-3,5,3',4'-Tetramethoxystilbene	<b>11</b>	$100 \pm 15$
( <i>E</i> )-2-Hydroxy-3,5,3',4'-tetramethoxystilbene	<b>13</b>	$42 \pm 3$
B. $IC_{50}$ of ( <i>Z</i> )-resveratrol derivatives		
( <i>Z</i> )-Resveratrol	<b>2</b>	$90 \pm 12$
( <i>Z</i> )-3,5,4'-Trimethoxystilbene	<b>4</b>	$0.3 \pm 0.04$
( <i>Z</i> )-2-Hydroxy-3,5,4'-trimethoxystilbene	<b>6</b>	$18 \pm 2$
( <i>Z</i> )-3,5,3',5'-Tetramethoxystilbene	<b>8</b>	$13 \pm 2$
( <i>Z</i> )-2-Hydroxy-3,5,3',5'-tetramethoxystilbene	<b>10</b>	$7 \pm 2$
( <i>Z</i> )-3,5,3',4'-Tetramethoxystilbene	<b>12</b>	$9.5 \pm 2$
( <i>Z</i> )-2-Hydroxy-3,5,3',4'-tetramethoxystilbene	<b>14</b>	$10 \pm 2$



**Fig. 2.** Effect of methoxyresveratrol analogs on SW480 cell cycle. Flow cytometry analysis of SW480 cells distribution in the cell cycle after 48 h treatments by resveratrol analogues (number). Diagrams show cell numbers against DNA content measurement by propidium iodide staining. Synthetic histograms of cell distribution among their cell cycle. Data are means  $\pm$  SD of a representative experiment among three independent. For experimental procedure, see material and methods.

Three types of compounds can be reported, according to their effects on cell cycle distribution: those that exert no effects and are essentially (*E*)-isomers plus (*Z*)-resveratrol (compounds **2**, **7**, **9**, **11**, **13**) with an average of 50% G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cells, 15% S cells, 25% 4n cells, and 10% >4n cells. Another compound is the well-known (*E*)-resveratrol by itself, which induces a strong S-phase arrest and a small increase of polyploidy. Finally, many compounds (especially (*Z*)-isomers, compounds **3**, **4**, **5**, **6**, **8**, **10**, **12**, **14**) completely disturb the diploid cell cycle, leading to the generation of polyploid cells, more precisely of tetraploid cells because of the loss of 2n cells and of the increase in 4n and 8n cells.

To have an overall view of the mechanisms involved in the polyploidization induced by most of the (*Z*)-isomers, we performed a time- and concentration-dependent analysis of the effects of (*Z*)-3,5,4'-trimethoxystilbene (**4**) as reference [19]. The antiproliferative activity of this compound occurred in a time- and dose-dependent manner as compared to (*E*)-resveratrol, and did not exert toxic effects at the highest concentration used (1  $\mu$ M) (Fig. 3A). It was also noted that in contrast to (*E*)-resveratrol, there was no growth resurgence after 72 h. Moreover, at 1  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> = 0.3  $\mu$ M), compound **4** did not seem to be more potent than 0.2  $\mu$ M or 0.5  $\mu$ M. Thus, cell cycle analyses after treatment with the same concentrations showed comparable results: 0.5  $\mu$ M and 1.0  $\mu$ M treatments led to exactly the same profile of cell cycle disruption with an increase of 4n and >4n cells (Fig. 3B). Nevertheless, 0.2  $\mu$ M treatments exerted weaker effects than higher concentrations with regard to cell distribution in the cell cycle.

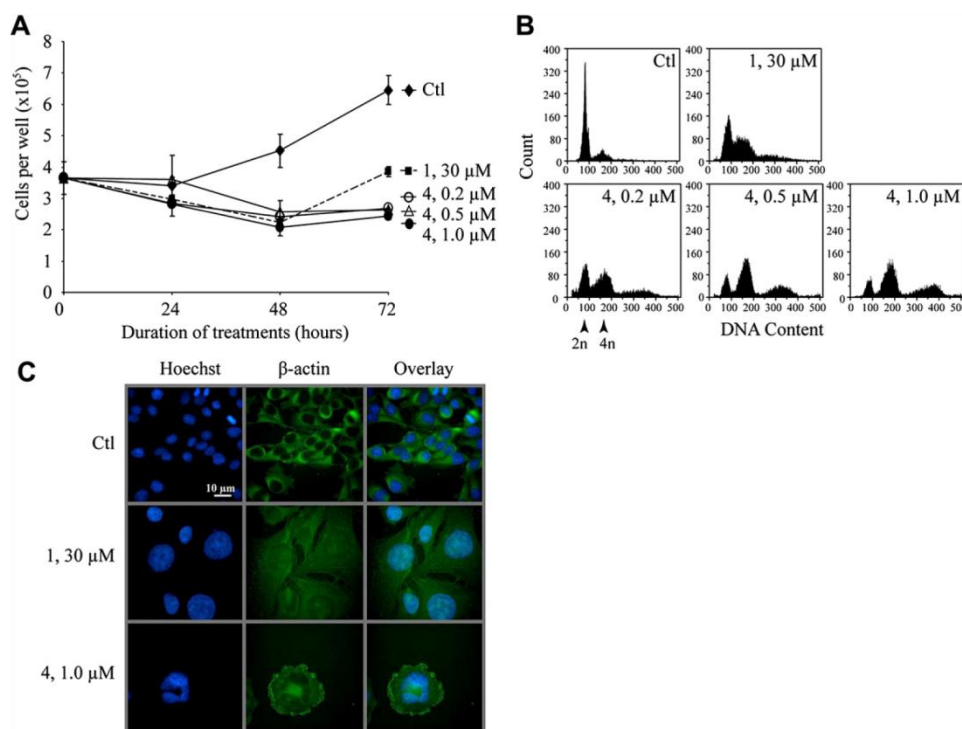
We then used microscopic analysis to illustrate the accumulation of polyploid cells after treatment with compound **4** (Fig. 3C). Hoechst staining allowed us to confirm that this (*Z*)-isomer leads to mitotic disturbances. Indeed, as compared to resveratrol treatment, which induces nuclear swelling, compound **4** inhibits cytokinesis resulting in endocycle and multinucleated cells (karyokinesis inhibition would have produced giant nuclei).

### 3.3. Binding model of (*E*)- and (*Z*)-stilbene isomers

Starting from the experimental data (presented in previous sections), we looked for possible relationships between structures of resveratrol analogs and their affinity to bind colchicine at the tubulin-binding site, responsible for mitosis inhibition and polyploidy, via a computational docking approach.

To validate the model, we docked combretastatin A-4 (Fig. 1C) and some structurally diversified combretastatin-like analogs that bind to colchicine at the tubulin binding site to compare their experimentally obtained IC<sub>50</sub> values with the calculated values. The results obtained (not reported here; see Supplementary Data) showed that the model is able to reproduce the IC<sub>50</sub> experimental values with a high precision that is, to our knowledge, the best obtained to date by docking methodology. The model was applied successively to compounds **1–14** and the results obtained, arranged in order of decreasing calculated activity, are presented in Table 2.

Although almost all the (*E*)-isomers were less active than the (*Z*)-isomers against the inhibition of SW480 cells, they were



**Fig. 3.** Inherent mechanisms of antiproliferative activity of compound **4**. **A**. Proliferation of SW480 cells treated with resveratrol (compound **1**) at 30  $\mu$ M and compound **4** from 0.2 to 1.0  $\mu$ M during 24, 48 and 72 h. Data are means  $\pm$  SD of a representative experiment among three independent. For experimental procedure, see material and methods. **B**. Flow cytometry analysis of SW480 cells distribution in the cell cycle after 48 h treatments by compound **1** and **4** at indicated concentrations. Diagrams show cell numbers against DNA content measurement by propidium iodide staining. **C**. Microscopic analysis of SW480 cells left untreated (Ctl) or treated with 30  $\mu$ M resveratrol (**1**) or with 0.5  $\mu$ M of compound **4** for 48 h. Green fluorescence (Alexa 488) is due to actin immunostaining performed to see the shape of the cells. Blue fluorescence (Hoechst 33342) reveals nuclei. All the pictures have been taken with the same conditions and magnification (100 $\times$ ). This figure represents an example of three independent experiments. [For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.]

**Table 2**

Calculated and experimental binding affinity to colchicine site of tubulin for substituted stilbenes 1–14.

Ligand	$\Delta G_{\text{bind}}$ calcd. (kcal/mol)	IC <sub>50</sub> calcd. ( $\mu\text{M}$ )
<b>10</b>	−7.87	1.69
<b>6</b>	−7.72	2.18
<b>12</b>	−7.53	3.00
<b>4</b>	−7.50	3.16 <sup>a</sup>
<b>2</b>	−7.27	4.66
<b>1</b>	−7.24	4.90
<b>14</b>	−7.14	5.80
<b>9</b>	−7.01	7.23
<b>7</b>	−7.01	7.23
<b>8</b>	−6.93	8.27
<b>3</b>	−6.82	9.96
<b>5</b>	−6.79	10.48
<b>11</b>	−6.72	11.79
<b>13</b>	−6.46	18.30

<sup>a</sup> An experimental value of 4.00 is reported. See Schneider et al. [19].

integrated into the colchicine site of tubulin. Moreover, compounds **1**, **7**, and **9** showed a binding affinity comparable to that of compounds **14** and **8**; these data point out that the efficiency in the interaction with the receptor site, alone, is not sufficient to elucidate the anticancer potency, and many other factors, such as absorption, distribution, and metabolism, must be considered especially important in this case. However, some conclusions can be made from the docking results. All docked structures of (*Z*)-isomers, with the exception of compound **2**, which is moved down, and compound **8**, which is overturned, substantially overlap the docked structure of combretastatin A-4, taken as reference (Fig. 4A). Moreover, compounds **6** and **14** collocated the 3,5-dimethoxy groups of the A-ring in the same position of the corresponding combretastatin A-4 rings with the hydroxylic moiety, which engages a hydrogen bond with Ser B132 (not shown); conversely, compound **10**, which possesses the best affinity, has two *m*-methoxy groups in both the A- and B-rings so it could be arranged into two possible orientations with respect to combretastatin A-4. The best arrangement results from the B-ring overlapping with the A-ring of compound **15**, as shown in Fig. 4B. In this position, compound **10** establishes six hydrogen bonds with the tubulin receptor: 3'-methoxyl with the Cys B238 sulfhydryl, 5'-methoxyl with the Ser A132 hydroxyl, 2-hydroxyl with both carbonyl of Thr A133 and Asn B255, and 3-methoxyl with the Lys A67 ammonium and with Ala A134 amidic hydrogen (Fig. 4B). Finally, Fig. 4C shows how all (*E*)-isomers overlap compared with combretastatin A-4. Also, in this case all compounds are sufficiently aligned between them but not with combretastatin, with the exception of compounds **3** and **5**, which, possessing only one methoxyl in the B-ring, prefer to interact with the hydrophobic channel that joins the A and B subunits protruding to the A subunits. Interestingly, the three compounds with the 2-hydroxyl group are almost perfectly overlapping with the B-ring of the reference compound combretastatin.

The comparison between binding models of (*E*)- and (*Z*)-resveratrol isomers with regard to tubulin and cell proliferation inhibition potencies is presented in Table 3, with the following results:

- Almost all the (*Z*)-polymethoxy stilbenes were more active than the (*E*)-polymethoxy stilbenes. One exception may occur for compound **9**, but the difference is within the SD range of compound **6**. Conversely, (*E*)-resveratrol (**1**) is significantly more active than (*Z*)-resveratrol (**2**) notwithstanding that both showed a similar affinity for the tubulin pocket (similar IC<sub>50</sub> values calculated from docking). These data are in agreement

with our previous assumptions [15], i.e., that the mechanism of the antiproliferative activity of resveratrol seems to be different from that of polymethoxy-stilbenes, the latter probably being related to inhibition of tubulin.

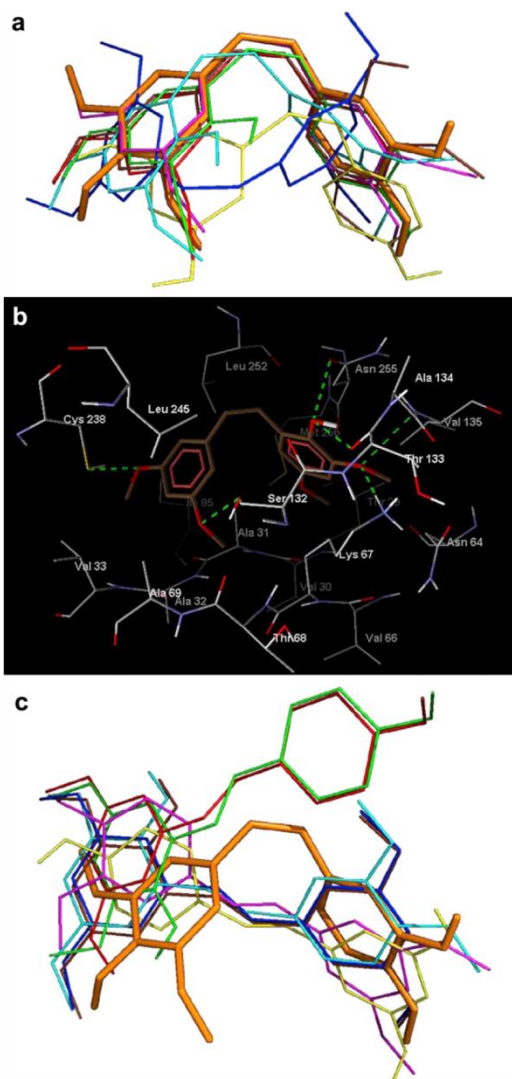
- Among (*Z*)-polymethoxy stilbenes, 3,5,4'-trimethoxystilbene (**4**) is confirmed to be the most active compound by far. This result is also in perfect agreement with the data of Schneider et al. [19], who reported an IC<sub>50</sub> = 0.23  $\mu\text{M}$  versus SW480 cells for **4**. This is partly in agreement with our docking results, indicating that compound **4** integrated well within the tubulin hydrophobic pocket but with a lower score than compounds **6**, **10**, and **12**. Nevertheless, **6** was (relative to **4**) scarcely hydrophobic (see calculated log *D* values) and this could explain the difference between tubulin fitting and *in vitro* activity: scarcely hydrophobic compounds (like resveratrol itself) could not reach the hydrophobic pocket of tubulin, regardless of their docking "score". Compound **4** was also more hydrophobic than **10** and **12**, and this is probably an important factor to target the tubulin site. Both compounds **6** and **10** were hydroxylated at C-2 and this structural detail seems important for tubulin fitting, but is probably an unfavorable factor in bioassays, perhaps because of easier metabolic conversion or air oxidation. It is known from the literature that **1** has a rapid metabolic conversion [31]. Compound **12** is probably in an intermediate situation, i.e., it has less tubulin affinity but it may be less sensitive to degradation.
- Compounds **8** and **14** were in a similar range of activity, which was partly confirmed by the docking data (Table 3). Analogously, the group of (*E*)-polymethoxy stilbenes with lower activity (**3**, **5**, **7**, **11**, **13**; experimental IC<sub>50</sub> values: 42–100  $\mu\text{M}$ ) do not fit well with the tubulin pocket (calculated IC<sub>50</sub> values: 7–18  $\mu\text{M}$ ).

#### 4. Discussion

We compared two series of molecules starting from (*E*)-stereoisomer and its (*Z*)-counterpart. It must be noted that to date the use of (*Z*)-resveratrol has not been reported. Some of the compounds tested demonstrate much more potencies than the natural parent molecule. Compared with (*E*)-resveratrol, which leads to a cell growth arrest in S phase, the methylated derivatives stop cell proliferation by inducing G<sub>2</sub>/M failures and also a polyploidization of the SW480 cell line. (*E*)-resveratrol derivatives also induce cancer cell apoptosis since sub-G<sub>1</sub> peaks were found during the flow cytometry analysis. Cell polyploidization, which can occur naturally to repair damaged DNA, is induced by all of the methylated compounds. (*Z*)-3,5,4'-trimethoxystilbene (**4**) has been described as an inhibitor of tubulin polymerization [31]. Inhibition leads to mitosis defect and cytokinesis impairment. The destiny of tetraploidy-induced cells is unknown; these cells could still proliferate and become more resistant [32] or die by mitotic catastrophe [33].

The study of synthetic (*E*)-resveratrol derivatives could offer a wide range of compounds that are potentially more active than (*E*)-resveratrol (about 66-fold for **4**), but these molecules seem to have a different way of delaying cancer cell growth.

Our team previously tested similar resveratrol analogs on various tumor cell lines: DU145 (androgen-nonresponsive human prostate cancer), LNCaP (androgen-responsive human prostate cancer tumor), M14 (human melanoma), and KB (human mouth epidermoid carcinoma) [15]. In all cell lines, results indicate a stronger effect of (*E*)-3,5,4'-trimethoxystilbene (**3**) than (*E*)-resveratrol, especially toward DU145 cells. The corresponding (*Z*)-trimethoxy analog **4** was very active toward the KB cell line but with a poor effect on M14 cells.



**Fig. 4.** Computational studies and binding model of (*E*)- and (*Z*)-stilbenes isomers. For part A and C, the binding models for all stilbenes were constructed using the combretastatin model [25] as a template and reference ligand in the binding site. Computational docking was carried out applying the Lamarckian genetic algorithm (LGA) implemented in AutoDock 4.0 [29]. For fine docking, we used the following parameters: grid spacing = 0.261 Å, number of runs = 100, npts = 50–60–50 centered on combretastatin A-4, ga\_num\_evals = 20,000,000, ga\_pop\_size = 150, and ga\_num\_generations = 27,000. A. Superposition of all (*Z*)-stilbene analogues docked at the colchicine-binding site. The docked structure of combretastatin A-4, represented in orange (tube rendering), is inserted for comparison. Only polar hydrogens are represented, for clarity. Ligands are rendered as sticks with the subsequent colour code: **2** yellow, **4** red, **6** green, **8** blue, **10** brown, **12** magenta and **14** cyan. B. Molecular docking result of compound **10** at the colchicine-binding site of tubulin. Only the amino acid residues within 4.5 Å around the inhibitor are shown for clarity. The ligand is represented with the carbon skeleton in brown with the only polar hydrogen. Dotted lines represent hydrogen bonds between ligand and receptor. The numerotation of amino acid residues is decremented by 3 unit for subunit A and 56 for subunit B respect to the original PDB file due to the strong manipulation and multiple file format conversions experienced. C. Superposition of all (*E*)-stilbene analogues docked at the colchicine-binding site. The docked structure of combretastatin A-4, represented in orange (tube rendering), is inserted for comparison. Only polar hydrogens are represented, for clarity. Ligands are rendered as sticks with the subsequent colour code: **1** yellow, **3** red, **5** green, **7** blue, **9** brown, **11** magenta and **13** cyan. [For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.]

Szekeres's group [34] reported on the influence of several (*E*)-resveratrol analogs on HT29 human colon cancer cell proliferation inhibition and apoptosis, and some results are similar to those obtained by our group, i.e., the poor effect of (*E*)-3,5,3',4'-tetramethoxystilbene (**11**) and blockade on G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>. Other results are conflicting; a strong effect of (*E*)-3,5,4'-trimethoxystilbene (**3**) on HT29 cells and a weaker effect on SW480 cells (our data). More generally, methylated resveratrol analogs, although nonantioxidant molecules, have a stronger effect than the parent molecule. Indeed, they inhibit the human tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor nuclear factor kappa B [35].

In summary, while (*E*)-resveratrol is considered to be a promising molecule for fighting cancer [36], synthetic resveratrol analogs could offer a wide range of compounds that are potentially more active than (*E*)-resveratrol. These molecules seem to have a different way of delaying cancer cell growth. Resveratrol inhibits cells in S phase, while most of the other synthetic derivatives stop mitosis or block it in an unknown manner (**7**, **9**, **11**, **13**). We can consider that these methylated derivatives, which are prevented from any hydroxyl group-conjugation dependency, would be less metabolized than resveratrol and potentially more bioavailable. Indeed, we have observed (unpublished results) limited metabolism of **4** after incubation with the SW480 cell line. Moreover, recent results from Lin and Ho [37,38] are in agreement with this statement, since they reported that the pharmacokinetics of (*E*)-3,5,4'-trimethoxystilbene (**3**) and (*E*)-3,5,3',4'-tetramethoxystilbene (**11**) in rat plasma are much slower than those of (*E*)-resveratrol, i.e., greater plasma exposure, longer elimination exposure, and lower clearance. In addition, the stronger effect of (*Z*)-methoxy derivatives with respect to their (*E*)-isomers is not related to the lack of an antioxidative effect (disappearance of hydroxyl groups) but is probably due to a steric-dependent mechanism leading to interference in different pathways as compared to the *trans* derivatives.

We learned of the recent work of Li et al. [39], while our work was just being completed and submitted. This work reports the effect of a pentamethoxy resveratrol derivative and the analysis of its apoptotic properties. Although from our respective analogs the (*Z*)-methoxy derivatives have both microtubule targets, our present paper does not have the same objective since our goal was the analysis of a structure–function relationship using a large series of analog (*E*)- and (*Z*)-derivatives, especially by combining experimental data and an original docking approach. Moreover, in our cell model and molecules we did not detect a strong apoptosis but a strong polyploidy (see Fig. 2).

With regard to the docking work, it is noteworthy that the adopted procedure, consisting in the extrusion of colchicine from the tubulin binding site, reconstruction of protein deficiencies (lacking in amino acid residues, hydrogen bondings, hydrogen orientations, etc.), restoring the appropriate ligand (combretastatin A-4), molecular mechanic minimization of the whole system, and, finally, submission to the AutoDock docking program [40], allowed us to obtain a model that was able to reproduce the IC<sub>50</sub> experimental values of other combretastatin analogs also reported in the literature with a high grade of precision that is, to our knowledge, the best obtained to date using docking methodology. Although the results obtained do not always coincide with the antitumoral activity, this is probably attributable to the ADME implications and not to the mechanism of actions. Then the described procedure results in a new valid approach for determining a potential tubulin ligand in the colchicine-binding site.

**Table 3**

Ranked comparison between binding models of compounds **1–14** to tubulin, cell proliferation inhibition potencies and log *D* values.

Compound <sup>a</sup>	Calculated tubulin IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	Experimental IC <sub>50</sub> range values (μM) <sup>c</sup>	Calculated log <i>D</i>
<b>10</b>	1.69	5–9	3.88
<b>6</b>	2.18	16–20	3.56
<b>12</b>	3.00	7.5–11.5	3.98
<b>4</b>	3.16	0.26–0.34	4.32
<b>2</b>	4.66	78–102	3.02
<b>1</b>	4.90	17–23	3.02
<b>14</b>	5.80	8–12	3.23
<b>9</b>	7.23	15–19	3.88
<b>7</b>	7.23	41–55	4.64
<b>8</b>	8.27	11–15	4.64
<b>3</b>	9.96	46–62	4.31
<b>5</b>	10.48	37–49	3.56
<b>11</b>	11.79	85–115	3.98
<b>13</b>	18.30	39–45	3.23

<sup>a</sup> Compounds are listed in decreasing order of calculated tubulin IC<sub>50</sub> values.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub> values calculated from docking and referred to tubulin inhibition.

<sup>c</sup> Range values determined on the basis of SW480 cell growth IC<sub>50</sub> values ± SD.

## 5. Conclusions

- 1- The relatively weak effect of (*E*)-RSV is not exclusively attributable to its high metabolic rate and efflux, since the masking of hydroxyl groups by methylation does not significantly improve the resveratrol analog efficacy;
- 2- The *Z* configuration does not enhance resveratrol efficacy since its potency is weaker than that of the isomer with the *E* configuration;
- 3- In contrast to the preceding statement (#2), the *Z* configuration associated with the substitution of hydroxyl groups by methoxyl groups is crucial and leads to potent inhibition efficacy;
- 4- Following the preceding statement (#3) the strong efficacy of the (*Z*)-3,5,4'-trimethoxystilbene **4** would also be associated with the molecule's poor cell metabolism;
- 5- The presence of more than three methoxyl groups on the (*Z*)-resveratrol core structure does not enhance resveratrol analog efficacy but rather gives it a weaker effect;
- 6- The presence of a new hydroxyl group on tri-methylated (*Z*)-resveratrol analogs dramatically decreases the inhibitory potency;
- 7- Concerning the inhibitory mechanism, the presence of methoxyl groups, whichever resveratrol isomer (*E*-), (*Z*-) is considered, induces cell polyploidy resulting from the blockade of cell divisions at the mitosis level;
- 8- The relationship between spatial conformations of resveratrol analogs and their effect fits quite well with docking studies where almost all of the docked structures of (*Z*)-polymethoxy isomers overlap substantially with the docked structure of combretastatin A-4 (**15**), taken as reference ligand, to bind at the colchicine–tubulin binding site, while most of the (*E*)-polymethoxy isomer counterparts fit between them but not with combretastatin.

## Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare.

## Acknowledgements

This study was supported by BIVB, the Regional Council of Burgundy, the Cancer League of Côte d'Or and Jura, INSERM U866, CNRS, UMR 5260, MIUR, Ministero dell'Università e della Ricerca (PRIN 2007, Rome, Italy), and Università degli Studi di Catania, (PRA, Catania, Italy). We thank Mrs. Linda Northrup for the improvement of English.

## Appendix. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found in the on-line version, at doi:10.1016/j.ejmech.2010.03.024.

## References

- [1] M. Jang, L. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W. Beecher, et al., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275 (1997) 218–220.
- [2] D. Delmas, P. Passilly-Degrace, B. Jannin, M.C. Malki, N. Latruffe, Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells. *Int. J. Mol. Med.* 10 (2002) 193–199.
- [3] D. Delmas, B. Jannin, M.C. Malki, N. Latruffe, Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines. *Oncol. Rep.* 7 (2000) 847–852.
- [4] D. Delmas, C. Rebe, S. Lacour, R. Filomenko, A. Athias, P. Gambert, et al., Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1482–1490.
- [5] D. Delmas, C. Rebe, O. Mischeau, A. Athias, P. Gambert, S. Grazide, et al., Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 23 (2004) 8979–8986.
- [6] S. Fulda, K.M. Debatin, Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 23 (2004) 6702–6711.
- [7] A.R. Jazirehi, B. Bonavida, Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 3 (2004) 71–84.
- [8] I. Zoberi, C.M. Bradbury, H.A. Curry, K.S. Bisht, P.C. Goswami, J.L. Roti Roti, et al., Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines. *Cancer Lett.* 175 (2002) 165–173.
- [9] X. Xu, H.J. Wang, P.A. Murphy, L. Cook, S. Hendrich, Daidzein is a more bioavailable soy milk isoflavone than is genistein in adult women. *J. Nutr.* 124 (1994) 825–832.
- [10] P.C. Hollman, J.M. van Trijp, M.N. Buysman, M.S. van der Gaag, M.J. Mengelers, J.H. de Vries, et al., Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 418 (1997) 152–156.
- [11] M.J. Lee, Z.Y. Wang, H. Li, L. Chen, Y. Sun, S. Gobbo, et al., Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4 (1995) 393–399.
- [12] D. Colin, A. Gimazane, G. Lizard, J.C. Izard, E. Solary, N. Latruffe, et al., Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5-fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 124 (2009) 2780–2788.
- [13] D. Colin, A. Lancon, D. Delmas, G. Lizard, J. Abrossinow, E. Kahn, et al., Anti-proliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie* 90 (2008) 1674–1684.
- [14] A.K. Marel, G. Lizard, J.C. Izard, N. Latruffe, D. Delmas, Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (2008) 538–548.
- [15] V. Cardile, R. Chillemi, L. Lombardo, S. Sciuto, C. Spatafora, C. Tringali, Anti-proliferative activity of methylated analogues of *E*- and *Z*-resveratrol. *Z. Naturforsch. C* 62 (2007) 189–195.
- [16] M. Roberti, D. Pizzirani, D. Simoni, R. Rondanin, R. Baruchello, C. Bonora, et al., Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogues as apoptosis-inducing agents. *J. Med. Chem.* 46 (2003) 3546–3554.
- [17] G.R. Pettit, M.P. Grealish, M.K. Jung, E. Hamel, R.K. Pettit, J.C. Chapuis, et al., Antineoplastic agents. 465. Structural modification of resveratrol: sodium resverastatin phosphate. *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2534–2542.
- [18] R. Chillemi, S. Sciuto, C. Spatafora, C. Tringali, Anti-tumor properties of stilbene-based resveratrol analogues: recent results. *Nat. Prod. Commun.* 2 (2007) 1–15.
- [19] Y. Schneider, P. Chabert, J. Stutzmann, D. Coelho, A. Fougereuse, F. Gosse, et al., Resveratrol analog (*Z*)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *Int. J. Cancer* 107 (2003) 189–196.
- [20] C. Spatafora, G. Basini, L. Baioni, F. Grasselli, A. Sofia, C. Tringali, Antiangiogenic resveratrol analogues by mild *m*-CPBA aromatic hydroxylation of 3,5-dimethoxystilbenes. *Nat. Prod. Commun.* 4 (2009) 239–246.
- [21] M. Deak, H. Falk, On the chemistry of the resveratrol diastereomers. *Monatsh. Chem.* 134 (2003) 883–888.
- [22] Atsuya Momotake, Mayuko Ud, Tatsuo Arai, Photochemical cyclisation reaction in *cis*-tetramethoxystilbene. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 158 (2003) 7–12.
- [23] M. Gao, M. Wang, K. Miller, G. Sledge, G. Hutchins, Q. Zhang, Synthesis of radiolabelled stilbene derivative a new potential PET probe for arylhydrocarbon receptor in cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 5767–5772.
- [24] D. Koh, K.H. Park, J. Jung, Mok KH Yang, Y. Lim, Spectral assignments and reference data NMR spectra of resveratrol derivatives complete assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C. *Magn. Reson. Chem.* 39 (2001) 768–770.

- [25] N.H. Nam, Combretastatin A-4 analogues as antimetabolic antitumor agents. *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 1697–1722.
- [26] R.B. Ravelli, B. Gigant, P.A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, et al., Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 428 (2004) 198–202.
- [27] T.L. Nguyen, C. McGrath, A.R. Hermone, J.C. Burnett, D.W. Zaharevitz, B.W. Day, et al., A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 6107–6116.
- [28] S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall 3rd, P.I. de Bakker, J.M. Word, M. G. Prisant, et al., Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins* 50 (2003) 437–450.
- [29] J. Gasteiger, M. Marsili, A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* 34 (1978) 3181–3184.
- [30] W. Cornell, P. Cieplak, C. Bayly, I. Gould, K. Merz Jr., D. Ferguson, et al., A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 3–13.
- [31] N. Seiler, Y. Schneider, F. Gosse, R. Schleiffer, F. Raul, Polyploidisation of metastatic colon carcinoma cells by microtubule and tubulin interacting drugs: effect on proteolytic activity and invasiveness. *Int. J. Oncol.* 25 (2004) 1039–1048.
- [32] J. Erenpreisa, M. Kalejs, M.S. Cragg, Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution. *Cell Biol. Int.* 29 (2005) 1012–1018.
- [33] S. Mansilla, W. Priebe, J. Portugal, Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Cell Cycle* 5 (2006) 53–60.
- [34] P. Saiko, M. Pemberger, Z. Horvath, I. Savinc, M. Grusch, N. Handler, et al., Novel resveratrol analogs induce apoptosis and cause cell cycle arrest in HT29 human colon cancer cells: inhibition of ribonucleotide reductase activity. *Oncol. Rep.* 19 (2008) 1621–1626.
- [35] J.J. Heynekamp, W.M. Weber, L.A. Hunsaker, A.M. Gonzales, R.A. Orlando, L. M. Deck, et al., Substituted trans-stilbenes, including analogues of the natural product resveratrol, inhibit the human tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor nuclear factor kappaB. *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7182–7189.
- [36] J.A. Baur, D.A. Sinclair, Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 493–506.
- [37] H.S. Lin, P.C. Ho, A rapid HPLC method for the quantification of 3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene (TMS) in rat plasma and its application in pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 387–392.
- [38] H.S. Lin, C. Tringali, C. Spatafora, C. Wu, P.C. Ho, A simple and sensitive HPLC-UV method for the quantification of piceatannol analog 3,5,3',4'-tetramethoxy-trans-stilbene in rat plasma and its application for a pre-clinical pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 679–684.
- [39] H. Li, W.K. Wu, Z. Zheng, C.T. Che, L. Yu, Z.J. Li, Y.C. Wu, K.W. Cheng, J. Yu, C. H. Cho, M. Wang, 2,3',4,4',5'-Pentamethoxy-trans-stilbene, a resveratrol derivative, is a potent inducer of apoptosis in colon cancer cells via targeting microtubules. *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 1224–1232.
- [40] G. Morris, D. Goodsell, R. Halliday, R. Huey, W. Hart, R. Belew, et al., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662.

## C. Discussion sur l'article et les nouveaux travaux parus depuis notre publication

Cette étude nous a permis de mettre en évidence des mécanismes d'action différents entre, d'une part, les analogues hydroxylés du *trans*-resvératrol, et d'autre part, les dérivés méthoxylés de configuration *cis*-. Ces derniers semblent agir d'une manière similaire à la combretastatine A-4 qui est le ligand de référence sur le site de liaison à la colchicine-tubuline.

Le 3,4',5-triméthoxy-*cis*-stilbène en particulier, qui présente des effets *in vitro* très puissants dans notre étude et dans d'autres, se révèle en revanche assez peu actif *in vivo* contrairement au 3,4',5-triméthoxy-*trans*-stilbène (Paul et coll., 2010) qui dans notre modèle se révélait d'une efficacité antiproliférative inférieure à celle du resvératrol. Ce même 3,4',5-triméthoxy-*trans*-stilbène semble néanmoins impliquer des mécanismes différents du resvératrol (Hsieh et coll., 2011) pouvant en particulier favoriser l'apoptose des cellules cancéreuses.

La présence de groupements en *para*- étant souvent présentée comme prépondérante dans les effets attribuables aux différents analogues de configuration *trans*- du resvératrol, les molécules portant des groupements hydroxyles ou méthoxyles en positions 4 ou 4' font l'objet d'attentions particulières. C'est le cas du 3,4,5,4'-tetraméthoxy-*trans*-stilbène (DMU-212) et de ses dérivés produits *in vivo* par déméthylations et hydroxylation (Androutsopoulos et coll., 2011). La présence de ces groupements méthoxyles en 4 ou 4' se montre effectivement déterminante pour l'activité anti-tumorale du stilbène. D'autres études se sont également portées sur un autre composé particulièrement actif *in vivo* : le 3,4,5,3',4',5'-hexahydroxy-*trans*-stilbène (M8) (Szekeres et coll., 2010).

Les études comparatives entre le resvératrol et ses dérivés naturels ou synthétiques sont donc toujours d'actualité et apportent de nombreuses pistes dans les stratégies de lutte contre le cancer (Weng et Yen, 2011).



**PARTIE IV : DISCUSSION, CONCLUSIONS  
GENERALES ET PERSPECTIVES**

## **A. Le vin, un aliment à part ou une part de l'alimentation ?**

Il est communément admis que pour être en bonne santé, il faut manger sainement. L'intérêt de la population pour une alimentation saine est évident au vu des nombreuses publications de tous types traitant de nutrition ou diététique (Willett et coll., 2001). Parmi les aliments qui sont mis en avant, on retrouve le vin, que ce soit pour le promouvoir ou le critiquer. Le vin a ainsi été considéré depuis les débuts de la civilisation comme un aliment bénéfique pour la santé, voire même un médicament (Lucia, 1972).

### **1. L'intérêt d'un apport en vin**

Le vin représente un apport important d'antioxydants et antiradicaux libres, et ce, même durant l'hiver où ils font normalement défaut. Le vin est principalement consommé par plaisir et comme élément de convivialité. Il peut être aussi un apport énergétique. Mais le bénéfice indirect d'une telle consommation était dans les temps anciens de palier la carence en fruits et légumes en dehors des saisons cultivables. En cela on peut considérer la consommation de vin comme un apport nutritionnel utile. Aujourd'hui, dans les pays riches on peut trouver des sources d'antioxydants même en dehors des périodes cultivables grâce à l'apport des technologies, les cultures sous serre, ou le commerce international. Néanmoins, c'est dans nos pays qu'on retrouve les taux les plus élevés de cancers du côlon (Figure 7), dont la cause est principalement due à une alimentation mal équilibrée et à la présence de mutagènes dans les aliments (Goldman et Shields, 2003; Sutandyo, 2010). Un apport supplémentaire de polyphénols au travers du vin ne peut donc pas être inutile.

### **2. Contexte nutritionnel**

Les bénéfices d'une consommation modérée de vin rouge sur la santé sont à considérer au sein d'une alimentation complète. Ainsi le vin fait partie à part entière du régime méditerranéen (Hu, 2003) qui est également riche en légumes, fruits, graines et huile d'olive. Ces aliments sont en particulier des sources importantes de composés phénoliques divers. Le vin blanc pourrait également être à prendre en considération, son pouvoir cardioprotecteur tout du moins, dû au tyrosol, ayant été jugé comparable à celui du

resvératrol (Dudley et coll., 2008). En France, les principales sources de polyphénols dans l'alimentation sont les pommes et pommes de terre (Brat et coll., 2006). On l'a vu, les polyphénols du vin sont capables d'interagir entre eux, mais si l'on replace la consommation de vin dans le contexte d'une alimentation normale, il convient donc de tenir compte également de tous les autres composés apportés par les autres aliments. Tous ces végétaux sont en effet riches en composés bioactifs comme les polyphénols, mais aussi d'autres tels que les fibres ou les acides gras polyinsaturés. Ces molécules sont classées comme bioactives du fait de leurs actions sur l'organisme et présentent pour beaucoup un rôle dans la prévention de nombreuses maladies (Kris-Etherton et coll., 2002). Plusieurs composés phénoliques ont montré des effets chimiopréventifs avérés contre les tumeurs primaires ou les métastases (Weng et Yen, 2011). En plus de pouvoir agir côte-à-côte, certaines combinaisons de polyphénols peuvent montrer des effets synergiques. Par exemple, l'acide ellagique, polyphénol présent dans de nombreux aliments (châtaignes, framboises, fraises, canneberges, noix, noix de pécan, grenades, ...), est capable d'agir en synergie avec la quercétine pour limiter la prolifération et induire l'apoptose de cellules leucémiques humaines MOLT-4 (Mertens-Talcott et coll., 2003). Ce mécanisme impliquant une activation de la voie p21<sup>waf1/cip1</sup> / p53 / MAPK (Mertens-Talcott et Percival, 2005).

### 3. Le vin, boisson alcoolisée

Si les polyphénols du vin rouge ont montré des effets protecteurs contre le cancer, il semble établi que l'éthanol en est un facteur principalement aggravant à partir d'une dose équivalente à deux à trois verres de vin par jour (Guo et Ren, 2010) et peut-être à partir de doses inférieures à un seul verre de vin par jour pour les cancers du sein comme le suggère une étude d'observation prospective récente (Chen et coll., 2011). Cette dernière étude a néanmoins été immédiatement remise en question (Narod, 2011), principalement du fait que les effets protecteurs d'une consommation modérée (2 verres par jour) de vin rouge contre l'athérosclérose et le cancer apportent une amélioration significative de l'espérance de vie (Renaud et coll., 1998). Si les effets délétères d'une forte consommation semblent évidents, il reste discutable qu'une consommation modérée de vin protège efficacement contre le cancer de manière générale. Des tests *in vivo* chez la souris ont néanmoins mis en évidence que les effets néfastes de l'éthanol sur certains paramètres neurologiques ne sont

pas observés avec une consommation de vin à quantité d'éthanol équivalente (Fiore et coll., 2009) et même qu'une consommation modérée de vin avait des effets protecteurs contre la démence chez les personnes âgées (Orgogozo et coll., 1997). Les inconvénients de l'éthanol sont donc minimisés lorsqu'il est dans le vin, ses effets néfastes étant neutralisés par les effets antioxydants des polyphénols (Opie et Lecour, 2007). Inversement il semble possible que les bénéfices santé d'une consommation de vin puissent ne pas être optimaux du fait de l'éthanol.

Remarque : La teneur en alcool des vins semble être amenée à augmenter selon les prévisions de réchauffement climatique. Cette augmentation de degré alcoolique n'est donc pas souhaitable sur le plan médical, mais également sur le plan commercial, les vins légers étant de plus en plus plébiscités. En effet les consommateurs sont de plus en plus attirés par les vins à faible teneur alcoolique, pour de nombreuses raisons. Premièrement par goût, Constant Bourquin, membre fondateur de l'Académie Internationale du Vin déclarait même : « *Je vois un certain avantage et même un avantage certain à n'aimer le vin que par gourmandise et, par conséquent, à n'être point du tout attiré (et c'est mon cas) par l'alcool. S'il était possible qu'un bon vin fût l'équivalent de ce qu'il est sans contenir de l'alcool, sans hésiter, je serais amateur de ce vin-là. Or le vin n'est vin qu'en raison de sa teneur naturelle en alcool. Alors, je m'incline et me fais une raison. Sentiment que je pourrais exprimer à la façon d'Anatole France : Hélas, volontiers* ». Ensuite pour des raisons économiques avec d'une part des taxes de plus en plus pressantes, et d'autre part des répressions de plus en plus contraignantes pour les conducteurs, l'industrie du vin pourrait donc être amenée dans un avenir proche à repenser les procédés de vinification afin de réduire la teneur en alcool des vins. Plusieurs approches sont ainsi possibles (limiter la fermentation, utiliser des levures à faibles capacités fermentaires, diminuer la température, éliminer les sucres avant la fermentation ou éliminer l'éthanol par osmose-inverse), mais aucune de ces techniques n'a pour l'instant permis d'obtenir de vins rouges de qualité suffisante pour pouvoir envisager une alternative aux vins à teneur alcoolique supérieure à 10%. Les vins peu alcoolisés ou désalcoolisés ainsi produits sont en effet souvent peu agréables en bouche et amers.

#### 4. Apport de nos résultats dans cette problématique

Nos tests *in vivo* chez la souris utilisaient un concentré de vin incorporé dans l'alimentation. Dépourvu d'éthanol, ces concentrés de vins n'ont pas montré de modifications significatives de prise de poids des animaux. Il pourrait être intéressant d'observer les effets d'un tel traitement sur des animaux souffrant de problèmes de stockage des graisses ou soumis à des régimes riches en graisses et sucres. En effet le resvératrol a depuis peu été décrit comme pouvant rétablir à la normale un métabolisme des lipides dérégulé (Baur et coll., 2006; Feige et coll., 2008; Dal-Pan et coll., 2010). L'obésité étant liée aux processus inflammatoires, il est logique de penser que les polyphénols du vin rouge pourraient également agir contre les maladies métaboliques (Chuang et McIntosh, 2011).

Une étude clinique menée par notre laboratoire (Rifler et coll., 2011) montre un effet préventif secondaire réel d'une consommation modérée de vin rouge de Bourgogne sur plusieurs paramètres sanguins liés aux maladies cardiovasculaires. Les patients inclus dans cette étude avaient tous soufferts d'infarctus du myocarde. Ils ont également reçu un régime de type méditerranéen. Comparé au groupe témoin ne buvant que de l'eau, le groupe recevant 250 mL de vin rouge par jour présente, après seulement deux semaines de suivi, un taux de cholestérol diminué, en particulier en ce qui concerne les LDL, une augmentation de leur statut antioxydant sanguin, et une meilleure fluidité membranaire des érythrocytes.

## B. La chimioprévention du cancer par les composés phénoliques du vin

Parmi les composés phénoliques du vin rouge, plusieurs molécules ont montré des capacités chimiopréventives ou tout du moins des actions positives à différents niveaux de la carcinogénèse (initiation, promotion, progression) ou même la capacité à limiter en amont l'action des carcinogènes sur les cellules saines. Ainsi le resvératrol en particulier a été le sujet de nombreuses études concluant qu'il représente un agent chimiopréventif puissant (Liu et coll., 2007) capable d'induire l'apoptose spécifiquement des cellules cancéreuses,

tout en en protégeant les cellules saines (Baarine et coll., 2011). Mais c'est également le cas d'autres molécules telles que l'acide gallique (Giftson Senapathy et coll., 2011) ou la quercétine (Lee et coll., 2008). Ces effets préventifs sont néanmoins très variable *in vitro* et à *fortiori in vivo* (Soleas et coll., 2001).

### 1. Combinaisons de molécules bioactives

Si de nombreux effets bénéfiques de ces composés isolés sont démontrés, ils restent relativement modestes après ingestion. Par exemple, plusieurs polyphénols ont été montrés comme capables d'inhiber CYP1A1, une enzyme de phase I du métabolisme des xénobiotiques, mais à des doses de plusieurs  $\mu\text{M}$  (Schwarz et Roots, 2003). Un moyen d'augmenter cette efficacité pourrait consister à administrer des combinaisons de polyphénols (Russo, 2007). Des études ont montré des interactions positives voir synergiques entre certaines molécules, comme nous avons également pu le voir avec la combinaison de resvératrol et de quercétine en particulier.

Si des combinaisons de deux ou trois composés peuvent s'avérer efficaces en chimioprévention, des combinaisons d'un grand nombre de composés peuvent représenter une approche encore plus optimale. Néanmoins, comme on l'a vu, il est difficile d'établir une cartographie exhaustive des interactions des mécanismes d'actions de ces polyphénols, et créer des mélanges de toute pièce s'avère extrêmement complexe. L'approche la plus logique est alors de partir de mélanges complexes préexistants et éventuellement d'en optimiser les effets anti-carcinogènes en modulant les concentrations spécifiques de certains polyphénols clés uniquement. L'un des mélanges naturels qui présente les efficacités chimiopréventives les plus importantes est le vin rouge (He et coll., 2008), mais on peut également citer les extraits de peau de raisin (Hudson et coll., 2007), les extraits de pépins de raisin (Velmurugan et coll., 2010), les extraits de chardon-Marie (*Silybum marianum*) ou *Ginkgo biloba* (El Mesallamy et coll., 2011). Des extraits de pépins de raisin artificiellement enrichis en resvératrol présentent une activité pro-apoptotique particulièrement importante sur des cellules de cancer colorectal (Radhakrishnan et coll., 2011).

Notre concentré de vin de Bourgogne à également été capable de protéger contre la survenue de lésions pré-néoplasiques coliques chez la souris. En particulier il diminue le

nombre de foyers de cryptes aberrantes et surtout celles de grandes tailles qui sont considérés comme de bons indicateurs de cancérogenèse.

A l'heure actuelle la meilleure approche de chimioprévention qui puisse être proposée reste la plus simple : avoir une alimentation saine, variée et riche en polyphénols (Scalbert et coll., 2005).

## **2. Modifications chimiques des composés phénoliques**

Apporter des modifications de la structure chimique des polyphénols peut être une voie prometteuse pour en pallier les lacunes. Ainsi le resvératrol présente normalement une biodisponibilité faible, inférieure à celle du ptérostilbène, son dérivé naturel le plus proche qui est également un agent chimiopréventif (Rimando et coll., 2002). L'ajout de groupements méthoxyles permet donc de gagner en biodisponibilité mais en modifiant potentiellement l'activité antitumorale. Partant de ce constat, de nombreux analogues du resvératrol ou d'autres composés aromatiques ont été synthétisés, ajoutant des groupements méthoxyles, acétoxyles, hydroxyles ou autres sur les cycles phénoliques. Ces divers groupements permettent notamment de réduire l'hydrophobicité des molécules. Cette approche a permis de développer un grand nombre de substances médicamenteuses telles que des inhibiteurs de Cdc25 basés sur des coumarines (Valente et coll., 2010), des agents antiprolifératifs dérivés de l'épicatchine-3-gallate (Sanchez-del-Campo et coll., 2008) ou des analogues du resvératrol (Saiko et coll., 2008) tels que ceux sur lesquels nous avons travaillé (Mazue et coll., 2010).

Des modifications structurelles de différents polyphénols peuvent également être produits par les cellules via le métabolisme des xénobiotiques et présenter des effets anticancéreux potentiellement importants. Il est même possible que certains de ces métabolites soient plus actifs biologiquement que les molécules dont ils dérivent (Forester et Waterhouse, 2009). C'est dans l'optique de la compréhension de l'activité anticancéreuse des métabolites du resvératrol que certains tests sont actuellement menés au sein de notre laboratoire.

## C. Conclusion générale et perspectives

Au travers de ces travaux nous avons évalué la capacité globale des polyphénols du vin rouge à inhiber la prolifération de cellules de cancer colique ou hépatique ainsi que leur impact sur le métabolisme d'un polyphénol en particulier : le resvératrol. Des concentrés et extraits de vins rouges de Bourgogne ayant des temps de macération et des millésimes différents ont tous montré des activités antiprolifératives dose-dépendantes et qualitative-dépendante *in vitro* sur des lignées de cellules de cancer colorectal. Dans certaines conditions, nous avons également montré qu'une combinaison de polyphénols de vin et de resvératrol était plus antiproliférative que des traitements par l'un ou l'autre séparément. Cette additivité s'est révélée ne pas suivre un schéma simple mais être la somme d'interactions entre différents polyphénols, qu'il s'agisse de synergie (resvératrol et quercétine) ou d'additivité partielle, voir même d'antagonismes (catéchine avec resvératrol et quercétine). L'un des mécanismes pouvant être impliqué dans ces interactions concerne la modulation des transports membranaires de polyphénols et de leur métabolisation par les cellules. Nous avons également pu mettre en évidence de possibles effets préventifs des polyphénols du vin sur l'apparition de foyers précancéreux intestinaux chez l'animal. La complexité de ces interactions et les nombreux mécanismes intracellulaires impliqués pour l'ensemble des polyphénols du vin rouge suggèrent un schéma d'action difficilement prévisible. En plus de l'action des polyphénols directement présents dans le vin, il faut aussi prendre en considération les effets des métabolites produits par les cellules par la voie des enzymes de détoxification des xénobiotiques.

Les études entreprises durant cette thèse ont fait ressortir certains points qu'il faut désormais tenter de préciser. En particulier il conviendra de continuer l'étude concernant les effets modulateurs des polyphénols de vin rouge sur le métabolisme de détoxification du resvératrol au niveau des phases II et III.

Ainsi la poursuite des dosages de quantités de resvératrol métabolisé par les cellules SW480 et HepG2 semble à notre avis la première priorité. Les tests préliminaires nous ayant permis de valider notre protocole de détection, et d'observer une tendance à une diminution de la métabolisation du resvératrol en présence de vin, des tests plus poussés s'avèrent



réalisables et souhaitables. Afin de quantifier ces métabolites de manière précise, il conviendra dans un premier temps d'effectuer des gammes étalons avec les standards des différents dérivés du resvératrol.

L'étude des enzymes de phase III au niveau cellulaire sera également poursuivie au cours des prochains mois. Des qPCR permettront d'évaluer les modifications des niveaux d'expressions des enzymes des phases II et III. Des westerns blottings (transferts de protéines et immunodécoration) permettront d'évaluer les quantités relatives de ces différentes enzymes.

Concernant l'étude *in vivo* utilisant les concentrés de vins de Bourgogne, la présence de polyphénols dans le sang et dans les tissus des animaux sera recherchée par dosage de Folin-Ciocalteu et éventuellement par HPLC. Des qPCR seront également effectuées pour étudier l'expression de certains gènes impliqués dans la cancérogenèse ou le métabolisme de détoxification des xénobiotiques au niveau des tissus coliques et hépatiques. A plus long terme, une autre étude pourrait être envisagée avec un nombre plus élevé d'animaux et sur des durées plus longues qui permettraient l'apparition de lésions pré-néoplasiques plus avancées voir même d'adénocarcinomes.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## A

Abraham, J., Balbo, S., Crabb, D. et Brooks, P. J. (2011). "Alcohol Metabolism in Human Cells Causes DNA Damage and Activates the Fanconi Anemia-Breast Cancer Susceptibility (FA-BRCA) DNA Damage Response Network." Alcohol Clin Exp Res **35**(12): 1-8.

Abraham, J. et Johnson, R. W. (2009). "Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice." Rejuvenation Res **12**(6): 445-53.

Afaq, F., Syed, D. N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M. H., Khan, N., Zaid, M. A. et Mukhtar, H. (2007). "Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis." J Invest Dermatol **127**(1): 222-32.

Al-Halabi, R., Bou Chedid, M., Abou Merhi, R., El-Hajj, H., Zahr, H., Schneider-Stock, R., Bazarbachi, A. et Gali-Muhtasib, H. (2011). "Gallotannin inhibits NFkB signaling and growth of human colon cancer xenografts." Cancer Biol Ther **12**(1): 59-68.

Androutsopoulos, V. P., Ruparelia, K. C., Papakyriakou, A., Filippakis, H., Tsatsakis, A. M. et Spandidos, D. A. (2011). "Anticancer effects of the metabolic products of the resveratrol analogue, DMU-212: structural requirements for potency." Eur J Med Chem **46**(6): 2586-95.

Aron, P. M. et Kennedy, J. A. (2007). "Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir during fermentation." J Agric Food Chem **55**(14): 5670-80.

Atkinson, E. et Hazleton, E. O. (1922). "A Qualitative Tannin Test." Biochem J **16**(4): 516-7.

## B

Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Altieri, A. et Coglianò, V. (2007). "Carcinogenicity of alcoholic beverages." Lancet Oncol **8**(4): 292-3.

Baarine, M., Thandapilly, S. J., Louis, X. L., Mazue, F., Yu, L., Delmas, D., Netticadan, T., Lizard, G. et Latruffe, N. (2011). "Pro-apoptotic versus anti-apoptotic properties of dietary resveratrol on tumoral and normal cardiac cells." Genes Nutr **6**(2): 161-9.

Barbe, J. C., De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A. et Lonvaud-Funel, A. (2001). "Role of botrytized grape micro-organisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena." J Appl Microbiol **90**(1): 34-42.

Barnard, H., Dooley, A. N., Areshian, G., Gasparyan, B. et Faull, K. F. (2011). "Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands." Journal of Archaeological Science **38**(5): 977-84.

Baron, J. A., Beach, M., Mandel, J. S., van Stolk, R. U., Haile, R. W., Sandler, R. S., Rothstein, R., Summers, R. W., Snover, D. C., Beck, G. J., Bond, J. H. et Greenberg, E. R. (1999). "Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group." N Engl J Med **340**(2): 101-7.

Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R. et Sinclair, D. A. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." Nature **444**(7117): 337-42.

Baur, J. A. et Sinclair, D. A. (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." Nat Rev Drug Discov **5**(6): 493-506.

Beck, F., Guilbert, P. et Gautier, A. (2007). Baromètre santé 2005. St-Denis, Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES): 115.

Beillerot, A., Dominguez, J. C., Kirsch, G. et Bagrel, D. (2008). "Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin." Bioorg Med Chem Lett **18**(3): 1102-5.

Benamouzig, R., Deyra, J., Martin, A., Girard, B., Jullian, E., Piednoir, B., Couturier, D., Coste, T., Little, J. et Chaussade, S. (2003). "Daily soluble aspirin and prevention of colorectal adenoma recurrence: one-year results of the APACC trial." Gastroenterology **125**(2): 328-36.

Bernhard, D., Tinhofer, I., Tonko, M., Hubl, H., Ausserlechner, M. J., Greil, R., Kofler, R. et Csordas, A. (2000). "Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells." Cell Death Differ **7**(9): 834-42.

Bertelli, A., Falchi, M., Dib, B., Pini, E., Mukherjee, S. et Das, D. K. (2008). "Analgesic resveratrol?" Antioxid Redox Signal **10**(3): 403-4.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G. et Gluud, C. (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis." JAMA **297**(8): 842-57.

Bobrowska-Hagerstrand, M., Lillas, M., Mrowczynska, L., Wrobel, A., Shirataki, Y., Motohashi, N. et Hagerstrand, H. (2006). "Resveratrol oligomers are potent MRP1 transport inhibitors." Anticancer Res **26**(3A): 2081-4.

Boden, J. M. et Fergusson, D. M. (2011). "Alcohol and depression." Addiction **106**(5): 906-14.

Boocock, D. J., Faust, G. E., Patel, K. R., Schinas, A. M., Brown, V. A., Ducharme, M. P., Booth, T. D., Crowell, J. A., Perloff, M., Gescher, A. J., Steward, W. P. et Brenner, D. E. (2007). "Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(6): 1246-52.

Boots, A. W., Haenen, G. R. et Bast, A. (2008). "Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical." Eur J Pharmacol **585**(2-3): 325-37.

Boutegrabet, L., Fekete, A., Hertkorn, N., Papastamoulis, Y., Waffo-Teguo, P., Merillon, J. M., Jeandet, P., Gougeon, R. D. et Schmitt-Kopplin, P. (2011). "Determination of stilbene derivatives in Burgundy red wines by ultra-high-pressure liquid chromatography." Anal Bioanal Chem **401**(5): 1513-21.

Brakenhielm, E., Cao, R. et Cao, Y. (2001). "Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes." FASEB J **15**(10): 1798-800.

Brat, P., George, S., Bellamy, A., Du Chaffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N. et Amiot, M. J. (2006). "Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables." J Nutr **136**(9): 2368-73.

Briviba, K., Pan, L. et Rechkemmer, G. (2002). "Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases." J Nutr **132**(9): 2814-8.

Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. et Crozier, A. (2002). "Plant foods and herbal sources of resveratrol." J Agric Food Chem **50**(11): 3337-40.

## C

Caderni, G., De Filippo, C., Luceri, C., Salvadori, M., Giannini, A., Biggeri, A., Remy, S., Cheynier, V. et Dolara, P. (2000). "Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats." Carcinogenesis **21**(11): 1965-9.

Caderni, G., Femia, A. P., Giannini, A., Favuzza, A., Luceri, C., Salvadori, M. et Dolara, P. (2003). "Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis." Cancer Res **63**(10): 2388-92.

Caderni, G., Remy, S., Cheynier, V., Morozzi, G. et Dolara, P. (1999). "Effect of complex polyphenols on colon carcinogenesis." Eur J Nutr **38**(3): 126-32.

Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., Aiello, F. B. et Piantelli, M. (2000). "Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential." Int J Cancer **87**(4): 595-600.

Campagna, M. et Rivas, C. (2010). "Antiviral activity of resveratrol." Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 50-3.

- Castillo-Pichardo, L., Martinez-Montemayor, M. M., Martinez, J. E., Wall, K. M., Cubano, L. A. et Dharmawardhane, S. (2009). "Inhibition of mammary tumor growth and metastases to bone and liver by dietary grape polyphenols." Clin Exp Metastasis **26**(6): 505-16.
- Chan, M. M., Mattiacci, J. A., Hwang, H. S., Shah, A. et Fong, D. (2000). "Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway." Biochem Pharmacol **60**(10): 1539-48.
- Chao, C., Haque, R., Van Den Eeden, S. K., Caan, B. J., Poon, K. Y. et Quinn, V. P. (2010). "Red wine consumption and risk of prostate cancer: the California men's health study." Int J Cancer **126**(1): 171-9.
- Chen, C. K. et Pace-Asciak, C. R. (1996). "Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta." Gen Pharmacol **27**(2): 363-6.
- Chen, W. Y., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A. et Willett, W. C. (2011). "Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk." JAMA **306**(17): 1884-90.
- Chow, H. H., Garland, L. L., Hsu, C. H., Vining, D. R., Chew, W. M., Miller, J. A., Perloff, M., Crowell, J. A. et Alberts, D. S. (2010). "Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study." Cancer Prev Res (Phila) **3**(9): 1168-75.
- Chuang, C. C. et McIntosh, M. K. (2011). "Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases." Annu Rev Nutr **31**: 155-76.
- Cichewicz, R. H., Kouzi, S. A. et Hamann, M. T. (2000). "Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*." J Nat Prod **63**(1): 29-33.
- Clark, W. G. et Geissman, T. A. (1949). "Potentiation of epinephrine effects by flavonoid compounds." Nature **163**(4131): 36.
- Clifford, A. J., Ebeler, S. E., Ebeler, J. D., Bills, N. D., Hinrichs, S. H., Teissedre, P. L. et Waterhouse, A. L. (1996). "Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids." Am J Clin Nutr **64**(5): 748-56.
- Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G., Izard, J. C., Solary, E., Latruffe, N. et Delmas, D. (2009). "Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells." Int J Cancer **124**(12): 2780-8.
- Colin, D., Lancon, A., Delmas, D., Lizard, G., Abrossinow, J., Kahn, E., Jannin, B. et Latruffe, N. (2008). "Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses." Biochimie **90**(11-12): 1674-84.

Colin, D., Limagne, E., Jeanningros, S., Jacquet, A., Lizard, G., Athias, A., Gambert, P., Hichami, A., Latruffe, N., Solary, E. et Delmas, D. (2011). "Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells." Cancer Prev Res (Phila) **4**(7): 1095-106.

Cooke, D., Schwarz, M., Boocock, D., Winterhalter, P., Steward, W. P., Gescher, A. J. et Marczylo, T. H. (2006). "Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis--relationship with tissue anthocyanin levels." Int J Cancer **119**(9): 2213-20.

Cooray, H. C., Janvilisri, T., van Veen, H. W., Hladky, S. B. et Barrand, M. A. (2004). "Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols." Biochem Biophys Res Commun **317**(1): 269-75.

Corder, R., Douthwaite, J. A., Lees, D. M., Khan, N. Q., Viseu Dos Santos, A. C., Wood, E. G. et Carrier, M. J. (2001). "Endothelin-1 synthesis reduced by red wine." Nature **414**(6866): 863-4.

Corder, R., Mullen, W., Khan, N. Q., Marks, S. C., Wood, E. G., Carrier, M. J. et Crozier, A. (2006). "Oenology: red wine procyanidins and vascular health." Nature **444**(7119): 566.

Cordova, A. C., Jackson, L. S., Berke-Schlessel, D. W. et Sumpio, B. E. (2005). "The cardiovascular protective effect of red wine." J Am Coll Surg **200**(3): 428-39.

Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C. et Beaudoux, J. L. (2010). "Resveratrol bioavailability and toxicity in humans." Mol Nutr Food Res **54**(1): 7-16.

Crockett, S. D., Long, M. D., Dellon, E. S., Martin, C. F., Galanko, J. A. et Sandler, R. S. (2011). "Inverse relationship between moderate alcohol intake and rectal cancer: analysis of the North Carolina Colon Cancer Study." Dis Colon Rectum **54**(7): 887-94.

Cvorovic, J., Tramer, F., Granzotto, M., Candussio, L., Decorti, G. et Passamonti, S. (2010). "Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells." Arch Biochem Biophys **501**(1): 151-7.

## D

Dal-Pan, A., Blanc, S. et Aujard, F. (2010). "Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity." BMC Physiol **10**: 11.

Das, S., Lin, H. S., Ho, P. C. et Ng, K. Y. (2008). "The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol." Pharm Res **25**(11): 2593-600.

Das, S., Santani, D. D. et Dhalla, N. S. (2007). "Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine." Exp Clin Cardiol **12**(1): 5-10.

- de la Lastra, C. A. et Villegas, I. (2007). "Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1156-60.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F. et Pacifici, G. M. (2000a). "Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver." Xenobiotica **30**(11): 1047-54.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F. et Pacifici, G. M. (2000b). "Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum." Xenobiotica **30**(6): 609-17.
- Delmas, D., Aires, V., Limagne, E., Dutartre, P., Mazue, F., Ghiringhelli, F. et Latruffe, N. (2011a). "Transport, stability, and biological activity of resveratrol." Ann N Y Acad Sci **1215**: 48-59.
- Delmas, D., Jannin, B., Cherkaoui Malki, M. et Latruffe, N. (2000). "Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines." Oncol Rep **7**(4): 847-52.
- Delmas, D., Jannin, B. et Latruffe, N. (2005). "Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing." Mol Nutr Food Res **49**(5): 377-95.
- Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B. et Latruffe, N. (2006). "Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer." Curr Drug Targets **7**(4): 423-42.
- Delmas, D., Passilly-Degrace, P., Jannin, B., Cherkaoui Malki, M. et Latruffe, N. (2002). "Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells." Int J Mol Med **10**(2): 193-9.
- Delmas, D., Rebe, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., Cherkaoui-Malki, M., Jannin, B., Dubrez-Daloz, L., Latruffe, N. et Solary, E. (2003). "Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells." J Biol Chem **278**(42): 41482-90.
- Delmas, D., Solary, E. et Latruffe, N. (2011b). "Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe." Curr Med Chem **18**(8): 1100-21.
- Deluc, L. G., Decendit, A., Papastamoulis, Y., Merillon, J. M., Cushman, J. C. et Cramer, G. R. (2011). "Water deficit increases stilbene metabolism in Cabernet Sauvignon berries." J Agric Food Chem **59**(1): 289-97.
- Deschner, E. E., Ruperto, J., Wong, G. et Newmark, H. L. (1991). "Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia." Carcinogenesis **12**(7): 1193-6.



Dixon, R. A. (2001). "Natural products and plant disease resistance." Nature **411**(6839): 843-7.

Docherty, J. J., Fu, M. M., Stiffler, B. S., Limperos, R. J., Pokabla, C. M. et DeLucia, A. L. (1999). "Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication." Antiviral Res **43**(3): 145-55.

Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A. P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C. et Cresci, A. (2005). "Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats." Mutat Res **591**(1-2): 237-46.

Donovan, J. L., Bell, J. R., Kasim-Karakas, S., German, J. B., Walzem, R. L., Hansen, R. J. et Waterhouse, A. L. (1999). "Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine." J Nutr **129**(9): 1662-8.

Dore, S. (2005). "Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity." Neurosignals **14**(1-2): 61-70.

Dorrie, J., Gerauer, H., Wachter, Y. et Zunino, S. J. (2001). "Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells." Cancer Res **61**(12): 4731-9.

Douillet-Breuil, A. C., Jeandet, P., Adrian, M. et Bessis, R. (1999). "Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation." J Agric Food Chem **47**(10): 4456-61.

Dragoni, S., Gee, J., Bennett, R., Valoti, M. et Sgaragli, G. (2006). "Red wine alcohol promotes quercetin absorption and directs its metabolism towards isorhamnetin and tamarixetin in rat intestine in vitro." Br J Pharmacol **147**(7): 765-71.

Dubuisson, J. G., Dyess, D. L. et Gaubatz, J. W. (2002). "Resveratrol modulates human mammary epithelial cell O-acetyltransferase, sulfotransferase, and kinase activation of the heterocyclic amine carcinogen N-hydroxy-PhIP." Cancer Lett **182**(1): 27-32.

Ducasse, M. A., Williams, P., Canal-Llauberes, R. M., Mazerolles, G., Cheynier, V. et Doco, T. (2011). "Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines." J Agric Food Chem **59**(12): 6558-67.

Ducimetiere, P., Richard, J. L., Cambien, F., Rakotovo, R. et Claude, J. R. (1980). "Coronary heart disease in middle-aged Frenchmen. Comparisons between Paris Prospective Study, Seven Countries Study, and Pooling Project." Lancet **1**(8182): 1346-50.

Dudley, J. I., Lekli, I., Mukherjee, S., Das, M., Bertelli, A. A. et Das, D. K. (2008). "Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol." J Agric Food Chem **56**(20): 9362-73.

## E

Ebeler, S. E., Brenneman, C. A., Kim, G. S., Jewell, W. T., Webb, M. R., Chacon-Rodriguez, L., MacDonald, E. A., Cramer, A. C., Levi, A., Ebeler, J. D., Islas-Trejo, A., Kraus, A., Hinrichs, S. H. et Clifford, A. J. (2002). "Dietary catechin delays tumor onset in a transgenic mouse model." Am J Clin Nutr **76**(4): 865-72.

El Mesallamy, H. O., Metwally, N. S., Soliman, M. S., Ahmed, K. A. et Abdel Moaty, M. M. (2011). "The chemopreventive effect of Ginkgo biloba and Silybum marianum extracts on hepatocarcinogenesis in rats." Cancer Cell Int **11**(1): 38.

Eng, E. T., Ye, J., Williams, D., Phung, S., Moore, R. E., Young, M. K., Gruntmanis, U., Braunstein, G. et Chen, S. (2003). "Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds." Cancer Res **63**(23): 8516-22.

## F

Falchetti, R., Fuggetta, M. P., Lanzilli, G., Tricarico, M. et Ravagnan, G. (2001). "Effects of resveratrol on human immune cell function." Life Sci **70**(1): 81-96.

Feige, J. N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S. M., Milne, J. C., Lambert, P. D., Matak, C., Elliott, P. J. et Auwerx, J. (2008). "Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation." Cell Metab **8**(5): 347-58.

Femia, A. P., Caderni, G., Vignali, F., Salvadori, M., Giannini, A., Biggeri, A., Gee, J., Przybylska, K., Cheynier, V. et Dolara, P. (2005). "Effect of polyphenolic extracts from red wine and 4-OH-coumaric acid on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats." Eur J Nutr **44**(2): 79-84.

Feng, Y. H., Zhou, W. L., Wu, Q. L., Li, X. Y., Zhao, W. M. et Zou, J. P. (2002). "Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice." Acta Pharmacol Sin **23**(10): 893-7.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. et Parkin, D. M. (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-917.

Fernandes, G., Yunis, E. J. et Good, R. A. (1976). "Influence of diet on survival of mice." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(4): 1279-83.

Ferrer, P., Asensi, M., Segarra, R., Ortega, A., Benlloch, M., Obrador, E., Varea, M. T., Asensio, G., Jorda, L. et Estrela, J. M. (2005). "Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma." Neoplasia **7**(1): 37-47.

Finkel, T., Deng, C. X. et Mostoslavsky, R. (2009). "Recent progress in the biology and physiology of sirtuins." Nature **460**(7255): 587-91.

Fiore, M., Laviola, G., Aloe, L., di Fausto, V., Mancinelli, R. et Ceccanti, M. (2009). "Early exposure to ethanol but not red wine at the same alcohol concentration induces behavioral and brain neurotrophin alterations in young and adult mice." Neurotoxicology **30**(1): 59-71.

Fitzpatrick, D. F., Bing, B., Maggi, D. A., Fleming, R. C. et O'Malley, R. M. (2002). "Vasodilating procyanidins derived from grape seeds." Ann N Y Acad Sci **957**: 78-89.

Forester, S. C. et Waterhouse, A. L. (2008). "Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites." J Agric Food Chem **56**(19): 9299-304.

Forester, S. C. et Waterhouse, A. L. (2009). "Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics." J Nutr **139**(9): 1824S-31S.

Frankel, E. N., Waterhouse, A. L. et Kinsella, J. E. (1993). "Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol." Lancet **341**(8852): 1103-4.

Fremont, L. (2000). "Biological effects of resveratrol." Life Sci **66**(8): 663-73.

Frotschl, R., Chichmanov, L., Kleeberg, U., Hildebrandt, A. G., Roots, I. et Brockmoller, J. (1998). "Prediction of aryl hydrocarbon receptor-mediated enzyme induction of drugs and chemicals by mRNA quantification." Chem Res Toxicol **11**(12): 1447-52.

## G

Gao, X., Deeb, D., Media, J., Divine, G., Jiang, H., Chapman, R. A. et Gautam, S. C. (2003). "Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant in vitro and in vivo immunological effects." Biochem Pharmacol **66**(12): 2427-35.

Gao, X., Xu, Y. X., Janakiraman, N., Chapman, R. A. et Gautam, S. C. (2001). "Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production." Biochem Pharmacol **62**(9): 1299-308.

Garcia, J. P., Chevrier, S., Dufraisse, A., Foucher, M. et Steinmann, R. (2010). "Le vignoble gallo-romain de Gevrey-Chambertin "Au-dessus de Bergis"." Revue Archéologique de l'Est **59**: 505-37.

Gardner, G. et Halweil, H. (2000). Underfed and Overfed: The Global Epidemic of Malnutrition. Washington DC, Worldwatch Institute. **150**: 1-68.

Geahlen, R. L. et McLaughlin, J. L. (1989). "Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor." Biochem Biophys Res Commun **165**(1): 241-5.

German, J. B. et Walzem, R. L. (2000). "The health benefits of wine." Annu Rev Nutr **20**: 561-93.

Giftson, J. S., Jayanthi, S. et Nalini, N. (2010). "Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis." Invest New Drugs **28**(3): 251-9.

Giftson Senapathy, J., Jayanthi, S., Viswanathan, P., Umadevi, P. et Nalini, N. (2011). "Effect of gallic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis in Wistar rats--a chemopreventive approach." Food Chem Toxicol **49**(4): 887-92.

Gillies, R. J., Didier, N. et Denton, M. (1986). "Determination of cell number in monolayer cultures." Anal Biochem **159**(1): 109-13.

Goldberg, D. M., Hahn, S. E. et Parkes, J. G. (1995). "Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality." Clin Chim Acta **237**(1-2): 155-87.

Goldberg, D. M., Yan, J. et Soleas, G. J. (2003). "Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects." Clin Biochem **36**(1): 79-87.

Goldman, R. et Shields, P. G. (2003). "Food mutagens." J Nutr **133 Suppl 3**: 965S-973S.

Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B., Vieira, W. et Virador, V. M. (2001). "Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells." J Agric Food Chem **49**(3): 1620-4.

Griggs, J., Metcalfe, J. C. et Hesketh, R. (2001). "Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A4." Lancet Oncol **2**(2): 82-7.

Guo, R. et Ren, J. (2010). "Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace." Int J Environ Res Public Health **7**(4): 1285-301.

## H

Hafeez, B. B., Siddiqui, I. A., Asim, M., Malik, A., Afaq, F., Adhami, V. M., Saleem, M., Din, M. et Mukhtar, H. (2008). "A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo: involvement of nuclear factor-kappaB signaling." Cancer Res **68**(20): 8564-72.

Hagerman, A. E. et Butler, L. G. (1981). "The specificity of proanthocyanidin-protein interactions." J Biol Chem **256**(9): 4494-7.

Hanahan, D. et Weinberg, R. A. (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hauss, F., Liu, J., Michelucci, A., Coowar, D., Morga, E., Heuschling, P. et Luu, B. (2007). "Dual bioactivity of resveratrol fatty alcohols: differentiation of neural stem cells and modulation of neuroinflammation." Bioorg Med Chem Lett **17**(15): 4218-22.

He, S., Sun, C. et Pan, Y. (2008). "Red wine polyphenols for cancer prevention." Int J Mol Sci **9**(5): 842-53.

Heber, D. (2008). "Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins." Cancer Lett **269**(2): 262-8.

Heiss, E. H., Schilder, Y. D. et Dirsch, V. M. (2007). "Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells." J Biol Chem **282**(37): 26759-66.

Henry-Vitrac, C., Desmouliere, A., Girard, D., Merillon, J. M. et Krisa, S. (2006). "Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells." Eur J Nutr **45**(7): 376-82.

Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Bertrais, S., Mennen, L., Malvy, D., Rousset, A. M., Favier, A. et Briancon, S. (2004). "The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals." Arch Intern Med **164**(21): 2335-42.

Hill, M. J., Morson, B. C. et Bussey, H. J. (1978). "Aetiology of adenoma--carcinoma sequence in large bowel." Lancet **1**(8058): 245-7.

Howells, L. M., Berry, D. P., Elliott, P. J., Jacobson, E. W., Hoffmann, E., Hegarty, B., Brown, K., Steward, W. P. et Gescher, A. J. (2011). "Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics." Cancer Prev Res (Phila) **4**(9): 1419-25.

Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B. et Sinclair, D. A. (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." Nature **425**(6954): 191-6.

Hsieh, T. C., Huang, Y. C. et Wu, J. M. (2011). "Control of prostate cell growth, DNA damage and repair and gene expression by resveratrol analogues, in vitro." Carcinogenesis **32**(1): 93-101.

Hu, F. B. (2003). "The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond." N Engl J Med **348**(26): 2595-6.

Huang, C., Ma, W. Y., Goranson, A. et Dong, Z. (1999). "Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway." Carcinogenesis **20**(2): 237-42.

Hudson, T. S., Hartle, D. K., Hursting, S. D., Nunez, N. P., Wang, T. T., Young, H. A., Arany, P. et Green, J. E. (2007). "Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms." Cancer Res **67**(17): 8396-405.

Hung, C. F., Lin, Y. K., Huang, Z. R. et Fang, J. Y. (2008). "Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin." Biol Pharm Bull **31**(5): 955-62.

Huxley, R. R. et Neil, H. A. (2003). "The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies." Eur J Clin Nutr **57**(8): 904-8.

## I

Igney, F. H. et Krammer, P. H. (2002). "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." J Leukoc Biol **71**(6): 907-20.

## J

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C. et Pezzuto, J. M. (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." Science **275**(5297): 218-20.

Jannin, B., Menzel, M., Berlot, J. P., Delmas, D., Lancon, A. et Latruffe, N. (2004). "Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake." Biochem Pharmacol **68**(6): 1113-8.

Jehandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M. et Meunier, P. (1995). "Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to Botrytis attack under natural conditions." J Phytopathol **143**(3): 135-9.

Jehandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. et Adrian, M. (2002). "Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism." J Agric Food Chem **50**(10): 2731-41.

Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M. E., Xiao, D. et Weinstein, I. B. (2002). "Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines." Clin Cancer Res **8**(3): 893-903.

Juan, M. E., Gonzalez-Pons, E. et Planas, J. M. (2009). "Multidrug resistance proteins restrain the intestinal absorption of trans-resveratrol in rats." J Nutr **140**(3): 489-95.

## K

Kaindl, U., Eyberg, I., Rohr-Udilova, N., Heinzle, C. et Marian, B. (2008). "The dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage." Food Chem Toxicol **46**(4): 1320-6.

Kang, S. Y., Seeram, N. P., Nair, M. G. et Bourquin, L. D. (2003). "Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells." Cancer Lett **194**(1): 13-9.

Kapetanovic, I. M., Muzzio, M., Huang, Z., Thompson, T. N. et McCormick, D. L. (2011). "Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats." Cancer Chemother Pharmacol **68**(3): 593-601.

Keller, M., Viret, O. et Cole, F. M. (2003). "Botrytis cinerea Infection in Grape Flowers: Defense Reaction, Latency, and Disease Expression." Phytopathology **93**(3): 316-22.

Kim, M. J., Kim, Y. J., Park, H. J., Chung, J. H., Leem, K. H. et Kim, H. K. (2006). "Apoptotic effect of red wine polyphenols on human colon cancer SNU-C4 cells." Food Chem Toxicol **44**(6): 898-902.

Kimura, Y. et Okuda, H. (2001). "Resveratrol isolated from Polygonum cuspidatum root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice." J Nutr **131**(6): 1844-9.

Krasnow, M. N. et Murphy, T. M. (2004). "Polyphenol glucosylating activity in cell suspensions of grape (Vitis vinifera)." J Agric Food Chem **52**(11): 3467-72.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E. et Etherton, T. D. (2002). "Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer." Am J Med **113 Suppl 9B**: 71S-88S.

Kueng, W., Silber, E. et Eppenberger, U. (1989). "Quantification of cells cultured on 96-well plates." Anal Biochem **182**(1): 16-9.

Kuhnle, G., Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., Srai, S. K., Rice-Evans, C. et Hahn, U. (2000). "Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide." Biochem Biophys Res Commun **272**(1): 212-7.

## L

Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P. et Auwerx, J. (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha." Cell **127**(6): 1109-22.

Lancon, A., Delmas, D., Osman, H., Thenot, J. P., Jannin, B. et Latruffe, N. (2004). "Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process." Biochem Biophys Res Commun **316**(4): 1132-7.

Lancon, A., Hanet, N., Jannin, B., Delmas, D., Heydel, J. M., Lizard, G., Chagnon, M. C., Artur, Y. et Latruffe, N. (2007). "Resveratrol in human hepatoma HepG2 cells: metabolism and inducibility of detoxifying enzymes." Drug Metab Dispos **35**(5): 699-703.

Langcake, P., Cornford, C. A. et Pryce, R. J. (1979). "Identification of pterostilbene as a phytoalexin from Vitis Vinifera leaves." Phytochemistry **18**: 1025-7.

Langcake, P. et Pryce, R. J. (1977). "A new class of phytoalexins from grapevines." Experientia **33**(2): 151-2.

Lansky, E. P., Harrison, G., Froom, P. et Jiang, W. G. (2005). "Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel." Invest New Drugs **23**(2): 121-2.

Latino-Martel, P., Arwidson, P., Ancellin, R., Druesne-Pecollo, N., Hercberg, S., Le Quellec-Nathan, M., Le-Luong, T. et Maraninchi, D. (2011). "Alcohol consumption and cancer risk: revisiting guidelines for sensible drinking." CMAJ **183**(16): 1861-5.

Lee, K. W., Kang, N. J., Heo, Y. S., Rogozin, E. A., Pugliese, A., Hwang, M. K., Bowden, G. T., Bode, A. M., Lee, H. J. et Dong, Z. (2008). "Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine." Cancer Res **68**(3): 946-55.

Liang, Y. C., Tsai, S. H., Chen, L., Lin-Shiau, S. Y. et Lin, J. K. (2003). "Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells." Biochem Pharmacol **65**(7): 1053-60.

Lin, K. H., Hsiao, G., Shih, C. M., Chou, D. S. et Sheu, J. R. (2009). "Mechanisms of resveratrol-induced platelet apoptosis." Cardiovasc Res **83**(3): 575-85.

Lin, S. J., Defossez, P. A. et Guarente, L. (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." Science **289**(5487): 2126-8.

Lipkin, M. (1974). "Phase 1 and phase 2 proliferative lesions of colonic epithelial cells in diseases leading to colonic cancer." Cancer **34**(3): suppl:878-88.

Liu, B. L., Zhang, X., Zhang, W. et Zhen, H. N. (2007). "New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy." Cancer Biol Ther **6**(12): 1833-6.

Lizarraga, D., Vinardell, M. P., Noe, V., van Delft, J. H., Alcarraz-Vizan, G., van Breda, S. G., Staal, Y., Gunther, U. L., Reed, M. A., Ciudad, C. J., Torres, J. L. et Cascante, M. (2011). "A lyophilized red grape pomace containing proanthocyanidin-rich dietary fiber induces genetic and metabolic alterations in colon mucosa of female C57BL/6J mice." J Nutr **141**(9): 1597-604.

Loke, W. M., Proudfoot, J. M., Stewart, S., McKinley, A. J., Needs, P. W., Kroon, P. A., Hodgson, J. M. et Croft, K. D. (2008). "Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity." Biochem Pharmacol **75**(5): 1045-53.

Lombard, D. B., Pletcher, S. D., Canto, C. et Auwerx, J. (2011). "Ageing: longevity hits a roadblock." Nature **477**(7365): 410-1.



Lucia, S. P. (1972). "Wine: a food throughout the ages." Am J Clin Nutr **25**(4): 361-2.

## M

Manson, M. M. (2003). "Cancer prevention -- the potential for diet to modulate molecular signalling." Trends Mol Med **9**(1): 11-8.

Marel, A. K., Lizard, G., Izard, J. C., Latruffe, N. et Delmas, D. (2008). "Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells." Mol Nutr Food Res **52**(5): 538-48.

Martin, S., Giannone, G., Andriantsitohaina, R. et Martinez, M. C. (2003). "Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis." Br J Pharmacol **139**(6): 1095-102.

Martinez, J. et Moreno, J. J. (2000). "Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production." Biochem Pharmacol **59**(7): 865-70.

Matic, I., Zizak, Z., Simonovic, M., Simonovic, B., Godevac, D., Savikin, K. et Juranic, Z. (2010). "Cytotoxic effect of wine polyphenolic extracts and resveratrol against human carcinoma cells and normal peripheral blood mononuclear cells." J Med Food **13**(4): 851-62.

Matsuoka, A., Kodama, Y., Fukuhara, K., Honda, S., Hayashi, M., Sai, K., Hasebe, M. et Fujiwara, Y. (2008). "A pilot study of evaluation of the antioxidative activity of resveratrol and its analogue in a 6-month feeding test in young adult mice." Food Chem Toxicol **46**(3): 1125-30.

Maxwell, S., Cruickshank, A. et Thorpe, G. (1994). "Red wine and antioxidant activity in serum." Lancet **344**(8916): 193-4.

Mazue, F., Colin, D., Gobbo, J., Wegner, M., Rescifina, A., Spatafora, C., Fasseur, D., Delmas, D., Meunier, P., Tringali, C. et Latruffe, N. (2010). "Structural determinants of resveratrol for cell proliferation inhibition potency: experimental and docking studies of new analogs." Eur J Med Chem **45**(7): 2972-80.

McCullough, M. J. et Farah, C. S. (2008). "The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes." Aust Dent J **53**(4): 302-5.

McGinley, J. N., Thompson, M. D. et Thompson, H. J. (2010). "A method for serial tissue processing and parallel analysis of aberrant crypt morphology, mucin depletion, and Beta-catenin staining in an experimental model of colon carcinogenesis." Biol Proced Online **12**(1): 9032.

Mellanen, P., Petanen, T., Lehtimaki, J., Makela, S., Bylund, G., Holmbom, B., Mannila, E., Oikari, A. et Santti, R. (1996). "Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout." Toxicol Appl Pharmacol **136**(2): 381-8.

Mertens-Talcott, S. U. et Percival, S. S. (2005). "Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells." Cancer Lett **218**(2): 141-51.

Mertens-Talcott, S. U., Talcott, S. T. et Percival, S. S. (2003). "Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells." J Nutr **133**(8): 2669-74.

Michel, J., Jourdes, M., Silva, M. A., Giordanengo, T., Mourey, N. et Teissedre, P. L. (2011). "Impact of concentration of ellagitannins in oak wood on their levels and organoleptic influence in red wine." J Agric Food Chem **59**(10): 5677-83.

Miyagi, Y., Miwa, K. et Inoue, H. (1997). "Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice." Am J Cardiol **80**(12): 1627-31.

Mizuno, C. S., Ma, G., Khan, S., Patny, A., Avery, M. A. et Rimando, A. M. (2008). "Design, synthesis, biological evaluation and docking studies of pterostilbene analogs inside PPARalpha." Bioorg Med Chem **16**(7): 3800-8.

Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." Nature **374**(6518): 131-4.

Mouria, M., Gukovskaya, A. S., Jung, Y., Buechler, P., Hines, O. J., Reber, H. A. et Pandol, S. J. (2002). "Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis." Int J Cancer **98**(5): 761-9.

Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saiko, P., Szekeres, T. et Jager, W. (2004). "Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship." Bioorg Med Chem **12**(21): 5571-8.

Murias, M., Jager, W., Handler, N., Erker, T., Horvath, Z., Szekeres, T., Nohl, H. et Gille, L. (2005). "Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship." Biochem Pharmacol **69**(6): 903-12.

Murota, K., Shimizu, S., Chujo, H., Moon, J. H. et Terao, J. (2000). "Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2." Arch Biochem Biophys **384**(2): 391-7.

## N

Nabha, S. M., Mohammad, R. M., Dandashi, M. H., Coupaye-Gerard, B., Aboukameel, A., Pettit, G. R. et Al-Katib, A. M. (2002). "Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic

catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage." Clin Cancer Res **8**(8): 2735-41.

Nalpas, B., Pol, S., Thepot, V., Berthelot, P. et Brechot, C. (1995). "Hepatocellular carcinoma in alcoholics." Alcohol **12**(2): 117-20.

Narod, S. A. (2011). "Alcohol and risk of breast cancer." JAMA **306**(17): 1920-1.

Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P. et Fincher, G. B. (1998). "Changes in cell wall composition during ripening of grape berries." Plant Physiol **118**(3): 783-92.

Nutakul, W., Sobers, H. S., Qiu, P., Dong, P., Decker, E. A., McClements, D. J. et Xiao, H. (2011). "Inhibitory Effects of Resveratrol and Pterostilbene on Human Colon Cancer Cells: A Side-by-Side Comparison." J Agric Food Chem **59**(20): 10964-70.

## O

Opie, L. H. et Lecour, S. (2007). "The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules." Eur Heart J **28**(14): 1683-93.

Orgogozo, J. M., Dartigues, J. F., Lafont, S., Letenneur, L., Commenges, D., Salamon, R., Renaud, S. et Breteler, M. B. (1997). "Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area." Rev Neurol (Paris) **153**(3): 185-92.

## P

Paganga, G., Miller, N. et Rice-Evans, C. A. (1999). "The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?" Free Radic Res **30**(2): 153-62.

Park, E. J., Park, H. J., Chung, H. J., Shin, Y., Min, H. Y., Hong, J. Y., Kang, Y. J., Ahn, Y. H., Pyee, J. H. et Kook Lee, S. (2011). "Antimetastatic activity of pinosylvin, a natural stilbenoid, is associated with the suppression of matrix metalloproteinases." J Nutr Biochem: in press.

Parker, J. A., Arango, M., Abderrahmane, S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H. et Neri, C. (2005). "Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons." Nat Genet **37**(4): 349-50.

Patel, K. R., Brown, V. A., Jones, D. J., Britton, R. G., Hemingway, D., Miller, A. S., West, K. P., Booth, T. D., Perloff, M., Crowell, J. A., Brenner, D. E., Steward, W. P., Gescher, A. J. et Brown, K. (2010). "Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients." Cancer Res **70**(19): 7392-9.

Patel, K. R., Scott, E., Brown, V. A., Gescher, A. J., Steward, W. P. et Brown, K. (2011). "Clinical trials of resveratrol." Ann N Y Acad Sci **1215**: 161-9.

Paul, S., Mizuno, C. S., Lee, H. J., Zheng, X., Chajkowisk, S., Rimoldi, J. M., Conney, A., Suh, N. et Rimando, A. M. (2010). "In vitro and in vivo studies on stilbene analogs as potential treatment agents for colon cancer." Eur J Med Chem **45**(9): 3702-8.

Paulitschke, V., Schicher, N., Szekeres, T., Jager, W., Elbling, L., Riemer, A. B., Scheiner, O., Trimurtulu, G., Venkateswarlu, S., Mikula, M., Swoboda, A., Fiebiger, E., Gerner, C., Pehamberger, H. et Kunstfeld, R. (2010). "3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene impairs melanoma progression in a metastatic mouse model." J Invest Dermatol **130**(6): 1668-79.

Paulsen, J. E., Loberg, E. M., Olstorn, H. B., Knutsen, H., Steffensen, I. L. et Alexander, J. (2005). "Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat." Cancer Res **65**(1): 121-9.

Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinskyy, N., Swindell, W. R., Kamara, D., Minor, R. K., Perez, E., Jamieson, H. A., Zhang, Y., Dunn, S. R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L. A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P. J., Becker, K. G., Navas, P., Ingram, D. K., Wolf, N. S., Ungvari, Z., Sinclair, D. A. et de Cabo, R. (2008). "Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span." Cell Metab **8**(2): 157-68.

Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A., Gazzaniga, P. P. et Violi, F. (2000). "The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide." Am J Clin Nutr **72**(5): 1150-5.

Potter, G. A., Patterson, L. H., Wanogho, E., Perry, P. J., Butler, P. C., Ijaz, T., Ruparelia, K. C., Lamb, J. H., Farmer, P. B., Stanley, L. A. et Burke, M. D. (2002). "The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1." Br J Cancer **86**(5): 774-8.

Poussier, B., Cordova, A. C., Becquemin, J. P. et Sumpio, B. E. (2005). "Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis." J Vasc Surg **42**(6): 1190-7.

Pretlow, T. P., O'Riordan, M. A., Somich, G. A., Amini, S. B. et Pretlow, T. G. (1992). "Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate." Carcinogenesis **13**(9): 1509-12.

Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., Luciano, F., Cassuto, J. P., Raynaud, S. et Auberger, P. (2010). "Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation." Cancer Res **70**(3): 1042-52.

## Q

Quan, F., Pan, C., Ma, Q., Zhang, S. et Yan, L. (2008). "Reversal effect of resveratrol on multidrug resistance in KBv200 cell line." Biomed Pharmacother **62**(9): 622-9.

## R

Radhakrishnan, S., Reddivari, L., Sclafani, R., Das, U. N. et Vanamala, J. (2011). "Resveratrol potentiates grape seed extract induced human colon cancer cell apoptosis." Front Biosci (Elite Ed) **3**: 1509-23.

Ray, P. S., Maulik, G., Cordis, G. A., Bertelli, A. A., Bertelli, A. et Das, D. K. (1999). "The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury." Free Radic Biol Med **27**(1-2): 160-9.

Reed, J. C. (1999). "Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer." Curr Opin Oncol **11**(1): 68-75.

Remsberg, C. M., Yanez, J. A., Ohgami, Y., Vega-Villa, K. R., Rimando, A. M. et Davies, N. M. (2008). "Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity." Phytother Res **22**(2): 169-79.

Renaud, S. et de Lorgeril, M. (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." Lancet **339**(8808): 1523-6.

Renaud, S. C., Gueguen, R., Schenker, J. et d'Houtaud, A. (1998). "Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France." Epidemiology **9**(2): 184-8.

Rifler, J. P., Lorcerie, F., Durand, P., Delmas, D., Ragot, K., Limagne, E., Mazue, F., Riedinger, J. M., d'Athis, P., Hudelot, B., Prost, M., Lizard, G. et Latruffe, N. (2011). "A moderate red wine intake improves blood lipid parameters and erythrocytes membrane fluidity in post myocardial infarct patients." Mol Nutr Food Res.

Rimando, A. M., Cuendet, M., Desmarchelier, C., Mehta, R. G., Pezzuto, J. M. et Duke, S. O. (2002). "Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol." J Agric Food Chem **50**(12): 3453-7.

Rimando, A. M., Nagmani, R., Feller, D. R. et Yokoyama, W. (2005). "Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters." J Agric Food Chem **53**(9): 3403-7.

Rimando, A. M. et Suh, N. (2008). "Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer." Planta Med **74**(13): 1635-43.

Roberti, M., Pizzirani, D., Simoni, D., Rondanin, R., Baruchello, R., Bonora, C., Buscemi, F., Grimaudo, S. et Tolomeo, M. (2003). "Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogues as apoptosis-inducing agents." J Med Chem **46**(16): 3546-54.

Rodrigo, R., Miranda, A. et Vergara, L. (2011). "Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease." Clin Chim Acta **412**(5-6): 410-24.

Romero-Perez, A. I., Ibern-Gomez, M., Lamuela-Raventos, R. M. et de La Torre-Boronat, M. C. (1999). "Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices." J Agric Food Chem **47**(4): 1533-6.

Ruellet, A. et Ruellet, A. (1985). "Selongey : Villa des Tuillières." Gallia **43**(2): 261.

Ruidavets, J., Teissedre, P., Ferrieres, J., Carando, S., Bougard, G. et Cabanis, J. (2000). "Catechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine?" Atherosclerosis **153**(1): 107-17.

Russo, G. L. (2007). "Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention." Biochem Pharmacol **74**(4): 533-44.

Russo, M., Nigro, P., Rosiello, R., D'Arienzo, R. et Russo, G. L. (2007). "Quercetin enhances CD95- and TRAIL-induced apoptosis in leukemia cell lines." Leukemia **21**(5): 1130-3.

## S

Sadr Azodi, O., Orsini, N., Andren-Sandberg, A. et Wolk, A. (2011). "Effect of type of alcoholic beverage in causing acute pancreatitis." Br J Surg **98**(11): 1609-16.

Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W. et Szekeres, T. (2008). "Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?" Mutat Res **658**(1-2): 68-94.

Sala, G., Minutolo, F., Macchia, M., Sacchi, N. et Ghidoni, R. (2003). "Resveratrol structure and ceramide-associated growth inhibition in prostate cancer cells." Drugs Exp Clin Res **29**(5-6): 263-9.

Salaspuro, M. (2011). "Acetaldehyde and gastric cancer." J Dig Dis **12**(2): 51-9.

Sanchez-del-Campo, L., Oton, F., Tarraga, A., Cabezas-Herrera, J., Chazarra, S. et Rodriguez-Lopez, J. N. (2008). "Synthesis and biological activity of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epicatechin-3-gallate." J Med Chem **51**(7): 2018-26.

Sanchez-Fidalgo, S., Cardeno, A., Villegas, I., Talero, E. et de la Lastra, C. A. (2010). "Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice." Eur J Pharmacol **633**(1-3): 78-84.

Sato, M., Suzuki, Y., Okuda, T. et Yokotsuka, K. (1997). "Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan." Biosci Biotechnol Biochem **61**(11): 1800-5.

Savio, M., Coppa, T., Bianchi, L., Vannini, V., Maga, G., Forti, L., Cazzalini, O., Lazze, M. C., Perucca, P., Prospero, E. et Stivala, L. A. (2009). "The resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-

trans-stilbene inhibits cell proliferation with higher efficiency but different mechanism from resveratrol." Int J Biochem Cell Biol **41**(12): 2493-502.

Scalbert, A., Johnson, I. T. et Saltmarsh, M. (2005). "Polyphenols: antioxidants and beyond." Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl): 215S-217S.

Scarlatti, F., Sala, G., Somenzi, G., Signorelli, P., Sacchi, N. et Ghidoni, R. (2003). "Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling." FASEB J **17**(15): 2339-41.

Schlachterman, A., Valle, F., Wall, K. M., Azios, N. G., Castillo, L., Morell, L., Washington, A. V., Cubano, L. A. et Dharmawardhane, S. F. (2008). "Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model." Transl Oncol **1**(1): 19-27.

Schneider, Y., Chabert, P., Stutzmann, J., Coelho, D., Fougerousse, A., Gosse, F., Launay, J. F., Brouillard, R. et Raul, F. (2003). "Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization." Int J Cancer **107**(2): 189-96.

Schwarz, D. et Roots, I. (2003). "In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1." Biochem Biophys Res Commun **303**(3): 902-7.

Secretan, B., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L. et Coglianò, V. (2009). "A review of human carcinogens-- Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish." Lancet Oncol **10**(11): 1033-4.

Sentheshanmuganathan, S. et Elsdén, S. R. (1958). "The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem J **69**(2): 210-8.

Serafini, M., Maiani, G. et Ferro-Luzzi, A. (1998). "Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans." J Nutr **128**(6): 1003-7.

Serpaggi, V., Remize, F., Grand, A. S. et Alexandre, H. (2010). "Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: a useful tool for winemakers." Cytometry A **77**(6): 497-9.

Shimoi, K., Saka, N., Nozawa, R., Sato, M., Amano, I., Nakayama, T. et Kinae, N. (2001). "Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation." Drug Metab Dispos **29**(12): 1521-4.

Shpitz, B., Bomstein, Y., Mekori, Y., Cohen, R., Kaufman, Z., Neufeld, D., Galkin, M. et Bernheim, J. (1998). "Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics." Hum Pathol **29**(5): 469-75.

Sinclair, D. (2005). "Sirtuins for healthy neurons." Nat Genet **37**(4): 339-40.

Slinkard, K. et Singleton, V. L. (1977). "Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods." Am. J. Enol. Vitic. **28**(1): 49-55.

Smith, M. R., Penner, M. H., Bennett, S. E. et Bakalinsky, A. T. (2011). "Quantitative colorimetric assay for total protein applied to the red wine Pinot noir." J Agric Food Chem **59**(13): 6871-6.

Snyder, S. A., Gollner, A. et Chiriach, M. I. (2011). "Regioselective reactions for programmable resveratrol oligomer synthesis." Nature **474**(7352): 461-6.

Soares Filho, P. R., Castro, I. et Stahlschmidt, A. (2011). "Effect of red wine associated with physical exercise in the cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats." Arq Bras Cardiol **96**(4): 277-83.

Sobin, L. H. (2001). "TNM: principles, history, and relation to other prognostic factors." Cancer **91**(8 Suppl): 1589-92.

Soleas, G. J., Goldberg, D. M., Grass, L., Levesque, M. et Diamandis, E. P. (2001). "Do wine polyphenols modulate p53 gene expression in human cancer cell lines?" Clin Biochem **34**(5): 415-20.

Spatafora, C., Basini, G., Baioni, L., Grasselli, F., Sofia, A. et Tringali, C. (2009). "Antiangiogenic resveratrol analogues by mild m-CPBA aromatic hydroxylation of 3,5-dimethoxystilbenes." Nat Prod Commun **4**(2): 239-46.

Sporn, M. B. (1976). "Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period." Cancer Res **36**(7 PT 2): 2699-702.

Stockley, C. S. (1998). "Wine in moderation: how could and should recent in vitro and in vivo data be interpreted?" Drug Alcohol Rev **17**(4): 365-76.

Surh, Y. J. (2003). "Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals." Nat Rev Cancer **3**(10): 768-80.

Sutandyo, N. (2010). "Nutritional carcinogenesis." Acta Med Indones **42**(1): 36-42.

Szaefer, H., Cichocki, M., Brauze, D. et Baer-Dubowska, W. (2004). "Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis." Nutr Cancer **48**(1): 70-7.

Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. et Gottesman, M. M. (2006). "Targeting multidrug resistance in cancer." Nat Rev Drug Discov **5**(3): 219-34.

Szekeres, T., Fritzer-Szekeres, M., Saiko, P. et Jager, W. (2010). "Resveratrol and resveratrol analogues--structure-activity relationship." Pharm Res **27**(6): 1042-8.



## T

Takahashi, M., Mutoh, M., Kawamori, T., Sugimura, T. et Wakabayashi, K. (2000). "Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis." Carcinogenesis **21**(7): 1319-27.

Tessitore, L., Davit, A., Sarotto, I. et Caderni, G. (2000). "Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21(CIP) expression." Carcinogenesis **21**(8): 1619-22.

Thakkar, K., Geahlen, R. L. et Cushman, M. (1993). "Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of polyhydroxylated stilbene analogues of piceatannol." J Med Chem **36**(20): 2950-5.

Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D. P., Steward, W. P. et Gescher, A. J. (2009). "Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs?" Cancer Chemother Pharmacol **64**(1): 201-11.

Toll, A. D., Fabius, D., Hyslop, T., Pequignot, E., DiMarino, A. J., Infantolino, A. et Palazzo, J. P. (2011). "Prognostic significance of high-grade dysplasia in colorectal adenomas." Colorectal Dis **13**(4): 370-3.

Tolomeo, M., Grimaudo, S., Di Cristina, A., Roberti, M., Pizzirani, D., Meli, M., Dusonchet, L., Gebbia, N., Abbadessa, V., Crosta, L., Barucchello, R., Grisolia, G., Invidiata, F. et Simoni, D. (2005). "Pterostilbene and 3'-hydroxypterostilbene are effective apoptosis-inducing agents in MDR and BCR-ABL-expressing leukemia cells." Int J Biochem Cell Biol **37**(8): 1709-26.

Tseng, S. H., Lin, S. M., Chen, J. C., Su, Y. H., Huang, H. Y., Chen, C. K., Lin, P. Y. et Chen, Y. (2004). "Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats." Clin Cancer Res **10**(6): 2190-202.

Tunstall-Pedoe, H., Kuulasmaa, K., Amouyel, P., Arveiler, D., Rajakangas, A. M. et Pajak, A. (1994). "Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents." Circulation **90**(1): 583-612.

## U

Ulrich, S., Wolter, F. et Stein, J. M. (2005). "Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis." Mol Nutr Food Res **49**(5): 452-61.

## V

Valente, S., Bana, E., Viry, E., Bagrel, D. et Kirsch, G. (2010). "Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases." Bioorg Med Chem Lett **20**(19): 5827-30.

Velmurugan, B., Singh, R. P., Agarwal, R. et Agarwal, C. (2010). "Dietary-feeding of grape seed extract prevents azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in fischer 344 rats." Mol Carcinog **49**(7): 641-52.

Verma, A. K., Johnson, J. A., Gould, M. N. et Tanner, M. A. (1988). "Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin." Cancer Res **48**(20): 5754-8.

Vingtdeux, V., Dreses-Werringloer, U., Zhao, H., Davies, P. et Marambaud, P. (2008). "Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease." BMC Neurosci **9 Suppl 2**: S6.

Viry, E., Anwar, A., Kirsch, G., Jacob, C., Diederich, M. et Bagrel, D. (2011). "Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases." Int J Oncol **38**(4): 1103-11.

Vitaglione, P., Ottanelli, B., Milani, S., Morisco, F., Caporaso, N. et Fogliano, V. (2009). "Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl4-induced liver lipid peroxidation." J Gastroenterol Hepatol **24**(4): 618-22.

Vitrac, X., Desmouliere, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., Rosenbaum, J. et Merillon, J. M. (2003). "Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration." Life Sci **72**(20): 2219-33.

## W

Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., Jr. et Walle, U. K. (2004). "High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans." Drug Metab Dispos **32**(12): 1377-82.

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

Wang, J., Ho, L., Zhao, Z., Seror, I., Humala, N., Dickstein, D. L., Thiyagarajan, M., Percival, S. S., Talcott, S. T. et Pasinetti, G. M. (2006). "Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease." FASEB J **20**(13): 2313-20.

Wang, Z., Zou, J., Huang, Y., Cao, K., Xu, Y. et Wu, J. M. (2002). "Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro." Chin Med J (Engl) **115**(3): 378-80.

Wanklyn, J. A. (1873). "Report on the Composition of Wine." Br Med J **2**(678): 767-8.

Weber, K., Schulz, B. et Ruhnke, M. (2011). "Resveratrol and its antifungal activity against *Candida* species." Mycoses **54**(1): 30-3.

Wen, X. et Walle, T. (2006). "Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability." Drug Metab Dispos **34**(10): 1786-92.

Weng, C. J. et Yen, G. C. (2011). "Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives." Cancer Treat Rev: in press.

Wieder, T., Prokop, A., Bagci, B., Essmann, F., Bernicke, D., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B., Schmalz, H. G., Daniel, P. T. et Henze, G. (2001). "Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts." Leukemia **15**(11): 1735-42.

Willett, W. C., Skerrett, P. J. et Giovannucci, E. L. (2001). Eat, Drink and Be Healthy: The Harvard Medical School Guide to Healthy Eating. New York, Simon & Schuster.

Wolter, F., Akoglu, B., Clausnitzer, A. et Stein, J. (2001). "Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines." J Nutr **131**(8): 2197-203.

Wu, J. M. et Hsieh, T. C. (2011). "Resveratrol: a cardioprotective substance." Ann N Y Acad Sci **1215**: 16-21.

## Y

Yang, J. Y., Della-Fera, M. A., Rayalam, S., Ambati, S., Hartzell, D. L., Park, H. J. et Baile, C. A. (2008). "Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin." Life Sci **82**(19-20): 1032-9.

Yen, G. C., Duh, P. D. et Lin, C. W. (2003). "Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes." Free Radic Res **37**(5): 509-14.

Young, L. F. et Martin, K. R. (2006). "Time-dependent resveratrol-mediated mRNA and protein expression associated with cell cycle in WR-21 cells containing mutated human c-Ha-Ras." Mol Nutr Food Res **50**(1): 70-7.

Yu, C., Shin, Y. G., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, J. W., Lee, Y. S., Hirschelman, W. H., Pezzuto, J. M., Mehta, R. G. et van Breemen, R. B. (2002). "Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol." Pharm Res **19**(12): 1907-14.

Yu, C., Shin, Y. G., Kosmeder, J. W., Pezzuto, J. M. et van Breemen, R. B. (2003). "Liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of inhibition of human cytochrome P450 isozymes by resveratrol and resveratrol-3-sulfate." Rapid Commun Mass Spectrom **17**(4): 307-13.

Yunoki, K., Tanji, M., Murakami, Y., Yasui, Y., Hirose, S. et Ohnishi, M. (2004). "Fatty acid compositions of commercial red wines." Biosci Biotechnol Biochem **68**(12): 2623-6.

## Z

Zamin, L. L., Filippi-Chiela, E. C., Dillenburg-Pilla, P., Horn, F., Salbego, C. et Lenz, G. (2009). "Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells." Cancer Sci **100**(9): 1655-62.

Zghonda, N., Yoshida, S., Araki, M., Kusunoki, M., Mliki, A., Ghorbel, A. et Miyazaki, H. (2011). "Greater effectiveness of epsilon-viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration." Biosci Biotechnol Biochem **75**(7): 1259-67.

# ANNEXES

# Liste des publications et communications réalisées au cours de l'étude

## Publications en premier auteur

Mazue, F., Colin, D., Gobbo, J., Wegner, M., Rescifina, A., Spatafora, C., Fasseur, D., Delmas, D., Meunier, P., Tringali, C. et Latruffe, N. (2010). "Structural determinants of resveratrol for cell proliferation inhibition potency: experimental and docking studies of new analogs." Eur J Med Chem **45**(7): 2972-80.

## Articles dans des journaux à comité de lecture

Rifler, J. P., Lorcerie, F., Durand, P., Delmas, D., Ragot, K., Limagne, E., Mazue, F., Riedinger, J. M., d'Athis, P., Hudelot, B., Prost, M., Lizard, G. et Latruffe, N. (2011). "A moderate red wine intake improves blood lipid parameters and erythrocytes membrane fluidity in post myocardial infarct patients." Mol Nutr Food Res **55** sous presse.

Baarine, M., Thandapilly, S. J., Louis, X. L., Mazue, F., Yu, L., Delmas, D., Netticadan, T., Lizard, G. et Latruffe, N. (2011). "Pro-apoptotic versus anti-apoptotic properties of dietary resveratrol on tumoral and normal cardiac cells." Genes Nutr **6**(2): 161-9.

Di Micco, S., Mazué, F., Daquino, C., Spatafora, C., Delmas, D., Latruffe, N., Tringali, C., Riccio, R. et Bifulco, G. (2011) Structural basis for the potential antitumour activity of DNA-interacting Benzo[*kl*]xanthene lignans. Org Biomol Chem **9**(3):701-10.

Delmas, D., Aires, V., Limagne, E., Dutartre, P., Mazue, F., Ghiringhelli, F. et Latruffe, N. (2011a). "Transport, stability, and biological activity of resveratrol." Ann N Y Acad Sci **1215**: 48-59.

## Livres

Delmas, D., Mazué, F., Colin, D., Dutartre, P. et Latruffe, N., (2009) Development of promising naturally derived molecules to improve therapeutic strategies. Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources **Chapitre 5**.

Latruffe, N., Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Lizard, G. Mazué, F., Dutartre, P. et Jannin, B. (2008) Resveratrol: from vine plant to human diet. Wine Active Compounds **2008**.

Latruffe, N., Mazué, F., Limagne, E., Colin, D. et Delmas, D. (2011) Does resveratrol exhibit a stronger biological effect as wine component than as isolated compound? Wine Active Compounds **2011**.

## Présentations de posters lors de congrès

Mazué, F., Delmas, D., Noret, L., Chassagne, D. et Latruffe, N. (2011) Experimental Burgundy wines: analysis of polyphenol content and perspectives for nutritional prevention. Journées de l'IFR92, Dijon, 31 mai 2011.

WAC2011, Beaune, 24-26 mars 2011.

Aires, V., Limagne, E., Mazué, F., Ghiringhelli, F., Latruffe, N. et Delmas, D. (2011) Stability and effect of resveratrol sulfo- and glucoconjugates on cancer cells proliferation. WAC2011, Beaune, 24-26 mars 2011.

Mazué, F., Chalal, M., Vervandier-Fasseur, D., Delmas, D., Meunier, P. et Latruffe, N. (2010) Effets d'analogues du resvératrol sur les cellules de cancer colorectal de la lignée SW480. Séminaire intercancéropôles CGE-CLARA, 2010.

Mazué, F., Delmas, D., Daquino, C., Spatafora, C., Latruffe, N. et Tringali, C. (2010) Effet de lignanes sur la prolifération de cellules cancéreuses des voies digestives. 5ème Congrès Goût-Nutrition-Santé Vitagora 2010, Dijon, mars 2010.

Mazué, F., Delmas, D., Colin, D. et Latruffe, N. (2009) Synergie des constituants polyphénoliques du vin et impact dans la prévention nutritionnelle. Forum des Jeunes Chercheurs UB-UFC 2009 – Journées BIOTechno Dijon 2009, Dijon, 25-26 juin 2009. *Prix poster.*

4ème Congrès Goût-Nutrition-Santé Vitagora 2009, Dijon, 18-19 mars 2009. *2ème prix poster.*

## Valorisation des travaux

Participation au reportage de M6 dans l'émission E=M6 de janvier 2010 sur le vieillissement et le resvératrol.

Participation au reportage de TV globo en 2009 sur les effets bénéfiques sur la santé du resvératrol.

Participation à un reportage du journal de France 3 dans les émissions 19-20, soir3 et 12-13 en 2009 sur les effets bénéfiques du vin sur la santé.