



HAL
open science

Etude phytochimique et activités biologiques de Diplotaxis sp.: application à l'étude des cellules souches coliques pathologiques

Imen Nasri

► **To cite this version:**

Imen Nasri. Etude phytochimique et activités biologiques de Diplotaxis sp.: application à l'étude des cellules souches coliques pathologiques. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT: 2016TOU30155 . tel-01578064

HAL Id: tel-01578064

<https://theses.hal.science/tel-01578064>

Submitted on 28 Aug 2017

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec l'Université de Sfax, Tunisie

Présentée et soutenue par :

Imen NASRI

le jeudi 29 septembre 2016

Titre :

Etude phytochimique et activités biologiques de *Diplotaxis* sp.:
Application à l'étude des cellules souches coliques pathologiques.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

INSERM U1220, IRSD Institut de Recherche en Santé Digestive

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Claire Racaud-Sultan

Pr. Raoudha Mezghani-Jarraya

Jury :

Pr. Mohamed Damak, PRESIDENT

Pr. Hélène Talarmin, RAPPORTEUR

Pr. Fakher Chabchoub, RAPPORTEUR

Pr. Nicolas Fabre, EXAMINATEUR



THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE SFAX

Spécialité Chimie

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Spécialité Cancérologie

PAR

Imen NASRI

Soutenue le : 29 Septembre 2016

**Etude phytochimique et activités biologiques de *Diplotaxis sp.*:
Application à l'étude des cellules souches coliques pathologiques.**

Pr. Mohamed Damak	Université de Sfax	PRESIDENT
Pr. Hélène Talarmin	Université de Brest	RAPPORTEUR
Pr. Fakher Chabchoub	Université de Sfax	RAPPORTEUR
Pr. Nicolas Fabre	Université de Toulouse	EXAMINATEUR
Pr. Raoudha Mezghani-Jarraya	Université de Sfax	DIRECTRICE
Dr. Claire Racaud-Sultan	Université de Toulouse	DIRECTRICE

Année Universitaire : 2015-2016

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes très chers parents Lamine et Razika

*qui m'ont entourée, tout le long de ma vie, de leur amour et leur soutien et dont
les sacrifices qu'ils ont consentis m'ont permis d'atteindre ce niveau*

À mon cher époux Jamel

pour son soutien et son appui moral tout le long de mon travail

À mon petit ange Louay

*pour te dire que tu resteras pour toujours
le rayon de soleil qui égaye ma vie*

Je t'aime mon bébé et je te souhaite tout le bonheur du monde

À mes frères, mes sœurs et leurs petites familles

pour leur assistance et leur amour fraternel et leur chaleur

À toute ma famille « NASRI ET HAMDI »

À tous ceux qui me sont chers.

Imen NASRI

Remerciements

Cette thèse a été réalisée sous cotutelle dans le **Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (UR11- ES74) de la Faculté des Sciences de Sfax-Tunisie** et à l'**INSERM de Toulouse-France (U1043-CPTP, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, puis U1220-IRSD, Institut de Recherche en Santé Digestive)**, dans le cadre d'un **partenariat PHC UTIQUÉ** (projet N°CMCU12G0821, «*Plantes médicinales à effets anti-inflammatoires et pré-cancérisation des cellules souches intestinales*»).

J'adresse tout d'abord mes plus vifs remerciements au Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles **UR11- ES74**, Professeur **Ridha BEN SALEM**, pour ses encouragements et ses qualités humaines, et à la Directrice de l'**Institut de Recherche en Santé Digestive**, Docteur **Nathalie VERGNOLLE**, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire durant trois stages qui m'ont donné beaucoup d'expérience et m'ont aidée à trouver ma voie pour le reste de mes études.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes Directrices de thèse, Mme **Raoudha MEZGHANI-JARRAYA**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax, et Mme **Claire RACAUD-SULTAN**, Chargée de recherches à l'INSERM, pour m'avoir encadrée, formée tout au long de mon parcours. Je tiens vivement à les remercier pour leur disponibilité, leurs conseils judicieux et leurs efforts déployés pour me fournir les ressources nécessaires pour mon travail en chimie et en biologie. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Je remercie également tous les membres du Jury pour leur disponibilité en acceptant de juger mon travail:

Mr **Mohamed DAMAK**, Professeur Emérite, qui m'a honorée en acceptant de présider le Jury de ma thèse.

Mr **Fakher CHABCHOUB**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax, et Mme **Hélène TALARMIN**, Professeur à l'Université Bretagne Loire, merci également d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant que rapporteurs. Merci de m'avoir consacré votre temps pour évaluer mon travail.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Mr **Nicolas FABRE**, Directeur du Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement PHARMA-DEV UMR 152 à Toulouse, qui a accepté d'examiner mon rapport et m'a aidée durant mes travaux en chimie à Toulouse.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu la chance et le plaisir de travailler et de discuter avec différentes personnes dans les laboratoires en Tunisie et en France. Je voudrais les remercier de l'aide qu'elles m'ont apportée au cours de ce travail:

- Mr **Younes AYADI** à la Faculté des Sciences de Sfax et Mme **Caroline TOPPAN** du service commun de RMN de Toulouse, pour les analyses de RMN.
- Mme **Isabelle FABING** à l'Institut de Chimie de Toulouse pour les analyses HPLC.
- Mr **Rachid CHAWECH** de notre laboratoire (UR11- ES74) et Mlle **Cynthia GIRARDI** du Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement à Toulouse pour leur gentillesse et leur aide.
- Mr **Slim TOUNSI**, Directeur du Laboratoire des Biopesticides au Centre de Biotechnologie de Sfax, Mr **Mohamed TRIGUI**, Maître de conférences ainsi que Madame **Dhekra MHALLA** et les membres de ce laboratoire, pour la réalisation des tests microbiologiques.
- Mme **Sophie ALLART** et Mme **Astrid CANIVET** du Plateau Technique d'Imagerie Cellulaire du Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan pour le traitement et l'analyse des images.
- Tous les membres du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et les membres de l'Institut de Recherche en Santé Digestive pour leurs amitiés, gentillesse et soutien moral.

Que tous ceux que je n'ai pas cités et qui m'ont aidée tout au long de ces années, soient assurés de ma profonde et sincère reconnaissance.

Résumé

Les plantes médicinales *Diplotaxis harra* et *Diplotaxis simplex* occupent une place importante dans la pharmacopée traditionnelle grâce à leurs compositions variées en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes. Ces derniers jouent un rôle important dans plusieurs activités biologiques, notamment anti-inflammatoires et anti-cancéreuses.

Dans ce contexte, et à la recherche de molécules bioactives dans *D. harra* et *D. simplex*, nous avons mis au point un nouveau modèle d'étude *in vitro* des cellules souches à l'origine des pathologies inflammatoires et cancéreuses coliques où leur survie dépend de l'activation de la Glycogène Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) en aval du récepteur de protéases inflammatoires PAR₂. Ce modèle a permis la purification bioguidée de glucoflavonoïdes à partir d'un extrait méthanolique des fleurs de *D. harra* capables d'inhiber GSK3 β *via* la voie PKC. Ainsi, l'Isorhamnétine-3,7-di-*O*-glucoside s'est révélé cytotoxique vis à vis des cellules inflammatoires ou cancéreuses coliques tout en épargnant les cellules normales.

D'autre part, en raison de l'intérêt grandissant porté aux fractions volatiles en thérapeutique, nous avons étudié les compositions chimiques et les activités antioxydantes des fractions volatiles des feuilles et des fleurs de *D. simplex*. En se basant sur la technique chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), nous avons montré que les deux fractions volatiles contiennent des quantités importantes de composés soufrés/azotés, parmi lesquels le 5-methylthiopentanenitrile et le 1-isothiocyanatobutane pourraient être impliqués dans l'effet antioxydant des fleurs de *D. simplex*.

En conclusion, nos travaux ont permis de révéler l'axe PAR₂/GSK3 β comme une nouvelle voie de survie des cellules souches coliques et l'intérêt thérapeutique des glucoflavonoïdes et des fractions volatiles de l'espèce *Diplotaxis*.

Abstract

The medicinal plants *Diplotaxis harra* and *Diplotaxis simplex* occupy an important place in traditional medicine due to their varied compositions in secondary metabolites such as flavonoids. Flavonoids play an important role in many biological activities, including inflammation and cancer.

In this context and in search of bioactive molecules in *D. harra* and *D. simplex*, we have developed a new study model, *in vitro*, where colonic stem cells causing inflammatory diseases and colorectal cancer survive through the activation of Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) downstream of inflammatory proteases PAR₂ receptor. This model allowed the bio-guided purification of glucoflavonoids from a methanol extract of *D. harra* flowers able to inhibit GSK3 β via a PKC-dependent pathway. Thus, isorhamnetin-3,7-di-*O*-glucoside was found to be cytotoxic against inflammatory or colon cancer cells while sparing normal cells. On the other hand, due to the growing interest in therapeutic volatile fractions, we studied the chemical composition and antioxidant activity of volatile fractions of leaves and flowers of *D. simplex*. Based on the gas chromatography mass spectrometry technique (GC-MS), we have shown that both volatile fractions contain significant amounts of sulfur/nitrogen compounds, including 5-methylthiopentanenitrile and 1-isothiocyanatobutane, which might be involved in the antioxidant effect of flowers from *D. simplex*.

In conclusion, our work revealed the axis PAR₂/GSK3 β as a new survival pathway for colon stem cells and the therapeutic value of glucoflavonoids and volatile fractions of *Diplotaxis* species.

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Tables des matières	3
Abréviations.....	7
Liste des figures.....	9
Liste de tableaux.....	12
Introduction.....	14

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- SPECIFICITES BOTANIQUES ET PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE <i>D. SIMPLEX</i> ET <i>D. HARRA</i>	17
I-1- La famille des Crucifères ou Brassicaceae.....	17
I-2- Le genre <i>Diplotaxis</i>	17
I-3- L'espèce <i>Diplotaxis simplex</i>	18
I-3-1- Classification.....	18
I-3-2- Description botanique.....	18
I-3-3- Composition chimique.....	18
I-3-4- Propriétés pharmacologiques.....	21
I-4- L'espèce <i>Diplotaxis harra</i>	21
I-4-1- Classification.....	21
I-4-2- Description botanique.....	21
I-4-3-Composition chimique.....	22
I-4-4- Utilisations traditionnelles.....	26
II- GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES.....	26
II-1- Définition.....	26
II-2- Composition chimique.....	27
II-3- Propriétés pharmacologiques.....	27
III- COMPOSES NATURELS ET CELLULES SOUCHES PATHOLOGIQUES	27
III-1- Cellules souches pathologiques et ciblage par des composés naturels	27
III-2- Les flavonoïdes et la voie GSK3 β dans les cellules souches cancéreuses.....	29
III-3- Les composés naturels dans les pathologies colorectales.....	34

Objectif des recherches	36
--------------------------------------	----

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I- MATERIEL VEGETAL.....	38
I-1- Collecte et identification du matériel végétal.....	38
I-2-Extraction par macération.....	38
I-3-Extraction des fractions volatiles par hydrodistillation.....	41
II- CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE.....	42
II-1- Tests phytochimiques préliminaires.....	42
II-2- Dosage des phénols totaux.....	43
II-2-1- Principe.....	43
II-2-2- Mode opératoire.....	43
II-3- Dosage des flavonoïdes totaux.....	44
II-3-1- Principe.....	44
II-3-2- Mode opératoire.....	44
III- METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.....	44
III-1- Méthodes chromatographiques analytiques.....	44
III-1-1 La chromatographie sur couche mince (CCM)	44
III-1-2 La Chromatographie Liquide Ultra haute Pression (UHPLC)	45
III-1-3 Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC\MS)	45
III-2- Méthodes chromatographiques préparatives.....	46
III-2-1 Chromatographie sur colonne ouverte.....	46
III-2-2 Chromatographie liquide à haute performance semi-préparative (HPLC semi-préparative)	46
III-2-3 Chromatographie sur couche épaisse préparative.....	47
IV- TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES.....	47
IV-1- Spectrométrie de masse (SM)	47
IV-2- Résonance magnétique nucléaire (RMN)	47
V- ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	49
V-1- Activité de piégeage de radicaux.....	49
V-2- Activité antibactérienne.....	51
V-2-1- Microorganismes.....	51

V-2-2- Méthode de diffusion par puits.....	51
V-2-3- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)	52
V-3- Activités anti-inflammatoires et anti-cancéreuses.....	53
V-3-1- Culture et caractérisation des colonosphères et des tumorosphéroïdes.....	53
V-3-2- Étude de la voie de signalisation PAR ₂ /GSK3β.....	55
V-3-3- Évaluation de la viabilité des cellules immatures inflammatoires ou cancéreuses.....	57
V-3-4- Immunomarquages des tissus coliques <i>in situ</i>	58

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I- ETUDES PHYTOCHIMIQUES DE <i>D. SIMPLEX</i> ET <i>D. HARRA</i>	60
I-1- Rendement d'extraction.....	60
I-2- Caractérisation phytochimique des organes de <i>D. simplex</i> et <i>D. harra</i>	61
I-2-1-Tests phytochimiques.....	61
I-2-2-Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	62
I-3- Composition chimique des fractions volatiles des fleurs et des feuilles de <i>D. simplex</i>	65
I-3-1- Fraction volatile des fleurs de <i>D. simplex</i>	66
I-3-2- Fraction volatile des feuilles de <i>D. simplex</i>	68
II- ACTIVITES ANTI-RADICALAIRE ET ANTIBACTERIENNES DES EXTRAITS DE <i>D. SIMPLEX</i> ET <i>D. HARRA</i>	70
II-1- Activité anti-radicalaire.....	70
II-1-1- Activité anti-radicalaire des extraits de <i>D. simplex</i> et <i>D. harra</i>	70
II-1-2- Activités anti-radicales des fractions volatiles de <i>D. simplex</i>	72
II-2- Activité antibactérienne.....	74
III- MODELE D'ETUDE DES CELLULES SOUCHES COLIQUES INFLAMMATOIRES OU CANCEREUSES.....	77
III-1- Rôle régulateur de PAR ₁ et de PAR ₂ sur les fonctions des cellules souches coliques.....	77
III-1-1- Expression de PAR ₁ et de PAR ₂ dans la crypte colique.....	77
III-1-2- Impact de l'activation de PAR ₁ et de PAR ₂ sur la survie et la prolifération des cellules souches coliques cultivées en 3D.....	80
III-2- Mise en évidence d'une voie de survie cellulaire PAR ₂ /GSK3β.....	84
IV- PURIFICATION BIOGUIDEE DES COMPOSES DE <i>D. HARRA</i> ET CIBLAGE DES CELLULES SOUCHES COLIQUES PATHOLOGIQUES.....	89
IV-1- Fractionnement de l'extrait méthanolique des fleurs de <i>D. harra</i> (NI10).....	89
IV-1-1- Activité inhibitrice de GSK3β de l'extrait méthanolique des fleurs de <i>D. harra</i>	90
IV-1-2- Analyse LC-MS/MS et activité biologique de la fraction F6.....	91

IV-1-3- Analyse MS-MS et activité biologique des deux fractions NIL7 et NIL12.....	104
IV-1-4- Purification et activité biologique de l'isorhamnétine-3,7-di-O-glucoside.....	106
V- ETUDE STRUCTURALE DES PRODUITS ISOLÉS DE <i>D. SIMPLEX</i> ET <i>D. HARRA</i>	112
V-1- Identification et activité anti-radicalaire de NIF1 purifié à partir de l'extrait au MeOH de <i>D. harra</i>	112
V-2- Identification de NIL7B purifié à partir de l'extrait au MeOH de <i>D. harra</i>	119
V-3- Identification de NIL7C purifié à partir de l'extrait au MeOH de <i>D. harra</i>	120
V-4- Identification de NIL7D purifié à partir de l'extrait au MeOH de <i>D. harra</i>	121
V-5- Identification de L71B purifié à partir de l'extrait au MeOH de <i>D. simplex</i>	122
V-5-1 Spectroscopie UV du produit (L71B).....	124
V-5-2 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse et le détecteur diode Array LCMS-DAD.....	125
V-5-3 Spectroscopie de RMN ¹ H.....	127
Conclusion et perspectives	135
Références bibliographiques	137
Publications	145

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APC	Adenomatous polyposis coli
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
BB	Le spectre totalement découplé de RMN de ¹³ C (Broad Band)
BHT	Hydroxytoluène butylé
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCE	Chromatographie sur couche épaisse préparative
CD3OD	Méthanol deutéré
CE50	Concentration efficace 50
CMB	Concentrations Minimales Bactéricides
CMI	Concentrations Minimales Inhibitrices
COSY	Spectroscopie de corrélation via les couplages scalaires (Correlated Spectroscopy)
CSI	Cellules souches intestinales
d	Doublet
dd	Doublet dédoublé
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO-d6	Diméthyl sulfoxyde deutérié
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DO	Densité optique
ESI	Ionisation par électronébulisation (ElectroSpray Ionization)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FCS	foetal calf sérum (Le sérum de veau fœtal).
GCMS	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
GSK3β	<i>Glycogene synthase kinase 3β</i>
HMBC	Corrélation hétéronucléaire à travers plusieurs liaisons (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Pression (High Pressure Liquid Chromatography)
HSQC	Spectroscopie hétéronucléaire simple quantum (Heteronuclear Single Quantum)
IR	Infra rouge
J	Constante de couplage
m/z	Rapport masse/charge atomique
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2Htetrazolium)
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
NOESY	Spectroscopie de corrélation par effet Overhauser nucléaire (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)

Nrf2	<i>Nuclear factor Erythroid 2-related factor 2</i>
PARs	Protease-activated receptors
PAR₂ KO	Knock-out PAR ₂
PI	Pouvoir inhibiteur
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKB /Akt	<i>Protein kinase B</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase A2</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsine homolog</i>
ppm	Partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SVF	Sérum de veau foetal
t	Triplet
TIC	Courant ionique total (Total Ion Current)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UPLC	Chromatographie Liquide Ultra haute pression
UV	Ultraviolet
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
s	Singulet
SM	Spectrométrie de Masse (Mass Spectrometry)
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Wnt	Wingless-related integration site
λ	Longueur d'onde
δ	Déplacement chimique

Liste des figures

Figure 1	Taxonomie de <i>Diplotaxis simplex</i>	p. 18
Figure 2	Taxonomie de <i>Diplotaxis harra</i>	p. 21
Figure 3	Composés naturels et ciblage des cellules souches cancéreuses	p. 28
Figure 4	Composés naturels et niche des cellules souches	p. 29
Figure 5	Voies de signalisation et les fonctions cellulaires de GSK3 β	p. 31
Figure 6	Macération des différents organes de <i>D. harra</i>	p. 39
Figure 7	Macération des différents organes de <i>D. simplex</i>	p. 40
Figure 8	Montage d'hydrodistillation	p. 41
Figure 9	Variation des PI en fonction des concentrations de la vitamine E et du BHT	p. 50
Figure 10	Exemple d'immunomarquage d'une crypte colique murine: Les récepteurs CD44 (vert) et PAR1 (rouge). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (cyan).	p. 58
Figure 11	Variation des PI des extraits des différents organes de <i>D. simplex</i>	p. 71
Figure 12	Variation des PI des extraits des différents organes de <i>D. harra</i>	p. 72
Figure 13	Variation des PI des fractions volatiles des feuilles/fleurs de <i>D. simplex</i>	p. 73
Figure 14	IHC de l'expression de PAR ₁ , PAR ₂ et CD44 dans le côlon humain	p. 78
Figure 15	IHC de l'expression de PAR ₁ , PAR ₂ et CD44 dans le côlon murin	p. 78
Figure 16	Expression de PAR1 et de PAR2 dans les cellules souches coliques Sox9-GFP et LGR5-GFP	p. 79
Figure 17	Localisation apico-basale de PAR ₁ et de PAR ₂ dans l'épithélium intestinal	p. 79
Figure 18	Expression de PAR ₁ et de PAR ₂ dans les sphéroïdes coliques tumoraux	p. 80
Figure 19	Croissance des sphéroïdes coliques sous stimulation de PAR ₁ et de PAR ₂	p. 81
Figure 20	PAR ₂ diminue la prolifération des cellules souches coliques	p. 82
Figure 21	PAR ₂ est nécessaire à la survie des sphéroïdes coliques	p. 83
Figure 22	La caspase 3 est activée dans les sphéroïdes coliques PAR ₂ -déficients	p. 83
Figure 23	Impact des inhibiteurs pharmacologiques de GSK3 β sur les sphéroïdes coliques	p. 84
Figure 24	Marquage de la forme inhibée de GSK3 β dans les sphéroïdes coliques	p. 84
Figure 25	Survie cellulaire des IEC6 et inhibition pharmacologique de GSK3 β	p. 85
Figure 26	Analyse par Western blot de la signalisation de PAR ₁ et de PAR ₂	p. 85
Figure 27	Analyse par Western blot de Pser9GSK3 β dans les CMT93 WT ou PAR ₂ KO	p. 86
Figure 28	Activation de GSK3 β PAR ₂ -dépendante et Rho kinase	p. 87
Figure 29	Schéma de la voie PAR ₂ /GSK3 β dans les cellules souches coliques	p. 87

Figure 30	Purification bioguidée des produits de l'extrait méthanolique des fleurs de <i>D. harra</i>	p. 90
Figure 31	Analyse par Western blot de GSK3 β s/activation de PAR ₂ et extraits de <i>D. harra</i>	p. 91
Figure 32	Analyse par Western blot de GSK3 β s/activation de PAR ₂ et fractions de <i>D. harra</i>	p. 92
Figure 33	Inhibition de GSK3 β par la fraction F6 de <i>D. harra</i> et implication de la PKC	p. 92
Figure 34	Cytotoxicité cellulaire de la fraction F6 de <i>D. harra</i>	p. 93
Figure 35	Spectre UV à 260 nm suivi par le courant ionique total de la fraction F6 de <i>D. harra</i>	p. 94
Figure 36	Spectres MS et MS ² (625) de la quercétine-3,4'-di- <i>O</i> -glucoside	p. 95
Figure 37	Spectres MS et MS ² (609) de kaempférol-3,4'-di- <i>O</i> -glucoside	p. 96
Figure 38	Spectres MS et MS ² (639) de l'isorhamnétine-3,4'-di- <i>O</i> -glucoside	p. 97
Figure 39	Spectres MS et MS ² (609) du kaempférol-4'- <i>O</i> -gentiobioside	p. 98
Figure 40	Spectres MS et MS ² (639) de l'isorhamnétine-4'- <i>O</i> -sophoroside	p. 99
Figure 41	Spectres MS et MS ² (609) du kaempférol-4'- <i>O</i> -sophoroside	p. 101
Figure 42	Spectres MS et MS ² (639) de l'isorhamnétine-7- <i>O</i> -gentiobioside	p. 102
Figure 43	Spectres MS et MS ² (477) de l'isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside	p. 103
Figure 44	Spectres de masse des fractions NIL7 et NIL12	p. 105
Figure 45	Cytotoxicité cellulaire de la fraction L12 de <i>D. harra</i>	p. 105
Figure 46	Spectre MS du produit NIF2	p. 106
Figure 47	Spectre de RMN du proton du produit NIF2	p. 107
Figure 48	Spectres de RMN du carbone 13 (BB et DEPT) du produit NIF2	p. 108
Figure 49	Spectre RMN 2D HMBC du composé NIF2	p. 110
Figure 50	Structure du composé NIF2 (isorhamnétine-3,7-di- <i>O</i> -glucoside)	p. 111
Figure 51	Cytotoxicité cellulaire de l'isorhamnétine-3,7-di- <i>O</i> -glucoside (NIF2)	p. 111
Figure 52	Spectres MS et MS ² (477) du produit NIF1	p. 113
Figure 53	Spectre de RMN du proton du produit NIF1	p. 114
Figure 54	Spectre de RMN du carbone 13 du produit NIF1	p. 115
Figure 55	Spectre RMN 2D HMBC du composé NIF1	p. 116
Figure 56	Structure du composé NIF1 (isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside)	p. 118
Figure 57	Variation des PI des fractions de l'extrait méthanolique des fleurs de <i>D. harra</i>	p. 119
Figure 58	Spectres MS, MS ² (639) et MS ³ (639) (ESI-MS) en mode négatif du composé NIL7B	p. 120
Figure 59	Spectres MS, MS ² (463) et MS ³ (463) (ESI-MS) en mode négatif du composé	p. 121

NIL7C

Figure 60	Structure du composé NIL7C (quercétine monoglucosylée)	p. 121
Figure 61	Spectres MS et MS ² (477) (ESI-MS) en mode négatif du composé NIL7D	p. 122
Figure 62	Structure du composé NIL7D (isorhamnétine monoglucosylée)	p. 122
Figure 63	Purification de l'extrait méthanolique des fleurs de <i>D. simplex</i>	p. 123
Figure 64	Spectre de masse (ES ⁺) du produit L71B	p. 125
Figure 65	Spectre de masse (ES ⁻) du produit L71B	p. 126
Figure 66	Chromatogramme LC couplé à la spectroscopie de masse (ES ⁻)	p. 126
Figure 67	Spectre UV par détecteur de diode Array DAD (détection à 360 nm)	p. 127
Figure 68	Spectre RMN du proton à 300MHz du produit L71B dans MeOD	p. 128
Figure 69	Étalements du spectre de RMN du proton à 300 MHz du L71B dans MeOD	p. 129
Figure 70	Spectre RMN ¹ H- ¹ H COSY à 300MHz du produit L71B	p. 132
Figure 71	Spectre RMN NOESY à 300MHz du produit L71B	p. 132
Figure 72	Structure du composé L71B (Isorhamnétine-3- <i>O</i> -hexose)	p. 133

Liste des tableaux

Tableau 1	Variation des PI en fonction des concentrations de la vitamine E et du BHT et leurs CE ₅₀	p. 52
Tableau 2	Rendements des extractions des différents organes de <i>D. simplex</i> et <i>D. harra</i>	p. 63
Tableau 3	Résultats des tests phytochimiques des différents extraits de <i>D. harra</i>	p. 64
Tableau 4	Résultats des tests phytochimiques des différents extraits de <i>D. simplex</i>	p. 64
Tableau 5	Variation de la DO en fonction des concentrations de l'acide gallique	p. 65
Tableau 6	Teneur en polyphénols des différents extraits de <i>D. harra</i> et de <i>D. simplex</i>	p. 66
Tableau 7	Variation de la DO en fonction des concentrations de la quercétine	p. 67
Tableau 8	Teneur en flavonoïdes des différents extraits de <i>D. harra</i> et de <i>D. simplex</i>	p. 68
Tableau 9	Composition chimique de la fraction volatile des fleurs de <i>D. simplex</i>	p. 70
Tableau 10	Composition chimique de la fraction volatile des feuilles de <i>D. simplex</i>	p. 72
Tableau 11	Variation des PI des extraits des différents organes de <i>D. simplex</i> et leurs CE ₅₀	p. 73
Tableau 12	Variation des PI des extraits des différents organes de <i>D. harra</i> et leurs CE ₅₀	p. 74
Tableau 13	Variation des PI des fractions volatiles des feuilles/fleurs de <i>D. simplex</i> et leurs CE ₅₀	p. 74
Tableau 14	Activité antibactérienne des extraits des feuilles/fleurs/racines de <i>D. simplex</i>	p. 75
Tableau 15	Activité antibactérienne des extraits des feuilles/fleurs/racines de <i>D. harra</i>	p. 76
Tableau 16	Détermination des valeurs des CMI et CMB des extraits de <i>D. simplex</i>	p. 77
Tableau 17	Données en RMN du composé NIF2	p. 109
Tableau 18	Déplacements chimiques RMN du ¹³ C de l'isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside et NIF1	p. 117
Tableau 19	Variation des PI des fractions de l'extrait méthanolique des fleurs de <i>D. harra</i>	p. 118
Tableau 20	Interprétation des résultats du spectre UV du composé L71B	p. 124
Tableau 21	λ _{max} UV L71B/isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside/isorhamnétine-3- <i>O</i> -galactoside	p. 126
Tableau 22	Déplacements chimiques des protons de l'isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside/isorhamnétine-3- <i>O</i> -galactoside/L71B	p. 130

Introduction

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des pathologies est devenue l'une des principales voies d'accès aux soins.

La plupart des espèces végétales possèdent des vertus thérapeutiques. L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes qui constituent un réservoir inépuisé de nouveaux métabolites secondaires.

Plusieurs plantes ont été utilisées traditionnellement pour se soigner; des plantes aromatiques sont utilisées comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine ; d'autres plantes sont connues pour leurs propriétés nutritives.

Dans l'espoir de valoriser les plantes médicinales de la flore Tunisienne, nous avons eu recours à l'étude structurale et biologique de deux plantes utilisées en médecine traditionnelle : *Diplotaxis simplex* et *Diplotaxis harra*.

Ce travail de recherche a été réalisé dans le cadre d'une thèse sous cotutelle entre le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (**UR-11/ES-74**) à la faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax et le centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (**U1043 INSERM-U5282 CNRS**), puis l'Institut de Recherche en Santé Digestive (**IRSD, U1220 INSERM**), de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

L'ensemble de mes travaux sera présenté en trois chapitres:

- Dans le premier chapitre, un aperçu général sur *D. simplex* et *D. harra* est présenté ainsi que quelques travaux phytochimiques et biologiques des principes actifs contenus dans ces deux espèces, une généralité sur les fractions volatiles et une notion sur les composés naturels et les cellules souches pathologiques.
- Le second chapitre est consacré aux techniques d'extraction, de séparation et de purification des composés de *D. simplex* et de *D. harra*. En outre, les méthodes d'évaluation des activités anti-oxydante, antibactérienne et anticancéreuse des extraits sont présentées.

- Le troisième chapitre présente les résultats sur le screening phytochimique, les activités antioxydante et antibactérienne des extraits des deux espèces de *Diplotaxis*, la composition chimique et l'activité antioxydante des fractions volatiles des feuilles et des fleurs de *D. simplex*, un modèle d'étude biologique des cellules souches coliques pathologiques intestinales, l'identification de deux produits par bioguidage sur le ciblage des cellules souches coliques et finalement l'identification du reste des produits isolés.
- Une discussion générale sur les résultats.
- Enfin, nous avons fini ce manuscrit par une conclusion générale sur l'ensemble du travail et les différentes perspectives envisageables.

Etude bibliographique

I- SPECIFICITES BOTANIQUES ET PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE *D. SIMPLEX* ET *D. HARRA*

I-1- La famille des *Crucifères* ou *Brassicaceae*

La famille de *Brassicaceae* a pour nom alternatif '*Crucifereae*', elle contient 338 genres et 3350 espèces [1,2]. Cette famille représente une part importante de l'alimentation humaine, elle est considérée comme une bonne source de composés actifs tels que les composés phénoliques, les vitamines, les fibres, les sucres solubles, les minéraux, les métaux, les acides aminés et les glucosinolates. Ces composés chimiques ont diverses applications en raison de leurs propriétés anticancéreuses, antimicrobiennes et antioxydantes [3].

Les plantes de cette famille ont été utilisées traditionnellement comme antidiabétiques, antibactériennes, antifongiques, anticancéreux, antirhumatismaux et anti-insectes [4].

De nombreuses espèces appartiennent à la famille *Brassicaceae* ont des feuilles caractérisées par un goût plus ou moins piquant et sont, par conséquent, utilisées pour parfumer les salades [5].

I-2- Le genre *Diplotaxis*

Le genre *Diplotaxis* appartient à la famille des *Brassicaceae*. Ce genre contient 32 espèces [1,2], originaires d'Europe, du bassin méditerranéen, et d'Asie. Certaines espèces de *Diplotaxis* sont cultivées pour la consommation humaine, ce sont des salades [6,7], tandis que d'autres sont des mauvaises herbes [8].

Les plantes du genre *Diplotaxis* sont vivaces ou bisannuelles à feuilles semi-charnues plus ou moins découpées, à rameaux allongés, avec des pédicelles minces, des pétales à longs onglets terminés par une lame ovale et jaune, des étamines libres non dentées, des siliques linéaires à valves planes, et des graines ovales comprimées placée dans chaque loge en deux séries. D'où le terme *Diplotaxis* [9].

I-3- L'espèce *Diplotaxis simplex*

I-3-1- Classification



Règne: *Plantae*
Classe: *Magnoliopsidae*
Famille: *Brassicaceae* ou *Crucifères*
Genre: *Diplotaxis* DC
Nom scientifique: *Diplotaxis simplex* (Viv.) Spreng
Nom vernaculaire arabe [10]: *Jirjir*
Synonymes [11]: *Sisymbrium simplex* Viv.
Diplotaxis muralis subsp. *simplex* (Viv.)

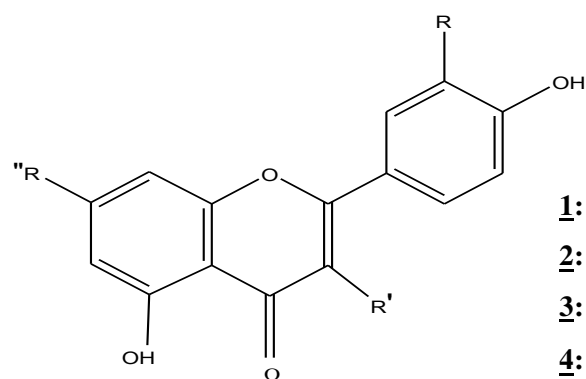
Figure 1: Taxonomie de *Diplotaxis simplex*

I-3-2- Description botanique

D. simplex est une plante comestible de la famille de *Brassicaceae* et est originaire de la région méditerranéenne. C'est une plante annuelle, glabre, à tiges très ramifiées, qui peut atteindre 50 cm de hauteur. Les feuilles sont basales, formant une rosette, et les fleurs jaune vif apparaissent en hiver jusqu'à la fin du printemps alors que les siliques sont ascendantes [12].

I-3-3- Composition chimique

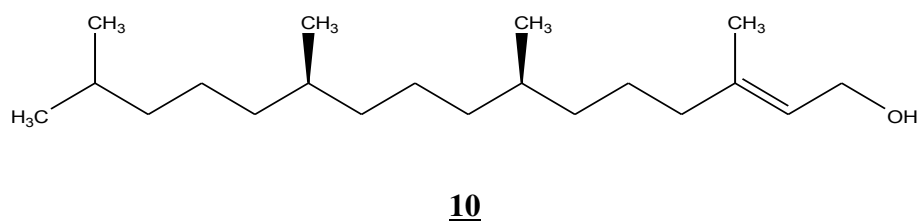
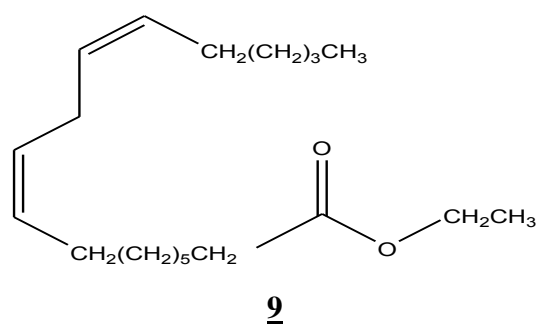
En 1994, Sanchez-Yelamo *et al.* ont purifié et identifié à partir des feuilles de *D. simplex* cinq glucoflavonoïdes dérivées du kaempférol, la quercétine et l'isorhamnétine : la quercétine-3-glucoside **1**, l'isorhamnétine-3-glucoside **2**, le kaempférol-3-glucoside **3**, le kaempférol-3,7-rhamnose-galactose **4** et le kaempférol-diglucoside [13].



- | | | | |
|-----------|--------------------|----------------|-------------------|
| 1: | R=OH | R'=O-glucose | R'''= OH |
| 2: | R=OCH ₃ | R'=O-glucose | R'''= OH |
| 3: | R=H | R'=O-glucose | R'''= OH |
| 4: | R=H | R'= O-rhamnose | R'''= O-galactose |

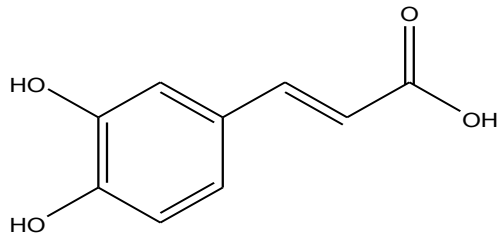
Un criblage phytochimique réalisée par Akrouit *et al*, en 2010, a révélé la présence de flavonoïdes, de tanins et de saponines et l'absence d'alcaloïdes et d'antraquinones dans *D. simplex* [10].

En 2015, Jdir et al. [14] ont étudié la composition lipidique et minérale des feuilles et des fleurs de *D. simplex*. Ils ont identifié deux hydrocarbures majeurs présents dans les fleurs: l'hexacosane **5** (C₂₆H₅₄) et le pentacosane **6** (C₂₅H₅₂) et qui sont absents dans les feuilles, et ont trouvé l'acide linoléique **7** (C₁₈H₃₀O₂) et l'acide palmitique **8** (C₁₆H₃₂O₂), les principaux acides gras présents dans la fraction lipidique des deux organes. En plus, la fraction lipidique des feuilles est caractérisée par un taux relativement élevé de linoléate d'éthyle **9** et de phytol **10**.

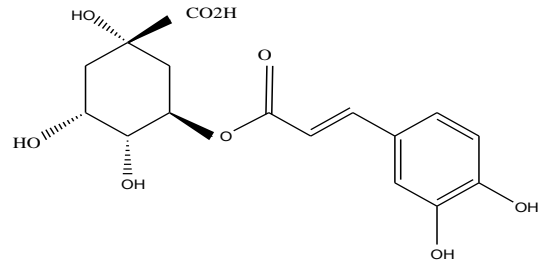


Le potassium et le calcium sont les minéraux les plus concentrés dans les extraits des feuilles et des fleurs, suivis par le sodium et le magnésium.

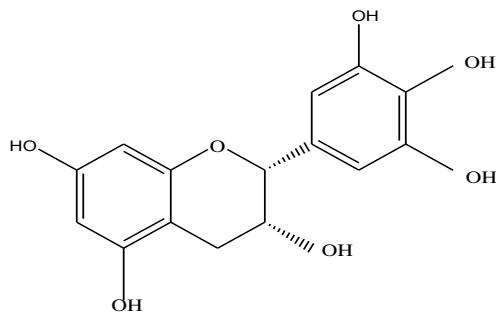
Les fleurs de *D. simplex* sont particulièrement riches en composés phénoliques détectés par HPLC qui sont l'acide caféique **11**, l'acide chlorogénique **12**, l'épigallocatechine **13**, l'acide p-coumarique **14** et l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque **15**.



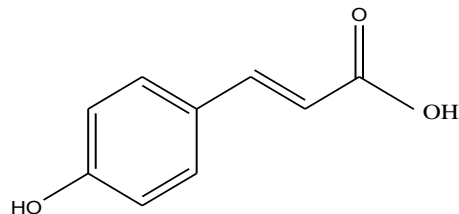
11



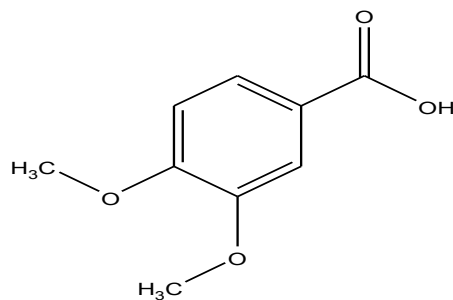
12



13



14



15

I-3-4- Propriétés pharmacologiques

Les feuilles et les fleurs de *D. simplex* contiennent plusieurs éléments nutritifs importants et des composés bioactifs avec des propriétés biologiques intéressantes [15]. *D. simplex* est douée d'activités antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne puissantes et d'une activité inhibitrice de l' α -amylase et de l' α -glycosidase. Ces potentialités biologiques ont été attribuées à sa teneur importante en composés phénoliques. Récemment, il a été montré que cette espèce supprime l'hyperglycémie post-prandiale chez des souris en inhibant les enzymes clés liées au diabète [14].

I-4- L'espèce *Diplotaxis harra*

I-4-1- Classification



Règne : *Plantae*
Classe : Magnoliopsidae
Famille : *Brassicaceae* ou *Crucifères*
Genre : *Diplotaxis* DC
Nom scientifique : *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss.
Nom vernaculaire arabe [18]: El harra
Synonymes [11]: *Sinapis crassifolia*
Diplotaxis crassifolia
Sinapis harra (Forssk.)

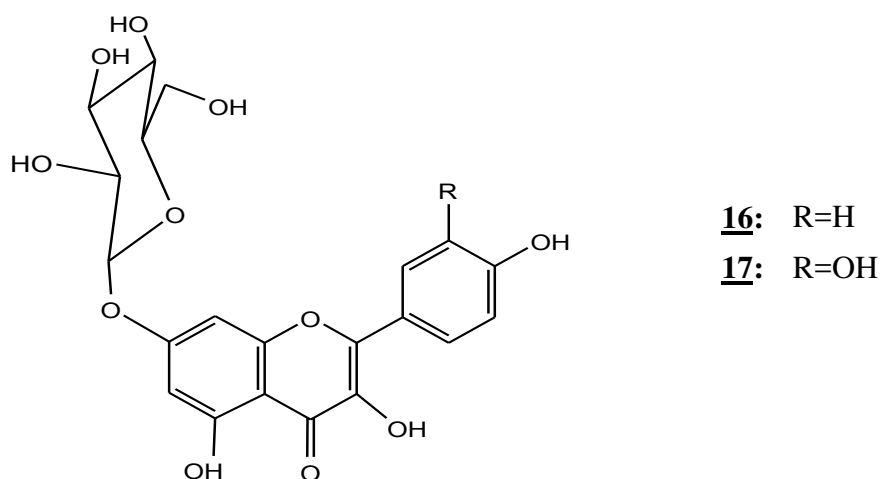
Figure 2 : Taxonomie de *Diplotaxis harra*

I-4-2- Description botanique

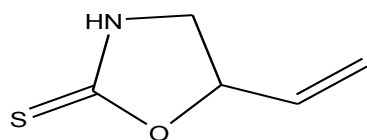
D. harra est une espèce annuelle ou vivace, appartenant à la famille des *Brassicaceae*, distribuée dans les déserts d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient sous forme de tapis de fleurs jaunes [18, 19]. Avec une hauteur de 20-30 cm, ses tiges sont dressées et ramifiées, ses fleurs sont jaunes avec un pédoncule filiforme, ses pétales sont deux fois plus longs que les sépales duveteux. Les fruits sont des siliques pendantes à la pointe de 2-4 mm de long.

I-4-3-Composition chimique

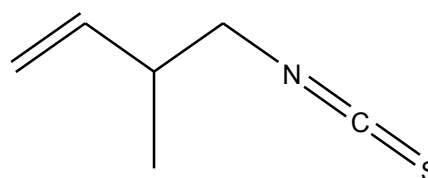
Les travaux chimiques effectués sur l'espèce *D. harra* ont commencé depuis 1994. Sanchez-Yelamo [13] a purifié et identifié les produits suivants: le kaempférol-7-glucoside **16**, la quercétine-7-glucoside **17**, la quercétine-3-glucoside **1**, l'isorhamnétine-3-glucoside **2**, le kaempférol-3-glucoside **3**, le kaempférol-3-digalactoside, la quercétine-triglycoside (rhamnose+galactose), l'isorhamnétine-diglucoside et le kaempférol-diglucoside.



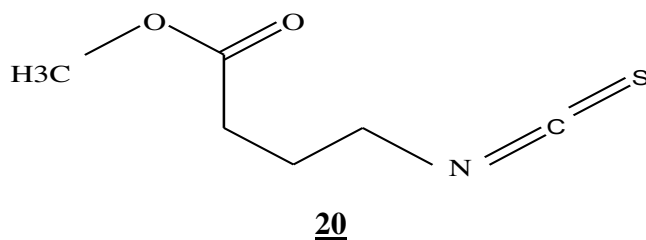
Ensuite en 1999, Hashem et ses collaborateurs [20] ont isolé à partir de l'extrait éthanolique et suite à une réaction enzymatique trois produits: le 5-vinyl-2-oxazolidinethione **18**, le 2-hydroxy-3-buténylisothiocyanate **19** et le 4-méthylisothiocyanatobutyrate **20**.



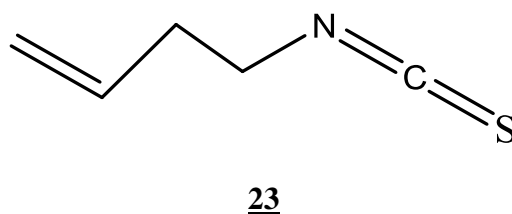
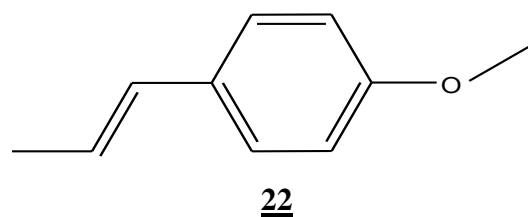
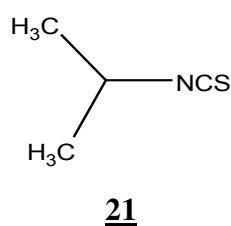
18



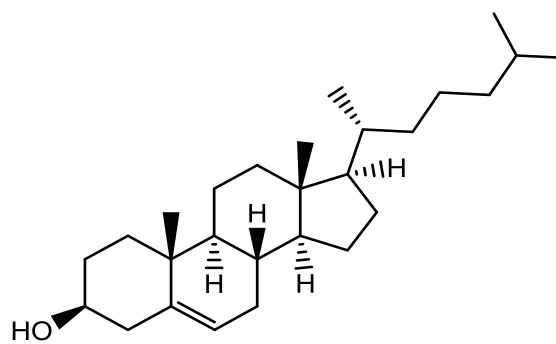
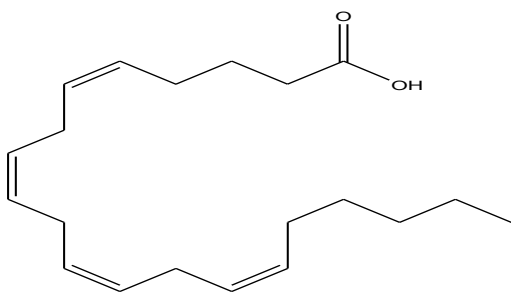
19

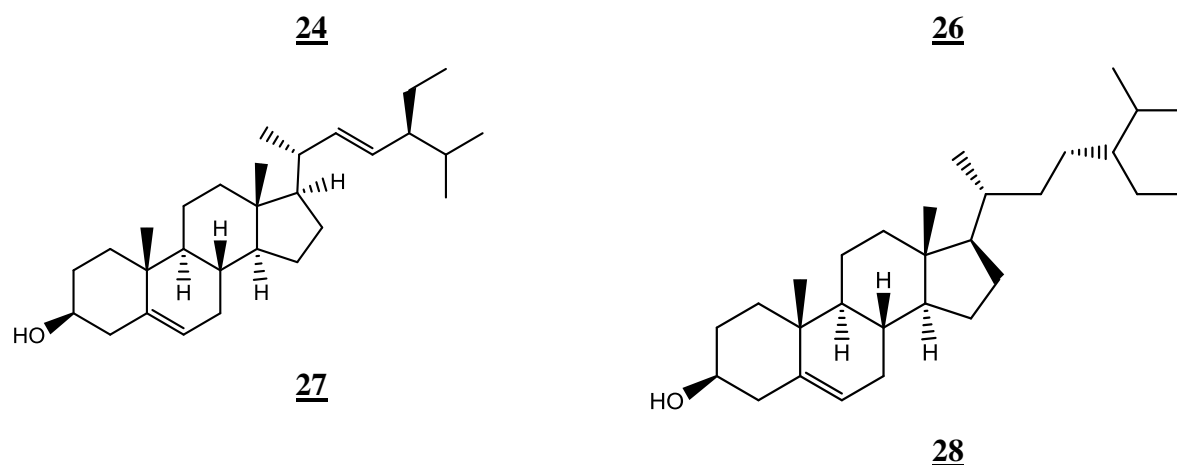


Dans la même étude, ils ont identifié, à partir de l'huile essentielle les produits suivants : l'isopropylisothiocyanate **21**, l'anéthol **22** et le 3-butényl isothiocyanate **23**.



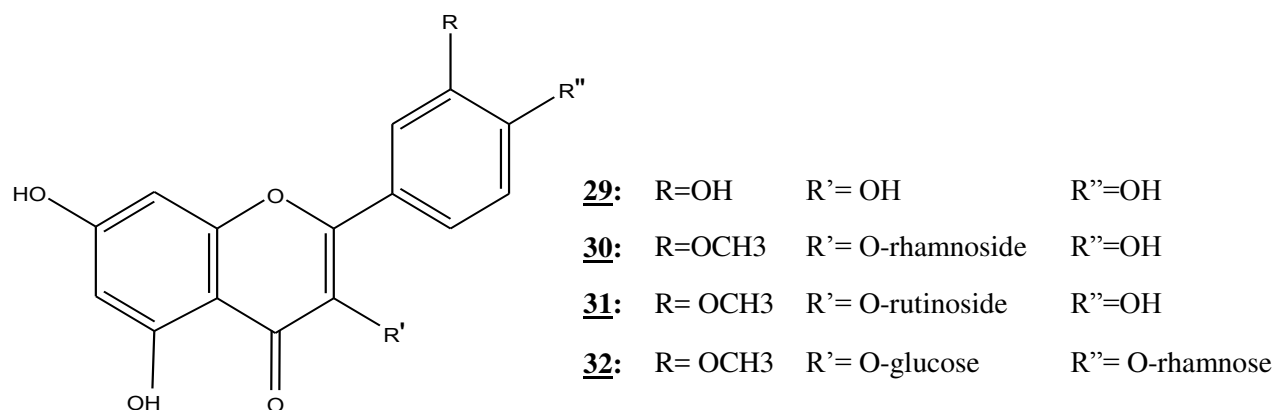
A partir des parties saponifiable et insaponifiable de l'extrait à l'éther de pétrole, ils ont montré la présence d'acide arachidonique **24**, d'acide palmitique **8** (C₁₆H₃₂O₂), de nonacosane **25** (C₂₉H₆₀), de cholestérol **26**, de stigmastérol **27** et de bêta-sitostérol **28**.



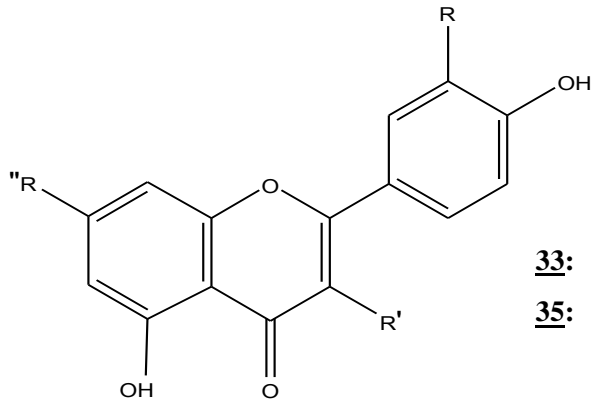


Cette équipe [20] a montré une activité plus élevée des acides gras libres de *D. harra* contre les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif tandis que les constituants volatils étaient plus actifs contre les levures.

Plusieurs autres travaux réalisés sur cette espèce ont montré leur richesse en flavonoïdes. En 2011 [21], Atta et al. ont isolé cinq flavonoïdes à partir d'un extrait de la partie aérienne douée d'une activité antimicrobienne : la quercétine **29**, l'isorhamnétine-3-rhamnoside **30**, l'isorhamnétine-3-O-rutinoside **31**, l'isorhamnétine-3-glucosyl-4'-rhamnoside **32** et l'isorhamnétine-3-O-β-glucoside **2**.

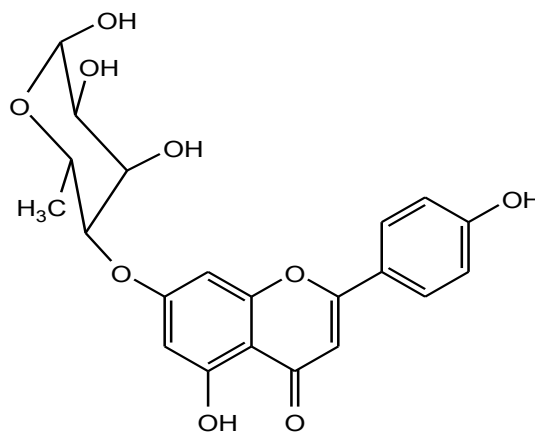


En 2013, Magdy et ses collaborateurs [22] ont isolé cinq flavonoïdes: la quercétine **29**, la quercétine-3-O-β-glucoside **1**, l'isorhamnétine-7-O-β-glucoside **33**, l'apigénine-7-O-β-rhamnoside **34** et le kaempférol-3-O-β-glucoside **35**. Ces flavonoïdes présentaient une activité cytotoxique *in vitro* contre la lignée cellulaire cancéreuse de colon HCT116.



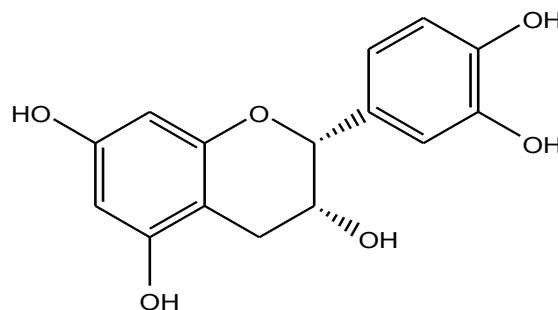
33: R= OCH₃ R'=OH R''= O-glucose

35: R=H R'=O-glucose R''= OH



34

Dans la même année, Falleh et ses collaborateurs [23] ont montré que l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra* est très riche en polyphénols et en flavonoïdes. Une analyse HPLC était faite sur cet extrait qui a identifié deux composés phénoliques majeurs : l'acide caféique **12** et l'acide chlorogénique **13** et un flavonoïde majeur: l'épicatéchine **36**. Grâce à l'existence de ces polyphénols, cet extrait possède une activité antioxydante importante et une activité antimicrobienne moyenne.



3

De plus, Kassem et ses collaborateurs [24] ont isolé deux nouveaux flavonoïdes **13** et **14** et 12 autres connus: la quercétine **29**, l'isorhamnétine **37**, l'isorhamnétine-3-*O*- α -rhamnoside **30**, l'isorhamnétine-3-*O*- β -glucoside **2**, la quercétine-3-*O*- β -glucoside **1**, l'isorhamnétine-7-*O*-glucoside **33**, le kaempférol-3-*O*- β -glucoside **3**, l'isorhamnétine-3-*O*-[2''-*O*-acétyl-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside **38**, l'isorhamnétine-3,4'-di-*O*- β -glucoside **39**, l'isorhamnétine-3,7-di-*O*- β -glucoside **40**, la quercétine-7-*O*- β -glucoside **18**, la quercétine-3-*O*- α -rhamnoside **41**.

Ces quatorze flavonoïdes possèdent une activité antivirale.

I-4-4- Utilisations traditionnelles

En médecine traditionnelle, *D. harra* est utilisée comme tonique et stimulant, antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et anticancéreux, et pour le traitement de l'anémie [25,26]. La partie aérienne de *D. harra* est utilisée en décoction en cas de constipation ou de diabète [18]. Elle est connue aussi pour son effet analgésique et a une toxicité modérée [27].

II- GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES

II-1- Définition

Une huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage.

Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante [28].

II-2- Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes d'environ 20 à 60 constituants aromatiques plus ou moins volatils, caractérisés par deux ou trois composés à haute concentration qui déterminent leurs propriétés biologiques. Les principaux constituants sont: les terpènes qui sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures, en particulier les mono- et sesquiterpènes très volatils et de faible masse [29,30], et les composants aromatiques qui sont principalement des dérivés du phénylpropane C6-C3, comprenant des phénols (chavicol, eugénol), des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des dérivés méthoxy (anéthol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, safrol) [31]. Les composés azotés ou soufrés tels que les dérivés des Isothiocyanates ou les nitriles sont également caractéristiques des métabolites secondaires trouvés dans les huiles essentielles de diverses plantes [32].

II-3- Propriétés pharmacologiques

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne ou fongique, contre les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes. Elles présentent également des propriétés cytotoxiques, anti-inflammatoires et anticancéreuses [33,34].

III- COMPOSES NATURELS ET CELLULES SOUCHES PATHOLOGIQUES

III-1- Cellules souches pathologiques et ciblage par des composés naturels

Les cellules souches des tissus adultes sont impliquées dans diverses pathologies et la restauration de leurs fonctions régénératrices ou leur éradication sont des objectifs clés des stratégies thérapeutiques actuelles. Les voies de survie et de prolifération des cellules souches sont dérégulées en cas de pathologie, et peuvent être ciblées par des composés naturels. Par exemple, des polyphénols, des isothiocyanates, des caroténoïdes et l'eriocalyxin B inhibent les voies Wnt et NF- κ B, alors que la cyclopaamine cible la voie Shh et certains triterpènes agissent *via* PTEN et Stat3 [35,36]. D'autres études ont montré

les effets inhibiteurs de la lutéoline et de l'épigallocatechine gallate, un composant majeur du thé vert, sur la prolifération et la survie cellulaires par des mécanismes PI3K/AKT ou ERK-dépendants, impliquant donc deux voies potentiellement régulatrices des cellules souches [37-39].

Ainsi, à côté des outils thérapeutiques modernes tels que les inhibiteurs spécifiques de kinases, les composés naturels pourraient prendre une place importante dans la stratégie de ciblage des cellules souches pathologiques, d'autant plus qu'ils pourraient agir également sur le microenvironnement ou nichent ces cellules souches [40].

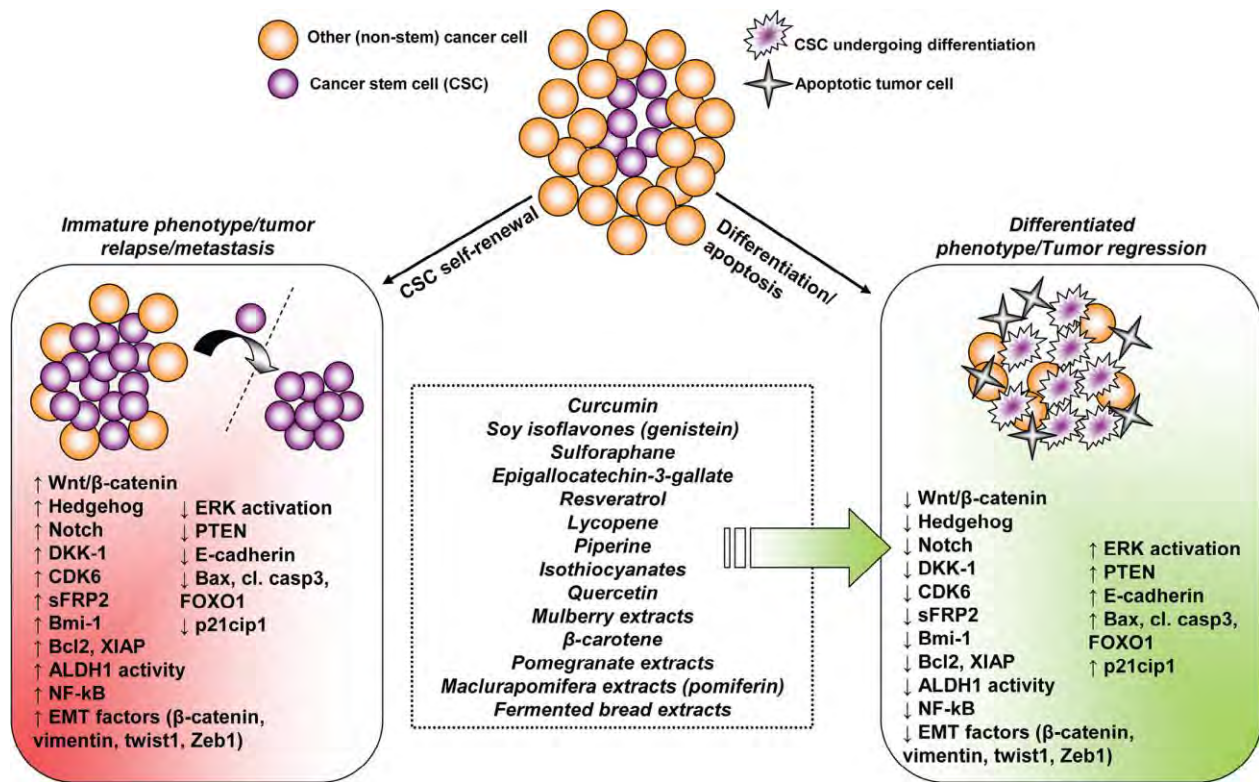


Figure 3: Composés naturels et ciblage des cellules souches cancéreuses [40].

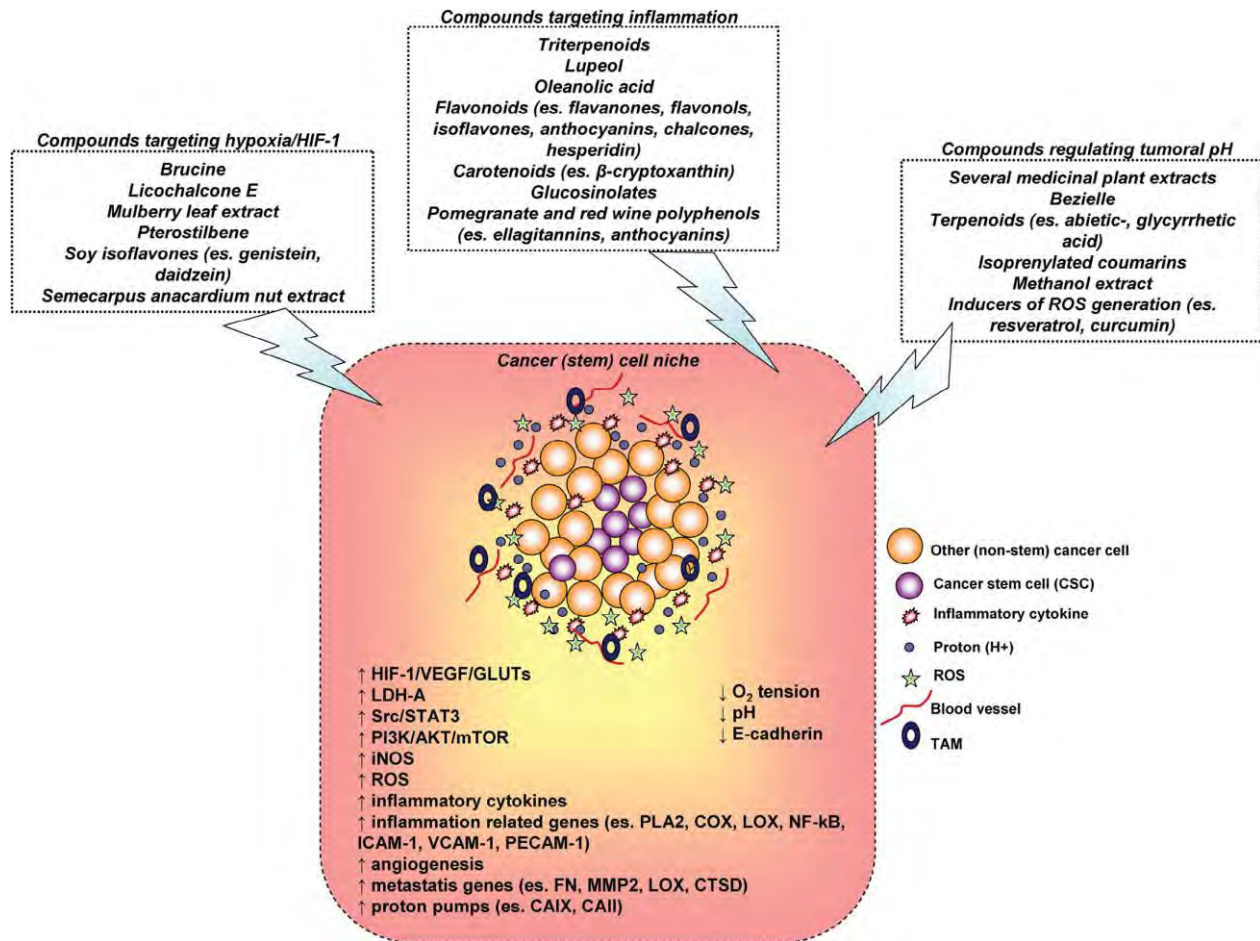


Figure 4: Composés naturels et niche des cellules souches[40] .

III-2- Les flavonoïdes et la voie GSK3β dans les cellules souches cancéreuses

*Cellules souches cancéreuses et résistance thérapeutique

Les cellules souches cancéreuses (CSC) représentent un petit nombre de cellules au sein de la tumeur qui a une très forte capacité de survie, de prolifération et de potentiel métastatique. Elles sont appelées aussi «cellules initiatrices de tumeur» car elles sont le lieu de l’initiation puis de la progression tumorale, et sont responsables des rechutes post-thérapie [41].

Les CSC sont résistantes aux traitements anti-tumoraux par divers mécanismes, parmi lesquels l’efflux des drogues, la réparation des dommages à l’ADN, l’état de quiescence et l’inhibition de l’apoptose [42]. Diverses approches thérapeutiques visent à éradiquer ces CSC en favorisant leur entrée dans le cycle cellulaire, leur migration hors de la niche

microenvironnementale qui les protège ou l'inhibition de leur survie. Selon leurs conditions d'activité métabolique, proliférative et adhésive, les CSC vont développer des mécanismes de survie spécifiques impliquant des voies de signalisation anti-apoptotiques et anti-oxydantes pouvant s'opposer. C'est le cas par exemple des deux grands carrefours de signalisation que sont les kinases Glycogene synthase kinase 3 β (GSK3 β) et Akt, qui régulent spécifiquement la voie Nrf2 anti-oxydante et la voie NF-kB de survie [43].

*Voie GSK3 β de survie cellulaire

La kinase GSK3 β est une cible thérapeutique d'un grand intérêt dans les pathologies inflammatoires et cancéreuses. Dans l'inflammation, elle est retrouvée suractivée dans les tissus et les cellules immunitaires, comme cela a été décrit dans les pathologies inflammatoires intestinales [44]. Dans diverses tumeurs, sa suractivation a été détectée et son ciblage a été proposé à visée anti-proliférative et pro-apoptotique [45]. En particulier, l'inhibition de cette sérine thréonine kinase qui joue un rôle important dans l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches permet d'induire l'apoptose des CSC [46,47].

Ainsi, la kinase GSK3 β située au carrefour de multiples fonctions cellulaires (**Figure 5**) que le métabolisme, la prolifération, l'adhésion et la survie, pourrait jouer un rôle clef dans la transition inflammation-cancer. En effet, il a été montré que la GSK3 β était activée précocement dans les cellules souches pathologiques au cours de la leucémogénèse et que cet état préparait une transition vers la cellule souche cancéreuse [48]. De façon très intéressante, un dimorphisme sexuel s'applique à cette voie de survie des cellules souches. En effet, si GSK3 β et Akt permettent respectivement la survie des cellules souches hématopoïétiques XY et XX en conditions basales de stress, leurs rôles sont inversés après cancérisation [47,49].

GSK3 β promeut la survie cellulaire au niveau membranaire en inhibant les complexes pro-mort associés aux récepteurs tels que le récepteur du TNF, au niveau mitochondrial en régulant l'hexokinase, et enfin au niveau nucléaire en facilitant l'activité transcriptionnelle de NF-kB sur des gènes spécifiques tels que Bcl-2 [50].

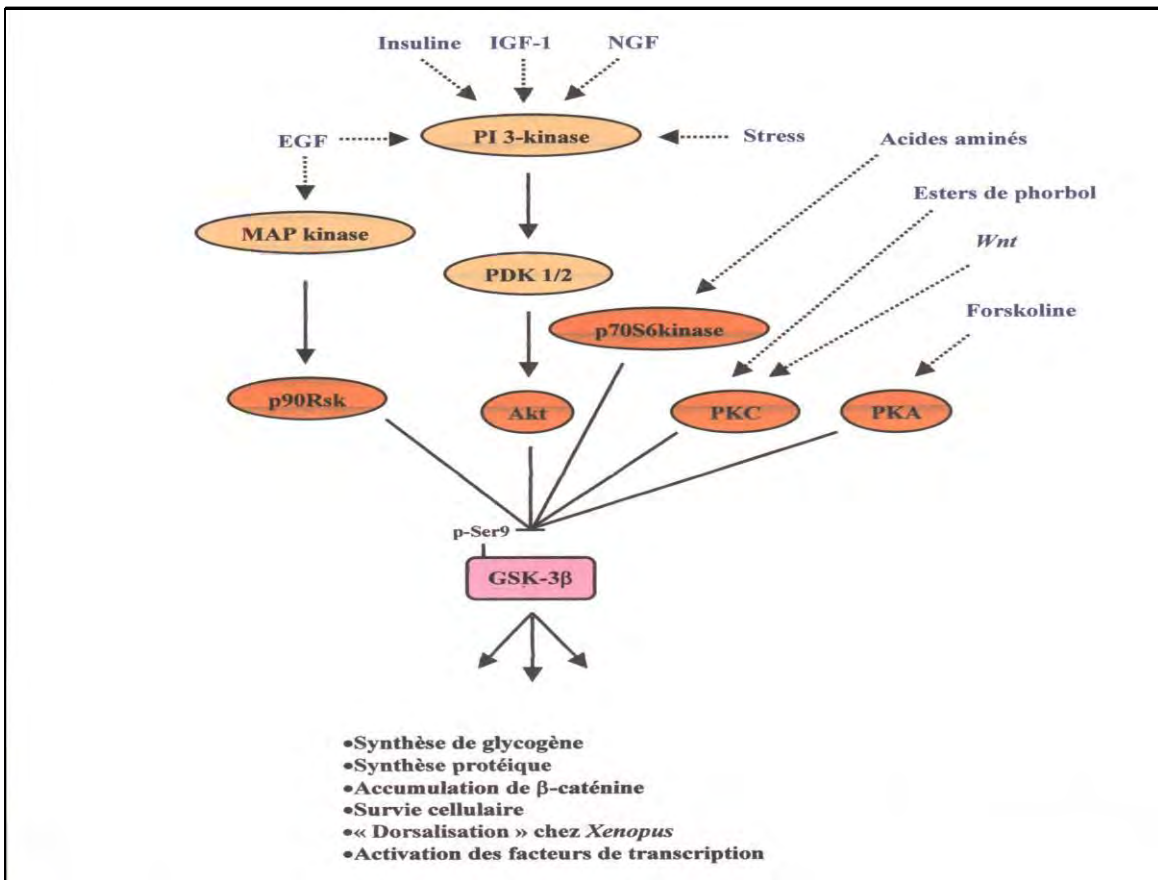
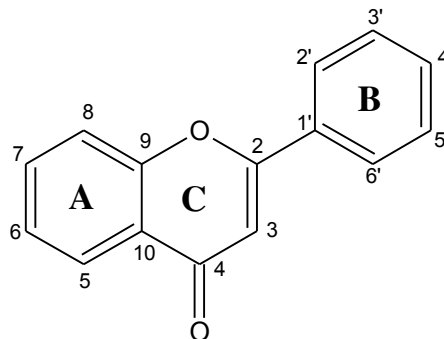


Figure 5: Voies de signalisation et les fonctions cellulaires de GSK3 β

*Flavonoïdes inhibiteurs de la voie GSK3 β

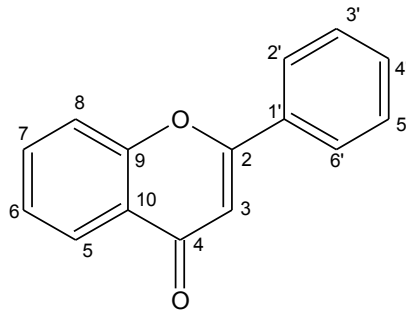
Les flavonoïdes sont un des plus importants groupes de produits naturels phénoliques. Ces composés possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, ayant deux noyaux aromatiques A et B séparés par un hétérocycle C [51].



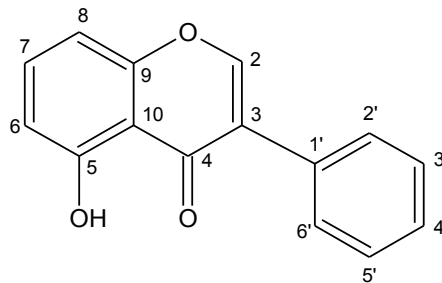
Les flavonoïdes interviennent dans la protection de la plante contre les radiations UV, dans la pigmentation des fleurs, dans les processus de défense contre les attaques microbiennes et les herbivores [52].

Les composés de ce groupe existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides. Selon le degré d'oxydation du noyau C, les flavonoïdes se divisent en plusieurs classes [53-55]:

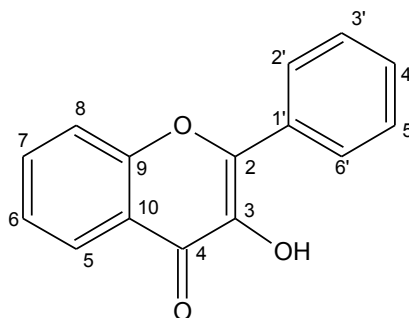
- Les flavones ou 2-phénylchromones sont des produits incolores.



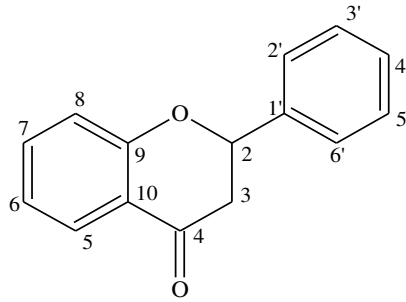
- Les isoflavones ou 3-phénylchromones.



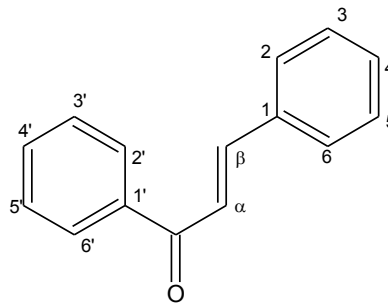
- Les flavonols ou 3-hydroxyflavones sont des pigments végétaux que l'on trouve souvent sous forme de glucosides.



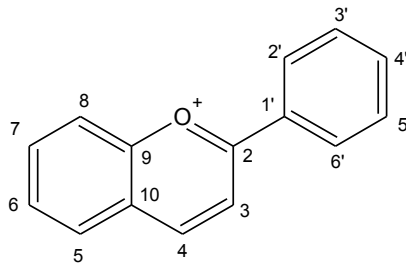
- Les flavanones ou 2,3-dihydroflavones (chromanes)



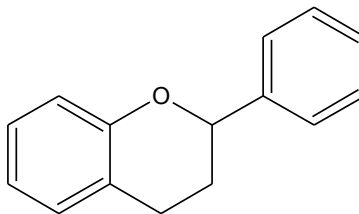
- Les chalcones sont des isomères des flavanones avec ouverture du noyau pyronique entre les positions C-1 et C-2.



- Les anthocyanes dérivent des flavonoïdes en formant un oxonium (2-phénylbenzopyrilium).



- Les flavanes ou catéchines sont des produits de réduction des flavanones.



De nombreuses études biologiques ont montré que certains flavonoïdes possèdent des activités d'hypotenseur, diurétique, anti-oxydante, antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire et anti carcinogène.

Il a été démontré que des flavonoïdes induisaient l'apoptose des CSC via l'inhibition de GSK3 β [56]. Parmi 22 flavonoïdes testés, Johnson et ses collaborateurs ont montré que la lutéoline, l'apigénine et la quercétine avaient des effets inhibiteurs importants sur GSK-3 β dans le cancer du pancréas [57].

Etant donné la diversité des structures des flavonoïdes et les différents mécanismes d'inhibition de GSK-3 β pouvant être mis en jeu, il est très difficile d'établir des relations de structure-activité. Si la présence de sucres en position 3 de la génine a été impliquée dans l'activité inhibitrice sur GSK3 β [56], au contraire, Johnson (2011) [57] a trouvé que la conjugaison du sucre avec la génine diminue l'effet inhibiteur.

III-3- Les composés naturels dans les pathologies colorectales

**La transition inflammation-cancer colorectal*

L'inflammation est un processus naturel de l'immunité déclenché en réponse à des agressions externes ou internes. En cas de stimuli chroniques, la survie et la prolifération des cellules peuvent devenir incontrôlées aboutissant à l'initiation tumorale. L'ensemble des cellules du stroma inflammatoire induit la sécrétion de protéases qui remodelent la matrice extracellulaire et activent les facteurs de croissance, mais qui peuvent aussi activer des récepteurs spécifiques tels que les « Protease-activated receptors » ou PARs. La famille des PARs comprend quatre membres, PAR_{1,2,3,4}, parmi lesquels PAR₁ et PAR₂ ont particulièrement été étudiés en tant que récepteurs de la thrombine et de la trypsine, respectivement [58]. Ces deux récepteurs jouent un rôle important dans l'inflammation intestinale et la carcinogénèse colorectale [58]. Cependant, leur implication dans la transformation des cellules souches intestinales est méconnue.

**Composés naturels et chimioprévention du cancer colorectal*

Avec une incidence grandissante des maladies inflammatoires digestives et le risque encouru de transformation tumorale, il est nécessaire de rechercher des moyens

thérapeutiques de chimioprévention. Les flavonoïdes ont une action anti-inflammatoire et sont capables d'inhiber l'initiation ainsi que la progression de la tumeur colorectale.

L'inflammation est modélisée sur des lignées cellulaires par l'ajout de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α ; IL-6) qui participent à la carcinogénèse. Paradkar et al. [59] ont suggéré que le kaempférol, la génistéine et l'épigallocatechine-3-gallate diminuent la sécrétion d'IL-6 dans la lignée cancéreuse humaine Caco-2. L'épigallocatechine-3-gallate diminue aussi la sécrétion de TNF- α .

La quercétine prévient la cancérogenèse du colon. L'effet antitumoral de la quercétine dans les cellules SW480 coliques est lié à l'inhibition de la voie beta-caténine [60]. Cependant, certains travaux montrent que le dérivé glycosylé de la quercétine, la rutine, serait plus efficace que la quercétine [61]. D'autres travaux ont montré que les procyanidines présents dans la pomme inhibent la croissance des cellules coliques tumorales SW620 [62].

Objectif des recherches

Au cours de cette synthèse bibliographique, nous avons vu le grand potentiel d'activités biologiques de *Diplotaxis simplex* et *Diplotaxis harra*.

Il nous a donc paru intéressant d'explorer plus avant leurs compositions chimiques, notamment celles de leurs fractions volatiles.

Dans la continuité de la collaboration franco-tunisienne entre l'équipe de chimistes de Sfax et celle des biologistes de Toulouse mise en place dès 2006 nous avons recherché des composés bio-actifs capables de cibler des cellules souches pathologiques, inflammatoires ou cancéreuses. Notre intérêt s'est particulièrement porté sur la voie de survie GSK3beta des cellules souches intestinales.

Matériels et méthodes

I- MATERIEL VEGETAL

I-1- Collecte et identification du matériel végétal

La récolte de *D. harra* et *D. simplex* a été réalisée en 2011 dans la région de Sidi Bouzid, Tunisie. Un Voucher spécimen de chaque plante est déposé dans l'herbier du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, département de chimie, Faculté des Sciences de Sfax, enregistré sous les n° **LCSN130** et **LCSN131** respectivement pour *D. harra* et *D. simplex*.

I-2-Extraction par macération

La macération est une technique d'extraction solide-liquide qui permet d'extraire les substances chimiques du matériel végétal par un solvant, à température ambiante, sous agitation magnétique ou mécanique. C'est la technique la plus simple et qui minimise l'oxydation des produits.

En effet, les différents organes des deux plantes (feuilles, fleurs et racines) récoltées ont été séchés à l'abri de la lumière puis extraits trois fois sous agitation mécanique à température ambiante par des solvants de polarités croissantes et qui sont respectivement l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol jusqu'à épuisement des substances naturelles qu'ils sont capables d'extraire.

Après chaque extraction, la solution obtenue est filtrée puis concentrée sous vide à une température qui ne dépasse pas 45°C.

Les organigrammes suivants (**Figures 6 et 7**) récapitulent les étapes des macérations des deux plantes.

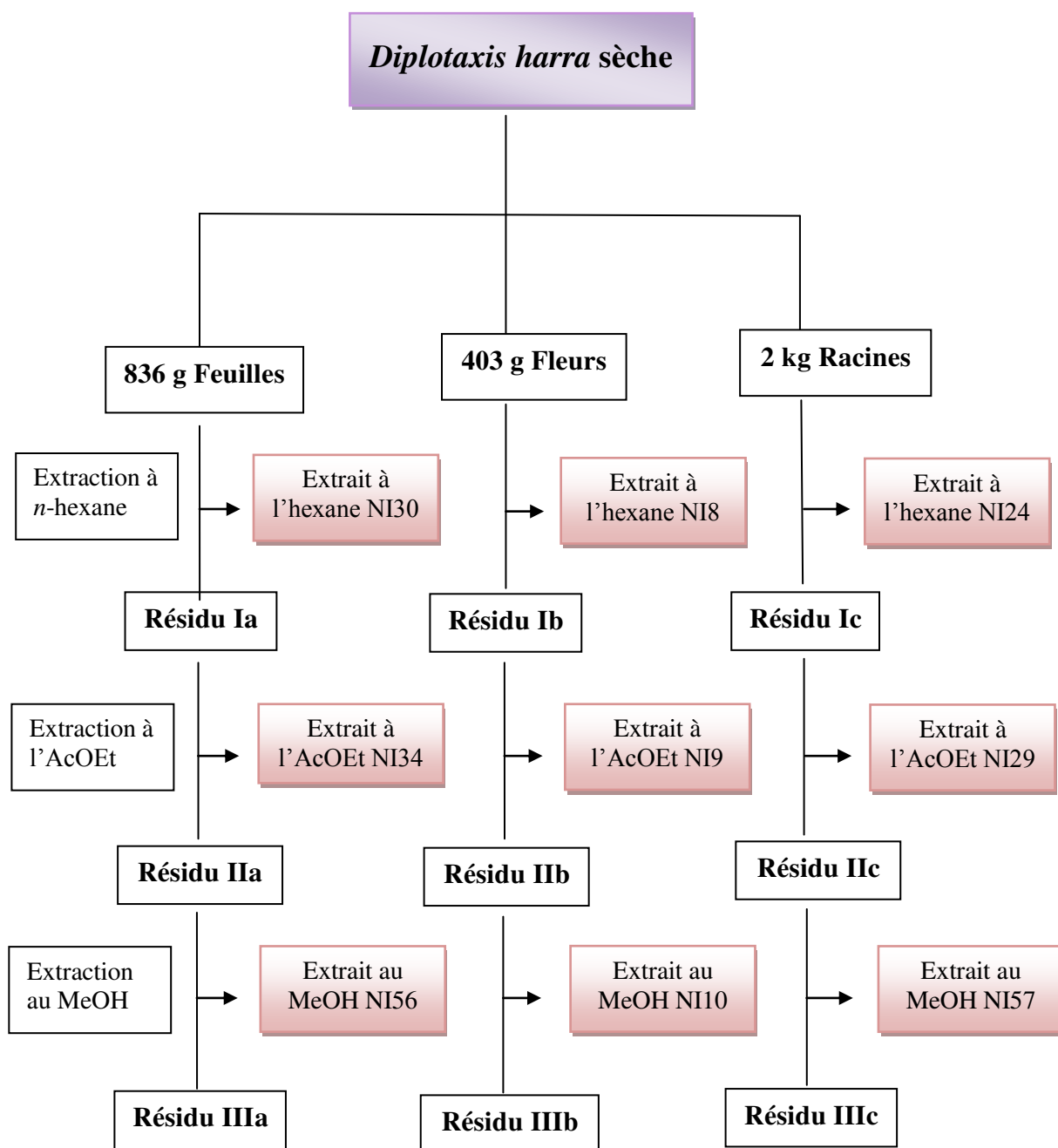


Figure 6: Macération des différents organes secs de *D. harra*

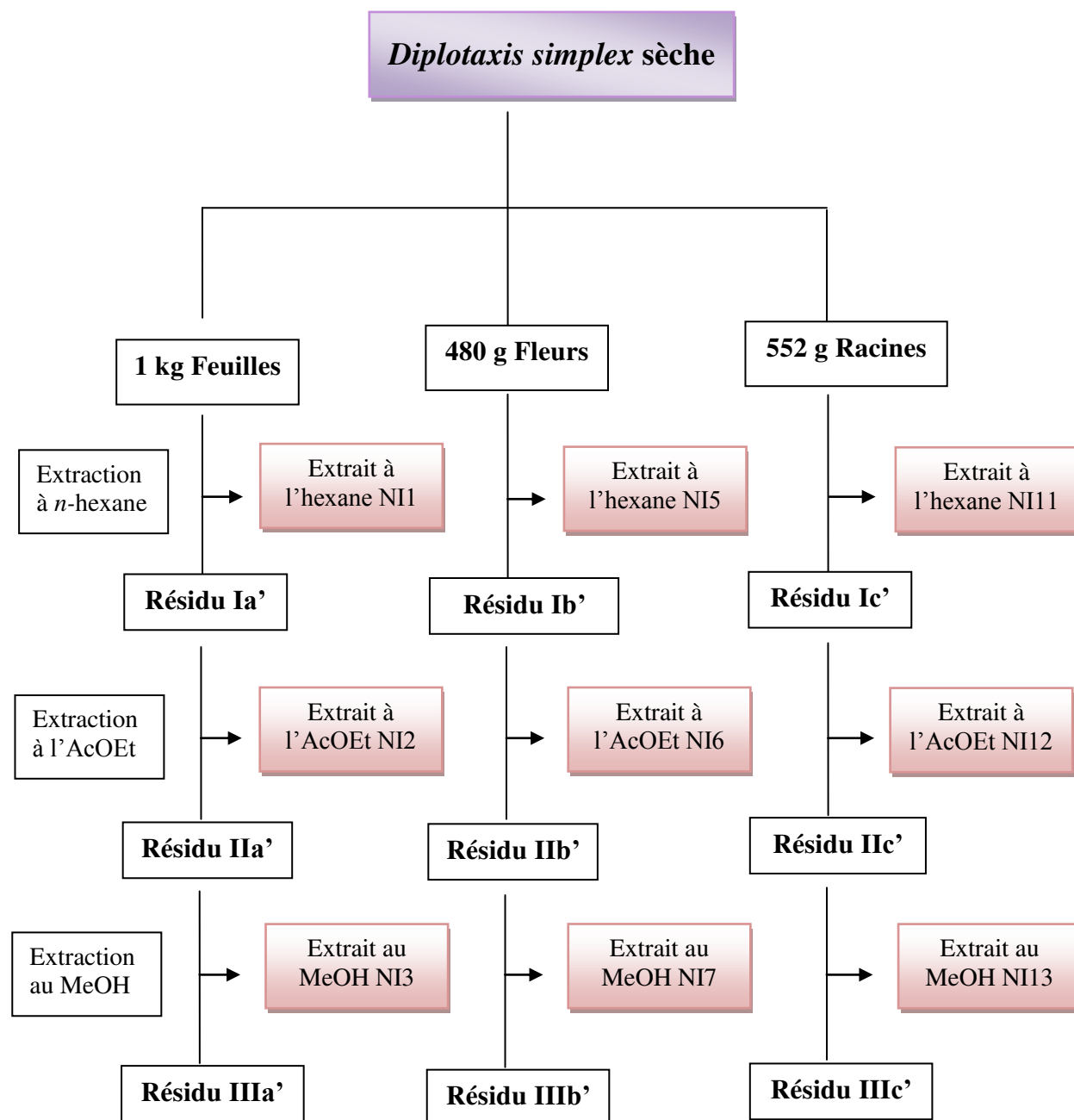


Figure 7: Macération des différents organes secs de *D. simplex*

I-3-Extraction des fractions volatiles par hydrodistillation

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des fractions volatiles, la plus utilisée est l'hydrodistillation. C'est la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée car elle ne nécessite pas un appareillage coûteux. Elle est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition de la fraction volatile et de l'eau. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau. La matière végétale est immergée dans un bain d'eau, et l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La fraction volatile se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité.

Pour extraire les fractions volatiles, nous avons divisé la plante fraîche en deux parties, 250 g des fleurs et 1,5 kg des feuilles. Les vapeurs hétérogènes ont été condensées dans un réfrigérant et récupérées dans un flacon. La fraction volatile est séparée de l'hydrolat par une extraction liquide-liquide avec l'éther diéthylique. La phase organique obtenue est déshydratée par le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), puis évaporée sous pression réduite pour donner les fractions volatiles ($\text{FV}_{\text{fleurs}} = 0,19 \text{ g}$; $\text{FV}_{\text{feuilles}} = 0,33 \text{ g}$)



Figure 8: Montage d'hydrodistillation

II- CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE

Pour une première analyse rapide des composés chimiques présents dans chaque extrait, nous avons effectué le « screening » phytochimique suivant:

II-1- Tests phytochimiques préliminaires

Des tests préliminaires ont été effectués selon les méthodes décrites par Harborne [63]. 100 mg de chaque extrait ont été dissous dans 100 mL de solvant adéquat afin d'obtenir une solution (S). Cette dernière est ajoutée à des réactifs spécifiques pour mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires.

T1: Test aux stérols (et) ou triterpènes (Réaction de LIBERMANN):

- 1 mL de la solution S
- 0,2 mL d'anhydride acétique
- 4 gouttes de H₂SO₄ (concentré)

La coloration violette virant au bleu-vert indique la présence de **stérols** et/ou **triterpènes**

T2 : Test aux tropolones (Réaction de WIUSTATER):

- 1 mL de la solution S+ 0,2 mL de MeOH
- 1 goutte de FeCl₃ au 1/200
- 0,6 mL d'eau + 0,4 mL de CHCl₃

Si la couleur de la phase organique vire instantanément au rouge, ceci indique la présence de noyau **tropolone**.

T3 : Test aux quinones libres (Réaction de BORNTRAEGER):

- 2 mL de la solution S
- 2 mL de NaOH 1/10

Si la coloration de la phase aqueuse vire au rouge puis au violet ceci indique la présence des **quinones libres**.

T4: Test des flavonoïdes (Réaction de WILSTATER)

- 1 mL de la solution S
- 2 mL EtOH-H₂O (1-1, v/v)

Quelques gouttes de HCl + copeaux de Mg

La coloration orangée à rouge violacée et bleue indique la présence des **flavonoïdes**.

T5: Test aux alcaloïdes (réaction de MAYER)

1 mL de la solution S

+ quelques gouttes de HCl (concentré) jusqu'à l'obtention d'un milieu acide

+ 5 gouttes de réactif de Mayer

La formation d'un précipité blanc indique la présence des **alcaloïdes**.

Préparation du réactif de Mayer :

- Solution A: 13,5 g HgCl₂ + 20 mL H₂O.

- Solution B: 49,8 g KI + 20 mL H₂O.

Les deux solutions sont mélangées et diluées avec de l'eau à un litre.

II-2- Dosage des phénols totaux

II-2-1- Principe

Le dosage des phénols totaux est un test colorimétrique, selon une méthode adoptée par Singleton et Ross [64] avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Son principe est basé sur la capacité de réduire ce réactif qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène lors de l'oxydation des phénols.

II-2-2- Mode opératoire

1 mL de l'extrait (1 mg/mL) est incubé avec 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, on ajoute 1 mL d'une solution saturée de Na₂CO₃ puis on complète le volume, jusqu'au trait de jauge, par de l'eau distillée. Le mélange réactionnel est gardé à l'obscurité pendant 90 minutes. Un essai à blanc est préparé dans les mêmes conditions, en absence d'extrait. Ensuite, les densités optiques (DO) sont déterminées à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. En se référant à une gamme étalon d'acide gallique, la quantité de polyphénols présents dans l'extrait est déterminée et exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique (AG) par g d'extrait.

II-3- Dosage des flavonoïdes totaux

II-3-1- Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Akrouit et al. [65] avec le trichlorure d'aluminium. Ce dernier forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe à 415 nm.

II-3-2- Mode opératoire

Pour chaque mesure, 1 mL de la solution à 1 mg/mL d'extrait dans le méthanol est mélangé avec 1 mL de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 min d'incubation à température ambiante, on mesure la DO des mélanges à 415 nm avec un spectrophotomètre. Un essai à blanc est préparé dans les mêmes conditions, en absence d'extrait. La teneur totale en flavonoïdes est déterminée en utilisant une courbe standard préparée avec la quercétine et exprimée en mg d'équivalent de quercétine (QE) par g d'extrait.

III- METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

III-1- Méthodes chromatographiques analytiques

III-1-1 La chromatographie sur couche mince (CCM)

C'est une technique d'analyse simple, très utilisée pour séparer un mélange à analyser. Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur plaques de gel de silice étalé sur un support en aluminium (Merck, 60 F₂₅₄). Cette technique consiste à placer sur la plaque une tâche à l'aide d'un capillaire en verre et à la laisser migrer dans un solvant ou un mélange de solvants appropriés.

Après séchage de la plaque, la révélation est l'étape qui permet de visualiser les positions des tâches issues du déplacement des constituants des mélanges obtenus en fin d'élution.

Les tâches peuvent être visibles ou invisibles sur la plaque, et pour les visualiser on utilise une révélation sous lampe UV avec des réactifs chimiques.

- **Révélation sous lampe UV:** permet de mettre en évidence sous forme de tâches sombres des substances qui absorbent les UV à $\lambda = 254$ nm et $\lambda = 366$ nm.

- **Révélation par l'iode:** Cette méthode est utilisée pour les composés à liaisons insaturées. L'iode s'additionne sur les doubles liaisons de la molécule qui va ressortir en jaune sur la plaque de silice.

- **Révélation par l'ammoniac:** La coloration des tâches sur plaque CCM exposées à des vapeurs d'ammoniac est jaune, indiquant la présence d'un flavonoïde.

- **Révéléateur à la vanilline sulfurique** (réactif universel): Ce révéléateur est dit universel car il permet de révéler la plupart des composés organiques par des tâches de couleurs variables après chauffage.

Pour 100 mL de solution, 1 g de vanilline est introduit dans 90 mL d'éthanol à 96%. 10 mL d'acide sulfurique sont ensuite ajoutés précautionneusement à la solution, car il se produit une réaction exothermique.

Le révéléateur à la vanilline sulfurique est conservé à l'abri de la lumière.

- **Révélation par réactif de Neu:** Ce révéléateur est spécifique pour les flavonoïdes; il est préparé à partir de ces deux solutions:

- Solution (A): 10 g de diphenylborate d'aminoéthanol dans 1L de méthanol.

- Solution (B): 50 g de PET (polyéthylène glycol) dans 1L de méthanol.

Ce réactif est constitué par un mélange de 10 mL de la solution (A) avec 8 mL de la solution (B).

III-1-2 La Chromatographie Liquide Ultra haute Pression (UHPLC)

L'analyse du degré de pureté des produits isolés a été effectuée avec un système Acquity UPLC Waters sur une colonne BEH C₁₈ Acquity 50 mm de longueur, 2,1 mm de diamètre et 1,7 µm de diamètre de particules à 40 °C en mode isocratique (80% H₂O/ 20% CH₃CN) avec un débit de 0,6 mL/min et une détection à 254 nm.

III-1-3 Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS)

La chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (GC/MS) permet la séparation des composés volatils d'un mélange par chromatographie, et leur identification en fonction de leur rapport masse sur charge par spectrométrie de masse.

Dans notre cas, l'analyse de la composition chimique de la fraction volatile a été effectuée sur un système Agilent d'un chromatographe en phase gazeuse modèle 6890 équipé d'une colonne de silice HP-5MS (5% Phenyl; 95% Methyl Siloxane) de longueur 30 cm, de diamètre nominal 250 μm avec un film d'épaisseur 0,25 μm . Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement 250°C et 280°C. La température du four a été maintenue à une température initiale de 100°C pendant 1 min, une augmentation à 4°C/min jusqu'à 260°C, puis maintenue à 324°C à 10°C /min pendant 1 min. Le volume injecté dans l'appareil est 1 μL . L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétention Kovats (IK) avec les données de la littérature.

III-2- Méthodes chromatographiques préparatives

III-2-1 Chromatographie sur colonne ouverte

Cette technique est utilisée pour séparer les composés dans un mélange. Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire de gel de silice 60 Å PF₂₅₄ 40-63 μm et du gel de silice 60 Å RP₁₈ 40-60 μm et d'une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants. La longueur et le diamètre de la colonne utilisée, ainsi que la masse de silice, dépendent de l'échantillon à séparer.

III-2-2 Chromatographie liquide à haute performance semi-préparative (HPLC semi-préparative)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne. C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange sur un montage haute pression. Dans notre cas, les analyses ont été effectuées à l'aide d'une HPLC semi-préparative sur un système à auto-purification de Waters avec un détecteur photodiode Array. La purification a été réalisée en phase inverse sur une colonne X bridge C₁₈ 5 μm , 150×19 mm. L'eau à 0,1% d'acide formique et de l'acétonitrile ont été respectivement utilisés en tant que solvants A et B. L'élution a été suivie d'une détection UV à 254 nm et 355 nm.

III-2-3 Chromatographie sur couche épaisse préparative

La chromatographie sur couche épaisse a le même principe que la chromatographie sur couche mince sauf que cette dernière permet une analyse qualitative alors que la première est préparative². Des plaques en verre de dimensions 20x20 cm et d'épaisseur 0,5 mm ont été préparées dont la phase stationnaire est constituée de gel de silice. L'étalement de l'extrait se fait sous forme d'une bande sur les plaques. Après l'élution avec le solvant qui permet de détecter la bonne séparation, la révélation est effectuée sous UV ce qui permet de marquer les différentes bandes qui existent. Ainsi, les bandes obtenues sont grattées et solubilisées dans un solvant adéquat permettant ainsi la séparation des constituants de l'échantillon. La séparation par CCE peut conduire à l'obtention de molécules pures.

IV- TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

IV-1- Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Les analyses ont été effectuées au laboratoire de l'UMR 152 grâce à un spectromètre de masse de type trappe d'ions Thermo-Finningan® LCQ Deca XP Max équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) en mode positif et négatif. Les échantillons ont été séparés par une colonne Phenomenex (Kinetex C₁₈, 150 x 4,6 mm², 5 μm) en utilisant un gradient de solvant commençant par 90% eau + 0,1% d'acide formique allant vers 100% acétonitrile + 0,1% d'acide formique avec un débit de 0,8 mL/min et un volume d'injection 20 μL. La température de la colonne a été maintenue à 30°C.

IV-2- Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ¹H, ¹³C et 2D ont été enregistrés au laboratoire de résonance magnétique à la Faculté des Sciences de Sfax sur un appareil de type Brüker Avance 400 et au service commun de RMN de l'Université Paul Sabatier de Toulouse sur un appareil de type Brüker Avance 300. Les échantillons ont été solubilisés

dans des solvants deutériés MeOD et DMSO-d₆ dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm. Les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. Le traitement des spectres a été réalisé grâce au logiciel NMR notebook 2.7 build 0.9.

Les expériences de RMN unidimensionnelle réalisées ont été les suivantes:

- **RMN du proton:** permet de déduire les différents types d'hydrogène, leur nombre et le nombre voisin de chaque noyau.
- **RMN du carbone 13:** Parmi les différentes techniques de RMN du ¹³C nous citons:
 - **BB (Broad Band):** Ce spectre est totalement découplé (suppression des couplages proton/carbone). Le spectre montre alors une série de singulets représentant les différents types d'atomes de carbone.
 - **DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer):** Le spectre DEPT permet de différencier les carbones selon leur hydrogénation (C_q, CH, CH₂ et CH₃), le plus utilisé à l'heure actuelle est le DEPT 135°. Dans ce cas les groupes CH et CH₃ sont positifs alors que les groupes CH₂ sont négatifs et les carbones quaternaires n'apparaissent pas.
 - **J-modulé:** Cette expérience donne la même information que le DEPT 135°, la seule différence réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le J -mod alors qu'ils ne le sont pas avec le DEPT 135°.

Les expériences de RMN bidimensionnelle réalisées ont été les suivantes:

- **¹H-¹H COSY (Correlation Spectroscopy):** Les spectres COSY mettent en évidence les couplages homonucléaires ² J et ³ J entre les protons. Cette méthode peut permettre de retrouver l'enchaînement des protons dans un squelette de la molécule et donc sa nature.
- **HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence):** C'est une séquence qui permet d'observer le couplage direct ¹ J entre un proton ¹H et le carbone ¹³C qui le porte. Cette expérience permet d'attribuer la majorité des carbones protonés de la molécule.

- **HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation):** Cette technique permet de détecter les couplages hétéronucléaires protons-carbones à longue distance (2J et 3J), et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.
- **NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy):** L'expérience NOESY permet d'observer les signaux de corrélation entre les paires de protons qui sont proches dans l'espace.

V- ACTIVITES BIOLOGIQUES

V-1- Activité de piégeage de radicaux

L'activité de piégeage de radicaux (anti-radicalaire) a été déterminée en utilisant la méthode de DPPH. C'est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité et sa rapidité. Elle est basée sur le piégeage du radical libre stable DPPH• en présence d'un piègeur ce qui entraîne la formation de la forme non radicalaire DPPH-H.

L'activité anti-radicalaire des extraits est exprimée en concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de radical DPPH (CI₅₀).

2 mg de DPPH sont dissous complètement dans le méthanol dans une fiole de 50 mL. Cette solution doit être protégée de l'air et de la lumière. Pour chaque extrait à analyser, on prépare plusieurs solutions à différentes concentrations (0,6; 0,3; 0,15; 0,075; 0,0375 mg/mL). Dans des flacons protégés de la lumière, 2 mL de chaque solution d'extrait sont mélangés avec 2 mL de la solution DPPH (C= 10⁻⁴ mol/L), et une solution contrôle (essai blanc) contenant 2 mL de méthanol et 2 mL de DPPH est aussi préparée. Les mélanges sont gardés à l'obscurité pendant 30 minutes. Puis, on mesure la densité optique (DO) de chaque solution à 517 nm.

La courbe donnant la variation du pourcentage d'inhibition (%) du radical DPPH en fonction des concentrations (mg/mL) des différentes solutions est ensuite tracée.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé par la relation suivante:

$$PI = \left(1 - \frac{\text{D.O. de l'essai}}{\text{D.O. du blanc}} \right) \times 100$$

Avec : DO blanc: Absorbance sans extrait.

DO essai: Absorbance avec extrait.

A partir de la courbe, on détermine la concentration efficace CI_{50} relative au $PI= 50\%$ qui sera comparée avec les antioxydants de référence (la Vitamine E et le Butyl Hydroxy Toluène).

La variation du pouvoir d'inhibition (PI) en fonction des concentrations de la vitamine E et du BHT sont illustrées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1: Variation des PI en fonction des concentrations de la vitamine E et du BHT et leurs CI_{50}

Concentration (mg/mL)	PI(%)		CI_{50} (mg/mL)	
	Vitamine E	BHT	Vitamine E	BHT
0,6	95	96	0,02	0,04
0,3	94	95		
0,15	93	94		
0,075	90	76		
0,0375	77	53		

La courbe de $PI=f(C)$ de la vitamine E et du BHT est présentée ci-dessous (**Figure 9**)

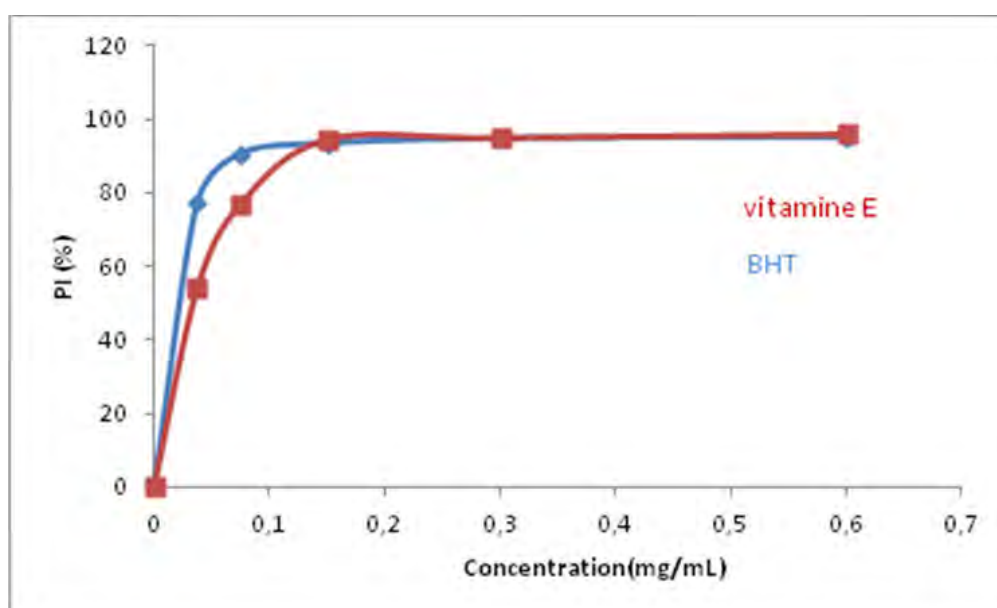


Figure 9: Variation des PI en fonction des concentrations de la vitamine E et du BHT

V-2- Activité antibactérienne

V-2-1- Microorganismes

Dans le cadre de la recherche de substances naturelles antibactériennes, nous avons testé les extraits des différents organes de deux plantes étudiées contre six souches pathogènes: *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella enteritidis* (isolat alimentaire), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922. Ces souches ont été obtenues à partir de la collection de microorganismes disponibles au Laboratoire des Biopesticides du Centre de Biotechnologie de Sfax.

L'activité antibactérienne a été évaluée, *in vitro*, par deux méthodes: la méthode de diffusion par puits pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition et la méthode des séries de dilutions pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB).

V-2-2- Méthode de diffusion par puits

La méthode utilisée est celle de diffusion par puits en milieu solide pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition telle que décrite par Tagg et McGiven [66].

Préparation de milieux: Le milieu de culture utilisé est Muller– Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Sa concentration était 38 g/L.

Préparation des suspensions: Dans un tube à hémolyse contenant 2 mL de Muller Hinton liquide, une colonie de chaque souche de référence a étéensemencée. Cette préculture est soumise pendant 18 h à 37°C. 20 µL de la préculture sont ajoutés à 2 mL de Muller Hinton liquide, le tout est incubé 3 à 5 h à 37°C pour arriver à la phase exponentielle. Sur un milieu de Muller Hinton solide, 30 µL de la suspension bactérienne sont étalés sur la boîte de Pétri. Après un certain temps, des puits sont créés sur la boîte à l'aide de l'extrémité d'une pipette pasteur. 25 µL de chaque extrait sont introduits dans chaque puits. La boîte est laissée 2 à 3 h à 4°C pour la bonne diffusion de l'extrait. Après cette incubation, les boîtes sont mises dans l'étuve à des températures qui correspondent à

chaque souche.

La capacité bactériostatique de l'extrait est mesurée relativement au diamètre de la zone d'inhibition du solvant ou de l'agent émulsifiant ayant servi à préparer l'échantillon.

V-2-3- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La méthode des séries de dilution utilisée pour la détermination des concentrations minimales (CMI et CMB) est celle décrite par Eloff et al [67]. Des précultures sont préparées de la même façon que celles décrites précédemment.

L'*inoculum* est préparé afin d'obtenir une densité bactérienne finale d'environ 106 CFU/mL. Dans les plaques à 96 puits, des séries de dilutions de l'extrait (0,078 à 10 mg/mL) convenablement solubilisés et émulsionnés sont déposées avec l'*inoculum*. En parallèle, des contrôles sont inclus représentant un témoin de stérilité et un témoin de croissance bactérienne. Des antibiotiques appropriés sont utilisés comme témoin positif. Les plaques ainsi préparées sont incubées sous agitation modérée, à la température optimale de croissance du microorganisme 37°C, pendant 24 h. Les tests ont été réalisés en trois duplicatas. Comme indicateur de la croissance des microorganismes, 25 µL de chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT, 0,5 mg/mL) ont été ajoutés aux puits qui sont ensuite incubés à 37°C pendant 30 min. Une coloration rose-rouge indique une croissance bactérienne et son absence renseigne sur une inhibition de cette croissance par l'échantillon testé. On détermine la concentration minimale inhibitrice (**CMI**) et la concentration minimale bactéricide (**CMB**) en ensemençant un échantillon des tubes ne présentant pas de croissance sur la gélose de Muller-Hinton. La concentration minimale inhibitrice (**CMI**) est la plus petite concentration de l'échantillon suffisante pour inhiber la croissance d'une souche de bactéries. La concentration la plus faible de l'échantillon à laquelle > 99,99% des bactéries sont tuées après 24 h d'incubation à 37°C correspond à la **CMB**.

V-3- Activités anti-inflammatoires et anti-cancéreuses

V-3-1- Culture et caractérisation des colonosphères et des tumorosphéroïdes

Les sphéroïdes tumoraux ont été obtenus à partir de 1×10^4 cellules Caco-2 (lignée de cancer colorectal humain présentant une mutation du gène APC) incorporées dans 4 μL de Matrigel (matrice complexe issue de sarcome murin) etensemencées au-dessus de 20 μL de Matrigel déposés dans des plaques à 48 puits [68]. Après 30 min d'incubation à 37°C permettant la polymérisation du Matrigel, le milieu de culture DMEM additionné de 100 U/mL de pénicilline/streptomycine, 10% de SVF et de 1% d'acides aminés non essentiels est ajouté à la culture. Dans certaines expériences, l'expression de PAR₂ était inhibée par RNA interférence (1 μM F2RL1 siRNA Accell) et après 72 h, elle était contrôlée par RT-PCR puis les cellules Caco-2 PAR₂-déficientes étaient cultivées sous forme de sphéroïdes.

Pour la préparation des colonosphères [69,70], les côlons de souris C57Bl6 mâles âgées de 6 à 10 semaines ou de souris C57Bl6 déficientes pour l'expression de PAR₂ (KO PAR₂) étaient prélevés, ouverts longitudinalement, lavés dans une solution de PBS et incubés dans un tampon de chélation (Na₂HPO₄ (5,6 mM), KH₂PO₄ (8 mM), NaCl (96,2 mM), KCl (1,6 mM), saccharose (43,4 mM), D-sorbitol (54,9 mM), DL1, 4-dithiothréitol (0,5 mM)) et EDTA (2 mM) pendant 30 min sous agitation douce à 4°C. Après élimination du surnageant, les fragments de côlon étaient resuspendus dans le tampon de chélation et agités manuellement et fortement pendant 2 min. Une nouvelle incubation était alors réalisée dans le tampon de chélation-EDTA pendant 30 min à température ambiante avant une nouvelle resuspension dans le tampon de chélation froid et une agitation manuelle forte pendant 1 min. Le surnageant contenant les cryptes était recueilli par 3 étapes de remise en suspension/agitation dans le tampon de chélation froid. Les cryptes intestinales étaient ensuite centrifugées à 43g pendant 5 min. Après élimination du surnageant, les cryptes étaient à nouveau remises en suspension dans le tampon de chélation froid puis centrifugées pour éliminer les cellules isolées résiduelles. 1000 cryptes étaient incorporées dans 25 μL de Matrigel etensemencées dans des plaques de 48 puits ou des Labtek. Après polymérisation du Matrigel à 37°C, 250 μL de milieu était

ajouté par puits contenant du DMEM F12 supplémenté avec 100 U/mL de pénicilline/streptomycine, 10 mM d'Hepes, 2 mM de Glutamax, du N2 (1/100), du B27 (1/50), 1 mM de N-acétylcystéine, 100 ng/mL Wnt3a, 50 ng/mL EGF, 100 ng/mL noggin et 1 pg/mL R Spondin-1.

Les sphéroïdes ont été observés quotidiennement au microscope (ApoTome) pour suivre leur croissance. 48 h après l'ensemencement, les deux types de culture 3D montrent des structures de forme ronde dont la taille augmente jusqu'au 7ème jour. A ce stade, les cultures sont arrêtées ou traitées pour un passage et un ré-ensemencement. Le milieu était changé tous les 2 jours.

Pour le passage, les sphéroïdes sont incubés pendant 30 min avec une solution de récupération (Cell Recovery Solution, Corning) sur la glace. Cette étape permet la dissociation des sphéroïdes du Matrigel. Ensuite, les sphéroïdes sont doucement remis en suspension dans un tube contenant du DMEM F12 supplémenté avec HEPES et Glutamax. Après centrifugation (43 g, 10 min), les sphéroïdes sont à nouveau incorporés dans du Matrigel et remis en culture.

Pour les analyses d'immunomarquage, les sphéroïdes ensemencés dans les Lab-Tek sont fixés dans le paraformaldéhyde à 2% (20 min), lavés 3 fois dans du PBS (15 minutes), puis perméabilisés dans du PBS plus 0,5% de Triton X-100 (20 minutes). Après deux lavages dans du PBS additionné de glycine 100 mM (20 min), une solution de blocage (7,7 mM de NaN₃, 1% de BSA, 0,2% de Triton X-100 et 0,05% de Tween-20 dans du PBS) a été ajoutée pendant 90 min. L'anticorps primaire a été incubé pendant une nuit à 4 °C. Après trois lavages dans la solution de blocage (15 minutes), l'anticorps secondaire a été mis en incubation pendant 45 min. Puis, après des lavages dans du PBS, les lames ont été montées dans du ProGold DAPI et observées par microscopie à balayage laser confocal (Zeiss, LSM710). La visualisation de l'actine a été réalisée en ajoutant Acti-stain™ 670 pendant 30 minutes, suivie de trois lavages en PBS avant le montage.

Les contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions sans anticorps primaires, avec un anticorps secondaire uniquement, ou avec un sérum de lapin non immun ou un anticorps de contrôle isotypique.

Pour la stimulation des PARs, des peptides agonistes spécifiques ou leurs peptides contrôles (GENSCRIPT) étaient ajoutés, quotidiennement, au milieu de culture 48 h après l'initiation de la formation des sphéroïdes. Dans le cas des sphéroïdes tumoraux, cette stimulation était réalisée après 24 h de privation sérique.

Au 6^{ème} jour, le nombre et la taille des sphéroïdes étaient évalués par comptage visuel au microscope ou mesure MTS, et grâce au logiciel Image J.

V-3-2- Etude de la voie de signalisation PAR₂/GSK3 β

- Culture cellulaire:

Nous avons choisi les deux lignées cellulaires IEC6 (murin) et Caco-2 (humain), car elles sont fréquemment utilisées pour étudier la signalisation épithéliale intestinale et elles représentent respectivement l'épithélium intestinal normal ou tumoral. Les cellules ont été cultivées à 37 °C et 5% de CO₂ jusqu'à atteindre 90% de confluence et le milieu a été changé tous les 2 jours (durée de culture = 1 mois, avec passage hebdomadaire).

Pour la stimulation des PARs, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits ou des plaques 96 puits et cultivées dans le DMEM à 10% SVF pendant 24h. Ensuite les cellules sont privées en sérum 24h puis stimulées avec les peptides agonistes de PAR₁ et de PAR₂ ou les peptides contrôles pendant 1 h. La stimulation est arrêtée par l'addition d'un tampon de lyse cellulaire afin d'étudier la signalisation par Western blot ou un test MTS de viabilité est réalisé à 48h.

- Western blotting:

Les protéines des lysats cellulaires sont séparées sur des gels de polyacrylamide SDS et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après blocage pendant 1 heure, à température ambiante et sous agitation, dans une solution de tampon Tris (TBS) contenant 0,5% de lait et d'albumine sérique bovine (BSA), la membrane est incubée avec les anticorps primaires appropriés dans du TBS-BSA-lait additionné de 0,05% de Tween pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages de 15 min avec TBS-lait, l'anticorps secondaire « anti-rabbit » ou « anti-mouse » (Anticorps IgG H+L HRP Conjugate, Promega-WI-USA) est incubé 1 heure à température ambiante sous agitation et la détection est ensuite

réalisée en utilisant un substrat chimioluminescent (SuperSignal, Amersham Pharmacia Biotech).

Pour l'analyse Western blot des sphéroïdes, les colonosphères de 14 puits ont été dissociés du Matrigel avec la « Cell recovery solution » et les échantillons groupés ont été lavés trois fois dans du DMEM F12 supplémenté avec Heps, Glutamax avant la dénaturation dans un tampon de Laemmli.

- **L'activité kinase de GSK3 β :**

15 millions de cellules Caco-2 à 80% de confluence ont été privées de sérum et stimulées par des peptides agonistes PAR₁ ou PAR₂ à une concentration 100 μ M. Après 1 heure, les cellules ont été lavées dans du PBS froid et récupérées par grattage dans le tampon de lyse froid (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% de Triton X100, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇, 1 mM EDTA plus un cocktail d'anti-protéases. Après 20 minutes d'agitation sur de la glace, les lysats ont été centrifugés 15 min à 12000g 4°C et les surnageants ont été incubés ensuite pendant 30 min avec la protéine G sépharose (« preclearing »). Ensuite, les surnageants ont été incubés avec 20 μ L d'anticorps GSK3 β pendant 2 h à 4°C. Une incubation avec 50 μ L de protéine G-Sepharose pendant 2 heures à 4°C puis un lavage dans le tampon de lyse et deux lavages en PBS, ont permis de récupérer les complexes immuns qui ont été mis dans 7 μ L de tampon kinase (Kit Omnia). Ensuite, l'activité kinase a été mesurée suivant le protocole indiqué par le fournisseur du kit: Brièvement, les complexes de GSK3 β immunoprécipitée (2 ou 5 μ L) ont été mis en incubation à 30°C avec le peptide substrat (Sox fluorophore chélaté) dans un tampon de réaction kinase contenant de l'ATP. L'intensité de fluorescence a été enregistrée toutes les 30 secondes pendant 60 min en mesurant l'A485 dans une plaque à 96 puits. Des quantités égales d'immunoprécipité de GSK3 β à partir des différents essais ont été vérifiées par Western blot.

- Complexe de signalisation PAR₂/arrestin β 2/GSK3 β

Les CMT93 PAR₂ KO ont été produites dans l'équipe par la technique Crispr cas9 à partir de la lignée intestinale tumorale murine CMT93. Les CMT93 WT ou PAR₂ KO à

confluence dans des flacons de 75 cm² (10x10⁶ cellules) étaient privées en sérum pendant 24 h puis stimulées pendant 1 h par 100 μM PAR₂AP. Après deux lavages dans du PBS froid (Ca²⁺/Mg²⁺), les cellules étaient récupérées par grattage dans un tampon de lyse froid (50 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% de Triton X-100, 1 mM de l'orthovanadate de sodium, 1 mM de fluorure de sodium, cocktail anti-protéases, 2 mM de PMSF et 1 mM d'EDTA). Au bout de 20 min d'incubation sur la glace, les échantillons étaient centrifugés à 12000g pendant 15 min, 4°C. Une partie du surnageant était réservée pour le contrôle du lysat total et après un « pre-clearing » avec la protéine A-sépharose, les échantillons étaient incubés pendant une nuit à 4°C avec les anticorps anti-β arrestine 2 (clone C16D9) ou anti-Akt (clone 11E7). Ensuite, la protéine A-sépharose était ajoutée aux échantillons pendant 2 heures à 4°C sous agitation douce. Après centrifugation, un aliquot du surnageant était réservé pour le contrôle IP surnageant, et après 1 lavage dans un tampon de lyse froid et deux lavages dans du PBS froid, le tampon Laemmli était ajouté. Après sonication et chauffage à 100°C pendant 10 min, les protéines étaient séparées sur des gels de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) et transférées sur nitrocellulose (membrane Hybond C-super, Merck Millipore). Après blocage des sites aspécifiques de liaison pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de tampon Tris (TBS) contenant 0,5% de lait sans matières grasses et de la sérum-albumine bovine (BSA), les membranes étaient incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps appropriés dans du TBS-BSA-lait additionné de 0,05% de Tween. Après incubation pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps anti-souris ou anti-lapin, la détection était réalisée en utilisant un substrat chimioluminescent (SuperSignal, Amersham Pharmacia Biotech).

V-3-3- Evaluation de la viabilité des cellules immatures inflammatoires ou cancéreuses

Les lignées cellulaires et les sphéroïdes sontensemencés dans des plaques 96 puits et 48 puits dans un volume de 100 μL et de 250 μL de DMEM à 10% de SVF, respectivement. 24 heures après, les cellules sont privées de sérum pendant 24 h et stimulées par les

peptides agonistes de PAR₂ pendant 1 h puis traitées par les extraits de *D. harra* ou les inhibiteurs pharmacologiques de GSK3 (BIO, SB216763, TOCRIS BIOSCIENCE). 48 h après, les cellules sont incubées à 37 °C pendant 4 h avec du MTS 20 µL/puit dans les plaques 96 puits ou 40 µL/puits dans les plaques 48 puits; la lecture de l'absorbance est effectuée sur un lecteur Varioskan.

V-3-4- Immunomarquages des tissus coliques *in situ*

Afin de localiser l'expression des PARs dans le côlon, nous avons choisi des échantillons de côlon humain qui ont été prélevés d'un tissu normal et des coupes réalisées sur des prélèvements de souris mâle normale (C57BL/6, 8 semaines). Des souris Sox9-GFP et LGR5-GFP ont été obtenues auprès de l'Université de Caroline du Nord.

L'immunomarquage des coupes histologiques des colons humain et murin (**Figure 10**) est une méthode permettant de révéler l'expression et la localisation de protéines, grâce à l'utilisation des anticorps spécifiques. Les marqueurs Lgr5, sox9 et CD44 permettent de situer les cellules souches dans le fond des cryptes coliques.

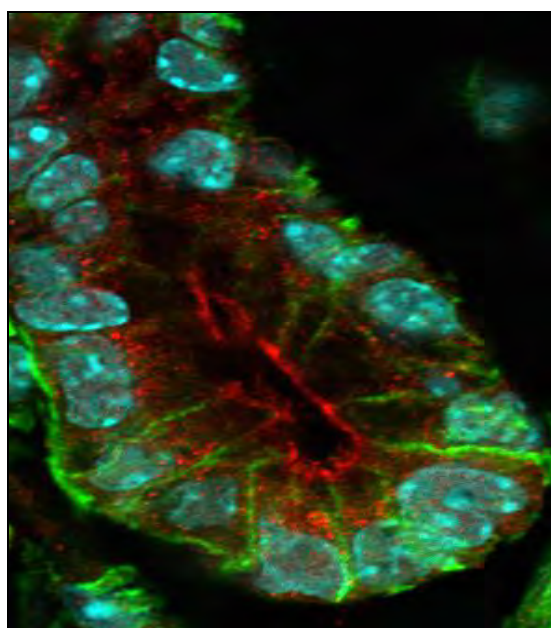


Figure 10: Exemple d'Immunomarquage d'une crypte colique murine: Les récepteurs CD44 (vert) et PAR1 (rouge). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (cyan).

Résultats et discussions

I- ETUDES PHYTOCHIMIQUES DE *D. SIMPLEX* ET *D. HARRA*

I-1- Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction obtenus par macération pour les différents organes de *D. harra* et *D. simplex* sont récapitulés dans le **Tableau 2**.

Le rendement d'un extrait a été calculé selon la formule suivante :

$$R(\%) = (\text{masse de l'extrait} / \text{masse de la plante}) * 100$$

Tableau 2: Rendements des extractions des différents organes de *D. simplex* et *D. harra*

Plante sèche	Organes	Solvants (volume en L)	Masse (g)	Rendement (%)
<i>D. harra</i>	836 g feuilles	3 L hexane	6,4	0,7
		3 L acétate d'éthyle	5,7	0,6
		3 L méthanol	27,0	3,2
	403 g Fleurs	2 L hexane	6,7	1,6
		2 L acétate d'éthyle	2,5	0,6
		2 L méthanol	35,8	8,8
	2 kg Racines	4 L hexane	8,4	0,4
		4 L acétate d'éthyle	6,1	0,3
		4 L méthanol	50	2,5
<i>D. simplex</i>	1 kg Feuilles	3 L hexane	3,4	0,3
		3 L acétate d'éthyle	12,6	1,2
		3 L méthanol	56,5	5,6
	480 g Fleurs	2 L hexane	15,4	3,2
		2 L acétate d'éthyle	7,4	1,5
		2 L méthanol	40,7	8,4
	552 g Racines	2 L hexane	1,8	0,3
		2 L acétate d'éthyle	2,1	0,3
		2 L méthanol	14,9	2,7

On remarque que les rendements des extractions augmentent en passant des racines aux feuilles puis aux fleurs. De plus, les rendements augmentent avec la polarité du solvant d'extraction. En effet, les rendements pour les extraits méthanoliques sont supérieurs à

ceux à l'acétate d'éthyle ; ceux à l'hexane sont supérieurs à l'acétate d'éthyle dans la plupart des cas.

I-2- Caractérisation phytochimique des organes de *D. simplex* et *D. harra*

I-2-1-Tests phytochimiques

Une investigation phytochimique préliminaire des extraits de *D. harra* et *D. simplex* a été effectuée et a permis de déterminer à quelle famille chimique appartiennent les composés présents dans ces deux espèces.

Les résultats obtenus sont consignés dans les **Tableaux 3 et 4**.

Tableau 3 : Résultats des tests phytochimiques des différents extraits de *D. harra*

Tests phytochimiques	Extraits de <i>D. harra</i>								
	Feuilles			Fleurs			Racines		
	Hexane	AcOEt	MeOH	Hexane	AcOEt	MeOH	Hexane	AcOEt	MeOH
Stérols/Triterpènes	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Quinones	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoïdes	-	+	+	-	+	++	-	-	+
Alcaloïdes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tropolones	-	-	-	-	-	-	-	-	-

On remarque que les fleurs des deux espèces de *Diplotaxis* renferment des flavonoïdes concentrés dans les extraits méthanoliques. De plus, nous avons remarqué l'absence des quinones, des alcaloïdes et des tropolones dans tous les extraits des deux espèces.

Tableau 4: Résultats des tests phytochimiques des différents extraits de *D. simplex*

Tests phytochimiques	Extraits de <i>D. simplex</i>								
	Feuilles			Fleurs			Racines		
	Hexane	AcOEt	MeOH	Hexane	AcOEt	MeOH	Hexane	AcOEt	MeOH
Stérols/Triterpènes	+	++	-	+	+	-	+	-	-
Quinones	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoïdes	-	++	++	-	-	+	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tropolones	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I-2-2-Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux

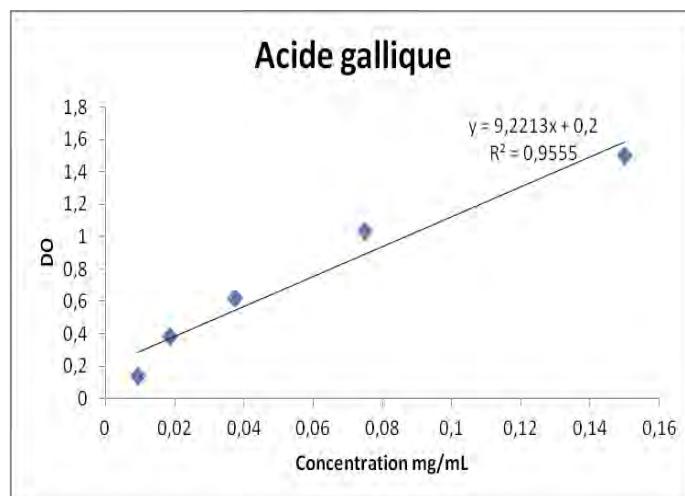
- Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux contenus dans les différents extraits ont été déterminées en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimées en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait (mg AG/g d'extrait).

Les résultats obtenus sont illustrés ci-dessous :

Tableau 5: Variation de la DO en fonction des concentrations de l'acide gallique

Concentration (mg/mL)	Densité optique
0,0093	0,14
0,0187	0,38
0,0375	0,61
0,075	1,03
0,15	1,50



Courbe 1: Courbe de variation de la DO en fonction des concentrations de l'acide gallique

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **Tableau 6**. On remarque que tous les extraits polaires des trois organes (racines, feuilles et fleurs) des deux espèces renferment des phénols dont les teneurs augmentent avec la polarité du solvant d'extraction à l'exception de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de *D. simplex*.

Tableau 6 : Teneur en polyphénols des différents extraits de *D. harra* et de *D. simplex*

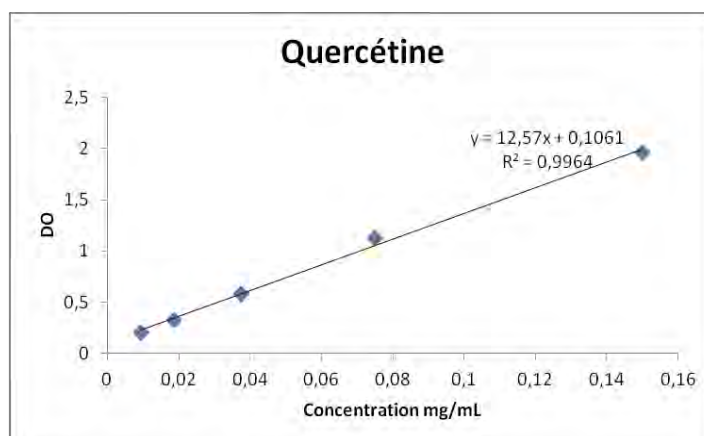
Plantes	Organes	Solvants	Phénol totaux (mg AG/g d'extrait)	Flavonoïdes (mg Q/g d'extrait)
<i>D. harra</i>	Feuilles	Hexane	-	84,0
		Acétate d'éthyle	-	250,0
		Méthanol	190,0	320,0
	Fleurs	Hexane	68,0	29,6
		Acétate d'éthyle	285,0	103,6
		Méthanol	413,5	456
	Racines	Hexane	-	-
		Acétate d'éthyle	53,0	21,0
		Méthanol	165,0	316,0
<i>D. simplex</i>	Feuilles	Hexane	65,0	77,4
		Acétate d'éthyle	487,0	429,6
		Méthanol	316,5	412,0
	Fleurs	Hexane	61,5	42,0
		Acétate d'éthyle	108,0	96,0
		Méthanol	426,5	208,0
	Racines	Hexane	89,0	-
		Acétate d'éthyle	141,0	14,2
		Méthanol	249,5	8,6

- Dosage des flavonoïdes totaux

Le contenu en flavonoïdes a été déterminé en utilisant une courbe standard $DO = f(C)$ est préparée avec la quercétine, et il est exprimé en mg équivalent de quercétine/g d'extrait (mg Q/g d'extrait). Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

Tableau 7: Variation de la DO en fonction des concentrations de la quercétine

Concentration (mg/mL)	Densité optique
0,0093	0,20
0,0187	0,32
0,0375	0,57
0,075	1,12
0,15	1,95



Courbe 2: Courbe de variation de la DO en fonction des concentrations de la quercétine

Parallèlement aux teneurs en phénols, ceux en flavonoïdes sont les plus importants dans les extraits méthanoliques. Les feuilles de *D. simplex* se sont révélées les plus riches en flavonoïdes alors que dans *D. harra*, ce sont les fleurs qui sont les plus riches en flavonoïdes. On remarque que les fleurs des deux espèces de *Diplotaxis* renferment des flavonoïdes concentrés dans les extraits méthanoliques.

Tableau 8 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits de *D. harra* et de *D. simplex*

Plantes	Organes	Solvants	Flavonoïdes (mg Q/g d'extrait)
<i>D. harra</i>	Feuilles	Hexane	84,0
		AcOEt	250,0
		Méthanol	320,0
	Fleurs	Hexane	29,6
		AcOEt	103,6
		Méthanol	456,0
	Racines	Hexane	-
		AcOEt	21,0
		Méthanol	316,0
<i>D. simplex</i>	Feuilles	Hexane	77,4
		AcOEt	429,6
		Méthanol	412,0
	Fleurs	Hexane	42,0
		AcOEt	96,0
		Méthanol	208,0
	Racines	Hexane	-
		AcOEt	14,2
		Méthanol	8,6

I-3- Composition chimique des fractions volatiles des fleurs et des feuilles de *D. simplex*

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique des fractions volatiles des fleurs et des feuilles de *D. simplex* qui n'ont jamais fait l'objet d'étude antérieure.

Après extraction par hydrodistillation des fleurs et des feuilles de *D. simplex*, les compositions des fractions volatiles ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-SM).

I-3-1- Fraction volatile des fleurs de *D. simplex*

Le rendement d'extraction de la fraction volatile des fleurs de *D. simplex* est égal à 70 µL pour 100 g. Son analyse par GC-MS, présentée dans le **Tableau 9**, a abouti à l'identification de 42 composés représentant 99,60% de la fraction volatile totale qui contient 77,43% de composés soufrés/azotés.

L'indice de Kovats (I_K) a été utilisé comme paramètre d'identification des substances dans les fractions volatiles. L' I_K d'un produit inconnu X est calculé suivant la formule présentée ci-dessous en référence à une série d'alcane (C2-C32).

$$I_K = 100 \left[n + \frac{t_R(X) - t_R(n)}{t_R(n+1) - t_R(n)} \right]$$

Avec

- n est le nombre d'atomes de carbone de l'alcane élué avant le produit inconnu X.
- $t_R(X)$ est le temps de rétention du produit inconnu X.
- $t_R(n)$ est le temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le produit inconnu X.
- $t_R(n+1)$ est le temps de rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone élué après le produit inconnu X.

D'après le **Tableau 9**, on remarque que les produits majoritaires de la fraction volatile des fleurs de *D. simplex* sont respectivement le 5-(méthylthio)-pentanenitrile (38,83 %) et le 1-isothiocyanato-butane (38,60%).

Tableau 9 : Composition chimique de la fraction volatile des fleurs de *D. simplex*

N°	Composés identifiés	Composition (%)	Ik
1	Trisulfide, dimethyl	0,39	946
2	beta-Isophorone	0,41	1016
3	4,5-epoxy-1-isopropyl-4-methyl-1-cyclohexene	0,24	1058
4	alpha-Isophoron	0,22	1070
5	Cyclobutanecarbonitrile	0,29	1076
6	Camphor	6,19	1087
7	2,4-Dithiapentane	0,30	1145
8	5-(méthylthio)-pentanenitrile	38,83	1186
9	Nonanoic acid	0,21	1270
10	2,2-Dimethyl-1-(2-hydroxy-1-isopropyl) propyl ester of isobutanoic acid	0,19	1330
11	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	0,12	1352
12	Decanoic acid	0,33	1365
13	Tetradecane	0,08	1373
14	1-isothiocyanato-butane	38,60	1430
15	Di(tert-butyl) trisulfide, perfluoro-	0,33	1449
16	Benzoic acid, p-tert-butyl-	2,32	1499
17	Dodecanoic acid	0,08	1551
18	Beta-tumerone	0,08	1636
19	N-methyl-1,3-dithioisindoline	0,85	1646
20	1,2,4,5-Tetrathiane	0,41	1697
21	Tetradecanoic acid	0,27	1735
22	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	0,29	1807
23	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4,5]deca-6,9-diene-2,8-dione	0,35	1884
24	1,4-Dithiin-2-methanol, 5,6-dihydro-3-methyl-	0,85	1907
25	n-Hexadecanoic acid	1,87	1938
26	1-Octadecene	0,13	2043
27	Phytol	0,24	2075
28	9,17-Octadecadienal, (Z)-	1,18	2110

29	Octadecanoic acid	0,58	2133
30	4-(2'-Hydroxyphenyl)-2,2,4-trimethyl-tetrahydrobenzopyran	0,19	2158
31	Bicyclopentyl-1,1'-diene	0,17	2162
32	2,5-Trimethylenenorborn-1'-ene (Tricyclo [5,3.0.0(3,9)]dec-4-ene)	0,08	2183
33	Tricyclo[4.2.1.1(2,5)]decan-3-ol	0,13	2190
34	1,4-Methanobenzocyclodecene, 1,2,3,4,4a,5,8,9,12,12a-decahydro-	0,13	2212
35	Phenol, 2-(2-benzoxazolyl)-	0,24	2309
36	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	0,34	2354
37	n-Heptadecylcyclohexane	0,25	2370
38	Pentacosane	0,30	2451
39	2-Benzyl-2-methyl-1,3-oxathiolane	0,59	2606
40	Hexacosane	0,24	2636
41	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diundecyl ester	0,33	2697
42	Heptacosane	0,44	2756

I-3-2- Fraction volatile des feuilles de *D. simplex*

La composition chimique de la fraction volatile des feuilles de *D. simplex* est présentée dans le **Tableau 10**. Son rendement d'extraction est égal à 20 µL pour 100 g. Son analyse par GC-MS a permis d'identifier 25 composés représentant 98,45% de la fraction volatile totale qui contient 53,70% des cétones et 33,23% des composés soufrés/azotés. Les composés les plus abondants sont le 3,5-diméthylcyclohexen-1-one (38,59%), le 5-méthylthiopentanenitrile (15,74%), le 2,6-diméthoxy-3,5-bis(méthylthio)-1,4-benzoquinone (15,11%), le 1-isothiocyanatobutane (12,56%) et le cyclobutanecarbonitrile (4,93%).

Tableau 10 : Composition chimique de la fraction volatile des feuilles de *D. simplex*

N°	Composés identifiés	Composition (%)	I _k
2	Cis-3-hexenyl acetate	0,33	993
3	Cyclobutanecarbonitrile	4,93	1072
4	2-methyltetrahydrothiophen-3-one	2,48	1085
5	5-(methylthio)-pentanenitrile	15,74	1174
6	2-thienylmethanol	0,43	1327
7	1-isothiocyanato-butane	12,56	1412
8	Butyl thiocyanate	0,07	1433
9	Benzoic acid , p-tert-butyl-	0,90	1477
10	O-Fluorophenol	0,54	1646
11	N-hydroxy-2-aminofluorene	0,05	1657
12	Butyl methyl sulfoxide	0,11	1663
13	Hexadecane	0,12	1732
14	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione	0,12	1882
15	Hexadecanoic acid	1,29	1918
16	Phytol	0,27	2074
17	Linoleic acid	0,17	2106
18	3,5-dimethylcyclohexen-1-one	38,59	2123
19	Nonadecane	0,17	2191
20	Nonacosane	3,53	2197
21	6H-Pyrido[2,3b][1,4] benzodiazepin-6-one	0,22	2308
22	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl)ester	0,19	2353
23	2,6-dimethoxy-3,5-bis(methylthio)-1,4-benzoquinone	15,11	2383
24	Hexanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester	0,30	2595
25	Eicosane	0,23	2622

Les deux produits majoritaires de la fraction volatile des fleurs de *D. simplex* sont également présents dans la fraction volatile des feuilles de cette plante mais avec des pourcentages plus faibles. Cependant, le produit majoritaire de la fraction volatile des feuilles (le 3,5-diméthylcyclohexen-1-one (38,59%)) est absent de la fraction volatile des

fleurs de cette plante.

En conclusion, les deux fractions volatiles des fleurs et des feuilles de *D. simplex* présentent un pourcentage élevé de composés soufrés/azotés. Ces composés, tels que les isothiocyanates et les nitriles, représentent une grande classe de composés produits par la famille des *Brassicaceae* [71]. Il a été montré que ces produits jouent un rôle important dans les caractéristiques des arômes de plusieurs fractions volatiles [72].

II- ACTIVITES ANTI-RADICALAIRE ET ANTIBACTERIENNES DES EXTRAITS DE *D. SIMPLEX* ET *D. HARRA*

II-1- Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire a été déterminée par la méthode de DPPH pour les extraits bruts de *D. simplex* et *D. harra*, la fraction issue de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra*, le produit pur isolé (isorhamnétine-3-*O*-glucoside), les fractions volatiles des fleurs et des feuilles de *D. simplex*.

II-1-1- Activité anti-radicalaire des extraits de *D. simplex* et *D. harra*

Les variations des PI en fonction des concentrations des extraits bruts des deux espèces de *Diplotaxis*, de la fraction issue de l'extrait méthanolique de *D. harra* ainsi que de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside sont illustrées dans les **Tableaux 11 et 12** suivants:

Tableau 11 : Variation des PI des extraits des différents organes de *D. simplex* et leurs CI₅₀

C (mg/mL)	Pouvoir d'inhibition PI (%)								
	Hexane			AcOEt			MeOH		
	Feuilles	Fleurs	Racines	Feuilles	Fleurs	Racines	Feuilles	Fleurs	Racines
0,6	13	24	13	24	54	75	20	91	37
0,3	10	20	11	20	33	61	14	87	24
0,15	7	12	8	12	24	44	9	67	15
0,075	5	7	5	7	15	23	3	40	10
0,0375	2	3	2	3	10	11	2	28	5
CI ₅₀	-	-	-	-	0,52	0,23	-	0,12	-

Les valeurs de CI_{50} sont déduites à partir des courbes présentées sur la **Figure 11** suivante:

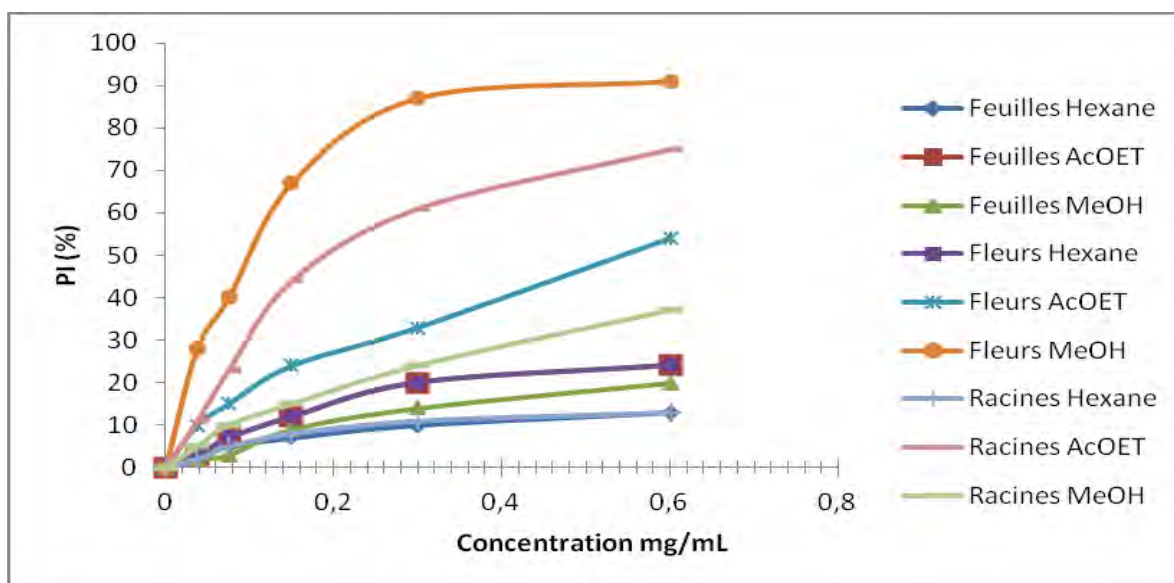


Figure 11: Variation des PI des extraits des différents organes de *D. simplex*

Tableau 12: Variation des PI des extraits des différents organes de *D. harra* et leurs CI_{50}

C (mg/mL)	Pouvoir d'inhibition PI (%)								
	Hexane			AcOEt			MeOH		
	Feuilles	Fleurs	Racines	Feuilles	Fleurs	Racines	Feuilles	Fleurs	Racines
0,6	20	Insoluble	14	20	40	91	36	90	50
0,3	15		11	15	35	85	31	89	44
0,15	11		7	11	21	71	20	75	30
0,075	7		4	7	10	41	15	28	18
0,0375	3		2	2	2	26	8	12	7
CI_{50}	-		-	-	-	0,22	-	0,10	0,40

Les valeurs de CI_{50} sont déduites à partir des courbes présentées sur la **Figure 12** suivante:

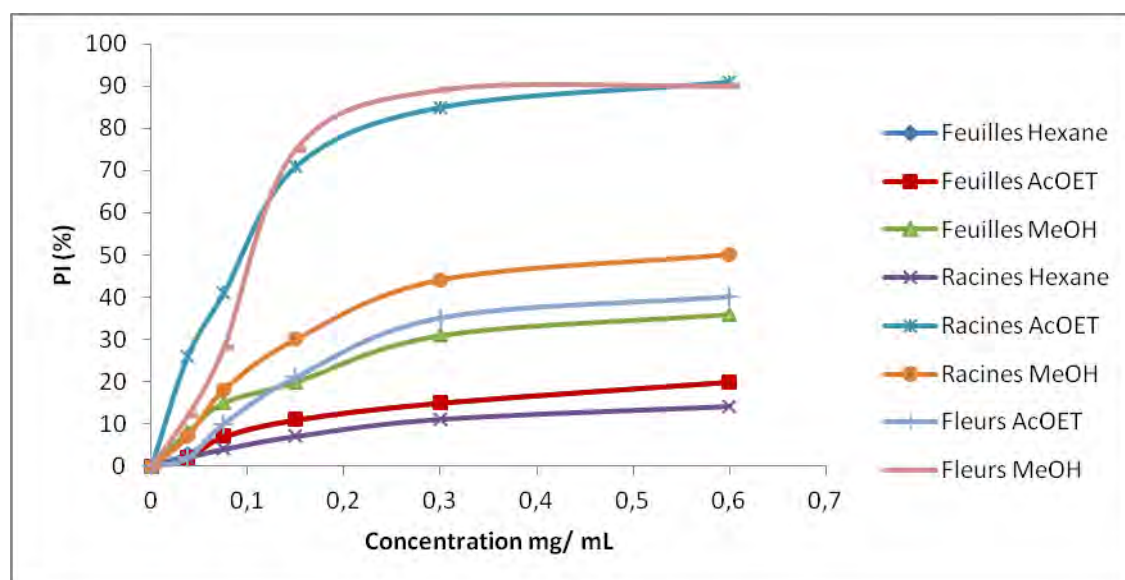


Figure 12: Variation des PI des extraits des différents organes de *D. harra*

Un échantillon est d'autant plus actif que la valeur de sa CI_{50} est faible. La comparaison de ces CI_{50} avec celles des antioxydants de référence (cf Matériel et méthodes: CI_{50} (vitamine E)= 0,02 mg/mL et CI_{50} (BHT)= 0,04 mg/mL) nous a permis de tirer les conclusions suivantes:

- les extraits méthanoliques des fleurs de *D. harra* et de *D. simplex* présentent la plus forte activité.
- les deux extraits à l'AcOEt des racines des deux espèces de *Diplotaxis* sont doués d'une activité moyenne.
- tous les autres types d'extrait présentent une activité antioxydante faible ou nulle.

II-1-2- Activités anti-radicalaires des fractions volatiles de *D. simplex*

Les variations des PI en fonction des concentrations des fractions volatiles des feuilles et des fleurs de *D. simplex* sont illustrées dans le **Tableau 13** :

Tableau 13 : Variation des PI des fractions volatiles des feuilles/fleurs de *D. simplex* et leurs CI₅₀

C (mg/mL)	Pouvoir d'inhibition PI (%)	
	Fraction volatile des feuilles	Fraction volatile des fleurs
0,6	42	96
0,3	20	65
0,15	9	37
0,075	4	22
0,0375	2	12
CI ₅₀	-	0,23

Les valeurs de CI₅₀ sont déduites à partir des courbes présentées sur la **Figure 13** suivante:

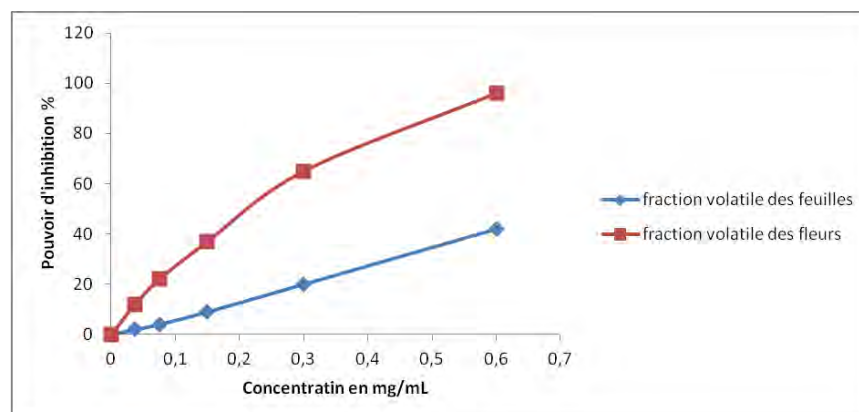


Figure 13: Variation des PI des fractions volatiles des feuilles/fleurs de *D. simplex*

La fraction volatile des fleurs de *D. simplex* présente une activité antioxydante moyenne comparativement à la vitamine E (CI₅₀= 0,02 mg/mL) et au BHT (CI₅₀= 0,04 mg/mL)(cf Matériel et méthodes) alors que celle des feuilles est inactive.

Les composés de type isothiocyanate et nitrile sont connus pour leur activité antioxydante importante, et pourraient être responsables de l'activité de piégeage de DPPH modérée que nous avons mesurée dans la fraction volatile des fleurs de *D. simplex* (CI₅₀ = 0,23 mg/mL). Des études antérieures ont montré que les dérivés d'isothiocyanate possèdent une activité antioxydante qui dépend du groupe fonctionnel N=C=S [73]. A notre connaissance, il s'agit de la première étude sur la composition chimique et l'activité

antioxydante des fractions volatiles de *D. simplex*

II-2- Activité antibactérienne

Les extraits de *D. simplex* et de *D. harra* ont été testés contre les six souches bactériennes suivantes: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enteritidis*. Les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits sont indiqués dans les **Tableaux 14 et 15 suivants**:

Tableau 14 : Activité antibactérienne des extraits des feuilles/ fleurs/ racines de *D. simplex*

Extraits		Diamètre de la zone d'inhibition (ZI, mm)					
Organes	Solvant	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Feuilles	Hexane	12	18	17	14	9	-
	AcOEt	10	11	11	-	10	-
	Méthanol	13	-	10	-	15	-
Fleurs	Hexane	10	17	-	-	15	10
	AcOEt	19	25	18	18	-	-
	Méthanol	11	17	12	9	9	10
Racines	Hexane	20	21	17	10	-	22
	AcOEt	11	16	12	12	-	10
	Méthanol	10	-	9	-	12	-
Gentamicine (15µg/mL)		25	30	18		18	22

Tableau 15 : Activité antibactérienne des extraits des feuilles/fleurs/ racines de *D. harra*

Extraits		Diamètre de la zone d'inhibition (ZI, mm)					
Organes	Solvant	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Feuilles	Hexane	10	30	7	8	7	7
	AcOEt	18	14	12	10	14	15
	Méthanol	Non testé					
Fleurs	Hexane	10	12	7	10	10	11
	AcOEt	11	-	-	-	-	-
	Méthanol	-	15	11	10	7	-
Racines	Hexane	Non testé					
	AcOEt	12	29	14	10	7	10
	Méthanol	Non testé					
Gentamicine (15µg/mL)		25	30	18		18	22

Par comparaison avec l'antibiotique de référence (gentamicine), nous avons montré que :

- Les extraits à l'acétate d'éthyle des fleurs, à l'hexane des feuilles et des racines de *D. simplex* ont une forte activité inhibitrice vis à vis de plusieurs souches bactériennes,
- L'extrait à l'AcOEt des feuilles de *D. harra* est aussi actif sur plusieurs souches.
- L'extrait à l'AcOEt des racines de *D. harra* est aussi très réactif sur deux souches : *S. aureus* et *E. faecalis*.
- L'extrait à l'hexane des feuilles de *D. harra* est très actif sur la souche : *S. aureus* avec une ZI= 30mm.

Ces résultats montrent bien l'intérêt des extraits de *Diplotaxis* sp. vis à vis de souches bactériennes pathogènes GRAM+ et GRAM-. Nos données montrent que les bactéries Gram positif sont plus sensibles que les bactéries Gram-négatif aux différents extraits de *D. simplex* et *D. harra*.

En se basant sur l'activité inhibitrice intéressante des extraits de *D. simplex* sur plusieurs souches, nous avons cherché la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des différents extraits. Les résultats sont indiqués dans le **Tableau 16**.

Tableau 16 : Détermination des valeurs des CMI et CMB des extraits de *D. simplex*

Extraits		CMI/CMB des extraits de <i>D. simplex</i> (µg/mL)					
Organes	Solvant	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Feuilles	Hexane	2,5	5	10	>10	>10	-
		10	10	10	-	-	-
	AcOEt	5	10	10	-	>10	-
		5	10	10	-	-	-
Méthanol	2,5	-	10	-	>10	-	-
	5	-	10	-	-	-	-
Fleurs	Hexane	10	5	-	-	>10	10
		>10	10	-	-	-	-
	AcOEt	1,25	2,5	5	5	>10	>10
		1,25	2,5	5	5	-	-
Méthanol	10	5	10	>10	>10	>10	>10
	10	10	10	-	-	-	-
Racines	Hexane	0,625	0,625	2,5	2,5	-	10
		0,625	0,625	5	5	-	-
	AcOEt	5	2,5	5	5	-	-
		>10	5	5	10	-	-
Méthanol	5	>10	10	10	10	>10	>10
	>10	-	>10	>10	>10	-	-
Gentamicine (15µg/mL)		0,001	0,001	0,002	0,016	-	0,002
		0,002	0,002	0,004	0,032	-	0,004

Ainsi, les extraits à l'hexane des racines et à l'AcOEt des fleurs de *D. simplex* présentent des valeurs intéressantes de CMB et CMI vis à vis de *B. cereus* et *S. aureus*. L'extrait à l'hexane des racines de *D. simplex* s'est révélé le plus actif montrant une CMB de 0,625 µg/mL et CMI égale 0,625 µg/mL.

D'après les résultats trouvés (paragraphe II-1-1), nous avons conclu que la forte activité antioxydante trouvée dans les extraits méthanoliques des fleurs de *D. simplex* et de *D. harra* pourrait être corrélée à leur richesse en flavonoïdes. D'après la littérature, ces produits sont doués de plusieurs activités notamment activité antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse. Des travaux antérieurs faits par notre équipe ayant montré que les flavonoïdes pourraient cibler l'enzyme GSK3β pro-inflammatoire et pro-carcinogène, nous avons choisi comme modèle d'étude biologique les cellules souches

coliques qui sont responsables des pathologies intestinales inflammatoires et cancéreuses où GSK3 β est suractivée.

III- MODELE D'ETUDE DES CELLULES SOUCHES COLIQUES INFLAMMATOIRES OU CANCEREUSES

Les récepteurs activés par les protéases (*Protease-Activated Receptors*; PARs) sont des récepteurs couplés aux protéines G et comportent quatre membres, PAR₁, PAR₂, PAR₃ et PAR₄. PAR₁ et PAR₂ sont connus pour leurs rôles importants dans l'inflammation et le cancer, en particulier au niveau intestinal [58].

III-1- Rôle régulateur de PAR₁ et de PAR₂ sur les fonctions des cellules souches coliques

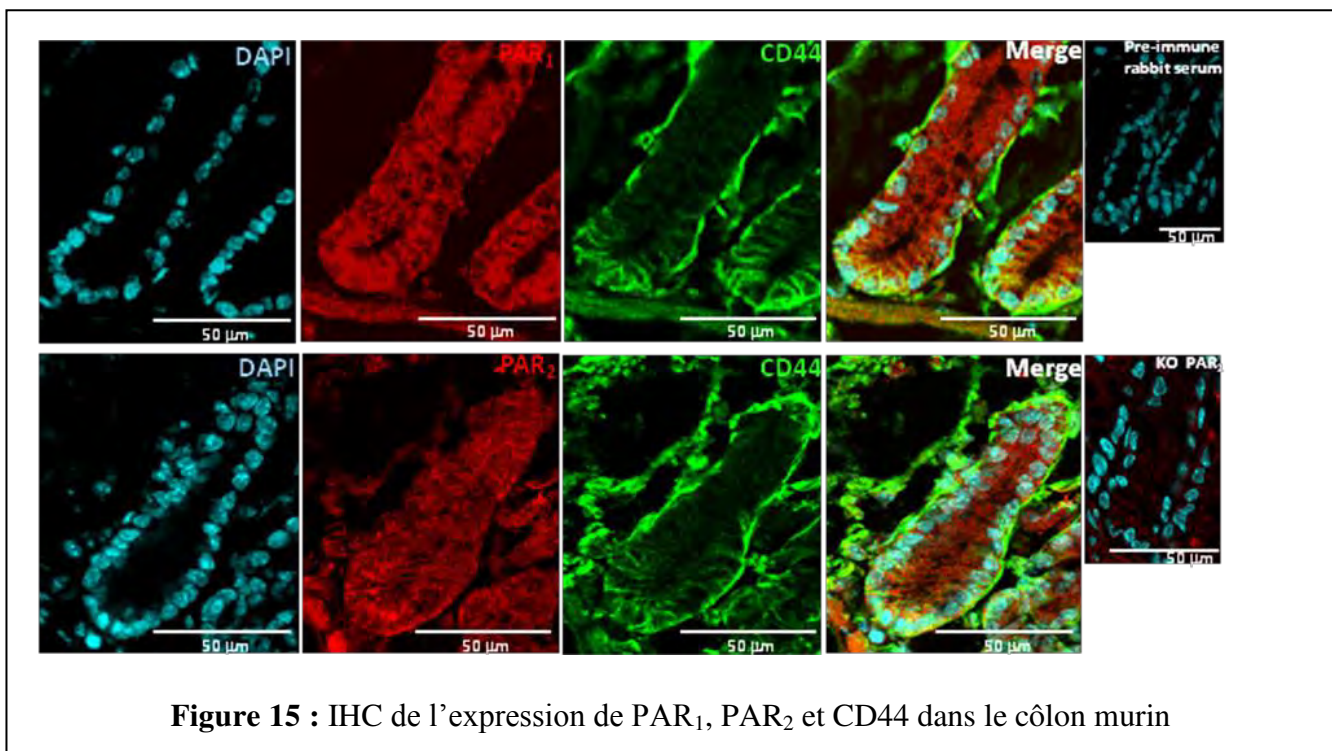
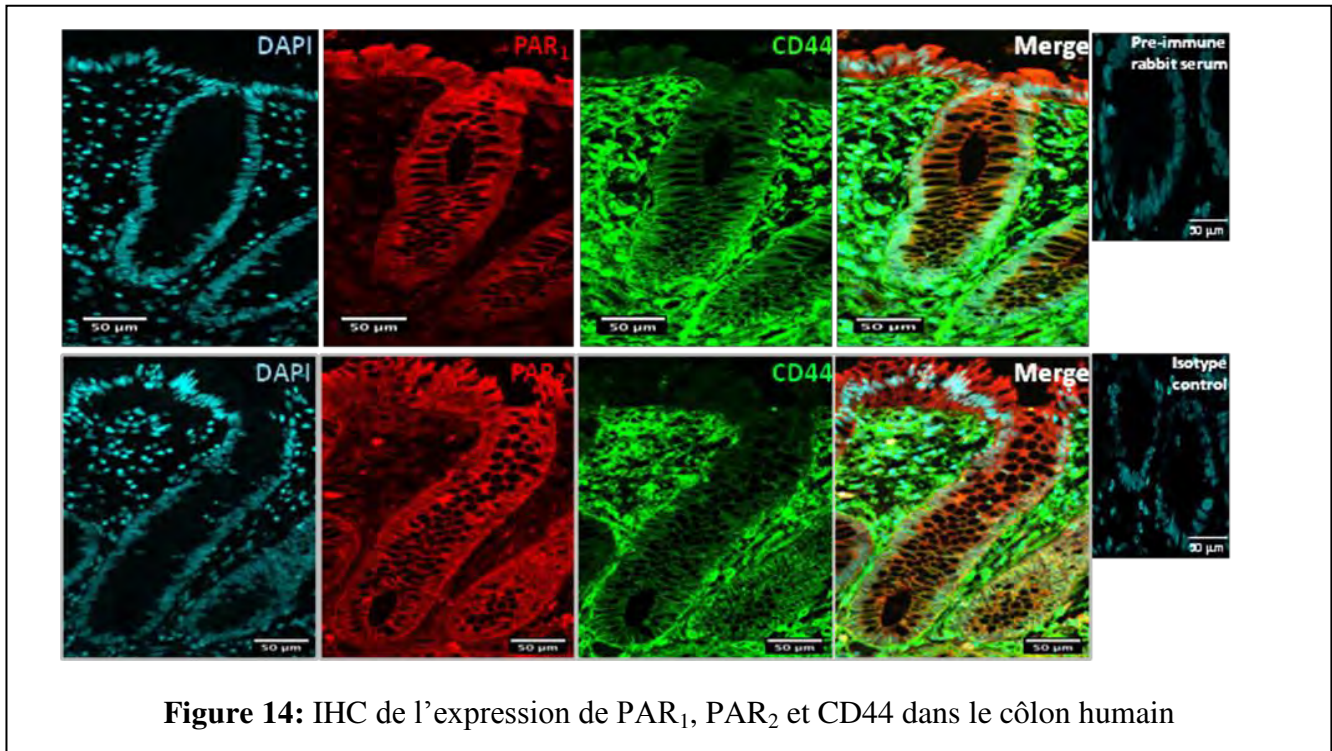
Le rôle des PARs dans la régulation des cellules souches en général est méconnu, notamment dans le cas des cellules souches intestinales (CSI). De plus, leur rôle régulateur dans les fonctions épithéliales intestinales a jusque là été étudié avec des modèles de lignées tumorales, ne reflétant pas la physiologie et les étapes précoces de la transition inflammation-cancer. C'est pourquoi nous avons voulu mettre en place un modèle d'étude en 3D permettant l'étude *in vitro* des CSI à partir de tissu primaire et sur lequel nous avons évalué l'impact d'une stimulation des récepteurs de protéases inflammatoires PAR₁ et PAR₂. La formation de sphéroïdes intestinaux dans cette culture 3D est basée sur les propriétés de survie et d'auto-renouvellement des CSI.

III-1-1- Expression de PAR₁ et de PAR₂ dans la crypte colique

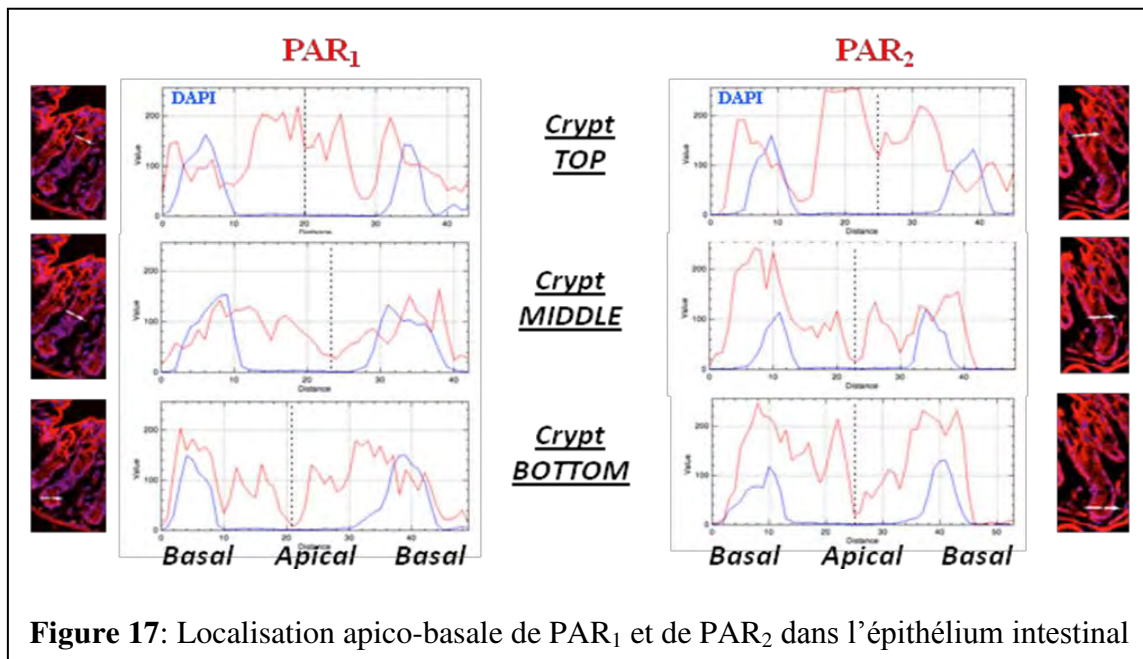
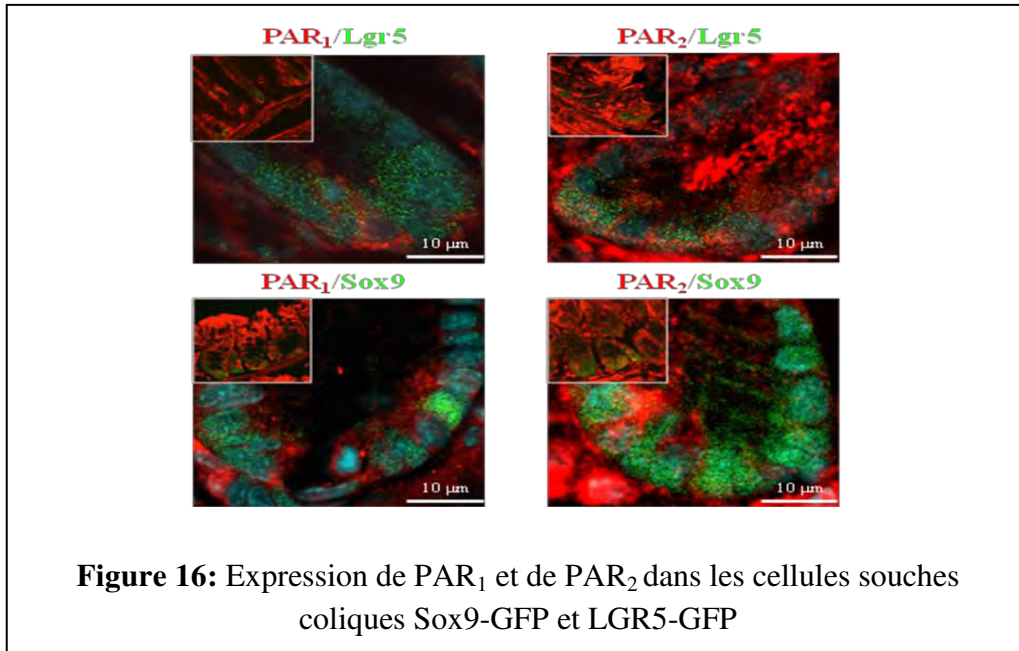
Nous avons d'abord recherché l'expression des PARs dans les cellules immatures de la crypte colique par immunomarquage.

Comme montré sur les **Figures 14 et 15**, au niveau du colon murin et du colon humain, PAR₁ et PAR₂ sont localisés dans l'ensemble de la crypte. Le marquage d'immaturation CD44 montre un marquage localisé de façon prédominante au fond des cryptes mais aussi dans le stroma. La co-localisation des PARs et de CD44, mais aussi leur expression dans

les cellules souches Lgr5+ ou Sox9+ (Figure 16) montre que PAR₁ et PAR₂ sont exprimés par les cellules immatures coliques.

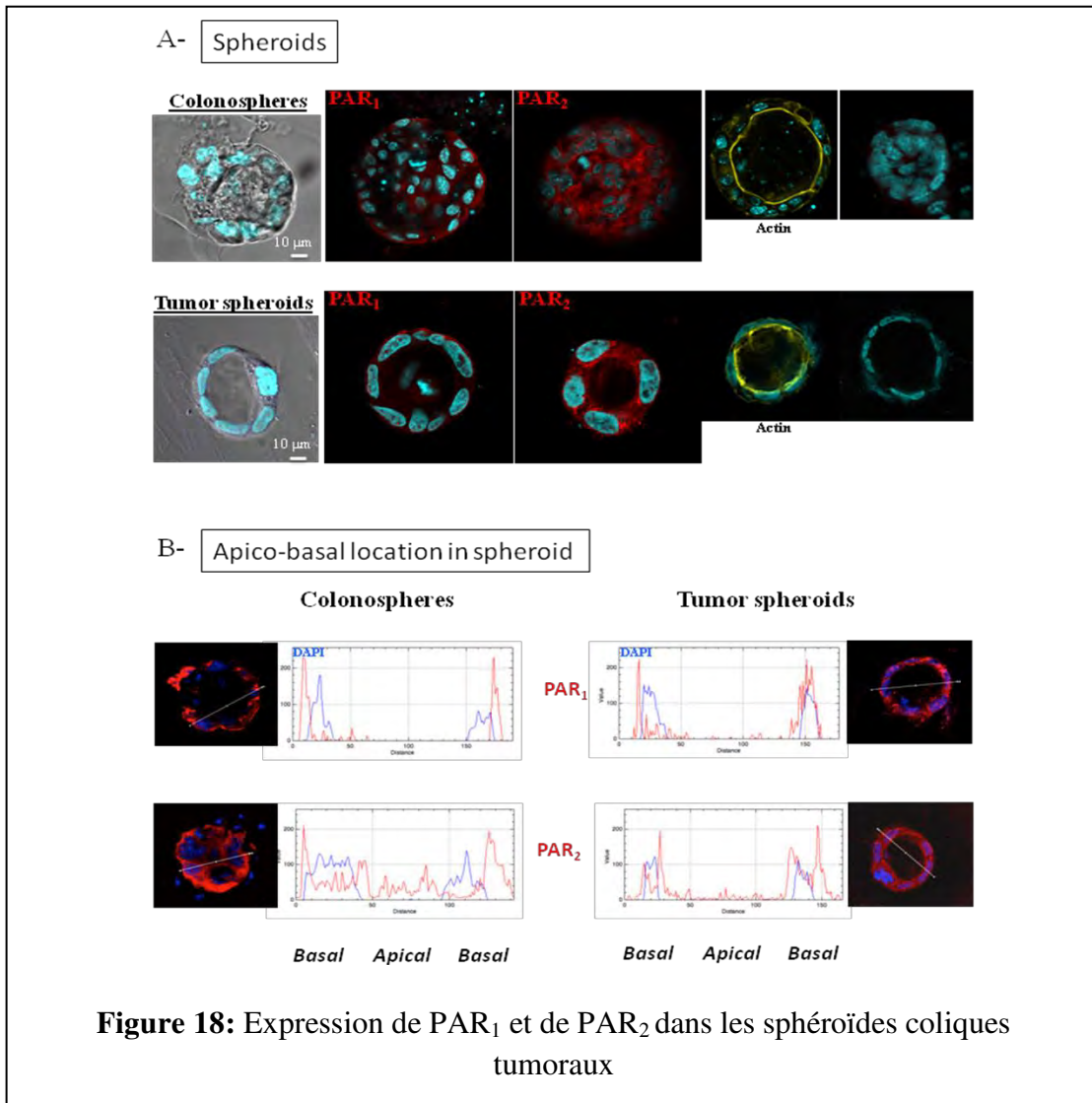


Il est à noter que PAR₁ et PAR₂ sont exprimés tant au niveau du pôle apical que du pôle basolatéral des cellules épithéliales coliques polarisées mais avec une nette prédominance de la localisation apicale dans les cellules du haut de la crypte (Figures 14-15 et Figure 17).



Pour être dans un modèle *in vitro* proche de l'architecture intestinale, nous avons mis en place une culture en 3D des cryptes à partir de colon murin (colonosphères) ou de colon

humain tumoral (lignée Caco-2, sphéroïdes tumoraux). PAR₁ et PAR₂ sont exprimés dans les deux modèles de sphéroïdes, essentiellement en position basolatérale (**Figure 18**).



III-1-2- Impact de l'activation de PAR₁ et de PAR₂ sur la survie et la prolifération des cellules souches coliques cultivées en 3D

Après avoir confirmé la présence des PARs dans les colonosphères et les sphéroïdes tumoraux, nous avons stimulé ces sphéroïdes avec des peptides agonistes des PARs (PAR AP) ou leurs peptides contrôles afin d'étudier l'impact sur le développement des sphéroïdes.

Nous avons observé (**Figure 19**) que le nombre et la taille des sphéroïdes traités par PAR₂AP ont été réduits par rapport aux témoins. Par contre, sous stimulation par PAR₁, les sphéroïdes deviennent plus grands et leur nombre a été augmenté par rapport aux témoins. Donc PAR₁ et PAR₂ régulent de façon opposée les cellules immatures coliques.

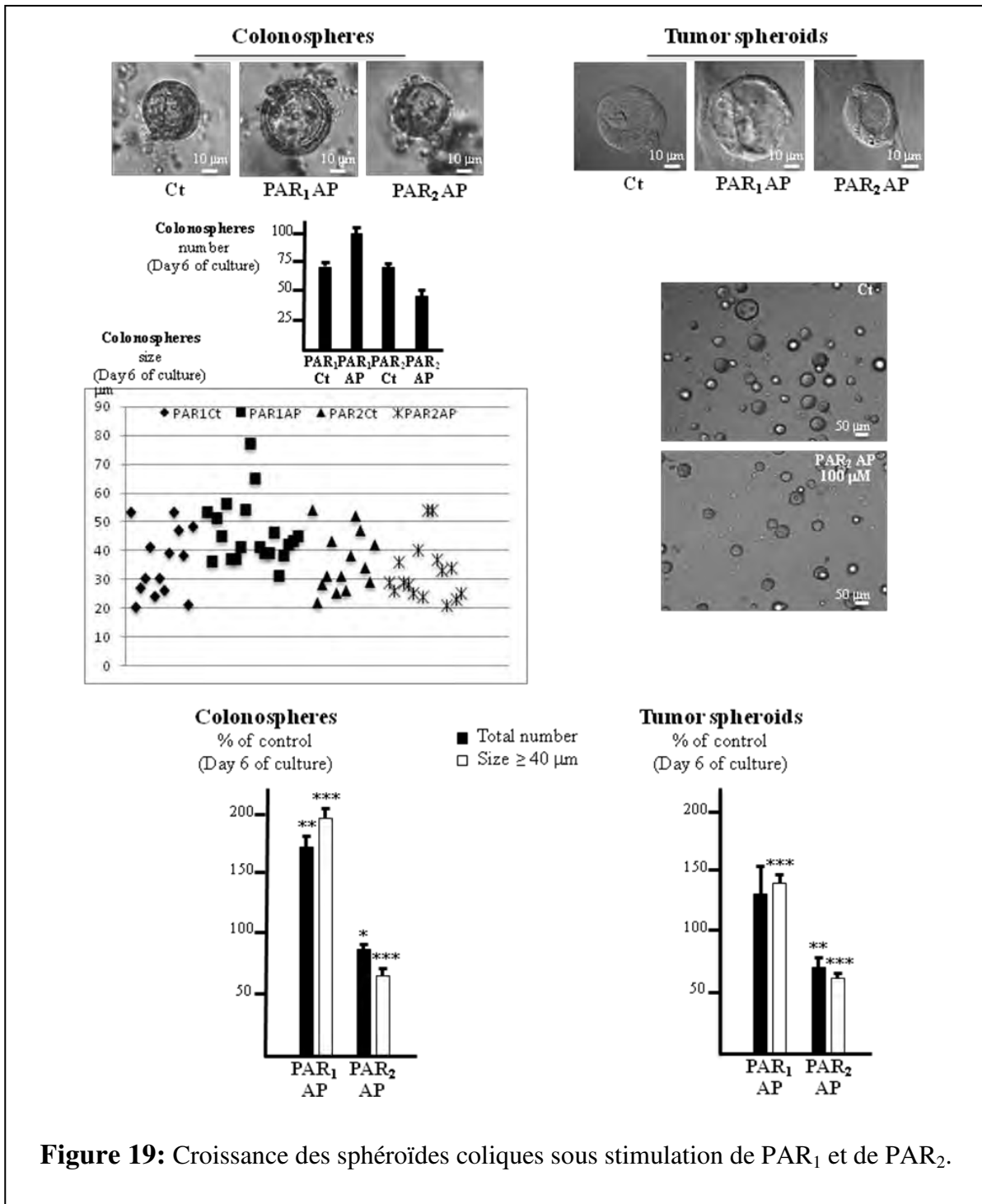
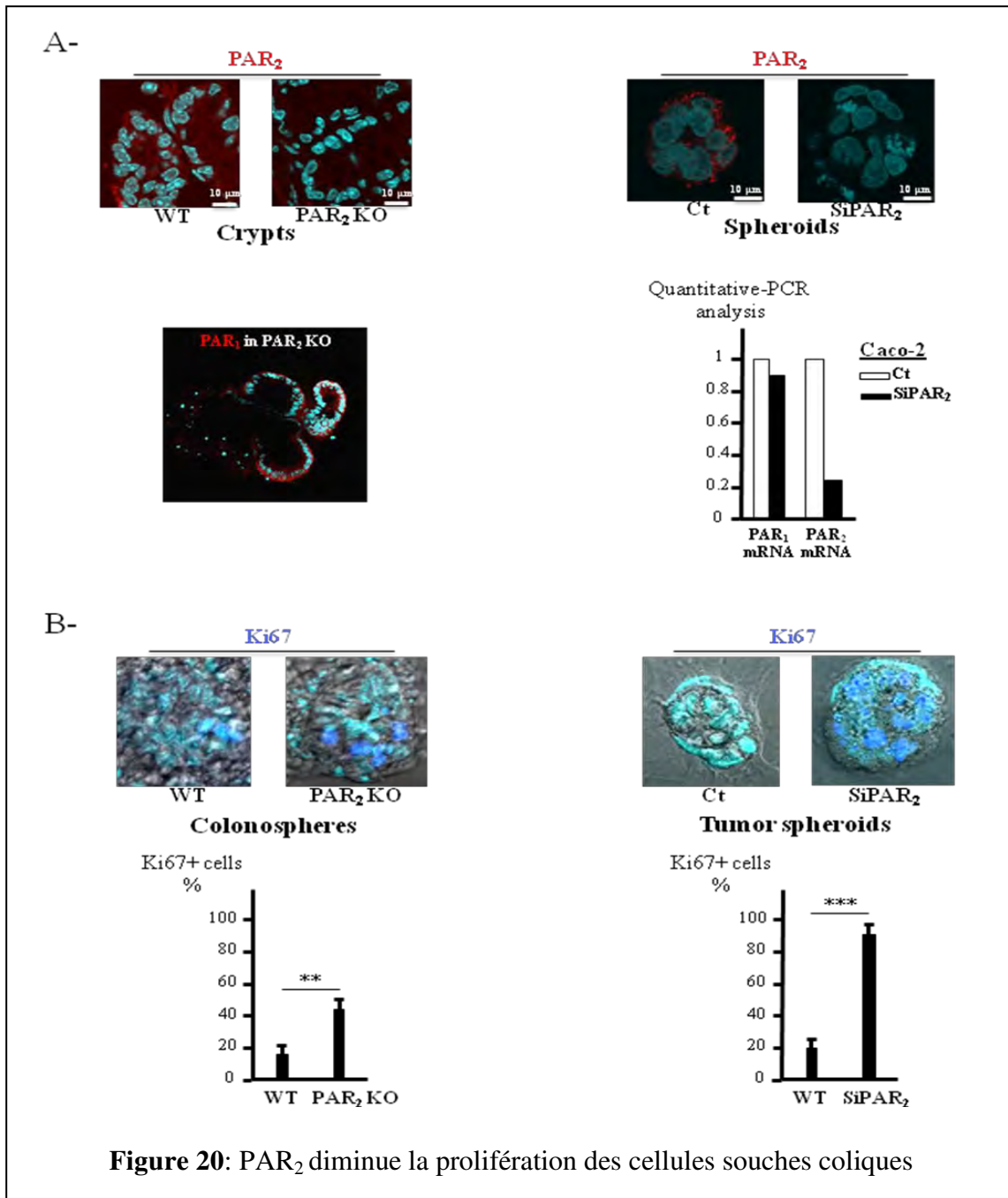
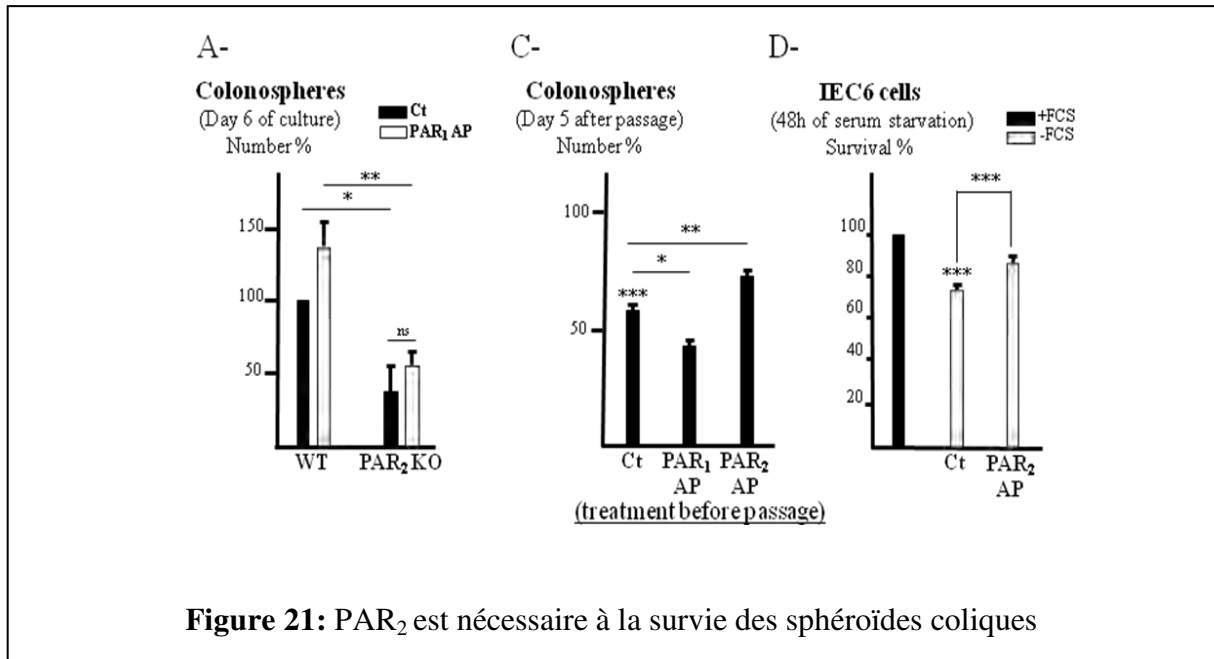


Figure 19: Croissance des sphéroïdes coliques sous stimulation de PAR₁ et de PAR₂.

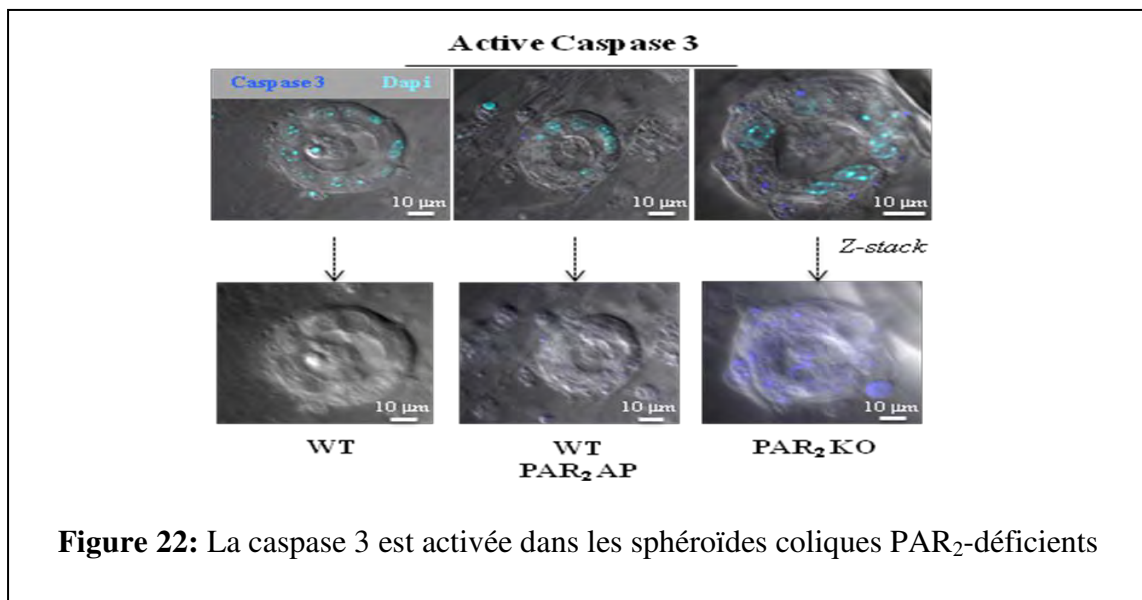
Ces données suggérant que PAR₂ puisse exercer un frein sur la prolifération des cellules souches coliques, nous avons cultivé des sphéroïdes à partir de colon murin KO pour PAR₂ ou de cellules Caco-2 traitées par un siRNA dirigé contre PAR₂. De façon concordante, nos résultats (**Figure 20**) montrent que le nombre de cellules exprimant le marqueur de prolifération Ki67 augmente dans les sphéroïdes déficients pour l'expression de PAR₂ comparativement aux contrôles.



Si PAR₂ inhibe la prolifération des cellules souches de la crypte, il semble qu'il soit indispensable à leur survie. En effet, le nombre de colonosphères diminue lorsque les cellules sont déficientes pour l'expression de PAR₂ et la stimulation par PAR₁ ne restaure pas le nombre des colonosphères, alors que la stimulation de PAR₂ protège les cellules épithéliales du stress de dé-adhésion lors du passage de la culture ou lors du stress de privation sérique (**Figure 21**).



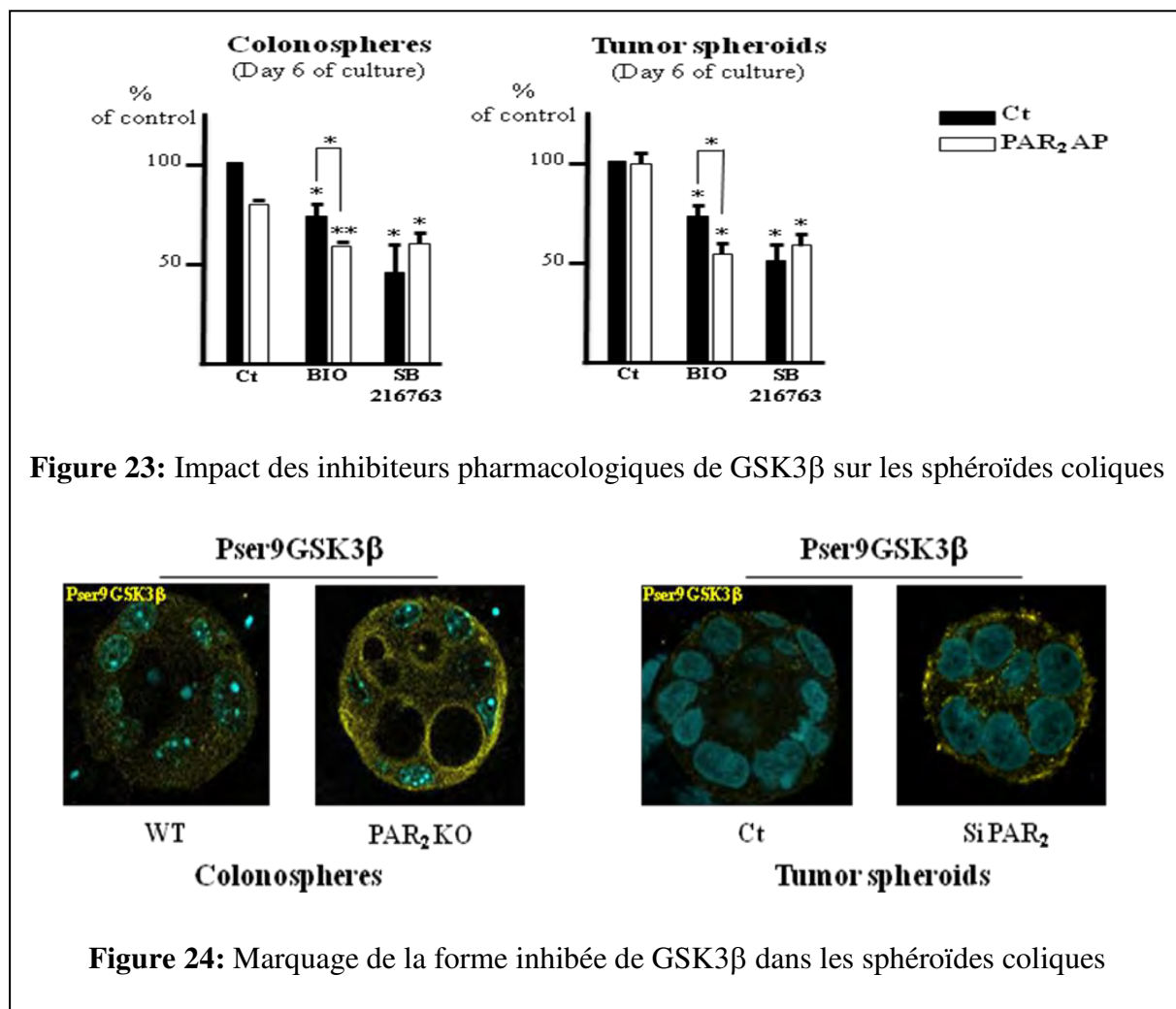
L'absence de PAR₂ entraîne l'apoptose des cellules épithéliales souches (**Figure 22**).



III-2- Mise en évidence d'une voie de survie cellulaire PAR₂/GSK3β

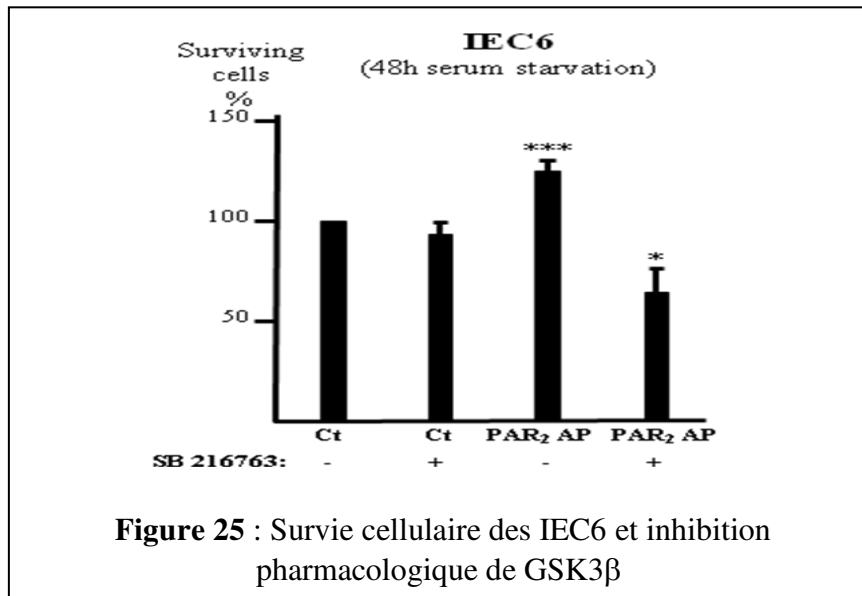
La GSK3β est une kinase qui joue un rôle important dans la survie cellulaire et qui freine la prolifération cellulaire. Il était donc intéressant d'explorer une éventuelle activation de cette kinase par PAR₂.

Nous avons incubé les sphéroïdes avec des inhibiteurs pharmacologiques de GSK3β (BIO et SB216763) et cela a induit une diminution du nombre de colonosphères et de sphéroïdes tumoraux en l'absence ou en présence de l'agoniste peptidique de PAR₂ (Figure 23). En accord avec ce résultat, nous avons observé une activation basale de GSK3β dans les sphéroïdes qui est inhibée lorsque l'expression de PAR₂ est éteinte (Figure 24). Ces résultats montrent que PAR₂ joue un rôle important dans la survie des cellules souches coliques normales ou tumorales via l'activation de GSK3β.

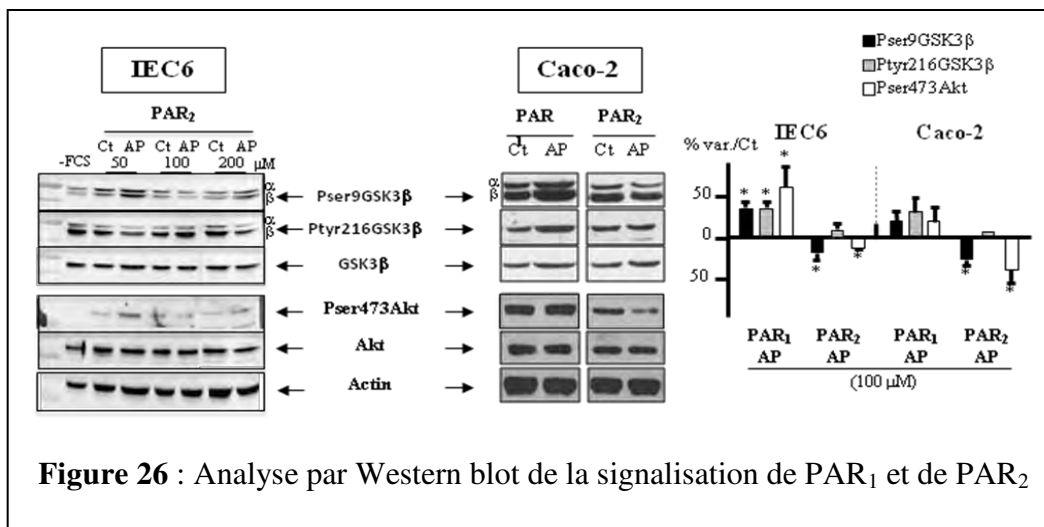


Nos résultats indiquant que PAR₂ contrôle l'activation de GSK3β dans les cellules immatures intestinales, nous avons voulu explorer les mécanismes qui sous-tendent cette voie. Cette investigation a été réalisée sur des lignées intestinales cultivées en 2D.

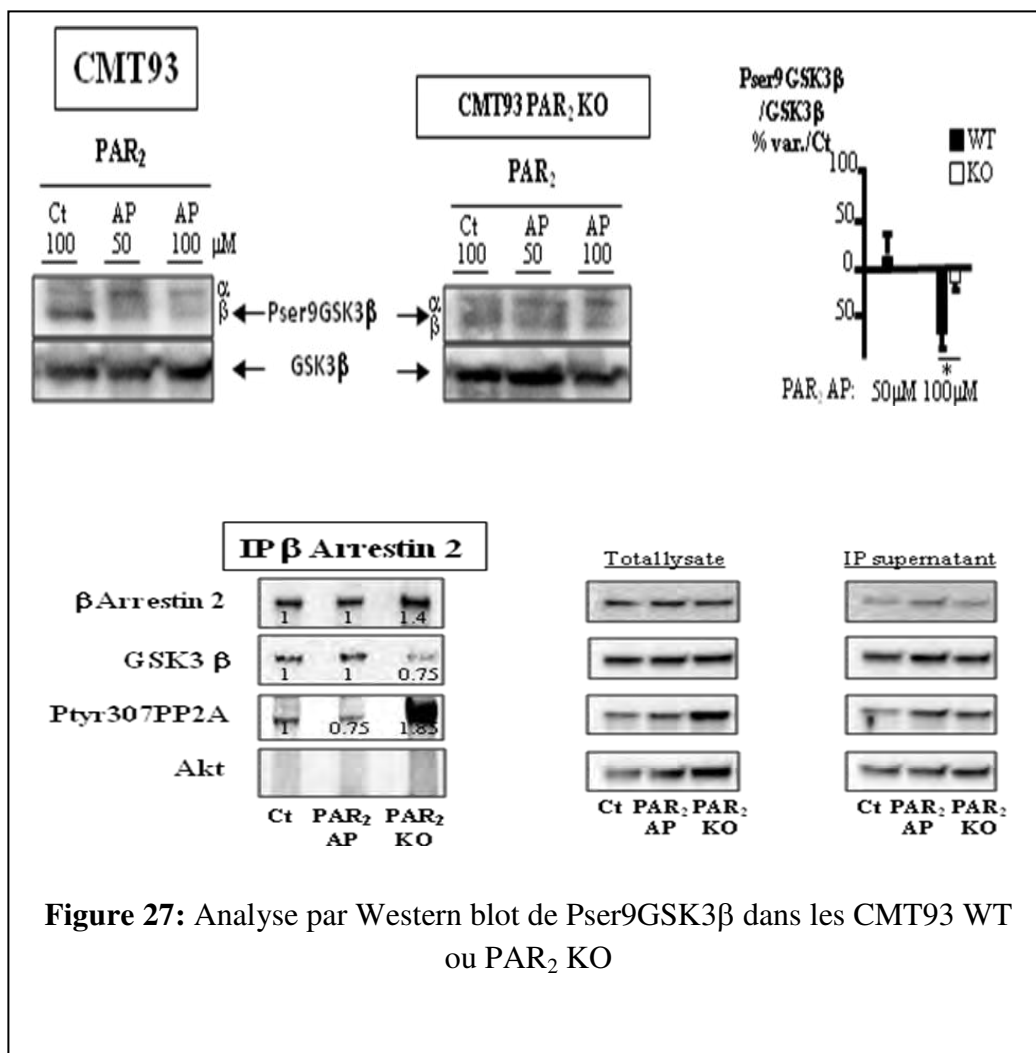
Dans un premier temps, nous avons vérifié que la voie PAR₂/GSK3β contrôlait la survie des cellules de la lignée non tumorale IEC6 cultivée en 2D (**Figure 25**).



Dans un second temps, nous avons étudié l'activation de la GSK3β dans les cellules IEC6 et Caco-2 en suivant les variations de la forme inhibée de GSK3β, Phospho-sérine 9 GSK3β. Comme attendu, PAR₁ et PAR₂ régulent de façon opposée la kinase (**Figure 26**). La forme active d'Akt (Pser473Akt), kinase responsable de la phosphorylation sur sérine 9 de GSK3β, varie de façon concordante.



Enfin, dans une lignée intestinale (CMT93) rendue déficiente pour l'expression de PAR₂, nous avons vérifié que PAR₂ était bien responsable de l'activation de GSK3β et nous avons mis en évidence un complexe de signalisation en aval de PAR₂ associant la protéine adaptatrice arrestin β2, la phosphatase PP2A activatrice de GSK3β, et GSK3β (**Figure 27**). Il est à noter que cette voie dépend de l'activité rho kinase, c'est à dire de l'organisation du cytosquelette dans la cellule épithéliale. En cas d'inhibition de la rho kinase, c'est la voie de signalisation opposée Akt, conjuguant survie et prolifération, qui est activée (**Figures 28 et 29**).



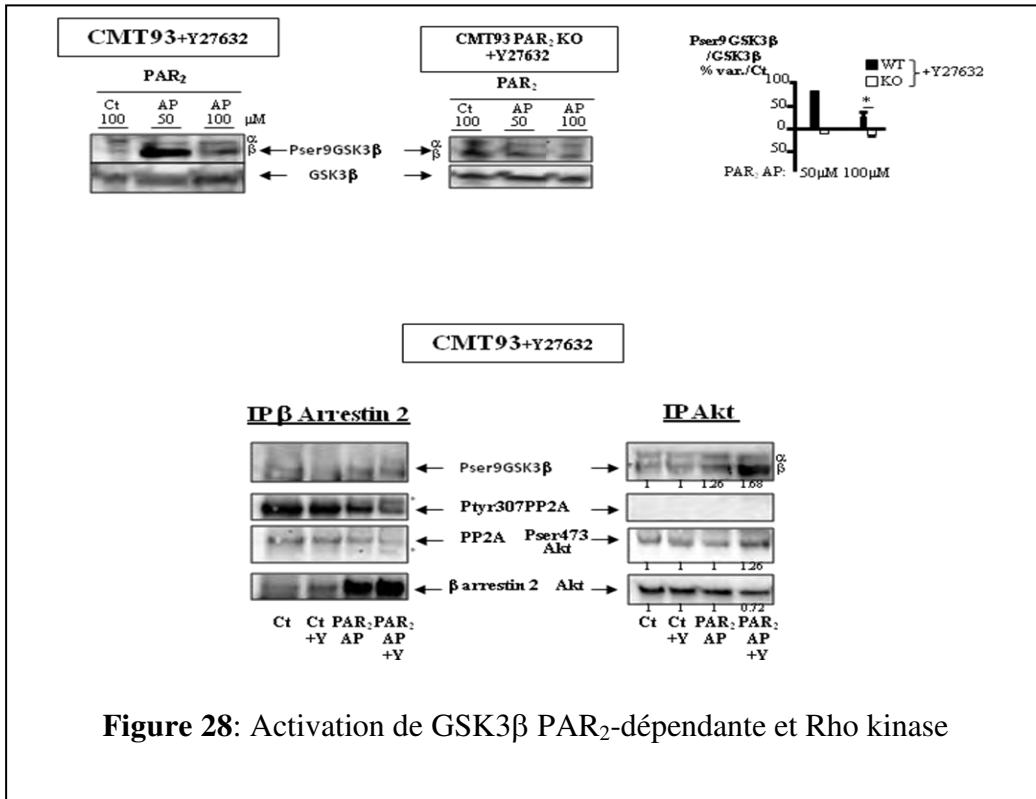


Figure 28: Activation de GSK3β PAR₂-dépendante et Rho kinase

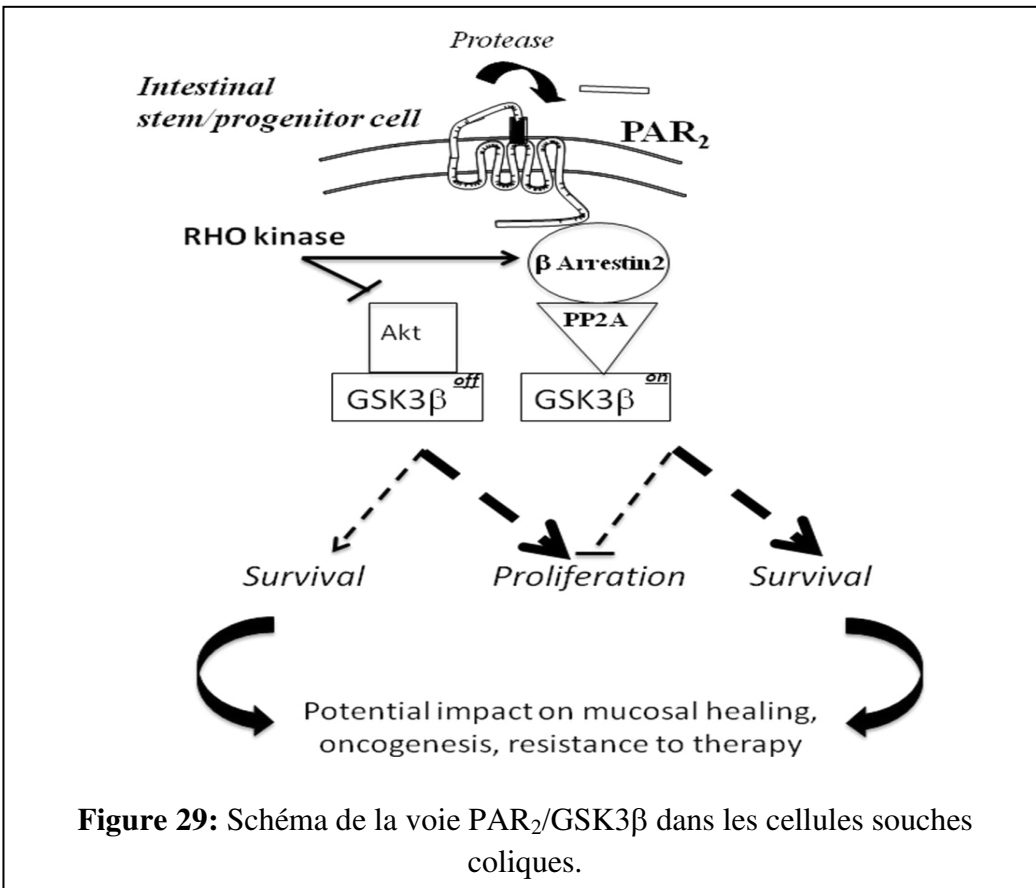


Figure 29: Schéma de la voie PAR₂/GSK3β dans les cellules souches coliques.

En conclusion, nous avons démontré que PAR₁ et PAR₂, deux récepteurs de protéases inflammatoires jouant un rôle majeur dans les pathologies digestives, sont exprimés dans les cellules souches coliques mais régulent de façon spécifique leurs fonctions de survie et de prolifération. En effet, si PAR₁ promeut la prolifération des cellules souches par une voie Akt, au contraire PAR₂ exerce un frein sur la prolifération tout en soutenant la survie cellulaire par une voie GSK3 β .

La cascade de signalisation PAR₂/arrestin β 2/PP2A/GSK3 β que nous avons révélée pourrait jouer un rôle majeur dans la survie des cellules souches en état de stress, c'est à dire en conditions inflammatoires ou cancéreuses. Elle représente donc une cible thérapeutique d'intérêt puisque son inhibition d'une part lèverait le blocage de la régénération tissulaire lors de l'inflammation et éradiquerait les cellules souches endommagées, et d'autre part, sensibiliserait les cellules souches cancéreuses à la chimiothérapie.

Donc nos expériences ont permis de mettre au point un nouveau modèle d'étude *in vitro* des cellules souches coliques inflammatoires ou cancéreuses, qui implique la voie de signalisation PAR₂/GSK3 β . De plus, il s'agit du premier travail démontrant un rôle des PARs dans la régulation des CSI. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans '*American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*' [74].

Cette première étude sur le rôle des PARs dans les cellules souches coliques ouvre de nombreuses perspectives d'investigations tant sur un plan fondamental que thérapeutique. Si la suractivation de GSK3 β dans le cancer colorectal et l'inflammation intestinale a été décrite à plusieurs reprises [75-77], notre travail place pour la première fois un récepteur, PAR₂, en amont de cette voie. Il reste à comprendre quelles sont les protéases qui activent PAR₂ dans les cellules souches coliques et s'il s'agit d'une spécificité fonctionnelle d'un pool de cellules souches. En effet, un type de cellule souche intestinale semble être particulièrement résistant au stress et représente une population de réserve [78,79]. Il serait donc intéressant de vérifier si PAR₂ joue son rôle protecteur vis-à-vis du stress dans ce sous-type de cellule souche.

Sur un plan thérapeutique, notre démonstration de l'existence de la voie PAR₂/GSK3β tant dans les cellules inflammatoires que cancéreuses coliques, suggère qu'elle puisse jouer un rôle clef dans la transition inflammation-cancer. Cette voie serait donc à cibler dans les stratégies de chimioprévention du cancer colorectal.

Etant donné le rôle majeur joué par les PARs et GSK3β en physiopathologie, nous avons utilisé ce modèle pour rechercher par bioguidage des produits naturels capables de cibler la voie de survie GSK3β dépendante de PAR₂, à partir des extraits méthanoliques de *D. simplex* et *D. harra* dont nous avons montré dans la première partie de nos résultats la richesse en composés potentiellement bioactifs.

IV- PURIFICATION BIOGUIDEE DES COMPOSES DE *D. HARRA* ET CIBLAGE DES CELLULES SOUCHES COLIQUES PATHOLOGIQUES

IV-1- Fractionnement de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra* (NI10)

Après avoir mis en évidence la richesse en composés potentiellement bioactifs de *Diplotaxis sp.* et l'importance de la voie PAR₂/GSK3β dans la survie des CSI, il nous a semblé important de cibler cette voie afin d'éradiquer les cellules souches coliques pathologiques.

L'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra*, riche en flavonoïdes, et donc potentiellement modulateur de GSK3β selon les résultats antérieurs de l'équipe, a été purifié par bioguidage en s'appuyant sur le modèle de signalisation inflammatoire PAR₂/GSK3β que nous avons révélé.

Les étapes de purification de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra* (NI10) sont récapitulées dans l'organigramme suivant:

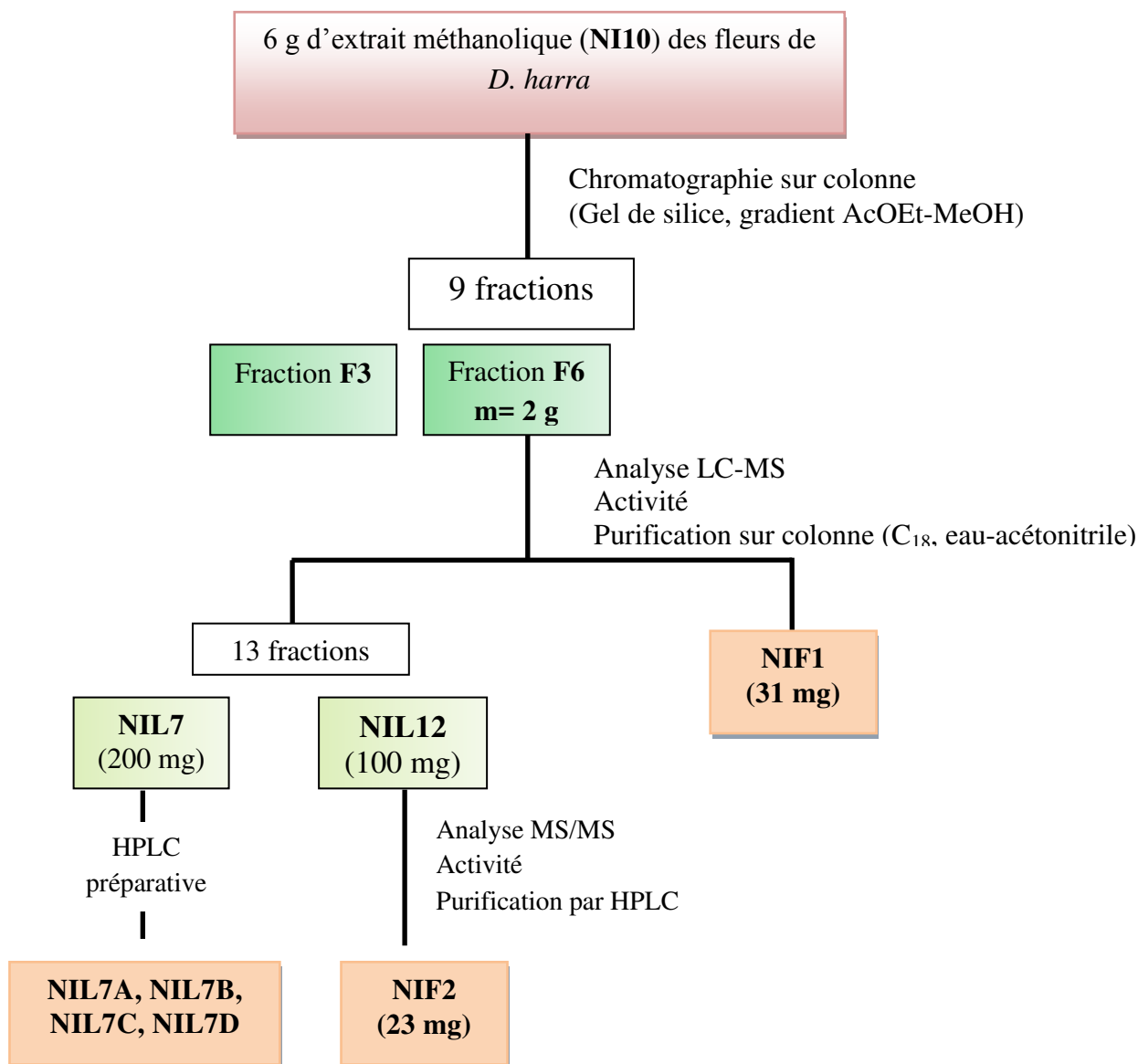


Figure 30: Purification bioguidée des produits de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra*

IV-1-1- Activité inhibitrice de GSK3 β de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra*

Le travail antérieur de nos deux équipes d'accueil ayant démontré l'activité inhibitrice de glucoflavonoïdes naturels sur GSK3 β [56], nous avons choisi *Diplotaxis sp.* réputée riche en composés flavonoïdiques [24] afin de rechercher d'autres composés actifs sur GSK3 β .

Nous avons testé les extraits méthanoliques des feuilles, fleurs et racines de *D. harra* et *D. simplex* sur la lignée normale intestinale IEC6 stimulée par des peptides agonistes de PAR₂. Seuls les résultats obtenus avec les extraits de *D. harra* sont montrés ici car ils se sont révélés plus actifs sur la modulation de GSK3β.

D'après la **Figure 31**, l'expression de la forme inhibée de GSK3β (Pser9GSK3β) est particulièrement augmentée après traitement par l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra* par rapport au contrôle. Donc l'activité de l'extrait des fleurs capable d'inhiber GSK3β et cette activité pourrait être corrélée à la teneur élevée en flavonoïdes dans les fleurs [23].

Nous avons donc choisi de poursuivre le fractionnement de cet extrait.

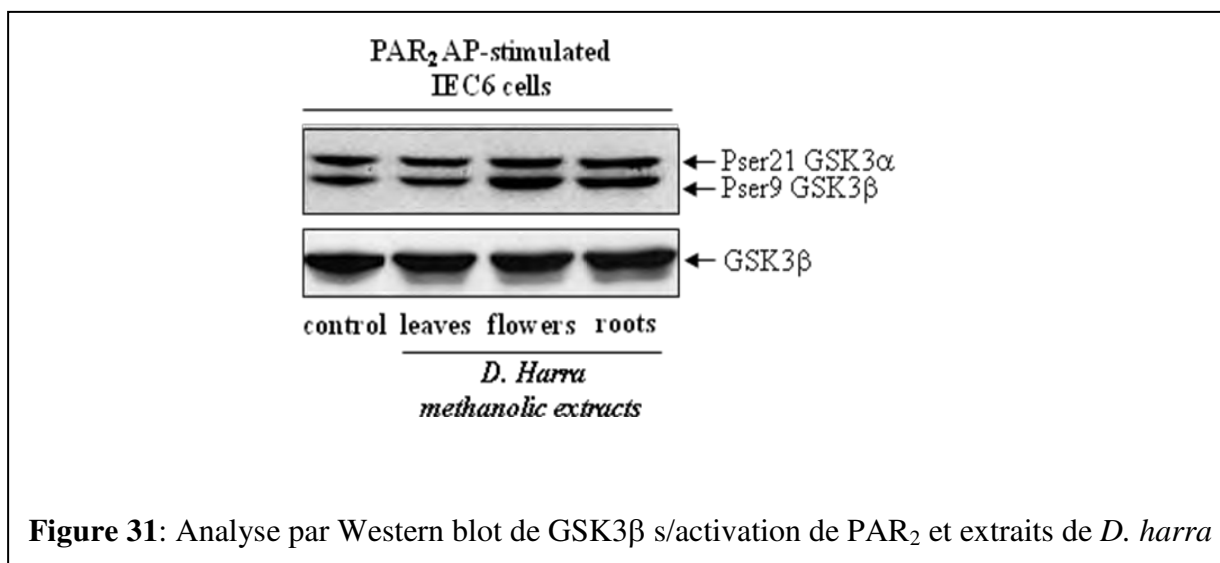


Figure 31: Analyse par Western blot de GSK3β s/activation de PAR₂ et extraits de *D. harra*

IV-1-2- Analyse LC-MS/MS et activité biologique de la fraction F6

Le fractionnement de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra* a été effectué sur colonne de silice et les fractions F3 et F6 ont été collectées selon leur richesse en flavonoïdes suggérée par la CCM.

Comme montré dans la **Figure 32**, la fraction F6 empêche l'activation par déphosphorylation de GSK3β sous stimulation par PAR₂ mais ce n'est pas le cas pour la fraction F3.

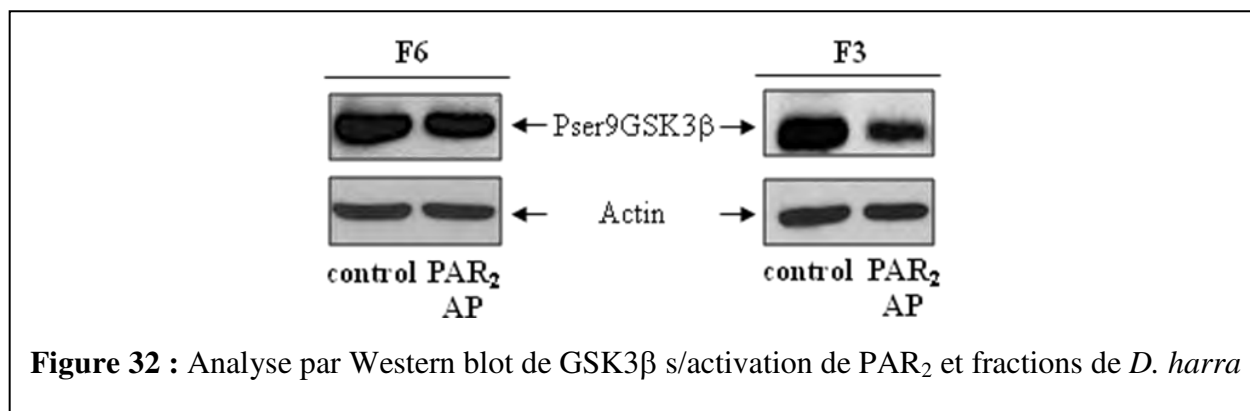


Figure 32 : Analyse par Western blot de GSK3β s/activation de PAR₂ et fractions de *D. harra*

Ce résultat suggère qu'un mélange de flavonoïdes présents dans la fraction F6 est capable d'inhiber GSK3β. De plus, cette inhibition dépendrait de l'activité PKC, une kinase modulatrice de GSK3β, comme montré dans la **Figure 33** :

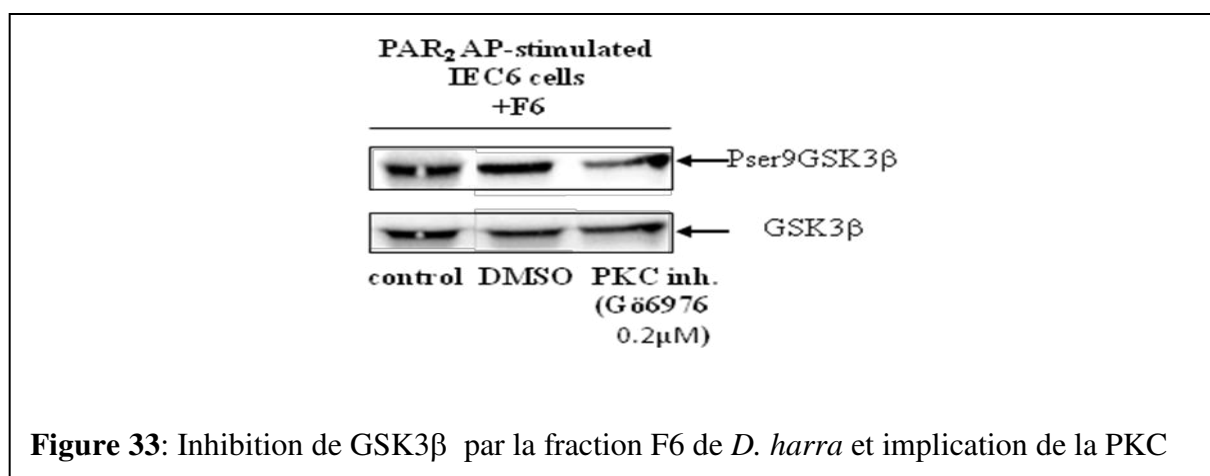
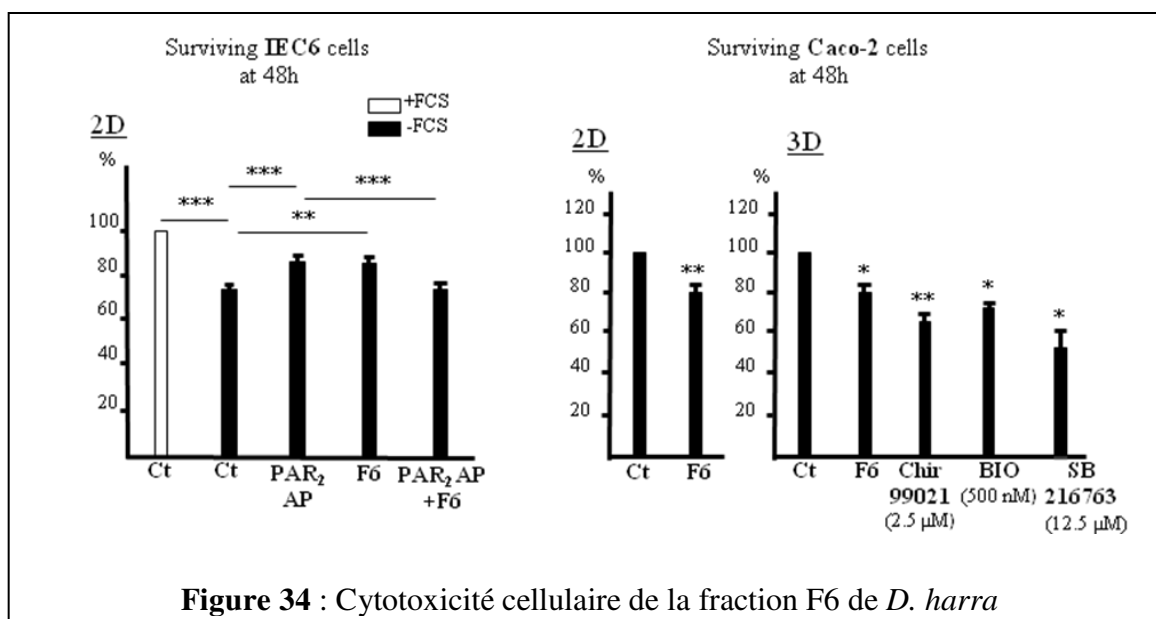


Figure 33: Inhibition de GSK3β par la fraction F6 de *D. harra* et implication de la PKC

Enfin, la fraction F6 favorise la survie des cellules IEC6 à l'état basal mais est cytotoxique en condition inflammatoire (stimulation PAR₂) et pour les cellules cancéreuses Caco-2 (**Figure 34**). A noter, cette fraction est également cytotoxique pour les sphéroïdes Caco-2 en culture 3D, comme le sont les inhibiteurs de GSK3β (CHIR99021, BIO et SB216763).



Russo et al. ont montré que l'activation de PKC induit la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose [80]. Dans nos expériences, les flavonoïdes de *D. harra* activeraient la PKC qui inhiberait GSK3 β , ce qui pourrait expliquer leur activité cytotoxique vis à vis des cellules inflammatoires ou cancéreuses. D'autres travaux, dans les cellules cancéreuses colorectales, ont montré que l'inhibition de GSK3 β dépendante de la voie PKC est corrélée à une prolifération cellulaire [81]. Ainsi, il est possible que l'effet cytotoxique des flavonoïdes soit corrélé à une perte de quiescence des cellules souches inflammatoires ou cancéreuses. De façon importante, les cellules immatures non inflammatoires ou cancéreuses sont épargnées par ce traitement.

L'analyse de la composition chimique de la fraction F6 a été ensuite réalisée par LC-UV-MS/MS en mode négatif. La Figure 35 présente le profil du spectre UV à 260 nm et le courant ionique total de la fraction F6 :

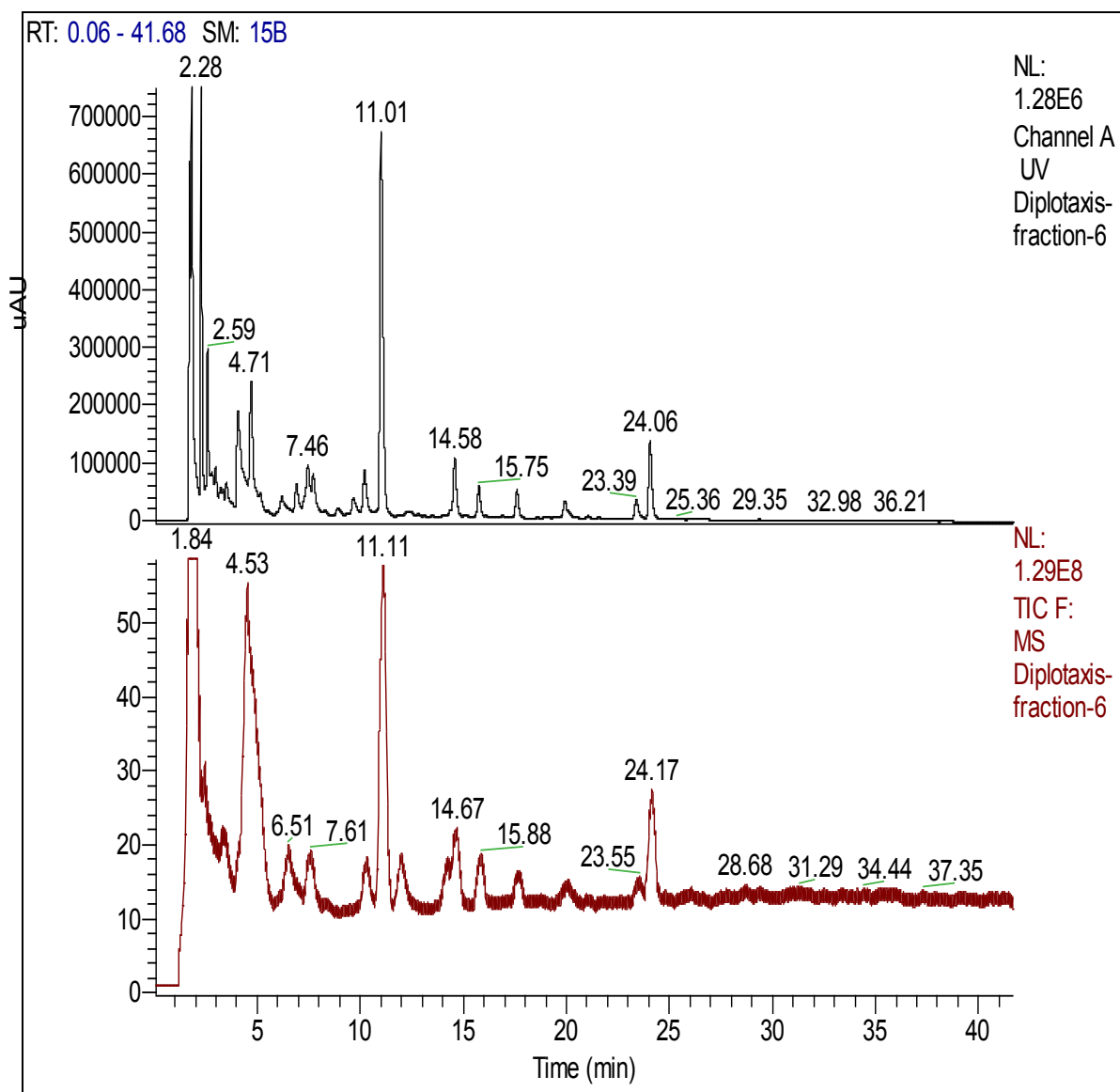


Figure 35: Spectre UV à 260 nm (haut) et le courant ionique total (bas) de la fraction F6 de *D. harra*

Des glucoflavonoïdes sortent à partir de 7,5 min, et c'est au total 8 flavonoïdes glycosylés qui ont pu être détectés dans cette fraction aux Tr 7,6 min, Tr 10,2 min, Tr 11,1 min, Tr 14,6 min, Tr 15,8 min, Tr 17,7 min, Tr 23,4 min et Tr 24,1 min.

Les spectres MS et MS² en mode négatif des 8 ions moléculaire sont présentés ci-dessous:

✓ Tr 7,6 min

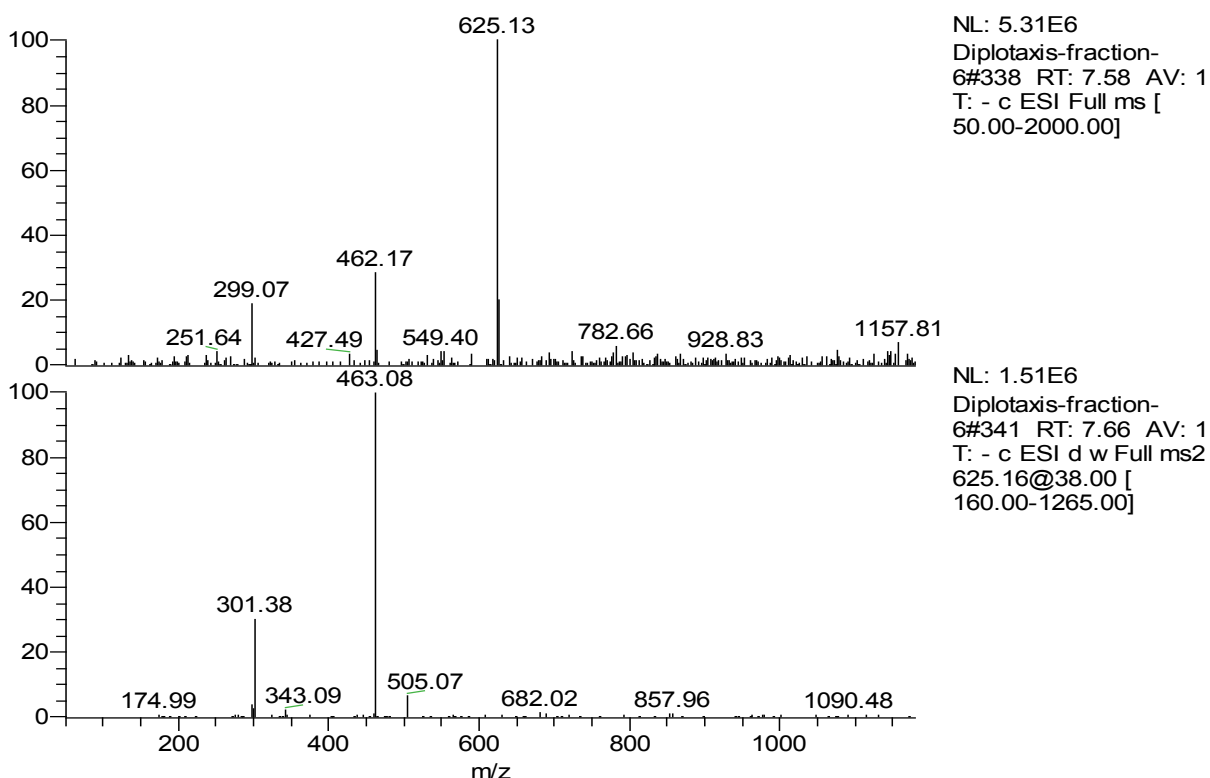
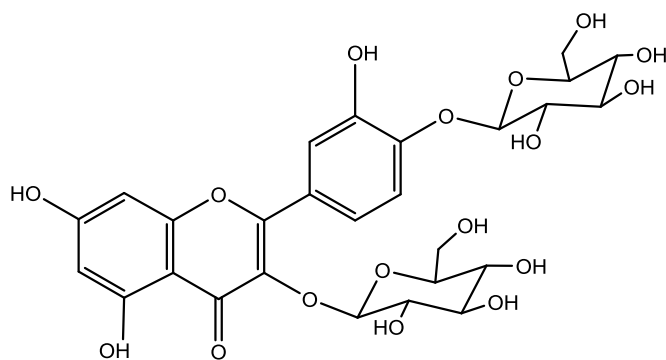


Figure 36: Spectres MS et MS² (625) de la quercétine-3,4'-di-*O*-glucoside.

La masse de ce composé est de 626 g/mol déduite à partir de l'ion quasimoléculaire m/z 625 [M-H]⁻. Le spectre MS² présente un ion majoritaire à m/z 463 [M-H-162]⁻ et un autre ion à m/z 301 [M-H-324]⁻. Ceci est caractéristique d'une génine quercétol substituée par 2 sucres à 2 endroits différents de la génine [82]. Donc ce composé pourrait être la quercétine-3,4'-di-*O*-glucoside qui a été déjà décrit dans *Diplotaxis*:



Quercétine-3,4'-di-*O*-glucoside

✓ Tr 10,2 min

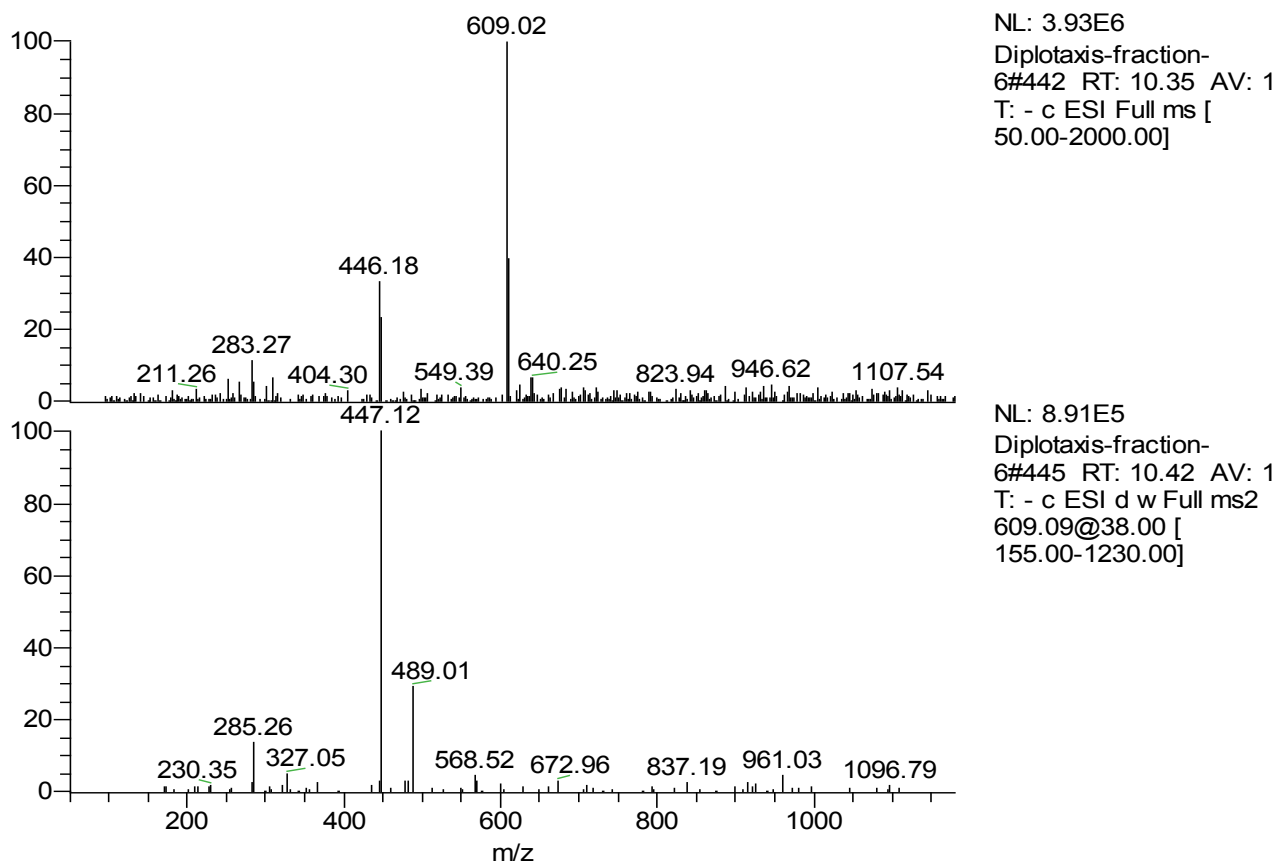
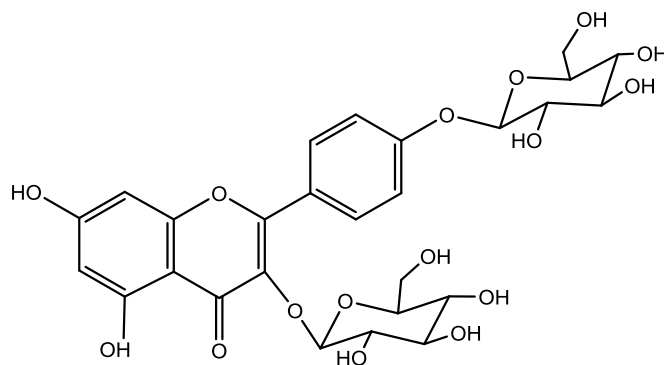


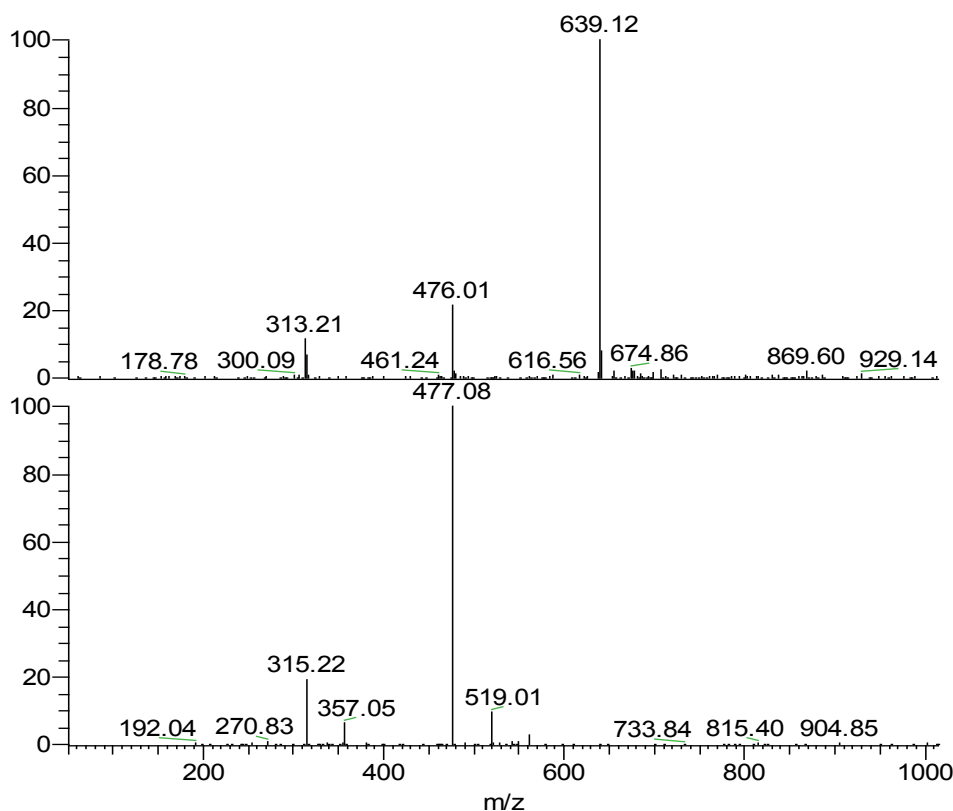
Figure 37: Spectres MS et MS² (609) de kaempférol-3,4'-di-*O*-glucoside

m/z 609 [M-H]⁻ correspond à un composé de masse 610 g/mol. Son spectre MS² montre la présence de deux ions fils, le premier ion obtenu à m/z 447 correspond suite à la perte de 162 uma (perte de glucose) et le second ion à m/z 285 correspond à une génine kaempférol. Par comparaison à la littérature [82] ce composé correspond à une génine kaempférol substituée par 2 glucoses en deux endroits différents. Ce composé a été identifié au kaempférol-3,4'-di-*O*-glucoside.



Kaempférol-3,4'-di-O-glucoside

✓ Tr 11,1 min



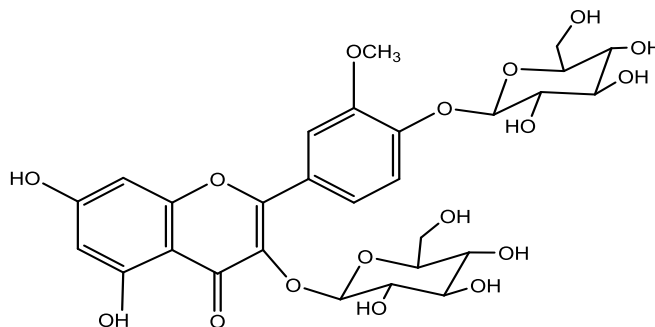
NL: 4.89E7
 Diplotaxis-fraction-6#470 RT: 11.08 AV: 1
 T: - c ESI Full ms [50.00-2000.00]

NL: 2.28E7
 Diplotaxis-fraction-6#471 RT: 11.11 AV: 1
 T: - c ESI d w Full ms2 639.12@38.00 [165.00-1290.00]

Figure 38: Spectres MS et MS² (639) de l'isorhamnétine-3,4'-di-O-glucoside

La masse de ce composé est de 640 g/mol déduite à partir de l'ion de m/z 639 [M-H]⁻. Le spectre MS² présente un ion majoritaire à m/z 477, ce fragment correspond à la perte de 162 uma (perte de glucose) et un autre ion à m/z 315 correspond à une génine isorhamnétine et à la perte de diglucoside. Ceci est caractéristique d'une génine

isorhamnétine substituée par 2 sucres à 2 endroits différents de la génine. Par comparaison à la littérature [83], ce composé a été identifié à l'isorhamnétine-3,4'-di-O-glucoside :



isorhamnétine-3,4'-di-O-glucoside

✓ Tr 14,6 min

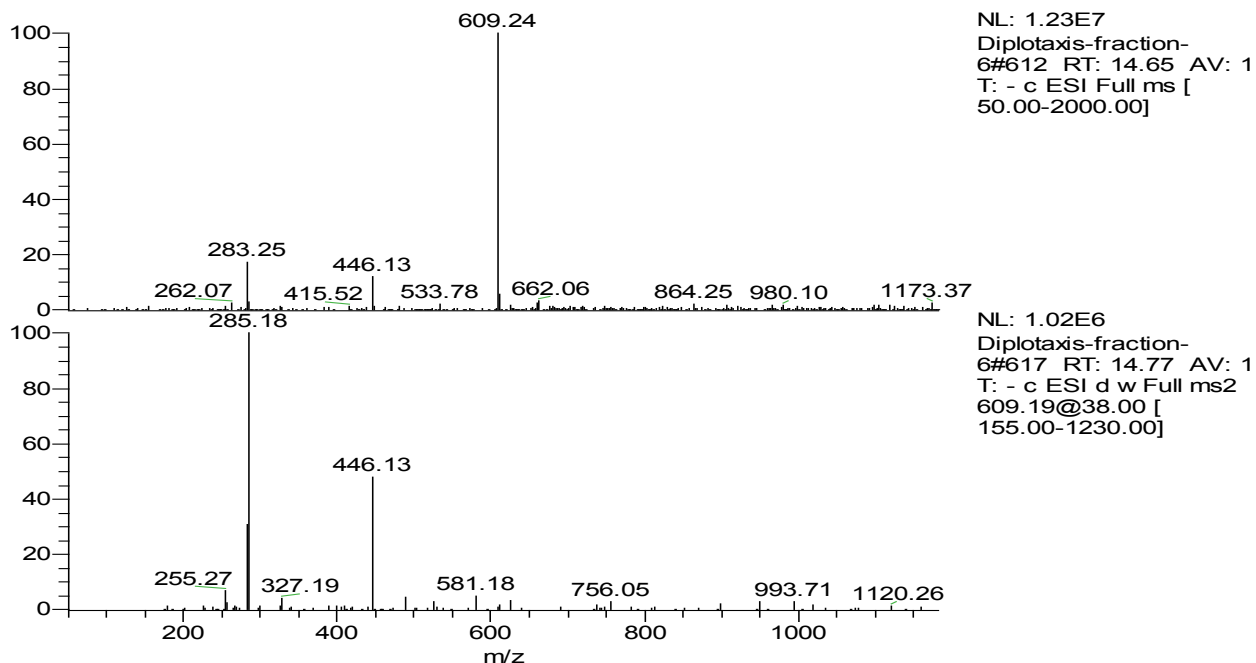
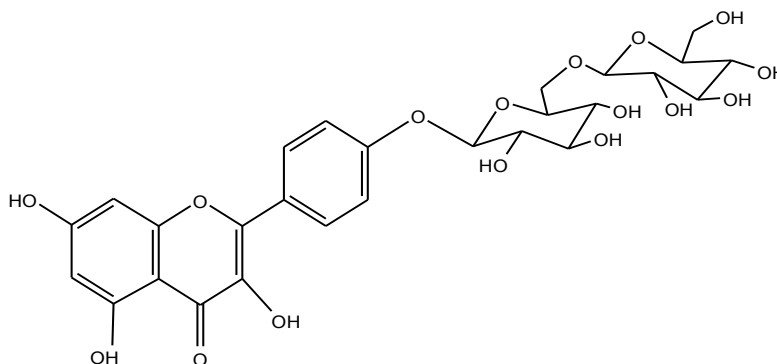


Figure 39: Spectres MS et MS² (609) du kaempférol-4'-O-gentiobioside

La masse de ce composé est de 610 g/mol déduite à partir de l'ion m/z 609 [M-H]⁻. Le spectre MS² présente un ion majoritaire à m/z 285 [M-H-324]⁻ correspond à la génine kaempférol et qui correspond à la perte de deux glucoses. Le fait d'avoir en MS² l'ion de

la génine à 100% signifie qu'elle est substituée par un diglucoside sur un seul OH [82].
Donc ce composé a été identifié au kaempférol-4'-*O*-gentiobioside:



kaempférol-4'-*O*-gentiobioside

✓ Tr 15,8 min

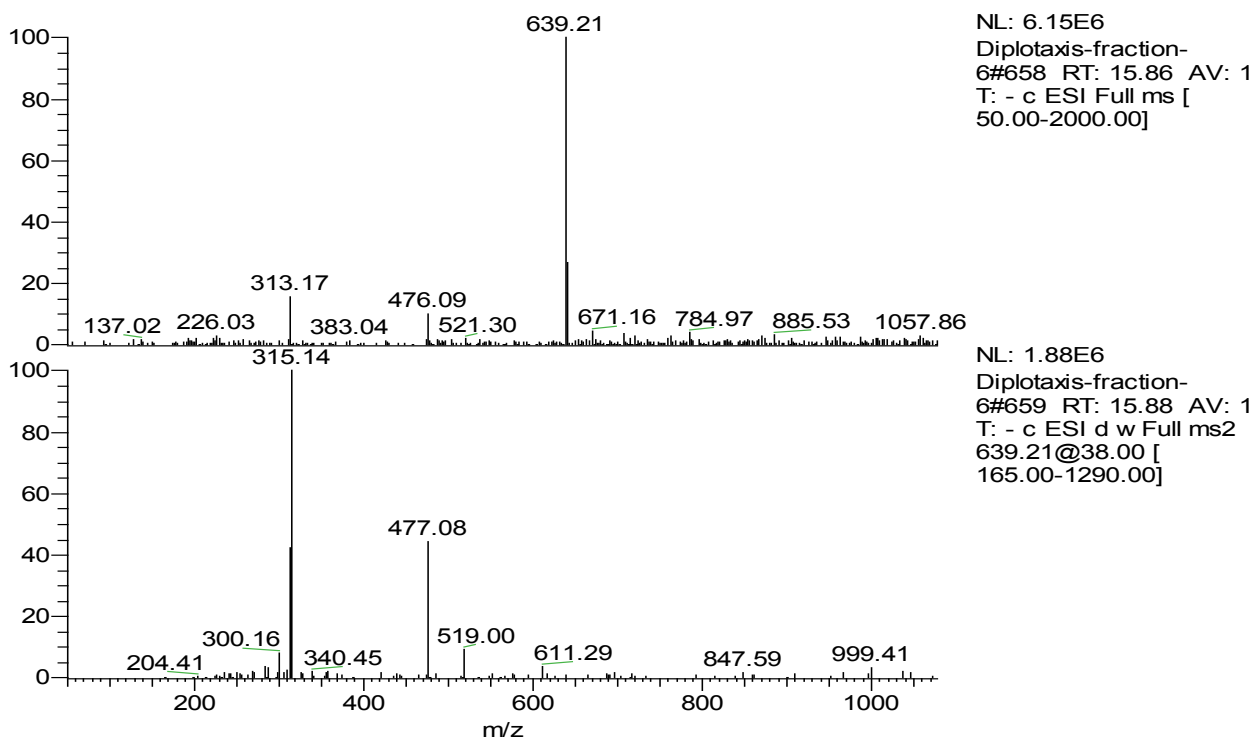
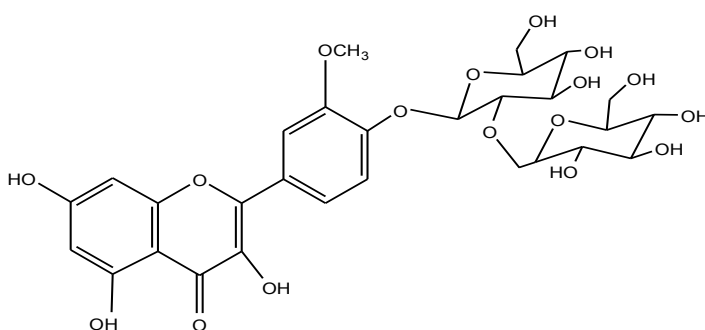


Figure 40: Spectres MS et MS² (639) de l'isorhamnétine-4'-*O*-sophoroside

La masse de ce composé est de 640 g/mol déduite à partir de l'ion m/z 639 $[M-H]^-$. Le spectre MS^2 présente un ion majoritaire à m/z 315 $[M-H-324]^-$ qui correspond à la génine isorhamnétine et qui correspond à la perte de deux glucoses. D'après Truchado et al [83], le fait d'avoir la génine correspondant à un ion de m/z 315 (et non 314) signifie que le glucose n'est pas substitué en 3. La présence d'un ion à m/z 477 $[M-H-162]^-$ à une abondance environ 45% montre que la génine est substitué par deux glucoses liés en 1→2 [82]. Ce composé a été identifié à l'isorhamnétine-4'-*O*-sophoroside:



isorhamnétine-4'-*O*-sophoroside

✓ Tr 17,7 min

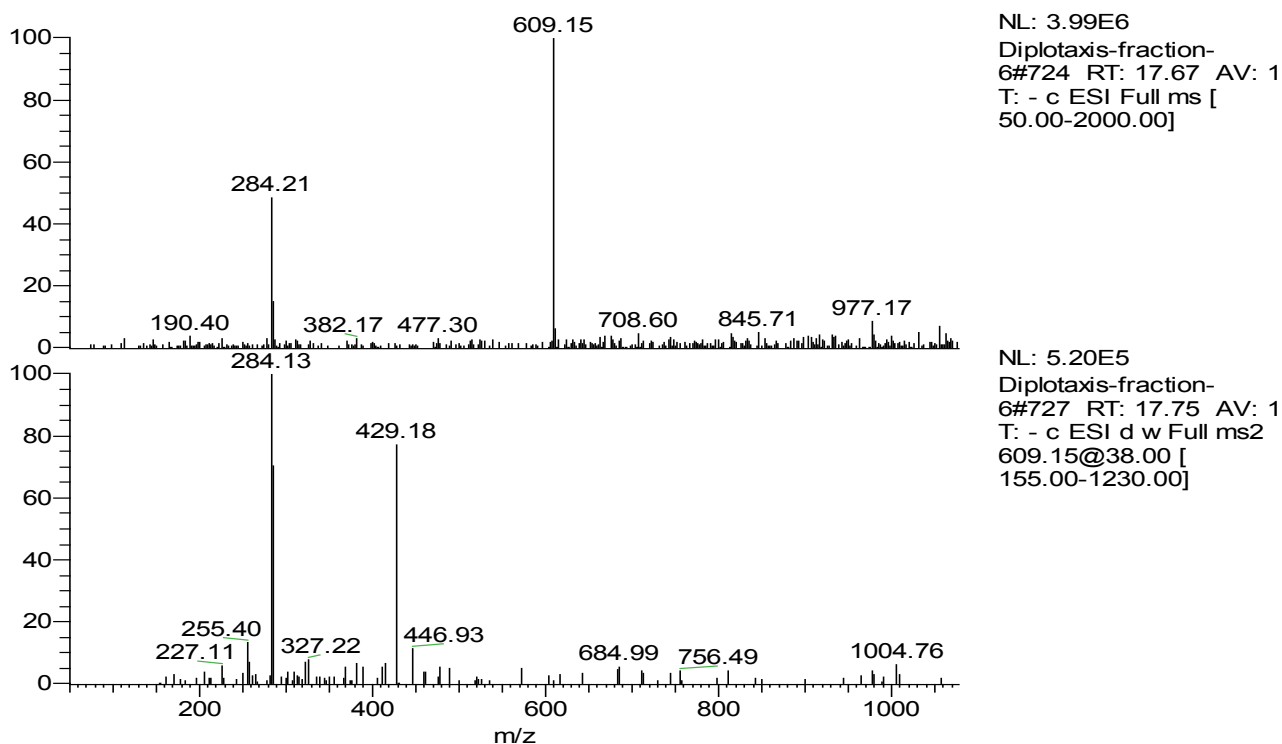
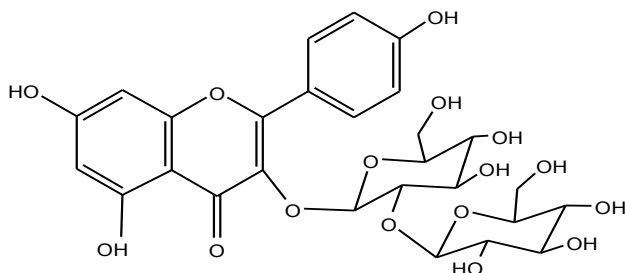


Figure 41: Spectres MS et MS² (609) du kaempférol-4'-O-sophoroside

Il s'agit d'un isomère du pic de Tr 14,6 min de masse 610 g/mol. Son spectre MS² présente deux ions moléculaires à m/z 284 [M-H-324]⁻ et à m/z 429 [M-H-180]⁻ différents du composé présenté à Tr 14,6 min à génine kaempférol substitué sur un seul OH par un diglucoside, les 2 sucres doit donc être liés en 1→2 [82]. Ce composé a été identifié au kaempférol-4'-O- sophoroside:



Kaempférol-4'-O-sophoroside

✓ Tr 23,4 min

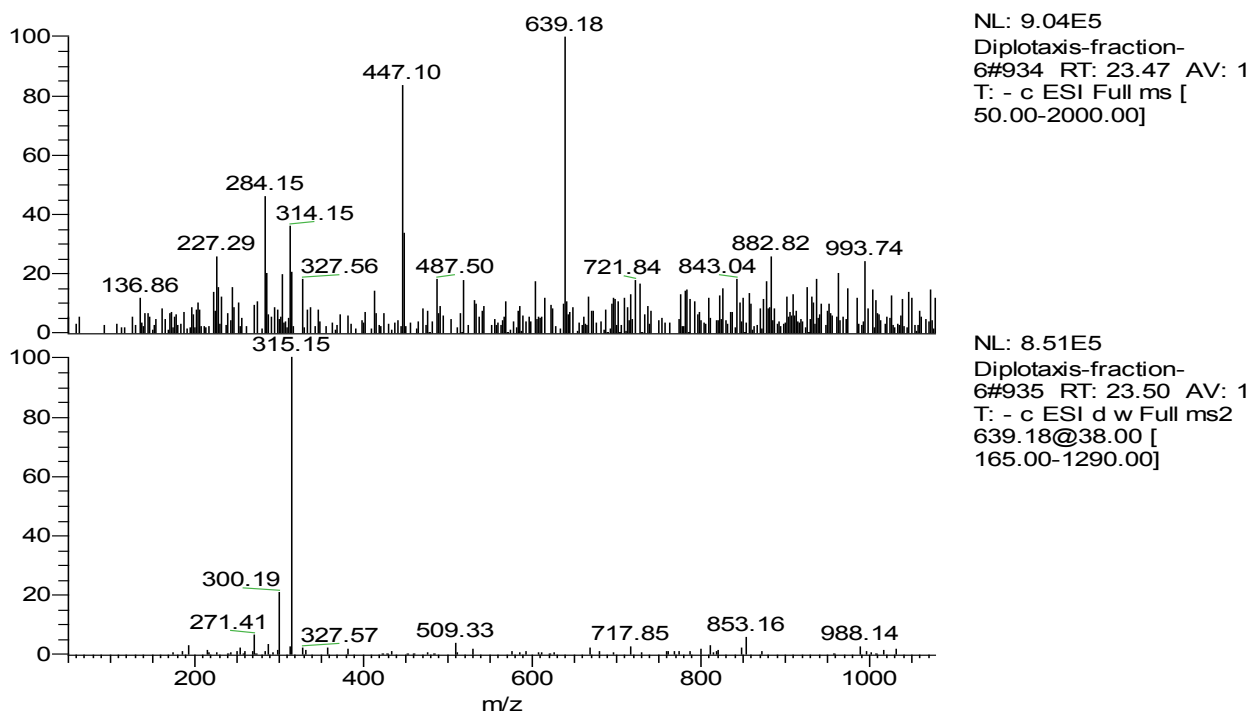
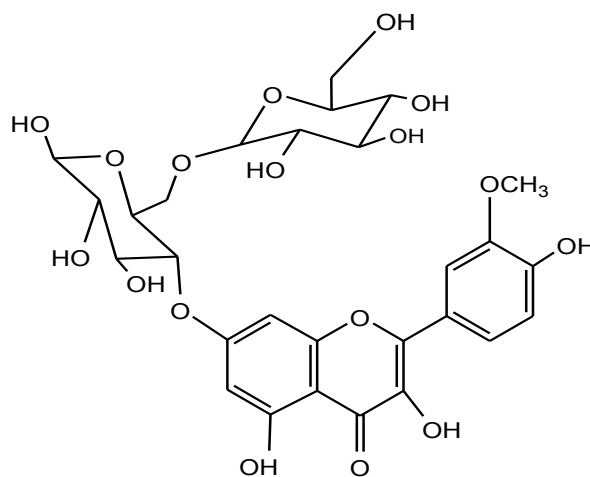


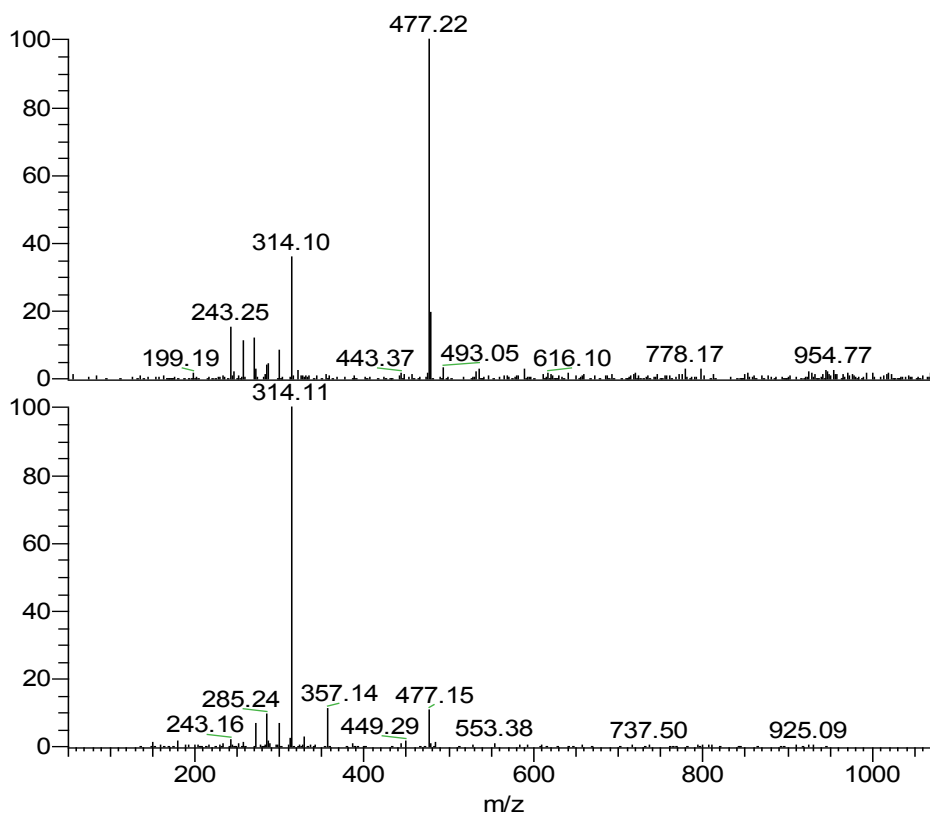
Figure 42: Spectres MS et MS² (639) de l'isorhamnétine-7-O-gentiobioside

Ce composé est un isomère du produit détecté à Tr 15,8 min mais à une fragmentation différente donc l'enchaînement des deux sucres doit être différent du composé précédent. D'après Ferreres et *al* [82] la génine est substitué par deux glucoses liés en 1→6. Ce composé a été identifié à l'isorhamnétine-7-O-gentiobioside :



Isorhamnétine-7-O- Gentiobioside

✓ Tr 24,1 min

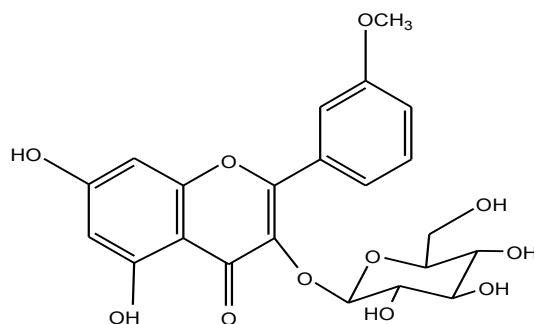


NL: 1.03E7
 Diplotaxis-fraction-
 6#960 RT: 24.14 AV: 1
 T: - c ESI Full ms [
 50.00-2000.00]

NL: 1.00E7
 Diplotaxis-fraction-
 6#961 RT: 24.17 AV: 1
 T: - c ESI d w Full ms2
 477.22@38.00 [
 120.00-965.00]

Figure 43: Spectres MS et MS² (477) de l'isorhamnétine-3-O-glucoside

La masse de ce composé est de 478 g/mol déduite à partir de l'ion m/z 477 $[M-H]^-$. Le spectre MS^2 présente un ion majoritaire à m/z 314 signifie que la génine est une isorhamnétine substituée par un sucre en position 3 [83]. Ce composé a été identifié à l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside :



Isorhamnétine-3-*O*-Glucoside

L'analyse LC-MS/MS a donc permis d'identifier 8 glucoflavonoïdes à génine quercétine, kaempférol et isorhamnétine qui ont pu être détectés dans la fraction F6. Il reste à préciser l'enchaînement des sucres sur la génine.

IV-1-3- Analyse MS-MS et activité biologique des deux fractions NIL7 et NIL12

La purification de la fraction F6 a été poursuivie par fractionnement sur une colonne de silice greffée C_{18} en utilisant un gradient de solvants de polarités décroissantes allant de 100% eau jusqu'à 100% acétonitrile. Ceci a permis d'obtenir 13 fractions, parmi lesquelles les fractions NIL7 et NIL12 ont été retenues pour leur richesse en flavonoïdes après analyse CCM.

Les deux fractions NIL7 et NIL12 ont été analysées par MS en mode négatif.

Le spectre MS de la fraction NIL7 (**Figure 44**) présente quatre principaux pics à m/z 639, à m/z 625, à m/z 609 et à m/z 477. Alors que le spectre de masse de NIL12 montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire majoritaire à m/z 639.

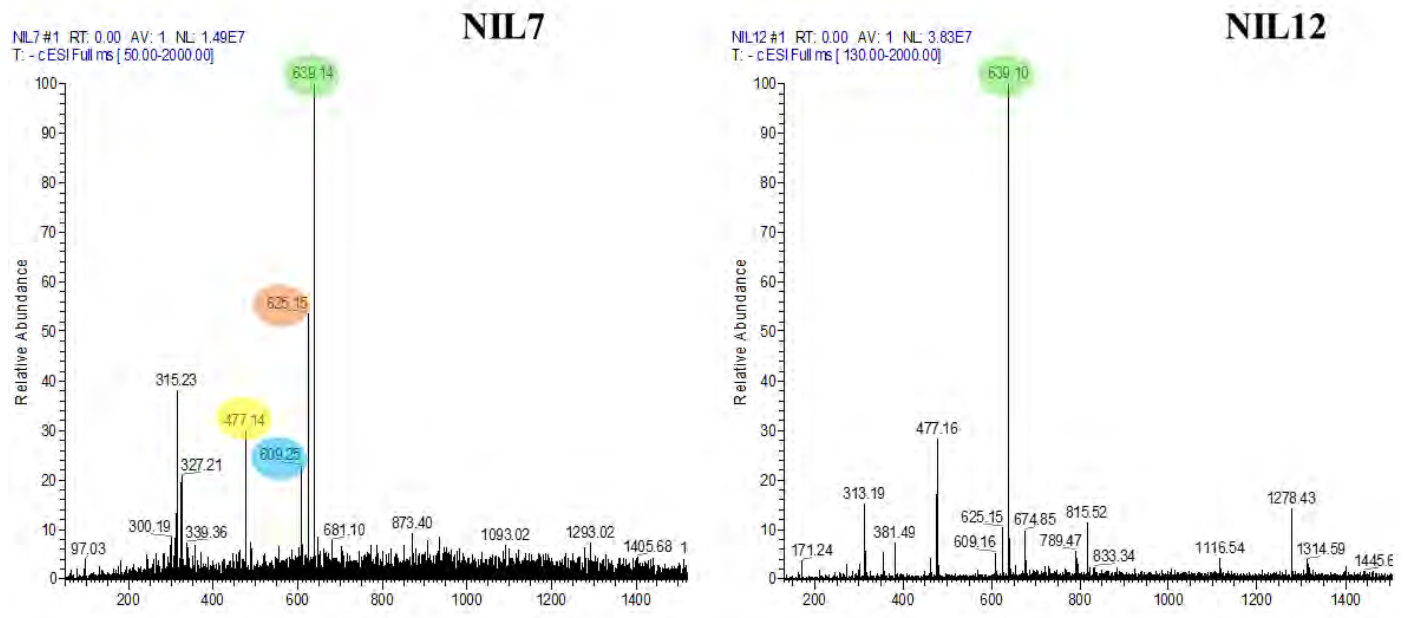


Figure 44: Spectres de masse des fractions NIL7 et NIL12

La Fraction NIL12 (Figure 45) n'est pas toxique pour les cellules IEC6 en conditions basales mais elle le devient pour les cellules cancéreuses Caco-2 en culture 3D mais ce n'est pas le cas pour la fraction NIL7 (non montré).

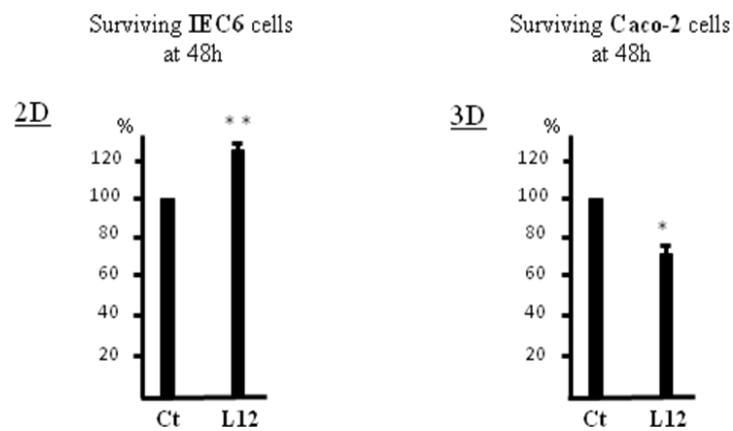


Figure 45: Cytotoxicité cellulaire de la fraction L12 de *D. harra*

IV-1-4- Purification et activité biologique de l'isorhamnétine-3,7-di-O-glucoside

L'activité biologique de NIL12 nous a incités à poursuivre sa purification par HPLC semi-préparative selon un gradient d'élution exécuté à partir d'acétonitrile. L'élution a été contrôlée par détection UV à 254 nm et 355 nm et les fractions recueillies ont été analysés par UPLC analytique. Un seul produit nommé NIF2 a été isolé à partir de cette fraction au $T_r = 3,89$ min dans un mélange de solvant H₂O-ACN (80-20: v-v).

Ce produit a été isolé sous forme de poudre jaune, de masse 23 mg avec une pureté de 95%. Son spectre ESI-MS en mode négatif (**Figure 46**) montre un pic d'ion déprotoné à $m/z = 639,05$ qui correspond à une isorhamnétine substituée par 2 glucoses.

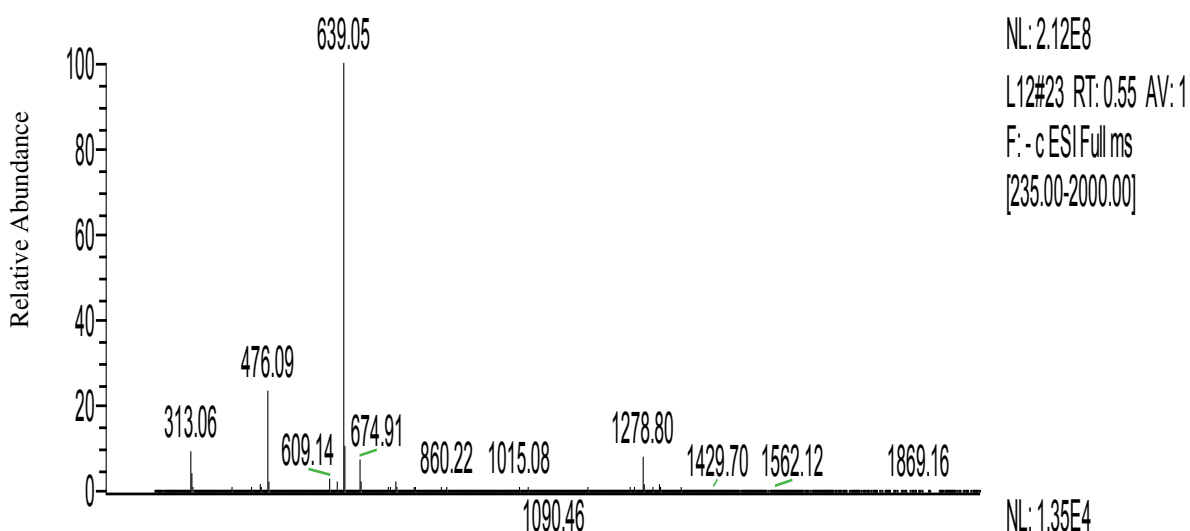


Figure 46: Spectre MS du produit NIF2.

Son spectre de RMN du ¹H à 400 MHz réalisé dans le DMSO-d₆ (**Figure 47**) montre la présence des signaux suivants :

- un m entre 3,1-3,7 ppm relatif aux protons de la partie sucre.
- un s (3H) à $\delta = 3,8$ ppm relatif au groupement OCH₃ en C-3' de l'isorhamnétine.
- deux doublets à $\delta = 5,0$ (1H, ³J = 7,5 Hz) et à $\delta = 5,5$ ppm (1H, ³J = 7,5 Hz) attribués respectivement aux protons anomériques H-1'' et H-1'''.
- deux doublets à $\delta = 6,4$ ppm (1H, ⁴J = 2 Hz) et à 6,8 ppm (1H, ⁴J = 2 Hz) relatifs respectivement aux deux protons H-6 et H-8.

- un d (1H, $^3J = 8,4\text{Hz}$) à $\delta = 6,9$ ppm, un dd (1H, $^3J = 8,4\text{Hz}$, $^4J = 1,9\text{Hz}$) à $\delta = 7,5$ ppm et un d (1H, $^4J = 1,9\text{Hz}$) à $\delta = 7,9$ ppm attribuables respectivement aux trois protons H-5', H-6' et H-2' du noyau B de l'isorhamnétine.

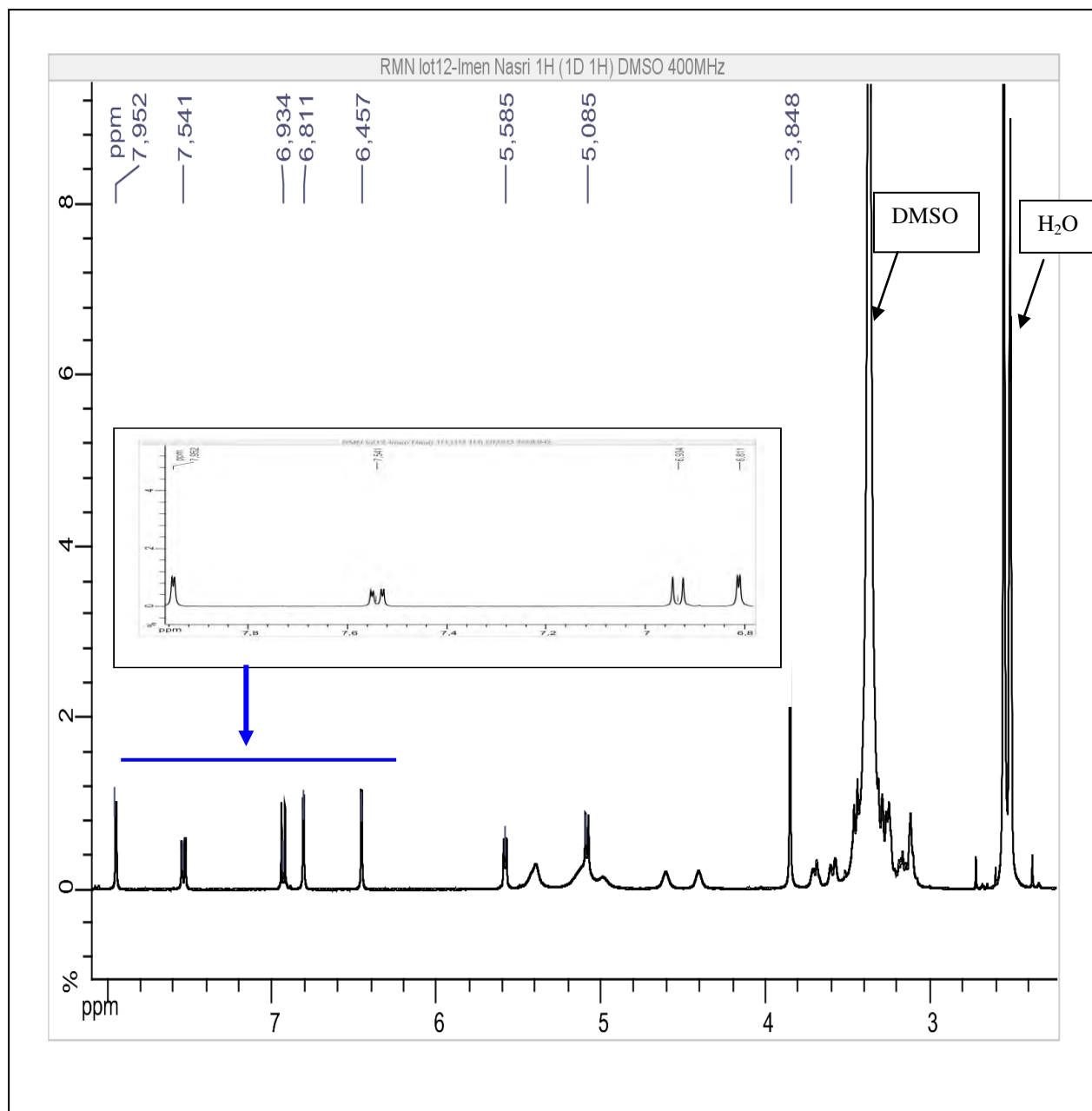


Figure 47: Spectre de RMN du proton du produit NIF2

Ses spectres RMN du ^{13}C (BB et DEPT) effectués dans DMSO-d₆ à 100 MHz (**Figure 48**) montrent la présence de 26 pics relatifs à 28 carbones.

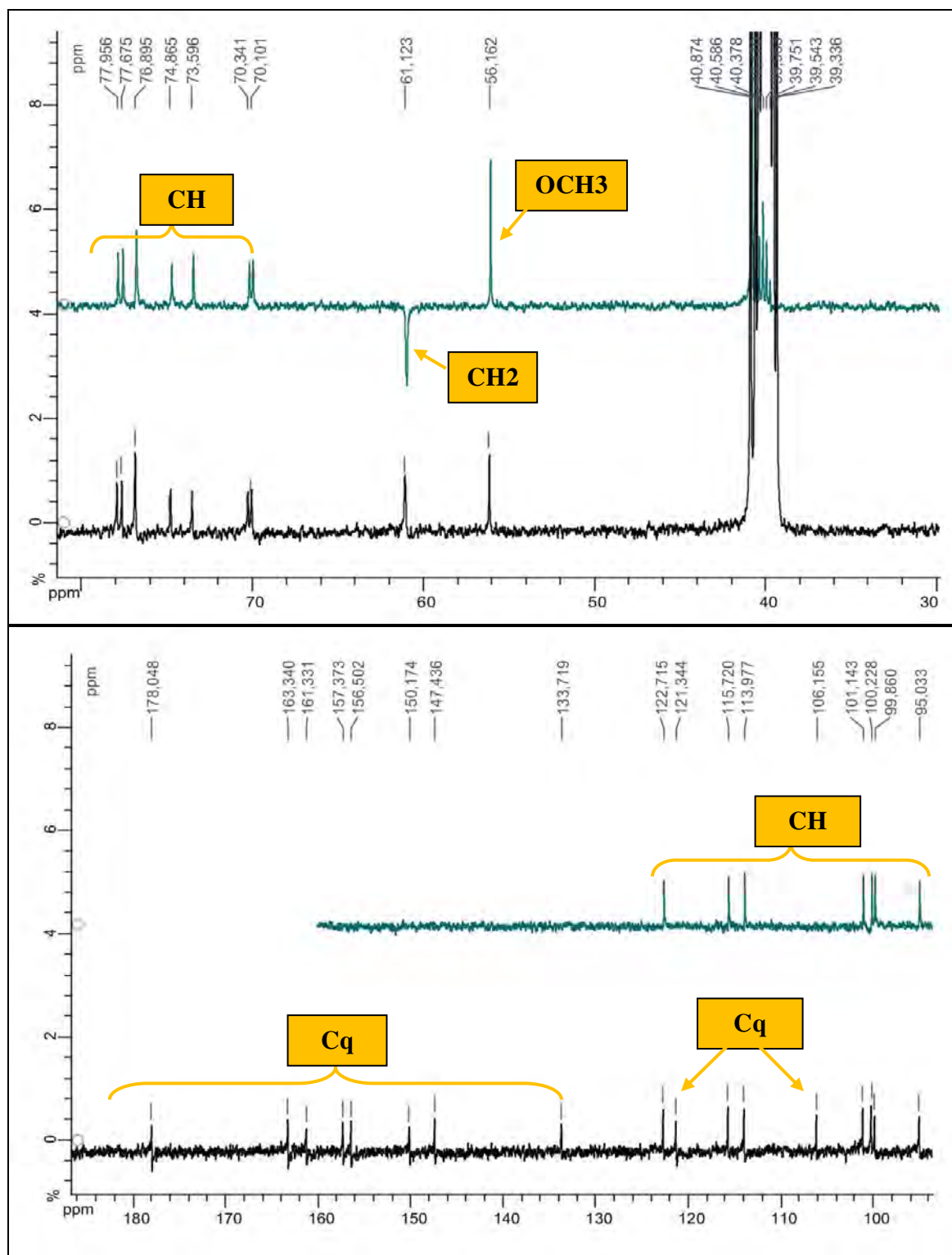


Figure 48: Spectres de RMN du carbone 13 (BB et DEPT) du produit NIF2

Tableau 17: Données en RMN du composé NIF2

	Atome	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$	multiplicité	J (Hz)
Isorhamnétine	2	156,5			
	3	133,7			
	4	178,0			
	5	161,3			
	6	99,8	6,4	d	2
	7	163,3			
	8	95,0	6,8	d	2
	9	157,3			
	10	106,1			
	OCH ₃	56,1	3,8	s	
	1'	121,3			
	2'	113,9	7,9	d	1,9
	3'	147,4			
	4'	150,1			
	5'	115,7	6,9	d	8,4
	6'	122,7	7,5	dd	8,4-1,9
Glucose	1''	100,2	5,0	d	7,5
	2''	73,5	3,3	m	
	3''	76,8	3,4	m	
	4''	70,0	3,1	m	
	5''	77,9	3,1	m	
	6''-a	61,1	3,5	m	
	6''-b	61,1	3,3	m	
Glucose	1'''	101,1	5,5	d	7,5
	2'''	74,8	3,3	m	
	3'''	76,8	3,4	m	
	4'''	70,2	3,1	m	
	5'''	77,6	3,1	m	
	6'''-a	61,0	3,7	m	
	6'''-b	61,0	3,4	m	

Pour déterminer l'enchaînement des deux sucres, on a eu recours au spectre HMBC. L'étude de ce spectre (**Figure 49**), nous a permis, à travers les corrélations carbone – proton, d'attribuer les déplacements chimiques des protons anomériques H-1'' et H-1''' :

- une tache de corrélation entre le proton H-1'' ($\delta=5,0$ ppm) et le carbone C-7 ($\delta=163,3$ ppm), donc le premier glucose est attaché à l'isorhamnétine sur le carbone C-7.
- une tache de corrélation entre le proton H-1''' ($\delta=5,5$ ppm) et le carbone C-3 ($\delta=133,7$ ppm), donc le deuxième glucose est attaché à l'isorhamnétine sur le carbone C-3.

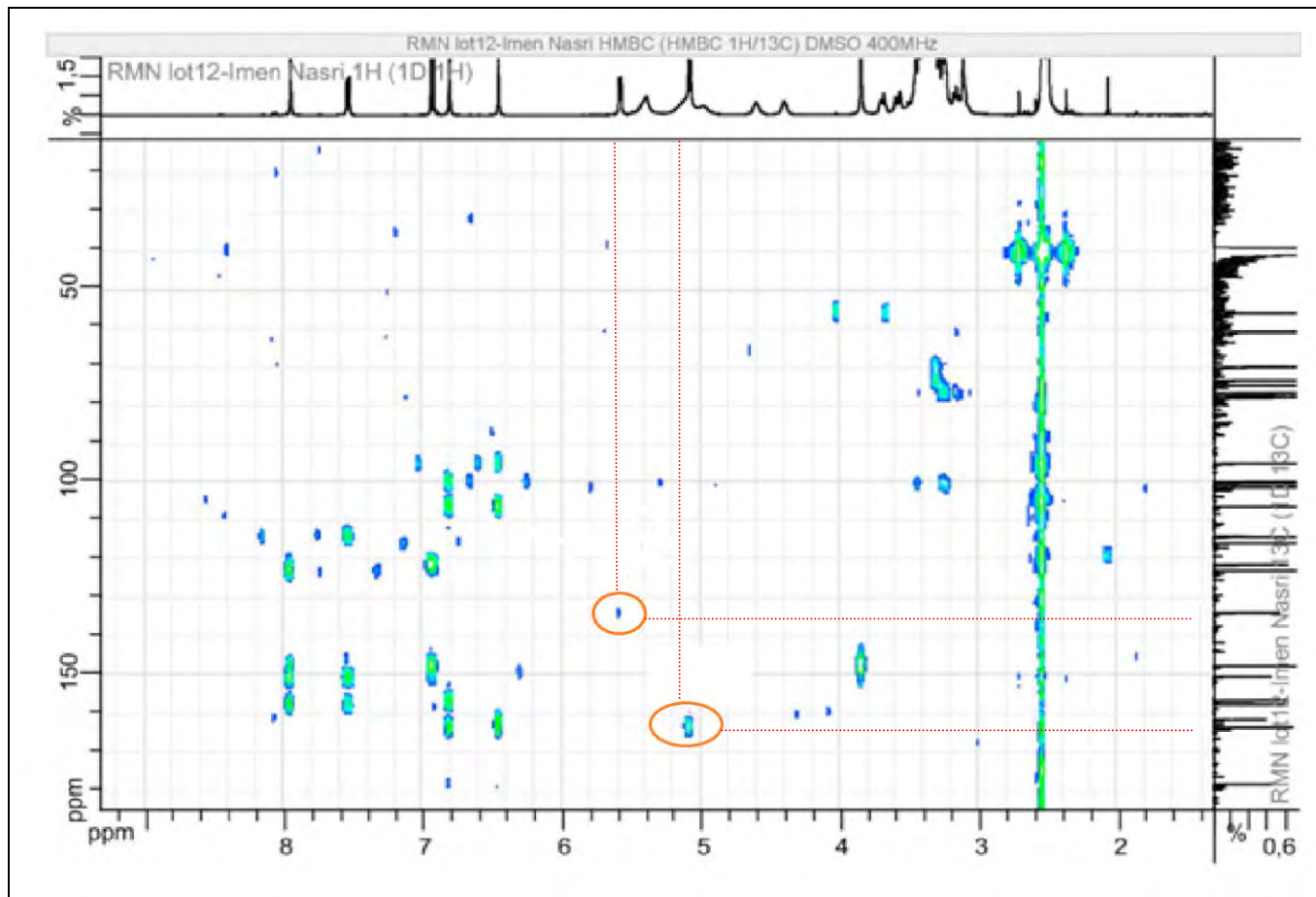


Figure 49: Spectre RMN 2D HMBC du composé NIF2

A la lumière de ces données spectroscopiques illustrées dans le **Tableau 17** et par comparaison avec la littérature [84], il a été possible d'élucider la structure complète de notre composé. Il s'agit de l'isorhamnétine-3,7-di-*O*-glucoside.

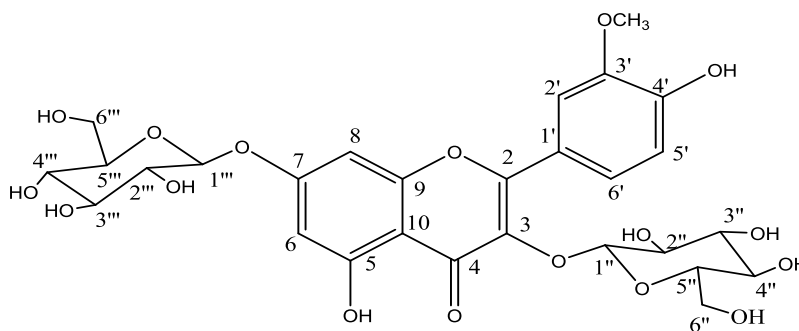


Figure 50: Structure du composé NIF2 (isorhamnétine-3,7-di-*O*-glucoside)

L'isorhamnétine-3,7-di-*O*-glucoside s'est révélé cytotoxique pour les IEC6 en conditions inflammatoires et pour les cellules cancéreuses Caco-2 en culture 3D alors qu'en conditions basales les cellules IEC6 sont au contraire protégées du stress de privation sérique (**Figure 51**).

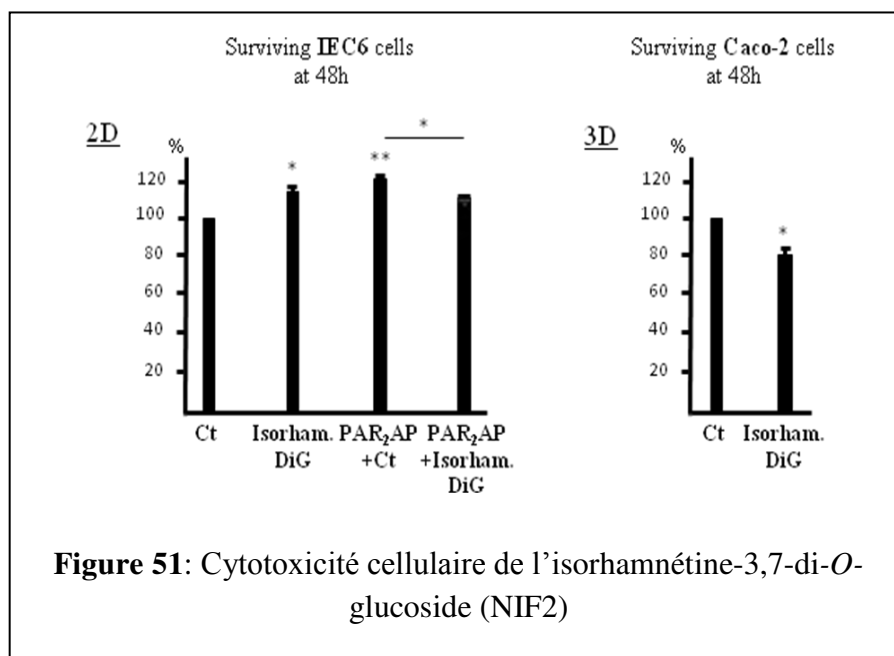


Figure 51: Cytotoxicité cellulaire de l'isorhamnétine-3,7-di-*O*-glucoside (NIF2)

Par contre l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside, produit isolé à partir du même extrait, ne présente aucun effet cytotoxique vis à vis des cellules inflammatoires et cancéreuses (non montré). Donc, l'activité de l'isorhamnétine-3,7-di-*O*-glucoside pourrait être expliquée par la présence de deux groupements glucose et la fixation du deuxième glucose en position 7. Ces résultats sont en accord avec Antunes-Ricardo et al [85] qui ont montré que la glycosylation affecte l'effet antiprolifératif de l'extrait d'*Opuntia ficus-indica*, et que l'isorhamnétine diglycosylé était plus cytotoxique par rapport à l'aglycone isorhamnétine vis à vis des cellules HT-29 de cancer colique. En accord avec les travaux antérieurs de nos équipes [56], la cytotoxicité de l'isorhamnétine-3,7-di-*O*-glucoside pourrait dépendre de son activité inhibitrice sur GSK3 β .

En conclusion, cette étude a révélé un nouveau glucoflavonoïde modulateur de GSK3 β : l'isorhamnétine-3,7-di-*O*-glucoside.

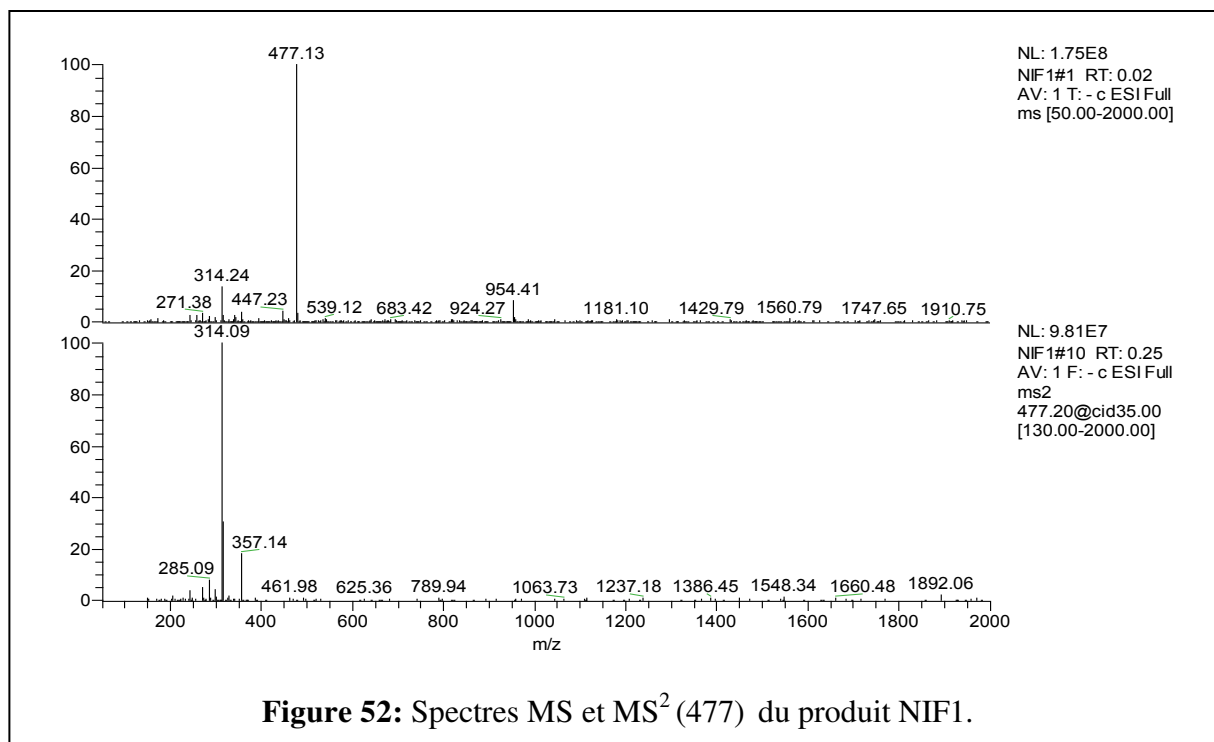
Ces résultats ont été publiés dans le journal '*Pharmaceutical Biology*' [86].

Nous avons ensuite souhaité poursuivre la recherche de nouveaux composés dans *Diplotaxis sp.* qui pourraient être responsables des activités décélée plus haut, en nous basant sur des techniques chromatographique et spectroscopique différentes.

V- ETUDE STRUCTURALE DES PRODUITS ISOLES DE *D. SIMPLEX* ET *D. HARRA*

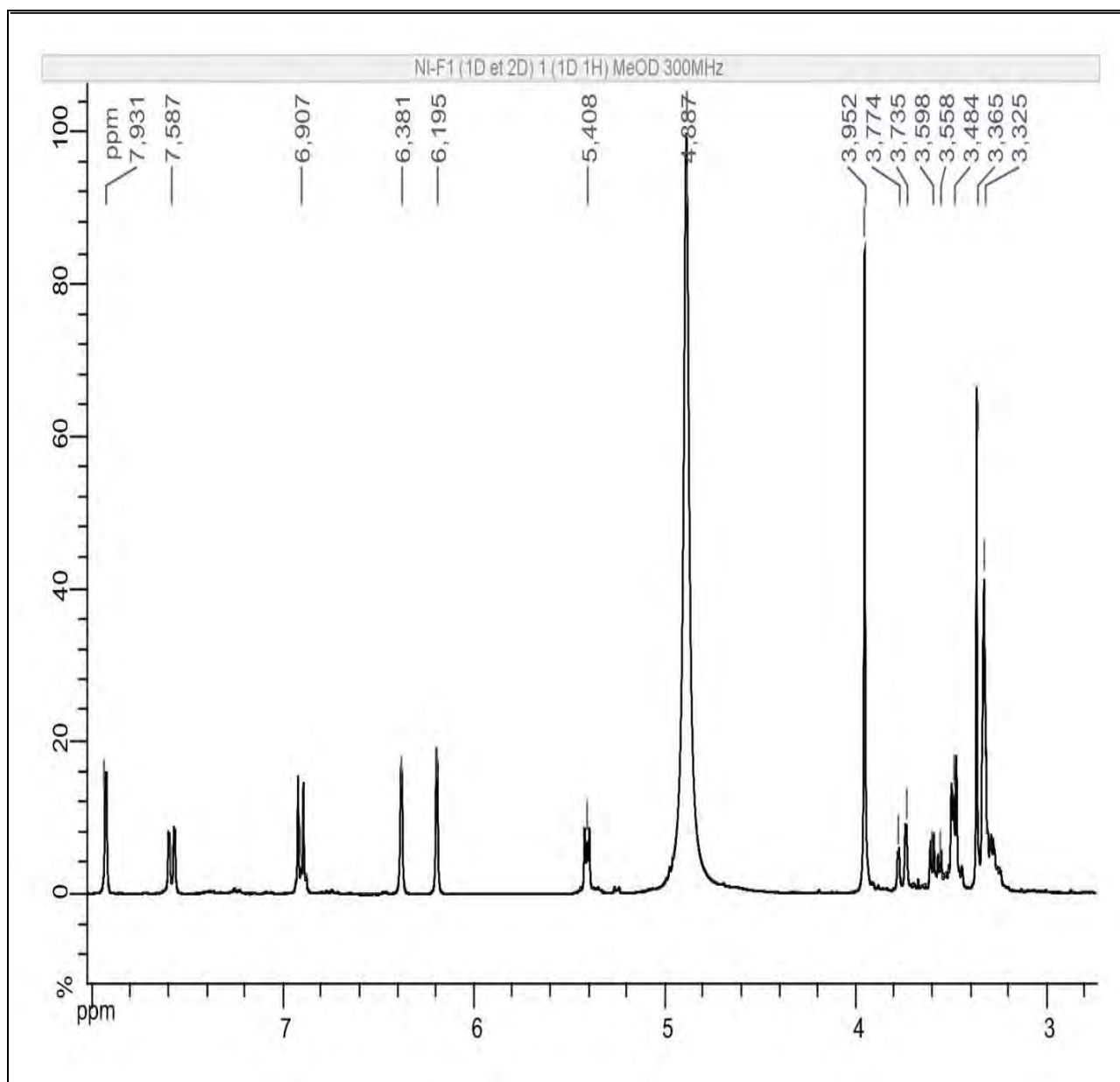
V-1- Identification et activité anti-radicalaire de NIF1 purifié à partir de l'extrait au MeOH de *D. harra*

Ce composé est une poudre jaune, il réagit avec la vapeur d'ammoniac en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm caractéristique d'un flavonoïde. Son spectre de masse ESI-MS en mode négatif (**Figure 52**) présente un pic moléculaire de $m/z = 477$ suggérant une masse atomique de 478. La génine de ce composé possède un m/z de 314 ce qui signifie que c'est une isorhamnétine substituée par un hexose en position 3.



Son spectre de RMN du ¹H à 300 MHz réalisé dans le MeOD (**Figure 53**) montre la présence des signaux suivants :

- un m entre 3,3-3,7 ppm relatif aux protons de la partie sucre.
- un s (3H) à $\delta = 3,5$ ppm relatif au groupement OCH₃ en C-3' de l'isorhamnétine.
- un d à $\delta = 5,4$ (1H, ³J = 7,6Hz) attribué à un proton anomérique H-1".
- deux d à $\delta = 6,1$ ppm (1H, ⁴J = 2 Hz) et à 6,3 ppm (1H, ⁴J = 2 Hz) relatifs respectivement aux deux protons H-6 et H-8.
- un d (1H, ³J = 8,5Hz) à $\delta = 6,9$ ppm, un dd (1H, ³J = 8,5Hz, ⁴J = 2Hz) à $\delta = 7,5$ ppm et un d (1H, ⁴J = 2Hz) à $\delta = 7,9$ ppm attribuables respectivement aux trois protons H-5', H-6' et H-2' du noyau B de l'isorhamnétine.



2

Figure 53 : Spectre de RMN du proton du produit NIF1

Son spectre RMN du ^{13}C réalisé à 75 MHz dans le MeOD (**Figure 54**) présente 22 signaux relatifs à 22 carbones.

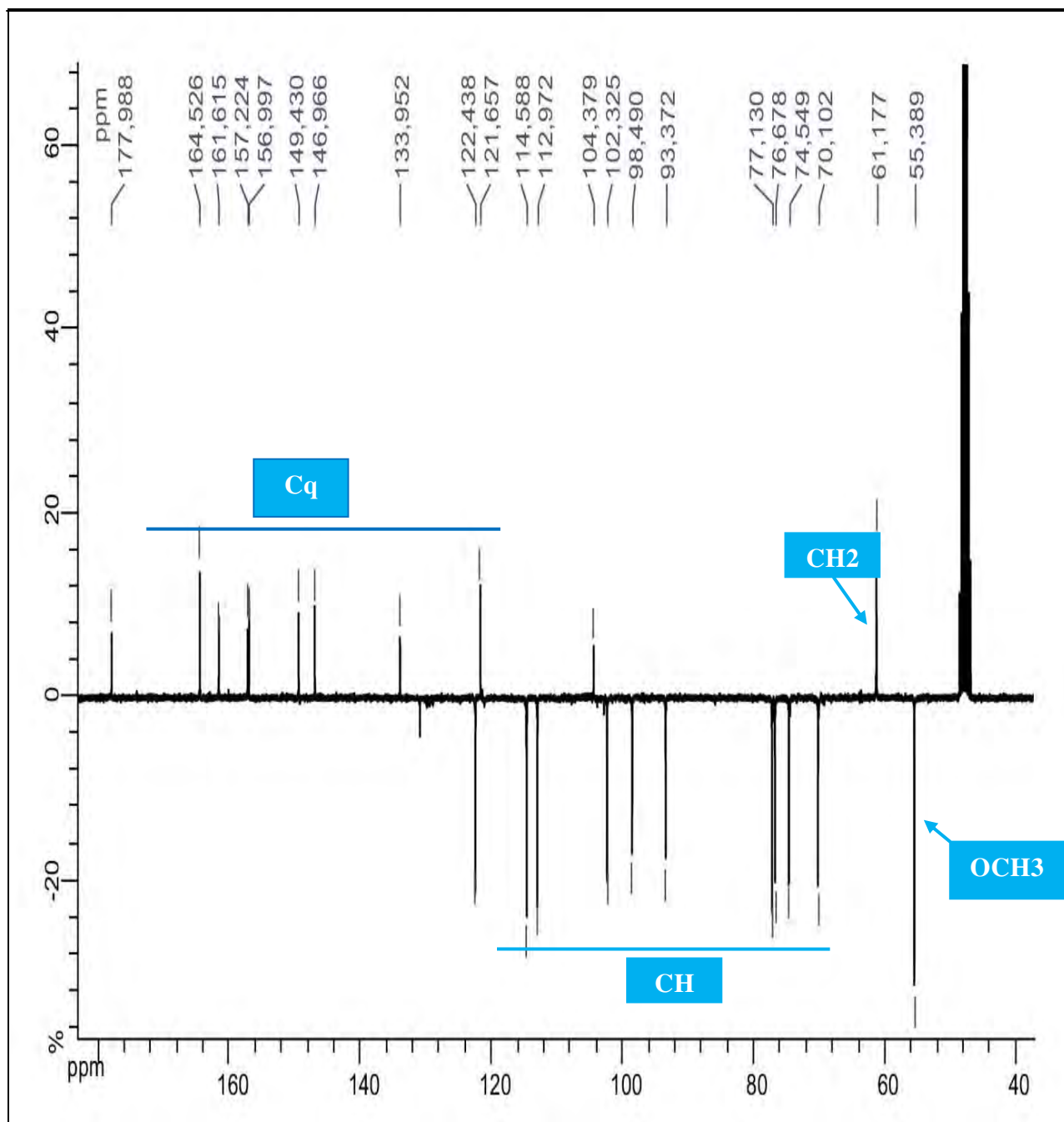


Figure 54: Spectre de RMN du carbone 13 du produit NIF1

Le spectre HMBC de produit NIF1 (**Figure 55**) montre une corrélation entre le carbone C3 ($\delta=133,9$ ppm) et le proton H1'' ($\delta=5,4$ ppm) ce qui confirme bien la présence d'un glucose en position 3.

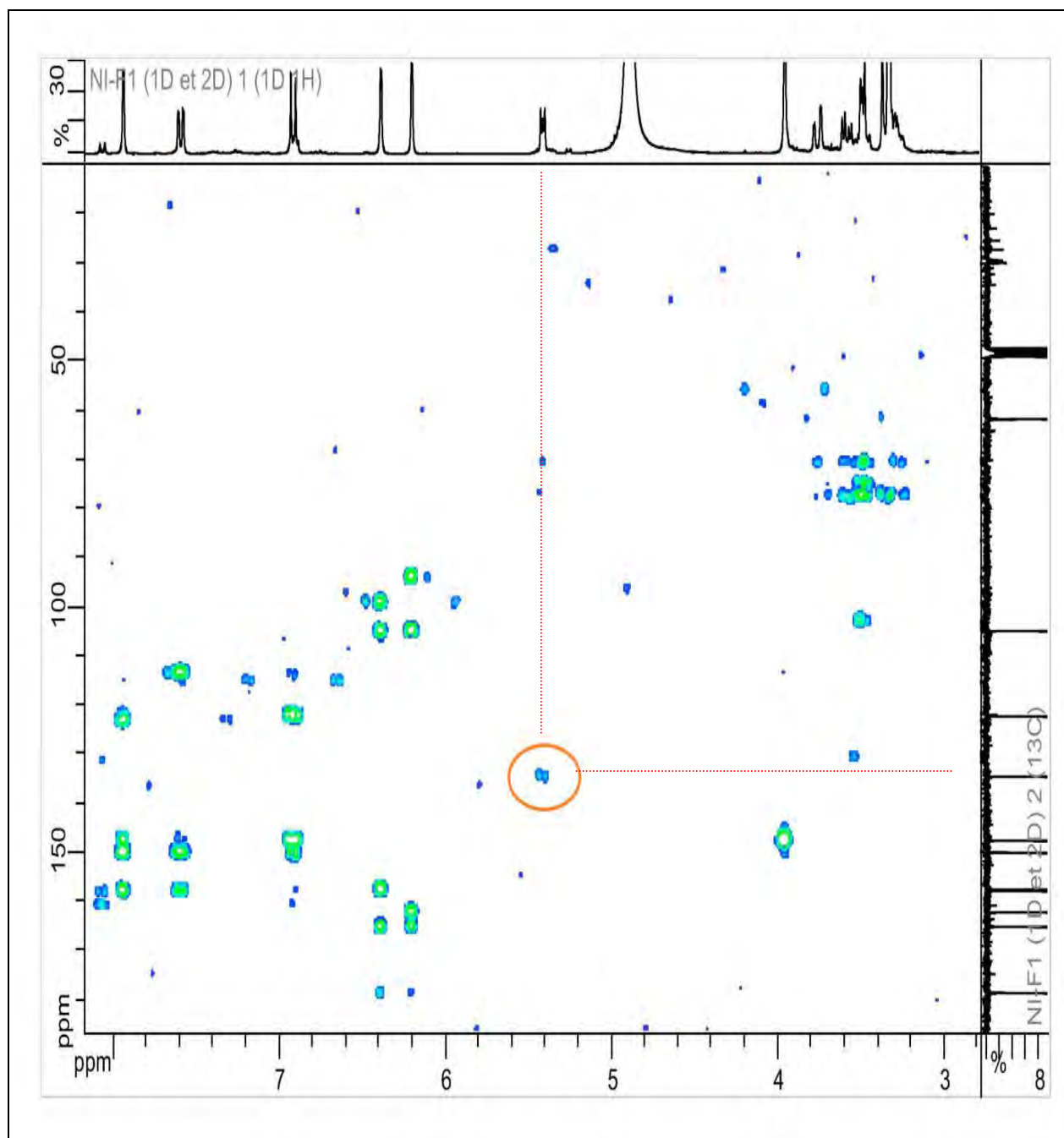


Figure 55: Spectre RMN 2D HMBC du composé NIF1

Suite à une étude bibliographique nous avons comparé les données spectroscopiques en RMN du ^{13}C de notre composé NIF1 avec celles de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside [88]. Cette comparaison est récapitulée dans le **Tableau 18**.

Tableau 18: Déplacements chimiques RMN du ^{13}C de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside et NIF1

$\delta^{13}\text{C}$ de l'isorhamnétine 3- <i>O</i> -glucoside	$\delta^{13}\text{C}$ de NIF1
156,2	156,9
133,0	133,9
177,5	177,9
161,1	161,6
98,8	98,4
164,0	164,5
93,8	93,3
156,4	157,2
104,2	104,3
55,7	55,3
121,7	121,6
111,5	112,9
146,4	146,9
149,9	149,4
115,6	114,5
122,3	122,4
101,1	102,3
74,6	74,5
76,7	76,6
70,1	70,1
77,7	77,1
60,8	61,1

Cette comparaison montre une bonne concordance au niveau de tous les déplacements chimiques. Ce qui nous a permis de proposer la structure de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside au notre composé NIF1.

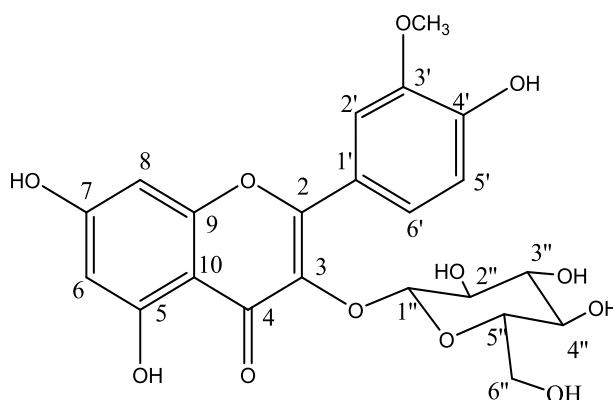


Figure 56: Structure du composé NIF1 (isorhamnétine-3-*O*-glucoside)

L'activité antioxydante par la méthode de DPPH a été déterminée pour l'extrait brut, les fractions F6 et NIL12 ainsi que le produit pur isorhamnétine-3-*O*-glucoside de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra*.

Les variations des PI en fonction des concentrations sont rassemblées dans le **Tableau 19**:

Tableau 19 : Variation des PI des fractions de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra*

C (mg/mL)	Pouvoir d'inhibition PI (%)			
	Extrait	Fraction F6	Lot NIL12	isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside
0,6	90	93	91	93
0,3	89	88	90	69
0,15	75	68	64	45
0,075	28	37	35	28
0,0375	12	21	20	18
CI₅₀ (mg/mL)	0,10	0,09	0,11	0,19

Les valeurs de CI₅₀ sont déduites à partir des courbes présentées sur la **Figure 57** suivante:

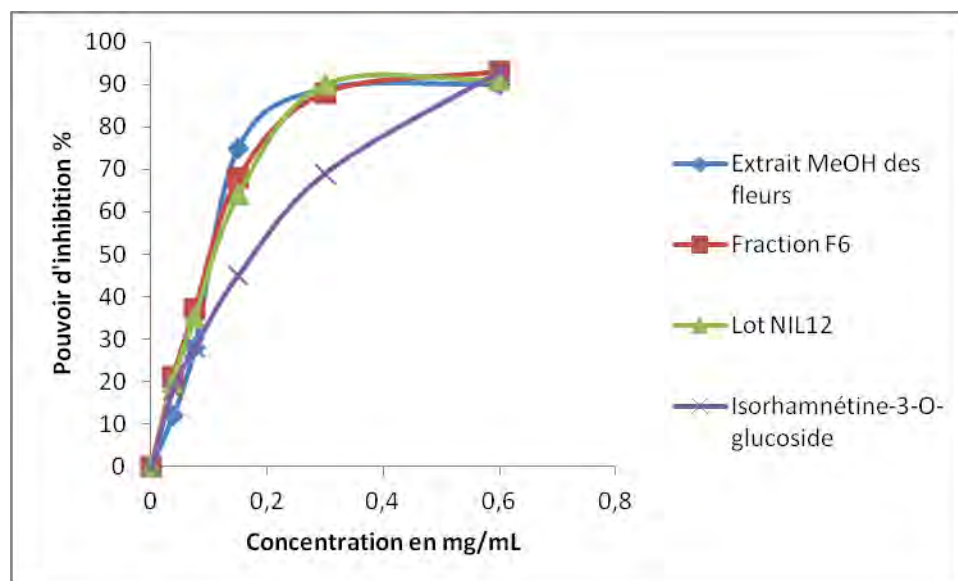


Figure 57: Variation des PI des fractions de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra*

D'après ces résultats, nous avons trouvé que l'extrait brut, ses fractions et le produit pur sont doués d'une activité intéressante comparativement à la vitamine E ($CI_{50} = 0,02$ mg/mL) et au BHT ($CI_{50} = 0,04$ mg/mL). La plus forte activité est trouvée dans la fraction F6. Cette activité pourrait être expliquée par la synergie d'un mélange des glucoflavonoïdes présents dans la fraction F6.

V-2- Identification de NIL7B purifié à partir de l'extrait au MeOH de *D. harra*

Ce produit a été isolé sous forme de poudre jaune à partir du lot 7 de l'extrait au MeOH de *D. harra*. La révélation par le réactif de Neu donne une tache fluorescente à 366 nm. Son spectre ESI-MS en mode négatif (**Figure 58**) montre un pic pseudo-moléculaire à $m/z = 639$ en accord avec une masse de 640 g/mol qui pourrait correspondre à la formule brute $C_{28}H_{32}O_{17}$. Le spectre SM^3 du composé NIL7B montre un ion à $m/z 315$ correspond à une génine l'isorhamnétine-3-O-diglucoside.

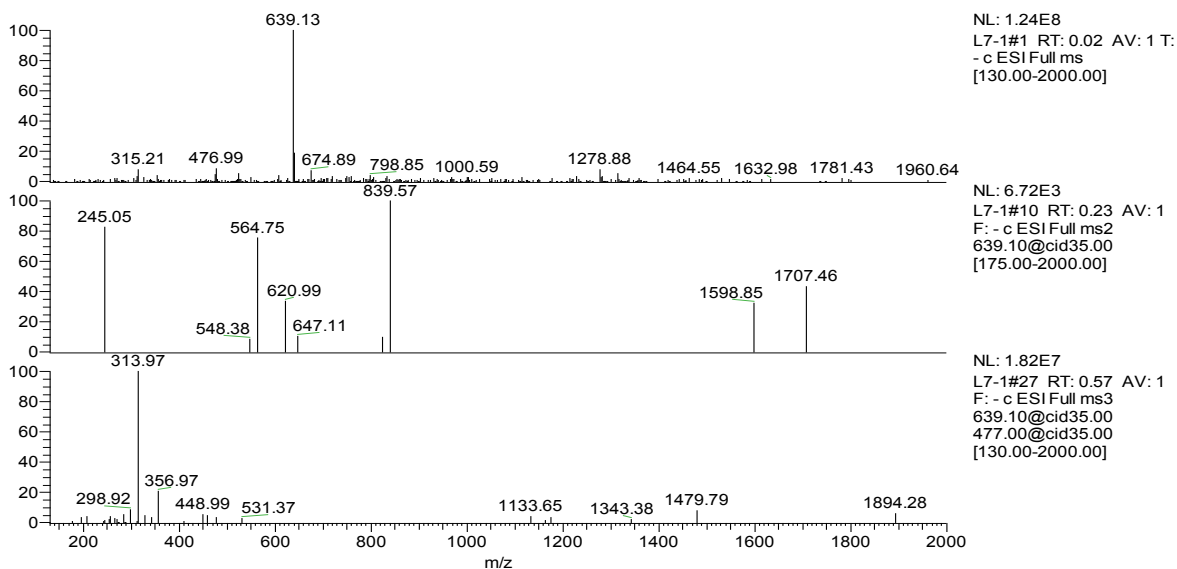


Figure 58: Spectres MS, MS² (639) et MS³ (639) (ESI-MS) en mode négatif du composé NIL7B

V-3- Identification de NIL7C purifié à partir de l'extrait au MeOH de *D. harra*

Ce produit a été isolé sous forme de poudre jaune à partir du lot 7 de l'extrait au MeOH de *D. harra*. Ce produit se présente sous forme d'une tache sombre et après révélation par le réactif de Neu, il donne une tache fluorescente à 366 nm. Son spectre de masse (ESI-MS) (**Figure 59**) montre un ion en mode négatif égal à m/z 463 [M-H]⁻ attribuable à une masse égal à 464 uma qui pourrait correspondre à la formule brute C₂₁H₂₀O₁₂. Le spectre MS² de l'ion de m/z 463 donne un ion majoritaire à m/z 301 dû à la perte de 162 uma correspondant à la perte d'un hexose.

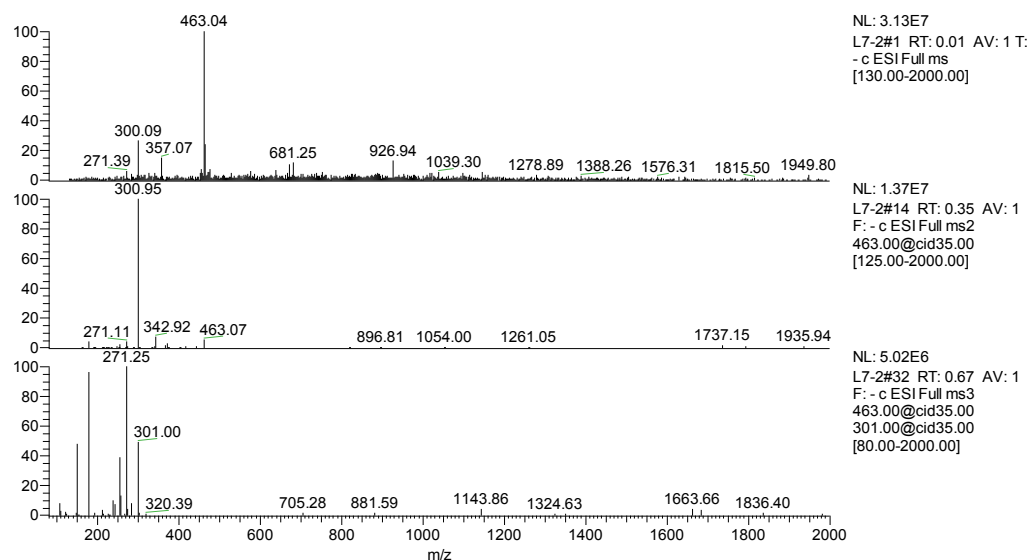


Figure 59: Spectres MS, MS²(463) et MS³(463) (ESI-MS) en mode négatif du composé NIL7C

Ce produit pourrait être identifié à une quercétine monoglucosylée (**Figure 60**).

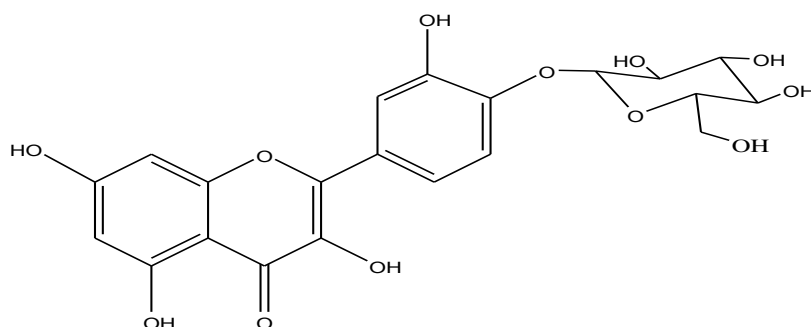


Figure 60: Structure du composé NIL7C (quercétine monoglucosylée)

V-4- Identification de NIL7D purifié à partir de l'extrait au MeOH de *D. harra*

Ce produit a été isolé sous forme de poudre jaune à partir du lot 7 de l'extrait au MeOH de *D. harra*. Il se présente sous forme d'une tâche sombre et après révélation par le réactif de Neu, il donne une tâche fluorescente à 366 nm. Son spectre de masse (ESI-MS) (**Figure 61**) montre un ion en mode négatif égal à m/z 477 $[M-H]^-$ attribuable à une masse égale à 478 uma et qui pourrait correspondre à la formule brute $C_{22}H_{22}O_{12}$. Le spectre MS² de l'ion de m/z 477 donne un ion majoritaire à m/z 315 dû à la perte de 162 uma correspondant à la perte d'un hexose. Ces données sont en bonne concordance avec celles

du composé NIF1 décrit précédemment. Il s'agit donc d'une isorhamnétine glucosylée.

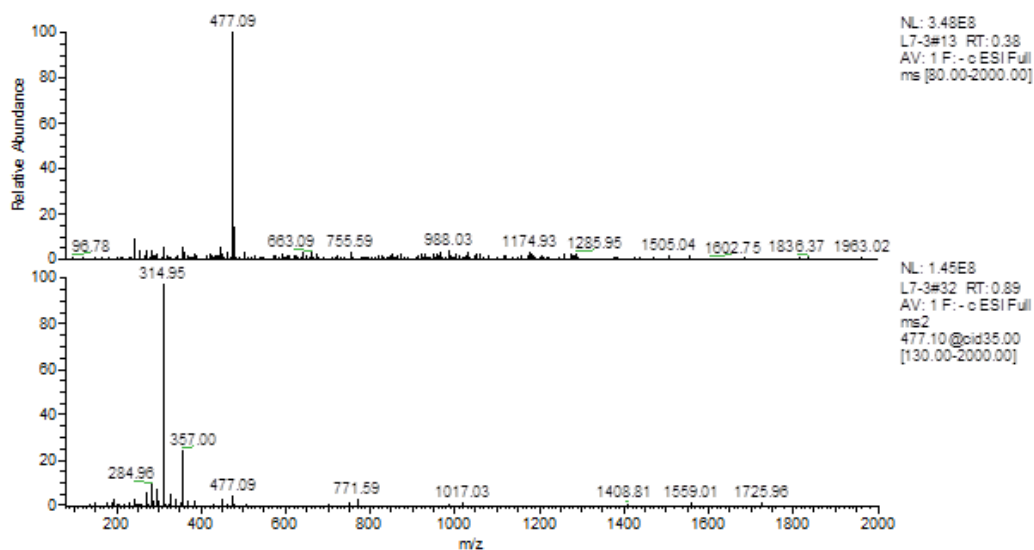


Figure 61: Spectres MS et MS² (477) (ESI-MS) en mode négatif du composé NIL7D

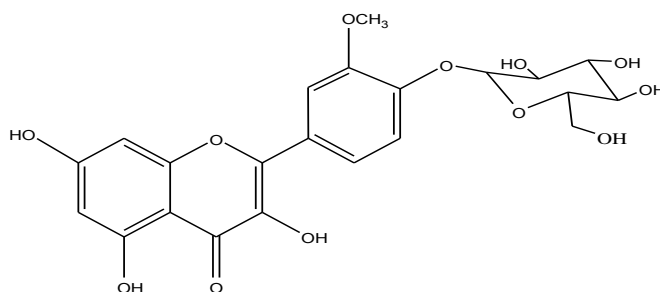


Figure 62: Structure du composé NIL7D (isorhamnétine monoglucosylée)

V-5- Identification de L71B purifié à partir de l'extrait au MeOH de *D. simplex*

Le composé L71B, se présente sous forme d'une poudre amorphe jaune, a été isolé à partir du lot 7 de l'extrait au MeOH de *D. simplex* comme mentionné dans l'organigramme suivant (Figure 63):

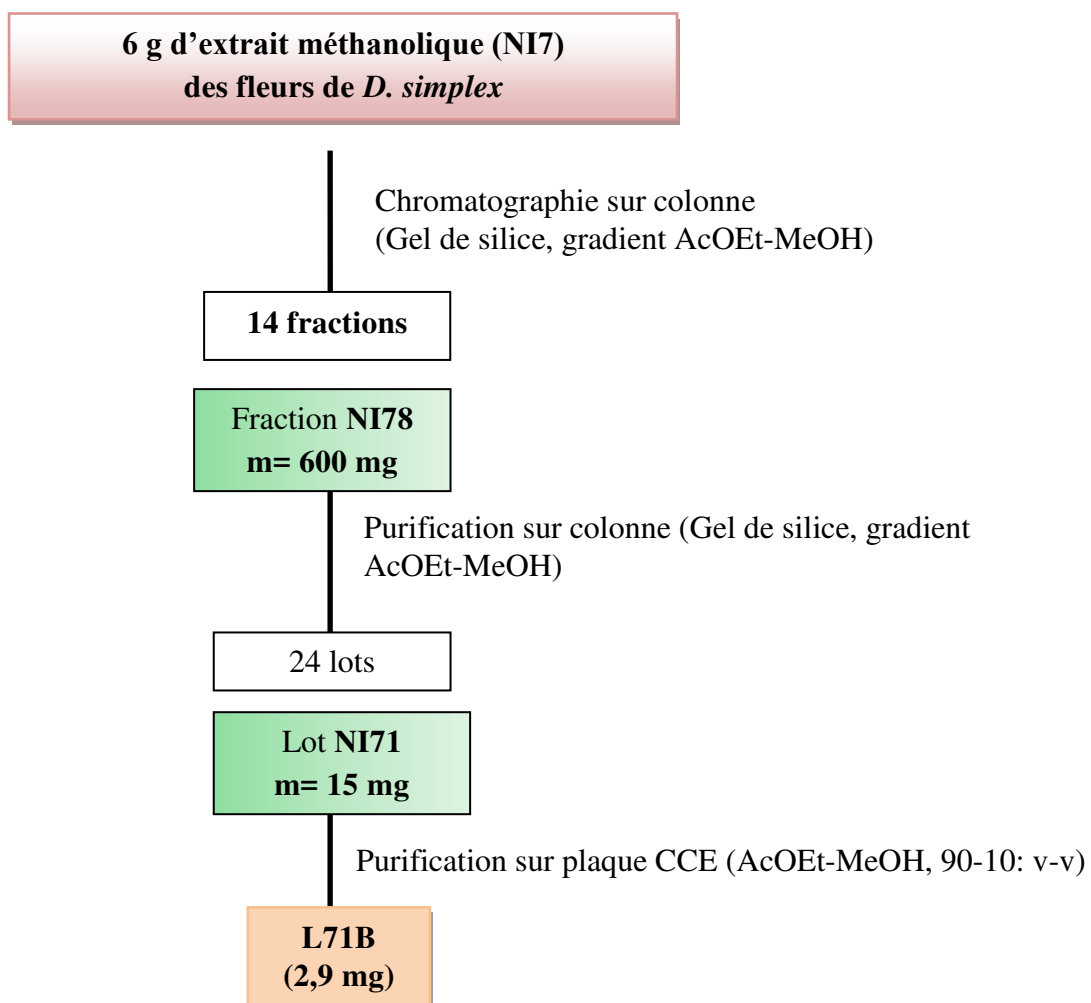


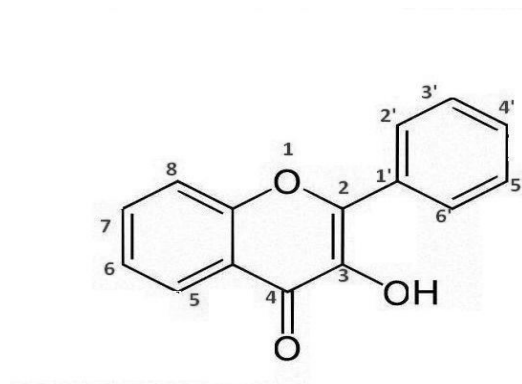
Figure 63: Purification de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. simplex*

Le rapport frontal du produit L71B est égal à 0,63 sur une plaque CCM de silice dans un éluant AcOEt- MeOH (85-15: v-v). La révélation de la plaque CCM du produit (L71B) par la vapeur d'ammoniac et les résultats des tests phytochimiques sont en faveur de l'identification du produit (L71B) à un flavonoïde.

Son étude structurale est basée sur la technique spectroscopie UV, spectroscopie RMN de proton, H-H COSY et NOESY.

V-5-1 Spectroscopie UV du produit (L71B)

Son spectre UV dans le méthanol montre deux bandes à 357 nm (bande I) et à 256 nm (bande II), ce qui pourrait être en faveur d'un squelette du flavonol [87].



Squelette du flavonol

Pour déterminer les positions des groupements hydroxyles, on a eu recours à l'ajout des réactifs spécifiques (**Tableau 20**) pouvant apporter des modifications au spectre UV de départ. Ainsi, suivant les déplacements des bandes I et II après l'addition des réactifs spécifiques, on a pu identifier les positions des groupements hydroxyles.

L'addition du réactif AlCl_3 a provoqué un déplacement bathochrome de la bande I ce qui est favorable à un OH en position 5.

- L'ajout du HCl à cette solution a provoqué un déplacement bathochrome de la bande I ce qui confirme la présence du OH en position 5.
- L'addition du NaOMe a provoqué un déplacement bathochrome de la bande I ce qui est favorable à un OH en position 4'.
- L'addition du NaOAc a provoqué un déplacement bathochrome de la bande II ce qui est favorable à un OH en position 7.
- L'addition du NaOAc et H_3BO_3 n'a présenté aucun déplacement bathochrome ce qui confirme l'absence d'un ortho-dihydroxyle.

Ainsi, le produit (L71B) pourrait être un flavonol-3-O glycoside.

Tableau 20 : Interprétation des résultats du spectre UV du composé L71B

Réactifs	λ (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	357	256	Flavonol
AlCl ₃	407	269	OH en position 5
AlCl ₃ + HCl	403	267	
NaOMe	415	272	OH en position 4'
NaOAc	387	274	OH en position 7
NaOAc + H ₃ BO ₃	361	257	Pas de <i>O</i> -dihydroxyle

V-5-2 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse et le détecteur diode Array LCMS-DAD

Le système utilisé pour la LCMS-DAD opère à une ionisation en mode positif et en mode négatif.

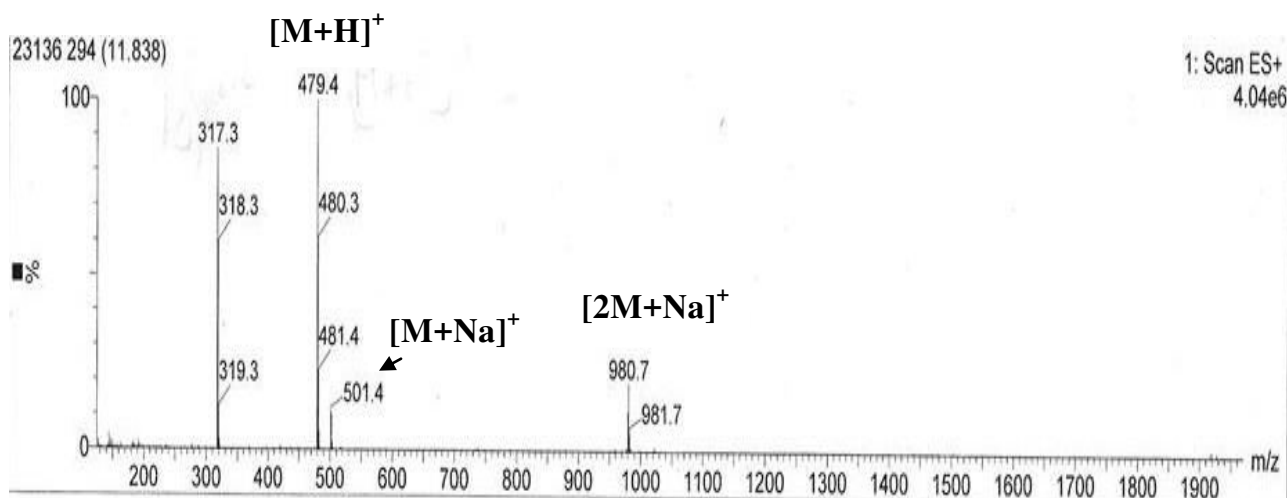


Figure 64 : Spectre de masse (ES⁺) du produit L71B

Le spectre de masse (ES⁺) montre:

- Un pic moléculaire à $m/z = 479,4$ $[M+H]^+$ d'où la masse molaire de notre produit est égal à 478,4

- Un pic de base à $m/z = 317,3$ indique la présence d'une isorhamnétine comme aglycone de ce flavonoïde. Ce pic correspond à $[M+H-162]^+$ ce qui montre la présence d'un hexose (glucose ou galactose).
- D'autres pics à $m/z = 501,4 [M+Na]^+$; $980,7 [2M+Na]^+$.

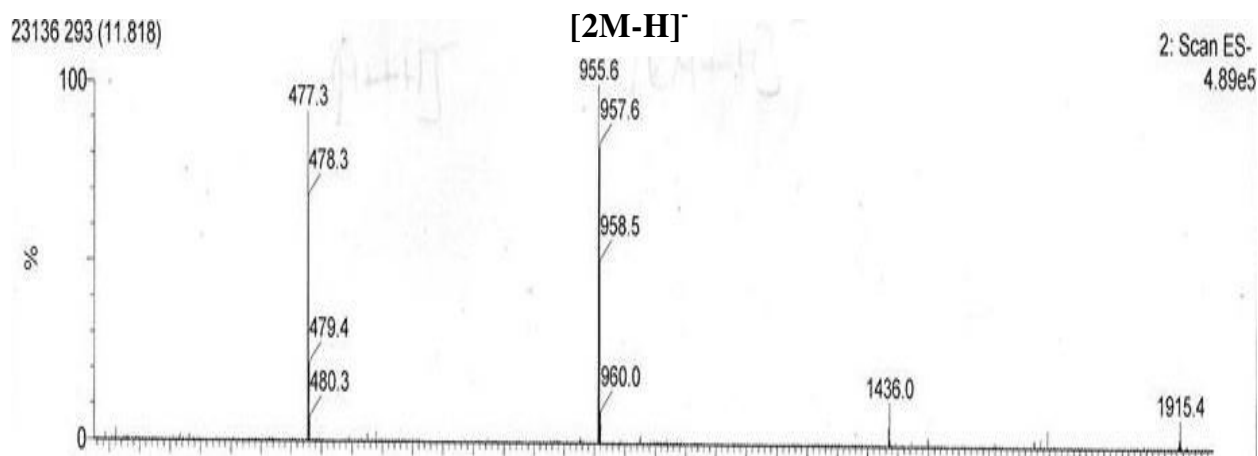


Figure 65 : Spectre de masse (ES^-) du produit L71B

Le spectre de masse (ES^-) montre :

- Un pic moléculaire à $m/z = 477,3$ équivalent à une masse molaire égale à 478,3
- Dimère à $m/z = 955,6$ correspond à $[2M-H]^-$

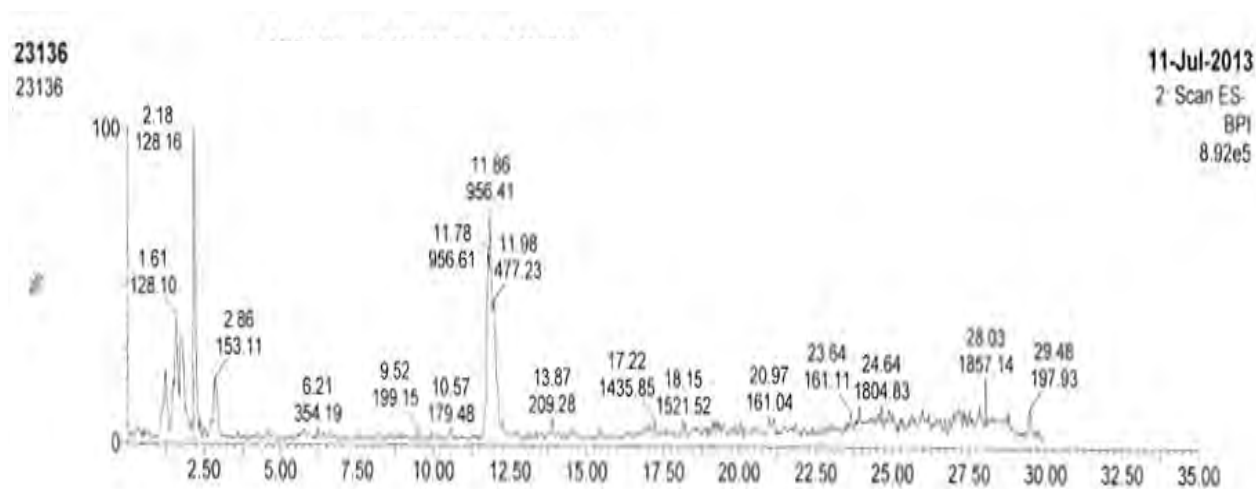


Figure 66: Chromatogramme LC couplé à la spectroscopie de masse (ES^-)

Ce chromatogramme montre que le pic moléculaire $m/z = 477,2$ du produit L71B est attribué à un temps de rétention égal à 11,9 min.

Nous pouvons affirmer que ce flavonoïde est l'isorhamnétine-3-*O*-hexose mais nous ne pouvons pas distinguer si l'hexose est un glucose ou un galactose.

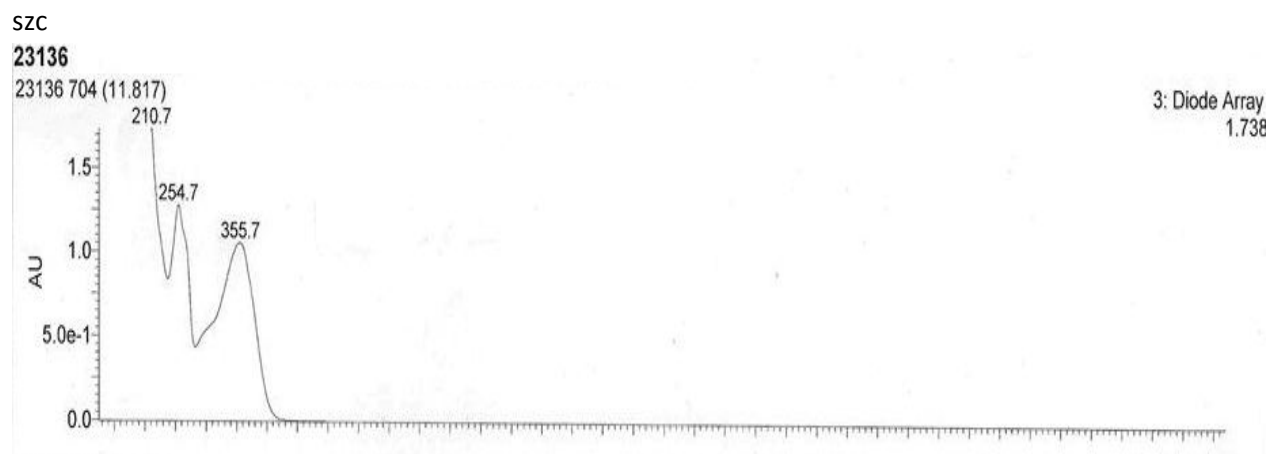


Figure 67 : Spectre UV par détecteur de diode Array DAD

Ce spectre montre 3 bandes :

- Bande maximale vers 355,7 nm
- Deux bandes vers 254,7 et 210,7 nm

V-5-3 Spectroscopie de RMN ^1H

Le spectre de RMN du proton à 300 MHz dans le MeOD du composé L71B est très complexe, il présente des signaux supplémentaires à ceux de notre produit et qui pourraient être attribués à des impuretés.

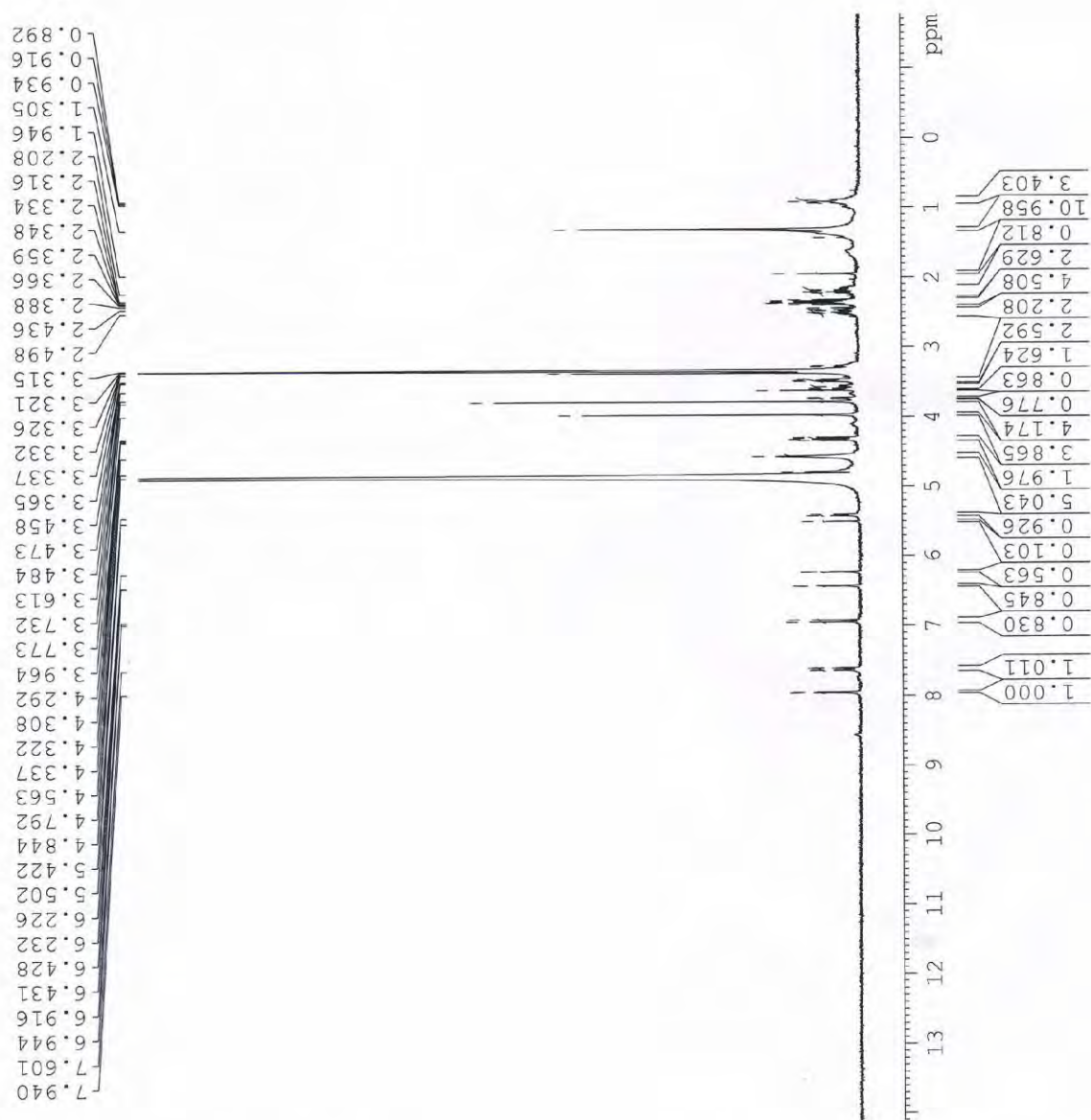


Figure 68: Spectre RMN du proton à 300MHz du produit L71B dans MeOD

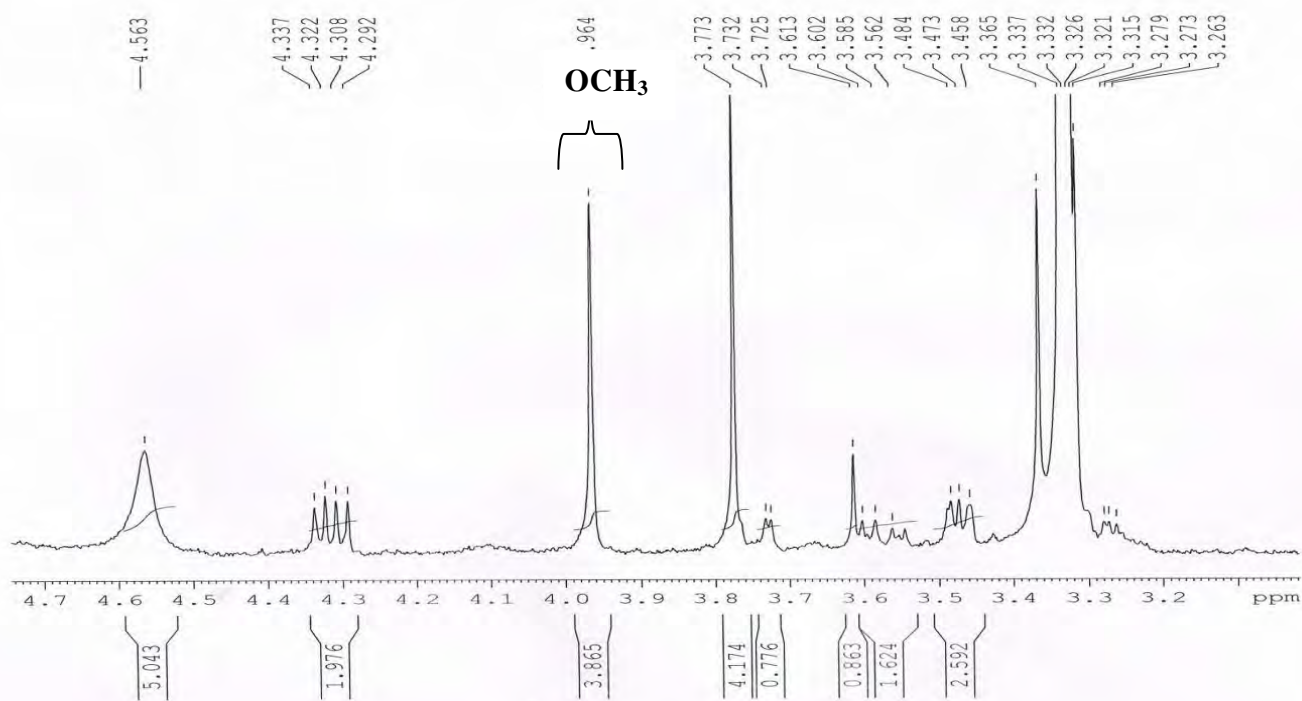
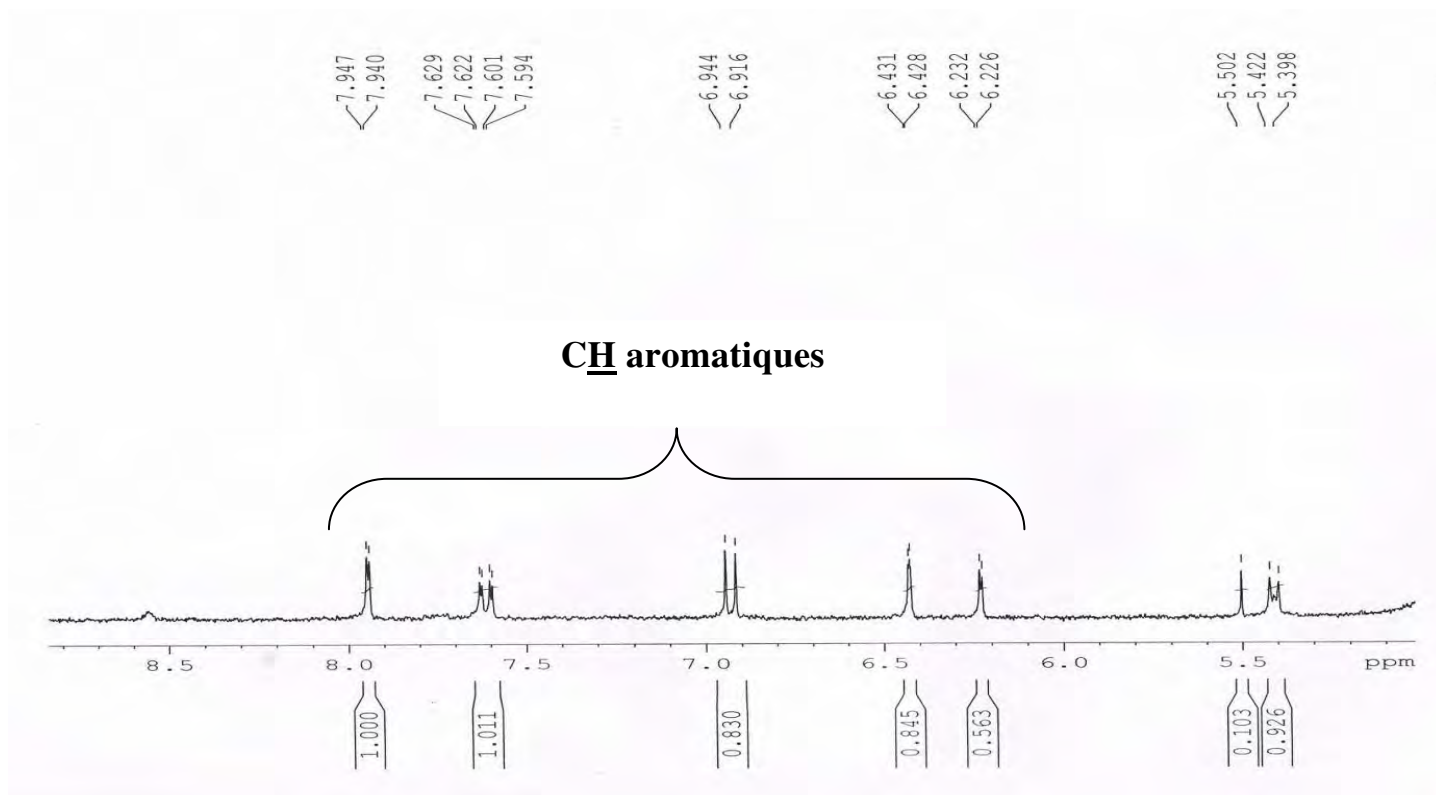


Figure 69 : Etalements du spectre de RMN du proton à 300 MHz du produit L71B dans MeOD.

Nous avons pu identifier :

- Cinq signaux entre 6,2 et 7,9 ppm attribués à des protons aromatiques :
 - d (1H, ${}^4J= 1,8$ Hz) à 6,2 ppm relatif à un –CH=
 - d (1H, ${}^4J= 0,9$ Hz) à 6,4 ppm relatif à un –CH=
 - d (1H, ${}^3J= 8,4$ Hz) à 6,9 ppm relatif à un –CH=
 - dd à 7,6 ppm avec une constante de couplage (${}^3J= 8,4$; ${}^4J= 2,1$ Hz) relatif à –CH=
 - d (1H) à 7,9 ppm avec une constante de couplage (${}^4J= 2,1$ Hz) relatif à –CH=
- un s (3H) vers 3,9 ppm correspond aux trois protons d'un CH₃-O.
- un d (1H) vers 5,4 ppm correspond à un proton très déblindé à cause de son emplacement près d'un ou plusieurs hétéroatomes.

Les résultats des analyses précédentes nous ont conduits à comparer les données de notre produit (**Tableau 22**) à celles de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside [88] ou l'isorhamétine-3-*O*-galactoside [89].

Le spectre comparé à celui d'isorhamnétine 3-*O*-glucoside montre :

- s à 3,9 ppm attribué à OCH₃
- d à 5,4 ppm attribué à H₁'
- d à 6,2 ppm attribué à H₆
- d à 6,4 ppm attribué à H₈
- d à 6,9 ppm attribué à H₅'
- dd à 7,6 ppm attribué à H₆'
- d à 7,9 ppm attribué à H₂'

Tableau 22 : Déplacements chimiques des protons de l'isorhamnétine 3-O glucoside/
isorhamnétine-3-O-galactoside/L71B

Atome	Isorhamnétine-3-O-glucoside		L71B		Isorhamnétine-3-O-galactoside	
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicité, J (Hz)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicité, J (Hz)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
6	6,1	d (1H) ; 2,1	6,2	d (1H) ; 1,8	6,2	d (1H) ; 1,9
8	6,3	d (1H) ; 1,8	6,4	d (1H) ; 0,9	6,4	d (1H) ; 7,7
2'	7,8	d (1H) ; 1,9	7,9	d (1H) ; 2,1	8,0	d (1H) ; 1,9
5'	6,8	d (1H) ; 8,4	6,9	d (1H) ; 8,4	6,9	d (1H) ; 8,4
6'	7,4	dd (1H); 8,4-2,0	7,6	dd (1H) ; 8,4-2,1	7,5	dd (1H) ; 8,4-1,9
CH₃-O	3,8	s (3H)	3,9	s (3H)	3,8	s (3H)

La comparaison des données spectroscopiques en RMN ^1H de ce composé avec celles de l'isorhamnétine-3-O-glucoside et l'isorhamnétine-3-O-galactoside montre une bonne concordance pour le squelette d'isorhamnétine.

L'attribution incomplète des déplacements chimiques nous a incités à utiliser le RMN à deux dimensions (^1H - ^1H COSY et NOESY) à 300 MHz dans le MeOD. On n'a pas pu faire l'analyse HMQC et HMBC à cause du mauvais spectre RMN ^{13}C dû à la faible masse de notre produit.

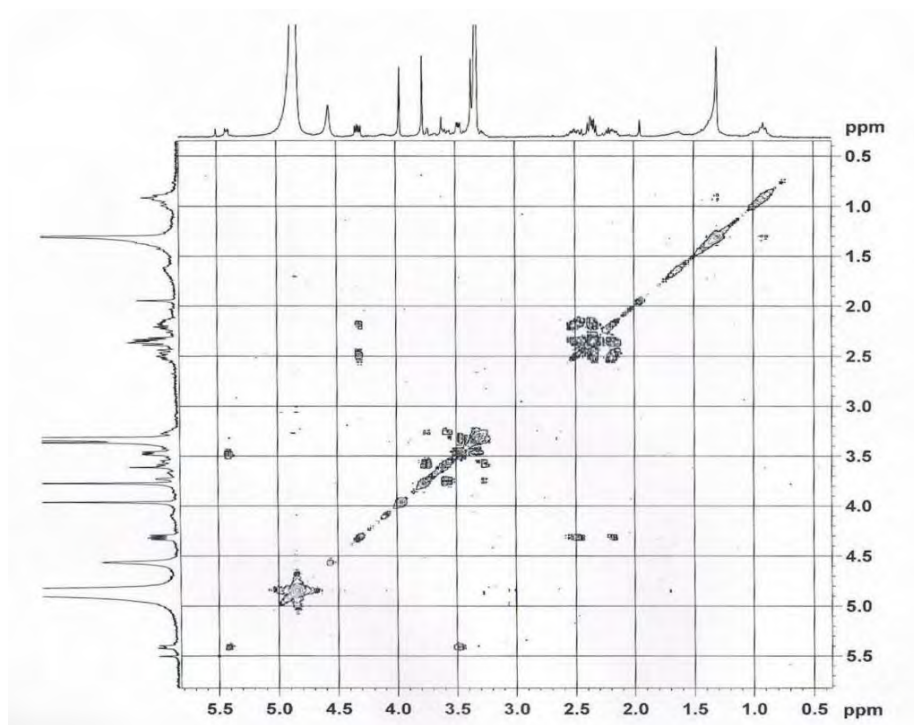


Figure 70 : Spectre RMN ^1H - ^1H COSY à 300 MHz du produit L71B

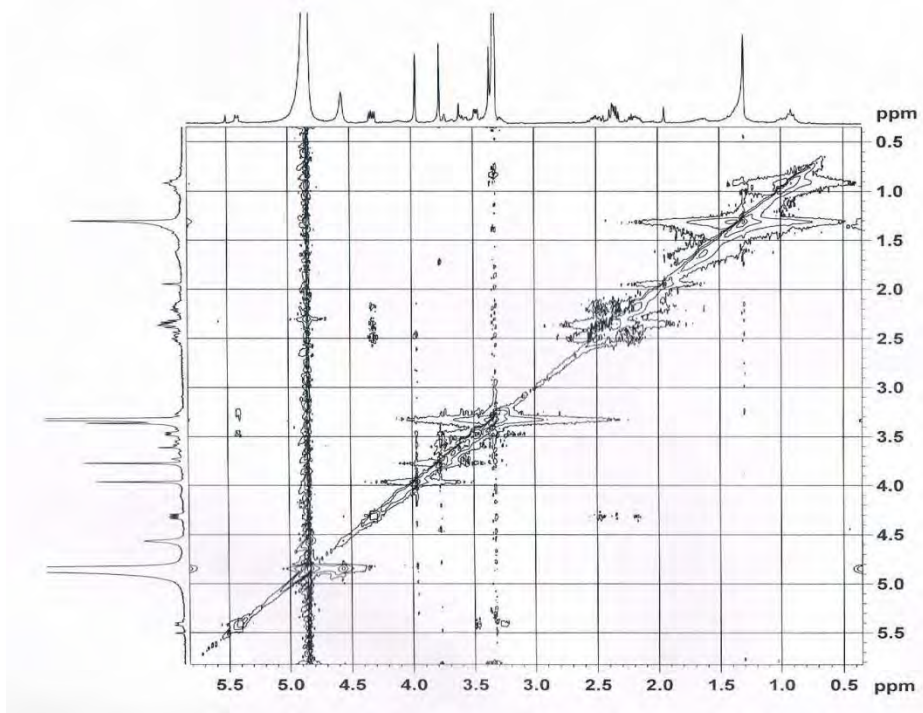


Figure 71 : Spectre RMN NOESY à 300 MHz du produit L71B

Nous avons constaté que :

- OCH₃ ne corrèle avec aucun proton
- H_{1''} corrèle avec un triplet à 3,4 ppm

Ce spectre montre des tâches de corrélation indiquant l'existence d'interactions dipolaires entre le proton H_{1''} et deux autres protons.

⇒ Les données spectroscopiques (RMN du proton, spectroscopie UV et LCMS-DAD) du produit L71B comparées avec celles de la littérature [90,91], ont bien montré que le composé L71B est l'isorhamnétine-3-*O*-hexose (**Figure 72**). D'autres investigations spectroscopiques seront complétées sur une quantité plus importante de ce produit afin de déterminer la nature de l'hexose.

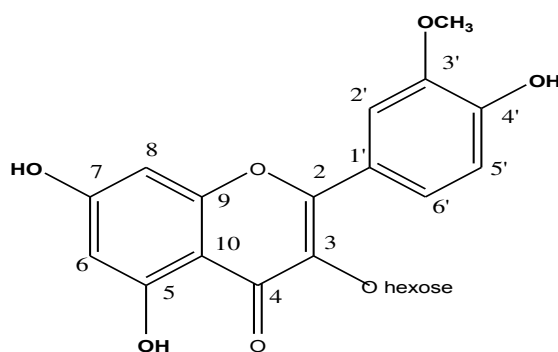


Figure 72: Structure du composé L71B (Isorhamnétine-3-*O*-hexose)

Conclusion et perspectives

De nos jours, l'utilisation des plantes restent la source prédominante dans la recherche biomédicale. Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs.

Les extraits issus des plantes contiennent une variété des composés et des fractions volatiles dotées des activités antioxydante, antibactérienne, antiinflammatoire et anticancéreuse.

Mon travail de thèse est une contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes largement utilisées en médecine traditionnelle: *Diplotaxis simplex* et *Diplotaxis harra*.

Dans ce contexte, nous avons montré un effet antioxydant important des extraits méthanoliques des fleurs de *D. simplex* et *D. harra* ainsi que l'intérêt des extraits de ces deux espèces vis-à-vis de souches bactériennes pathogènes GRAM+ et GRAM-. Les résultats trouvés sur cette dernière activité nous ont permis de localiser un effet antibactérien notable au niveau des extraits brut à l'AcOEt des fleurs, à l'hexane des feuilles et des racines de *D. simplex*. L'effet de ces extraits est confirmé par des CMI et CMB compris entre 0,625 et 2,5 mg/mL.

D'autre part, en raison de l'effet important des fractions volatiles en phytothérapie, nous avons étudié la composition chimique et l'activité antioxydante des fractions volatiles des feuilles et fleurs de *D. simplex*, l'analyse GC-MS montre la présence des composés soufrés/azotés en pourcentage élevé tels que l'isothiocyanate et les nitriles dans les deux fractions volatiles de *D. simplex*. Ces composés pourraient être responsables de l'activité de piégeage de DPPH modérée trouvée dans la fraction volatile des fleurs *D. simplex*.

Un screening phytochimique sur les différents organes des deux plantes montre la richesse des extraits méthanoliques en flavonoïdes ce qui nous a donné une idée de rechercher des nouveaux inhibiteurs de l'enzyme GK3 β pro-inflammatoire et pro-carcinogène.

Tout d'abord, nous avons mis au point un nouveau modèle d'étude *in vitro* des cellules souches coliques pathologiques, mettant en évidence le rôle des PARs dans la régulation des CSI et l'importance de la voie PAR₂/GSK3 β dans la survie des cellules souches

coliques en conditions inflammatoires ou cancéreuses et donc leur rôle clef dans la transition inflammation-cancer.

Ensuite, nous avons utilisé ce modèle pour rechercher par bioguidage des produits naturels capables de cibler la voie de survie GSK3 β dépendante de PAR₂, à partir de l'extrait méthanolique des fleurs de *D. harra*.

Nous avons montré qu'une fraction enrichie en flavonoïdes isolé à partir de *D. harra* a présenté un effet cytotoxique des cellules intestinales inflammatoires et cancéreuses. Cette cytotoxicité est corrélée à une inhibition de GSK3 β par une activation de la voie PKC. Ces résultats ont orienté nos travaux vers la purification et l'identification des produits qui pourraient être responsables de cette activité. Ainsi, l'isorhamnétin-3,7-di-O-glucoside pourrait être impliqué dans l'effet cytotoxique des fleurs de *D. harra* qui pourrait dépendre de son activité inhibitrice sur GSK3 β . Par comparaison avec l'isorhamnétin-3-O-glucoside, l'activité issue du diglucoside est expliquée par la présence de deux groupements glucose et la fixation du deuxième glucose en position 7.

En perspectives, nos résultats préliminaires montrent que de nombreux extraits et fractions des espèces *D. harra* et *D. simplex* témoignent d'activités antibactériennes et antioxydantes *in vitro*. Ces résultats feront l'objet de futurs travaux visant la possibilité d'isoler de nouveaux principes actifs. De plus, nous envisageons d'étudier l'impact d'un traitement par l'isorhamnétin-3,7-di-O-glucoside sur la carcinogenèse colique, *in vivo*.

Références bibliographiques

- [1] Tackholm V. **1974**. Students Flora of Egypt 2nd Edition. The Cooperative Printing Company, Cairo, Egypt; 170-171.
- [2] Boulos L. **1999**. Flora of Egypt Check-list. Al-Hadara Publishing Co, Cairo, Egypt; 419-420.
- [3] Jahangir M, Abdel-Farid IB, Kim HK, Choi YH & Verpoorte R. **2009**. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environ. Exp. Bot* 67: 23-33.
- [4] Rizk AM **1986**. The Phytochemistry of the Flora of Qatar. Scientific and applied research center, University of Qatar, Qatar; 582.
- [5] Padulosi S & Pignone D (Eds.). **1996**. Rocket: A Mediterranean crop for the world. Report of a workshop, Legnaro (Padova), Italy.
- [6] Pignone D. **1997**. Present status of rocket genetic resources and conservation activities. In: Padulosi S & Pignone D, Eds., Rocket: A Mediterranean Crop for the World. IPGRI, Rome: 2-12.
- [7] Pimpini F & Enzo M. **1997**. Present status and prospects for rocket cultivation in the Veneto region. In: Padulosi S & Pignone D., Eds., Rocket: a Mediterranean Crop for the World. IPGRI, Rome: 51-66.
- [8] Sans FX & Masalles RM. **1994**. Life-history variation in the annual arable weed *Diplotaxis erucoides* (Cruciferae). *Can J Bot* 72: 10-19.
- [9] Seringe N.C. **1845**. Flore des jardins et des grandes cultures. Tome I: 519.
- [10] Akrouit A, El Jani H, Zammouri T, Mighri H & Neffati M. **2010**. Phytochemical screening and mineral contents of annual plants growing wild in the southern of Tunisia. *J. Phytol* 2(1): 34-40.
- [11] Le floch É, Boulos L & Véla E. **2010**. Catalogue synonymique commenté de la flore de Tunisie, Tunis, Ministère de l'Environnement et du Développement durable: 143.
- [12] Chaieb M & Boukhris M. **1998**. Flore succinte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie: 76.
- [13] Sanchez-Yelamo MD. **1994**. A chemosystematic survey of flavonoids in the Brassicaceae: *Diplotaxis*. *Bot. J. Linn. Soc* 115: 9-18.
- [14] Jdir H, Khemakhamb B, Chakroun M, Zouaric S, Ben Ali Y & Zouari N. **2015**.

Diplotaxis simplex suppresses postprandial hyperglycemia in mice by inhibiting key-enzymes linked to type 2 diabetes. *Rev. bras. farmacogn* 25:152-157.

- [15] Zouari N. **2015**. Eating Wild Edible Plants Can Be A Good Alternative? *Med Aromat Plants*. doi: 10.4172/2167-0412.S1-e001.
- [16] Oueslati S, Ellili A, Legault J, Pichette A, Ksouri R, Lachaal M & Karray-Bouraoui N. **2015**. Phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of Tunisian *Diplotaxis simplex* (*Brassicaceae*). *Nat. Prod. Res* 29(12):1189-1191.
- [17] Bahloul N, Bellili S, Aazza S, Chérif A, Faleiro ML, Antunes MD, Miguel MG & Mnif W. **2016**. Aqueous Extracts from Tunisian *Diplotaxis*: Phenol Content, Antioxidant and Anti-Acetylcholinesterase Activities, and Impact of Exposure to Simulated Gastrointestinal Fluids. *Antioxidants* 5:12.
- [18] Anonymous. **2005**. A guide to Medicinal Plants in North Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain.109-110.
- [19] Warwick SI, Black LD & Aguinagalde I. **1992**. Molecular systematics of Brassica and allied genera (subtribe Brassicinae, Brassicaceae)-chloroplast DNA variation in the genus *Diplotaxis*. *Theor. Appl. Genet* 83: 839-850.
- [20] Hashem FA & Saleh MM. **1999**. Antimicrobial Components of Some *Cruciferae* Plants (*Diplotaxis harra* Forsk. and *Erucaria microcarpa* Boiss.). *Phytother. Res* 13: 329-332.
- [21] Atta EM, Hashem AI, Ahmed AM, Elqosy SM, Jaspars M & El-Sharkaw ER. **2011**. Phytochemical studies on *Diplotaxis harra* growing in Sinai. *Eur J Chem* 2(4): 535-538.
- [22] Mohammed MMD, El-Sharkawy ER & Matloub AA. **2013**. Cytotoxic flavonoids from *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. growing in Sinai. *J. Med. Plants Res* 7(1): 19-23.
- [23] Falleh H, Msilini N, Oueslati S, Ksouri R, Magne C, Lachaal M & Karray-Bouraoui N. **2013**. *Diplotaxis harra* and *Diplotaxis simplex* organs: Assessment of phenolics and biological activities before and after fractionation. *Ind Crops Prod* 45: 141-147.
- [24] Kassem MES, Afifi MS, Marzouk MM & Mostafa MA. **2013**. Two new flavonol glycosides and biological activities of *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. *Nat. Prod. Res* 27(24):2272-2280.
- [25] Bellakhdar J. **1997**. La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Ibis Press* 764.

- [26] Hartwell JL. **1982**. Plants used against cancer: a survey. Lawrence. Mass: Quarterman Publications.
- [27] Shabana MM, Aboutable EA, Mirhom YW, Genenah AA, Atef M, Youssef SA & Shalaby H. **1986**. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ* 48:321-422.
- [28] Bruneton J. **2016**. Tec & Doc Lavoisier; 5^o Édition. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 719-722.
- [29] Bruneton J. **1999**. Tec & Doc Lavoisier; Édition. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. 483-578.
- [30] Couic-Marinier F & Lobstein A. **2013**. Composition chimique des huiles essentielles. *Actual Pharm* 52(525):22-25.
- [31] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D & Idaomar M. **2008**. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol* 46(2):446-475.
- [32] Iranshahi M. **2012**. A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods. *J. Essent. Oil Res* 24(4):393-434.
- [33] Zambonelli A, Zechini D'Aulerio A, Severi A, Benvenuti S, Maggi L & Bianchi A. **2004**. Chemical Composition and Fungicidal Activity of Commercial Essential Oils of *Thymus vulgaris* L. *J. Essent. Oil Res* 16(1):69-74.
- [34] Kamatou, GPP & Viljoen AM. **2010**. A review of the application and pharmacological properties of α - bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *J. Am. Oil Chem. Soc* 87:1-7.
- [35] Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP & Roelink H. **1998**. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125(18):3553-3562.
- [36] Stechishin OD, Luchman HA, Ruan Y, Blough MD, Nguyen SA, Kelly JJ, Cairncross JG & Weiss S. **2013**. On-target JAK2/STAT3 inhibition slows disease progression in orthotopic xenografts of human glioblastoma brain tumor stem cells. *Neuro Oncol* 15(2):198-207.
- [37] Bagli E, Stefaniotou M, Morbidelli L, Ziche M, Psillas K, Murphy C & Fotsis T. **2004**. Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity. *Cancer Res* 64(21):7936-7946.

- [38] Grandage VL, Gale RE, Linch DC & Khwaja A. **2005**. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia* 19:586-594.
- [39] Ricciardi MR, McQueen T, Chism D, Milella M, Estey E, Kaldjian E, Sebolt-Leopold J, Konopleva M & Andreeff M. **2005**. Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19:1543-1549.
- [40] Pistollato F, Giampieri F & Battino M. **2015**. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food Chem Toxicol* 75:58-70.
- [41] Visvader JE. **2011**. Cells of origin in cancer. *Nature* 469:314-322.
- [42] Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, Chung CH & Lu B. **2011**. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol* 2011:941876.
- [43] Rojo AI, Sagarra MR & Cuadrado A. **2008**. GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* 105(1):192-202.
- [44] Hofmann C, Dunger N, Schölmerich J, Falk W & Obermeier F. **2010**. Glycogen synthase kinase 3- β : A master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 16(11):1850-1858.
- [45] Jacobs KM, Bhave SR, Ferraro DJ, Jaboin JJ, DE. Hallahan DE & Thotala D. **2012**. GSK-3beta: A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. *Int J Cell Biol* 2012:930710.
- [46] De Toni F, Racaud-Sultan C, Chicanne G, Mas VM, Cariven C, Mesange F, Salles JP, Demur C, Allouche M, Payrastra B, Manenti S & Ysebaert L. **2006**. A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia. *Oncogene* 25:3113-3122.
- [47] Bertrand J, Despeaux M, Joly S, Bourogaa E, Gallay N, Demur C, Bonneville P, Louache F, Maguer-Satta V, Vergnolle N, Payrastra B & Racaud-Sultan C. **2011**. Sex differences in the GSK3b-mediated survival of adherent leukemic progenitors. *Oncogene* 31:694-705.
- [48] Yeung J, Esposito MT, Gandillet A, Zeisig BB, Griessinger E, Bonnet D & So CW. **2010**. β -Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem

cells. *Cancer Cell* 18(6):606-618.

- [49] Merhi M, Demur C, Racaud-Sultan C, Bertrand J, Canlet C, Estradaa FB & Gamet-Payrastre L. **2010**. Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. *Toxicology* 267(1-3):80-90.
- [50] Ougolkov AV, Bone ND, Fernandez-Zapico ME, Kay NE & Billadeau DD. **2007**. Inhibition of GSK-3 activity leads to epigenetic silencing of NF-kappa B target genes and induction of apoptosis in CLL B-cells. *Blood* 110:735-742.
- [51] Ghédira K. **2005**. *Phytothérapie* 4:162-169.
- [52] Crozier A. **2003**. Classification and Biosynthesis of Secondary Plant Products: an overview. In: Goldberg (ed.). *Plants: Diet and Health* 27-48.
- [53] Mabry TJ, Markham KR & Thomas MB. **1970**. The systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York.
- [54] Markham KR, Mabry TJ & Mabry HE. **1975**. The Flavonoids. Chapman & Hall, London.
- [55] Harbone JB & Mabry TJ. **1982**. The Flavonoids Advances in Research. Chapman & Hall, London.
- [56] Bourogaa E, Bertrand J, Despeaux M, Jarraya R, Fabre N, Payrastre L, Demur C, Fournié JJ, Damak M, El Feki A & Racaud-Sultan C. **2011**. *Hammada scoparia* flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. *Leuk. Res* 35(8):1093-1101.
- [57] Johnson JL, Rupasinghe SG, Stefani F, Schuler MA & Gonzalez de Mejia E. **2011**. Citrus flavonoids luteolin, apigenin, and quercetin inhibit glycogen synthase kinase-3 β enzymatic activity by lowering the interaction energy within the binding cavity. *J Med Food* 14(4):325-333.
- [58] Vergnolle N. **2009**. Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol. Ther* 123:292–309.
- [59] Paradkar PN, Blum PS, Berhow MA, Baumann H & Kuo SM. **2004**. Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced inflammatory reaction in liver and intestine. *Cancer Lett* 215(1):21-28.
- [60] Shan BE, Wang MX & Li RQ. **2009**. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer

growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Invest* 27(6):604-612.

- [61] Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK & Yang CH. **2005**. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 4;328(1):227-234.
- [62] Gossé F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A, Fischer B, Seiler N & Raul F. **2005**. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26:1291-1295.
- [63] Harborne JB. **1998**. *Phytochemical Methods: A guide to Modern Techniques of Plant Analysis* 3rd ed. New York: Chapman. Hall. Int. Ed 234-245.
- [64] Singleton VL & Ross JA. **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic* 16:144.
- [65] Akrouit A, Gonzalez AL, Jani EJ & Madrid CP. **2011**. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food Chem. Toxicol* 49:342-347.
- [66] Tagg JR & McGiven AR. **1971**. Assay system for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol* 21:943-947.
- [67] Eloff JN. **1988**. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64:711-713.
- [68] Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer KL, Baldus SE, Huckenbeck W, Piekorz RP, Knoefel WT, Krieg A & Stoecklein NH. **2013**. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One* 8: e59689.
- [69] Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brik S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD & Clevers H. **2011**. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141:1762-1772.
- [70] Van Landeghem L, Santoro MA, Krebs AE, Mah AT, Dehmer JJ, Gracz AD, Scull BP, McNaughton K, Magness ST & Lund PK. **2012**. Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G1111-1132.

- [71] Fenwick GR, Heaney RK & Mullin WJ. **1983**. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 18(2):123-201.
- [72] Miyazawa M, Maehara T & Kurose K. **2002**. Composition of the essential oil from the leaves of *Eruca sativa*. *Flavour Fragr* 17:187-190.
- [73] Jang HW, Moon JK & Shibamoto T. **2015**. Analysis and Antioxidant Activity of Extracts from Broccoli (*Brassica oleracea L.*) Sprouts. *J. Agric Food Chem* 63:1169-1174.
- [74] Nasri I, Bonnet D, Zwarycz B, D'Aldebert E, Khou S, Mezghani-Jarraya R, Quaranta M, Rolland C, Bonnart C, Mas E, Ferrand A, Cenac N, Magness S, Van Landeghem L, Vergnolle N, Racaud-Sultan C. **2016**. PAR2-dependent activation of GSK3 β regulates the survival of colon stem/progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311. G221-G236.
- [75] Whittle BJ, Varga C, Posa A, Molnar A, Collin M & Thiemermann C. **2006**. Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *Br J Pharmacol* 147:575-582.
- [76] Wang HL, Hart J, Fan L, Mustafi R & Bissonnette M. **2011**. Upregulation of glycogen synthase kinase 3 β in human colorectal adenocarcinomas correlates with accumulation of CTNNB1. *Clin Colorectal Cancer* 1;10(1):30-36.
- [77] Grassilli E, Narloch R, Federzoni E, Ianzano L, Pisano F, Giovannoni R, Romano G, Masiero L, Leone BE, Bonin S, Donada M, Stanta G, Helin K & Lavitrano M. **2013**. Inhibition of GSK3B bypass drug resistance of p53-null colon carcinomas by enabling necroptosis in response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 19:3820-3831.
- [78] Mousa SA, Sudha T, Dyskin E, Dier U, Gallati C, Hanco C, Chittur SV & Rebbaa A. **2010**. Stress resistant human embryonic stem cells as a potential source for the identification of novel cancer stem cell markers. *Cancer Lett* 289(2):208-216.
- [79] Li L & Bhatia R. **2011**. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res* 17:4936-4941.
- [80] Russo R, Bonaventura R, Zito F, Schröder HC, Müller I, Müller WE & Matranga V. **2003**. Stress to cadmium monitored by metallothionein in gene induction in *Paracentrotus lividus* embryos. *Cell Stress Chaperones* 8(3):232-241.
- [81] Wang JQ, Liu X, Zhang G, Parelkar NK, Arora A, Haines M, Fibuch EE & Mao L. **2006**. Phosphorylation of glutamate receptors: a potential mechanism for the regulation of receptor function and psychostimulant action. *J. Neurosci. Res* 84:1621-1629

- [82] Ferreres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A. **2004**. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39(3):312-321.
- [83] Truchado P, Tourn E, Gallez LM, Moreno DA, Ferreres F & Tomás-Barberán FA. **2010**. Identification of botanical biomarkers in Argentinean *Diplotaxis* honeys: flavonoids and glucosinolates. *J Agric Food Chem* 58(24):12678-12685.
- [84] Igarashi K, Mikami T, Takahashi Y & Sato H. **2008**. Comparison of the preventive activity of isorhamnetin glycosides from atsumi-kabu (Red Turnip, *Brassica, campestris L.*) leaves on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 72 (3):856-860.
- [85] Antunes-Ricardo M, Moreno-García BE, Gutiérrez-Urbe JA, Aráiz-Hernández D, Alvarez MM & Serna-Saldivar SO. **2014**. Induction of apoptosis in colon cancer cells treated with isorhamnetin glycosides from *Opuntia ficus-indica* pads. *Plant Foods Hum Nutr* 69(4):331-336.
- [86] Imen Nasri, Rachid Chawech, Cynthia Girardi, Emmanuel Mas, Audrey Ferrand, Nathalie Vergnolle, Nicolas Fabre, Raoudha Mezghani-Jarraya, Claire Racaud-Sultan. **2016**. Anti-inflammatory and anti-cancerous effects of flavonol glycosides from *Diplotaxis harra* through GSK3 β regulation in intestinal cells. DOI: 10.1080/13880209.2016.1230877.
- [87] MARKHAM K R. **1982**. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London.
- [88] Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, Wang D, Han J, Yu Z & Yang F. **2010**. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules* 15:7933-7945.
- [89] Kim HY, Lee JM, Yokozawa T, Sakata K & Lee S. **2010**. Protective activity of flavonoid and flavonoid glycosides against glucose-mediated protein damage. *Food chem* 126:892-895.
- [90] Singleton VL & Ross JA. **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic* 116:144.
- [91] Velioglu YS, Mazza G, GAO L & Oomah BD. **1998**. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem* 46:4113-4117.

Publications

PAR₂-dependent activation of GSK3 β regulates the survival of colon stem/progenitor cells

Imen Nasri,^{1,2*} Delphine Bonnet,^{1,3*} Bailey Zwarycz,⁴ Emilie d'Aldebert,¹ Sokchea Khou,¹ Raoudha Mezghani-Jarraya,² Muriel Quaranta,¹ Corinne Rolland,¹ Chrystelle Bonnart,¹ Emmanuel Mas,^{1,5} Audrey Ferrand,¹ Nicolas Cenac,¹ Scott Magness,⁴ Laurianne Van Landeghem,⁶ Nathalie Vergnolle,¹ and Claire Racaud-Sultan¹

¹Institut de Recherche en Santé Digestive, Université de Toulouse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut National de la Recherche Agronomique, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; ²Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, Sfax, Tunisia; ³Service de Médecine Interne, Fédération Digestive, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France; ⁴Departments of Medicine and Cell Biology & Physiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina; ⁵Service de Gastroentérologie, Hépatologie et Nutrition, Hôpital des Enfants, Toulouse, France; and ⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U913, Université de Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

Submitted 18 September 2015; accepted in final form 16 May 2016

Nasri I, Bonnet D, Zwarycz B, d'Aldebert E, Khou S, Mezghani-Jarraya R, Quaranta M, Rolland C, Bonnart C, Mas E, Ferrand A, Cenac N, Magness S, Van Landeghem L, Vergnolle N, Racaud-Sultan C. PAR₂-dependent activation of GSK3 β regulates the survival of colon stem/progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311: G221–G236, 2016. First published June 16, 2016; doi:10.1152/ajpgi.00328.2015.—Protease-activated receptors PAR₁ and PAR₂ play an important role in the control of epithelial cell proliferation and migration. However, the survival of normal and tumor intestinal stem/progenitor cells promoted by proinflammatory mediators may be critical in oncogenesis. The glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) pathway is overactivated in colon cancer cells and promotes their survival and drug resistance. We thus aimed to determine PAR₁ and PAR₂ effects on normal and tumor intestinal stem/progenitor cells and whether they involved GSK3 β . First, PAR₁ and PAR₂ were identified in colon stem/progenitor cells by immunofluorescence. In three-dimensional cultures of murine crypt units or single tumor Caco-2 cells, PAR₂ activation decreased numbers and size of normal or cancerous spheroids, and PAR₂-deficient spheroids showed increased proliferation, indicating that PAR₂ represses proliferation. PAR₂-stimulated normal cells were more resistant to stress (serum starvation or spheroid passaging), suggesting prosurvival effects of PAR₂. Accordingly, active caspase-3 was strongly increased in PAR₂-deficient normal spheroids. PAR₂ but not PAR₁ triggered GSK3 β activation through serine-9 dephosphorylation in normal and tumor cells. The PAR₂-triggered GSK3 β activation implicates an arrestin/PP2A/GSK3 β complex that is dependent on the Rho kinase activity. Loss of PAR₂ was associated with high levels of GSK3 β nonactive form, strengthening the role of PAR₂ in GSK3 β activation. GSK3 pharmacological inhibition impaired the survival of PAR₂-stimulated spheroids and serum-starved cells. Altogether our data identify PAR₂/GSK3 β as a novel pathway that plays a critical role in the regulation of stem/progenitor cell survival and proliferation in normal colon crypts and colon cancer.

colorectal cancer; glycogen synthase kinase-3 β ; protease-activated receptor; inflammation; spheroid

CURRENT VIEWS SUGGEST THAT acute or chronic stress, such as inflammation, may induce a switch in intestinal stem cells and progenitors (i.e., primitive cells) toward an oncogenic phenotype characterized by unregulated growth and resistance to apoptosis (58). Patients with inflammatory bowel disease (IBD) have higher risk to develop colorectal cancer (CRC) within their lifetime. Probably associated with a genetic predisposition (55), inflammation is a major driver of colitis-associated CRC whose specific mechanisms are not well understood.

In the intestinal epithelium, protease-activated receptors (PARs) that belong to the G protein-coupled receptor family have been shown to regulate cell survival and proliferation (57). PARs are cleaved by proteases leading to new PAR amino-terminus exposure that can bind intramolecularly and activate the receptor. Once activated, PARs trigger multiple signaling pathways through intracellular coupling to specific G protein subunits and to signal modulating proteins such as β -arrestin. Expression of PAR₁ and PAR₂ is increased in IBD (57) and CRC (10, 65). Also, IBD- and CRC-derived tissues exhibit increased proteolytic activities of proteases such as thrombin and matrix metalloprotease 1 that activate PAR₁ and trypsin-like serine proteases, tissue factor, and matriptase, which activate PAR₂ (9, 47). PAR₁ and PAR₂ are coexpressed in tumor cells, and they both promote IBD (23) and cancer progression (54). Nevertheless, whether PAR₁ and/or PAR₂ affect normal and tumor colon stem/progenitor cell proliferation and survival is not defined yet.

Most patients with IBD who develop CRC have quiescent chronic inflammation associated with reepithelialization of colonic mucosa by abnormal clones giving multifocal dysplasia. Thus the survival of primitive intestinal epithelial cells promoted by proinflammatory mediators is critical in oncogenesis (19, 45). In nonintestinal cells, PAR₂ has been shown to promote cell survival upon stress or inflammation (39, 42). In CRC, PAR₂ activation is also protective (7, 24). PAR₁ activation enhances cell survival of melanoma and breast cancer cells (38, 46). Both protease receptors regulate prosurvival pathways such as ERK, Akt, and NF- κ B, but the final cell death or survival depends on the cell type, the amplitude, and duration

* I. Nasri and D. Bonnet contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Racaud-Sultan, IRSD, CHU Purpan, place du Dr Baylac, 31024 Toulouse cedex 3, France (e-mail: claire.racaud@inserm.fr).

of agonist exposure and the biased agonism (35, 68). Furthermore, the cross talk between PAR₁ and PAR₂, or between PARs and the epidermal growth factor (EGF) receptor or integrins, could have distinct regulatory functions on cell survival and proliferation (1, 37).

Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) is a major serine-threonine kinase at the crossroad of metabolic, survival, and proliferation pathways that has been implicated in inflammation and malignant transformation (61, 66). It is a regulator of NF- κ B and signal transducer and activator of transcription (Stat)-3, which play key roles in driving normal cells to an oncogenic phenotype (5, 50). Also, GSK3 β regulates the Wnt pathway, a major player in the CRC process, as well as epigenetic changes involved in intestinal wound healing (27, 41). In CRC, GSK3 β is overexpressed and overactivated (60), controlling cell survival and therapeutic response (17, 18, 36), as we have previously shown in leukemia (4, 13, 14). However, how GSK3 β is regulated in intestinal stem/progenitor cells and whether it could participate in PAR-dependent cell survival remains unknown.

We have previously shown that $\alpha_5\beta_1$ -integrins can trigger GSK3 β activation in leukemic progenitors through a RACK1-PP2A pathway (4, 14). In these conditions, GSK3 β is activated through serine-9 dephosphorylation either directly by PP2A or secondary to PP2A-induced inhibition of Akt. Indeed, in leukemic progenitors, we found a clear correlation between non-active Akt (Akt dephosphorylated at serine-473) and its active substrate GSK3 β (GSK3 β dephosphorylated at serine-9) (6). It is unknown if other receptors than integrins, and specifically PAR₁ and PAR₂, activate GSK3 β in stem/progenitor cells to favor their survival and potentially their malignant transformation.

Based on these considerations, our study aimed to determine whether PAR₁ and/or PAR₂ regulate normal and tumor colon stem/progenitor cell survival and ability to grow in three-dimensional (3D) spheres and whether this is mediated by GSK3 β activation. We used different models [normal or cancer cells, 2-dimensional (2D) or 3D cultures] to investigate whether the PAR-GSK3 β relationship could be linked to the malignant transformation or to the adhesion of colon epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Human samples. Patients were included in the registered MICILIP study (Clinical trials no. NCT01990716) and gave written informed consent. The protocol was approved by the local ethic committee from Toulouse, France (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre-mer).

Animal samples. Animal samples complied with protocol agreement 12-U1043-NV-11, approved by the local ethic committee from Toulouse, France (animal care committee CEEA-122).

Antibodies and Pharmacological Inhibitors

Monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies were as follows: phospho (P)-Tyr^{216/279}GSK3 clone 5G-2F, P-Ser⁹GSK3 β clone EPR2286Y (Merck Millipore, Molsheim, France); GSK3 β clone 7, cleaved PARP clone F21-852 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France); CD44 clone IM7 (Biolegend, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France); PAR₂ clone SAM11 (LSBio, Clinisciences, Nanterre, France), 647-conjugated IgG Fc γ 2a secondary antibody (Jackson

ImmunoResearch, Suffolk, UK); GSK3 α/β mAb5676, β -arrestin 2 clone C16D9, Akt clone 11E7, P-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ p44/42 MAPK (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France); Ki-67 clone SP6 (Abcam, Paris, France); and P-Tyr³⁰⁷PP2A (Epitomics).

Polyclonal antibodies. Rabbit PAR₂ antibody and Akt antibody were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX); rabbit PAR₁, active caspase-3, and actin antibodies were from Abcam (Paris, France); P-Ser^{9/21}GSK3, P-Ser⁴⁷³Akt, p44/42 MAPK, and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France); PP2A was from Upstate Biotechnology, Millipore; and Alexa488/Alexa555/Alexa680-conjugated secondary antibodies were from Invitrogen Molecular Probes Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France).

Pharmacological inhibitors. SB-216763 and 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) were from Tocris Bioscience (R&D Systems, Lille, France). Rho kinase inhibitor Y-27632 was from Sigma.

Animals

C57BL/6 male mice (6 wk old) were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). C57BL/6 male mice deficient for PAR₂ were from the group of Lindner et al. (33). In some experiments, C57BL/6 wild-type (WT) and PAR₂ knockout (KO) littermate male mice were used (Animal facilities, Anexplo platform; UMS US006/INSERM, Toulouse, France). Animals were maintained in ventilated cages (4 mice/cage) in a specific pathogen-free room at 20–24°C and relative humidity (40–70%) with a 12:12-h light-dark cycle and given free access to food and water. In total 60 mice were included in this study. All animal experiments were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of the European Council and were reported in accordance with the ARRIVE guidelines (29). Animals were killed for abdominal laparotomy and colon sampling by a lethal overdose of intraperitoneal pentobarbital followed by cervical dislocation.

Colons from Sox9-green fluorescent protein (GFP) or Lgr5-GFP mice were from the University of North Carolina (44, 56, 59).

Cells

IEC-6 (ATCC-CRL-1592) and Caco-2 (ATCC-HTB-37; LGC Standards authentication certificate) cell lines (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France) and CMT93 (ATCC-CCL-223) were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM catalog no. 31966 with Glutamax and 1 mM sodium pyruvate) supplemented with 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS) without complement. Caco-2 culture medium was supplemented by 1% nonessential amino acids. All cell culture reagents were from Invitrogen.

Both IEC-6 and Caco-2 cell lines were cultured at 37°C and 5% CO₂ until reaching 90% confluence, and medium was changed every 2 days. Tests to rule out the presence of mycoplasma contamination were performed. Cells were used for experiments before fourth passage after thawing (culture duration = 1 mo with passage each week). In those culture conditions, IEC-6 and Caco-2 cells were undifferentiated (11, 64).

CMT93 cell line deficient for PAR₂ was generated using Crispr/Cas9 technology. CMT93 was electroporated with mouse PAR₂ Crispr/Cas9 plasmid (ref. no. sc 420265; Santa Cruz). Transfected cells were sorted by fluorescence-activated cell sorter to isolate GFP-positive cells, from which clonal isolation and expansion were done. Functional calcium mobilization tests were performed to validate PAR₂ deficiency in clones. Briefly, CMT93 WT or invalidated for PAR₂ were incubated with fluo 8 probe (Screen Quest Fluo-8 calcium AAT bioquest) for 30 min at 37°C and 20 min at room temperature. PAR₂ or PAR₁ agonist peptides (APs), namely SLIGRL-NH₂ or TFLLR-NH₂ (Genscript, Piscataway, NJ), were added to the cells. Immediately after, fluorescence was measured at an excitation

wavelength of 460–490 nm and emission wavelength of 515 nm. Calcium flux assays were performed in an automated plate reader (NOVOstar; BMG Labtech). Results are expressed as the $\Delta F/F$, representing the ratio of the fluorescence measurement of each recording to the baseline measurement (mean of the fluorescence intensity between 0 and 10 s).

Colonospheres and Tumor Spheroids

Colonospheres were obtained from murine crypts following the protocols previously described (48, 56). Colon crypts were isolated from the 2/3 ends of descendant colon of C57BL/6 male mice (8 wk old). The colon was opened longitudinally, washed in phosphate-buffered saline (PBS), and incubated in chelation buffer (in mM: 5.6 Na₂HPO₄, 8 KH₂PO₄, 96.2 NaCl, 1.6 KCl, 43.4 sucrose, 54.9 D-sorbitol, and 0.5 DL-1,4-dithiothreitol) plus 2 mM EDTA during 30 min under gentle rocking at 4°C. Supernatant was then removed, and colonic fragments were resuspended in cold chelation buffer by manual vigorous up and down shaking for 2 min. Supernatant was removed, and colonic fragments were further incubated in chelation buffer plus EDTA for 30 min at room temperature. Supernatant was removed, and colonic fragments resuspended in cold chelation buffer were shaken vigorously for 1 min. Supernatant containing crypts was collected through three steps of resuspension/shaking in cold chelation buffer. Crypts were pelleted (43 g, 5 min), processed for RT-PCR analysis, or resuspended in cold chelation buffer and passed through a 21-gauge needle to dissociate the bottom from the top of colon crypts. After being washed in cold chelation buffer and centrifuged at 43 g for 5 min, which allows for individual cells and small aggregates to be discarded, 1,000 bottom crypts were embedded in 25 μ l Matrigel (EHS sarcoma tumor matrix, growth factor reduced, phenol red free; BD Biosciences) and seeded in 48-well plates. Ten minutes after initiation of Matrigel polymerization at 37°C, 250 μ l DMEM F-12 supplemented with 100 U/ml penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamax, N2 (1:100), B27 (1:50) (all from Thermo Fisher Scientific) and 1 mM *N*-acetylcysteine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 100 ng/ml Wnt-3a (R&D Systems), 50 ng/ml EGF (GIBCO, Thermo Fisher Scientific), 100 ng/ml noggin (Peprotech, Neuilly sur Seine, France), and 1 μ g/ml R-spondin 1 (R&D Systems) were added.

Tumor spheroids were obtained from 1×10^4 Caco-2 cells embedded in 4 μ l Matrigel seeded on top of 20 μ l polymerized Matrigel in 48-well plates (34). Later (30 min), DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin/streptomycin, 10% FCS, and nonessential amino acids was added for culture.

In 3D culture conditions, crypt epithelial cells and Caco-2 cells maintain their undifferentiated phenotype (43, 48). Colonospheres and tumor spheroids were observed daily using an apotome microscope (HXP120; Zeiss Axio-observer) to follow their growth. After seeding (48 h), both normal and tumor 3D cultures showed round shape structures whose size increased until the 7th day where cultures were stopped or processed for passage. Medium was changed every 2 days.

For passage, colonospheres were incubated for 30 min with Cell Recovery solution (BD Transduction Laboratories, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) on ice. This step allows the dissociation of spheroids from Matrigel. Next, spheroids were gently resuspended in ice-cold BSA-coated tubes containing DMEM F-12 supplemented with HEPES, Glutamax, and penicillin/streptomycin as described above. After centrifugation (43 g, 10 min), spheroids were reembedded in Matrigel and cultured as described.

PAR Stimulation

PAR₁ and PAR₂ activation was triggered by specific APs, TFLLR and SLIGRL from Genscript, respectively. One hundred micromolar APs or their reversed sequence used as controls (Genscript or Ezbiolab, Carmel, IN), both dissolved in Hanks' balanced salt solution, were added to the colonosphere and serum-starved (24 h) tumor

spheroid cultures every day from 48 h of seeding. At *day 6*, colonospheres were counted at the microscope: around 70 colonospheres were counted in control wells. Tumor spheroids number was evaluated by both microscopy and colorimetric analysis (MTS tetrazolium compound; Promega, Madison, WI), given their high density. Spheroid counting was conducted through brightfield microscopy, and for each well of culture four quadrants were analyzed along the entire depth of the Matrigel layer. The size of colonospheres and tumor spheroids was evaluated after importation of apotome images in the Image J software: spheroids from 20 to 80 μ m were measured, and a threshold at 40 μ m was chosen to calculate variations in the different conditions of treatment. For Western blot, colonospheres from 14 wells were dissociated from Matrigel with Cell Recovery Solution at *day 6* of culture, and pooled samples were washed three times in DMEM F-12 supplemented with HEPES, Glutamax, and penicillin/streptomycin before denaturation in Laemmli sample buffer.

In 2D culture, IEC-6 and Caco-2 cells were seeded in 96-well (4×10^4 cells) and 12-well (1×10^6 cells) plates. After 24 h of serum starvation, cells were stimulated by 100 μ M (or various concentrations, as indicated) PAR₁ or PAR₂ APs, or their controls. At 1 h of PAR stimulation, 12-well plates were processed to prepare cell lysates. Briefly, after a wash in PBS, cells were scraped in cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 mM EDTA + kinase/phosphatase/protease inhibitor cocktail). Samples were then shaken for 15 min at 4°C, further sonicated, and denatured in Laemmli sample buffer. Cells from 96-well plates were incubated with MTS at 24 h of PAR stimulation, and then the estimation of surviving cells was made by spectrometry (Varioskan Flash; Thermo Fisher Scientific).

Kinase Activity

Fifteen million Caco-2 cells at 80% confluence were serum starved and stimulated by 100 μ M PAR₁ or PAR₂ APs as described above. After 1 h, cells were washed in cold PBS and scraped in cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇, 1 mM EDTA + kinase/phosphatase/protease inhibitor cocktail). After 20 min agitation on ice, lysates were centrifuged 15 min at 12,000 g at 4°C, and the supernatants were recovered for 30 min preclearing with protein G-Sepharose. Next, supernatants were incubated with 20 μ l GSK3 β antibody for 2 h at 4°C. This was followed by an incubation with 50 μ l protein G-Sepharose for 2 h at 4°C. After one wash in lysis buffer and two washes in PBS, immune complexes were resuspended in 7 μ l of kinase buffer (Omnia Ser/Thr peptide 13 Kit; Life Technologies, Saint-Aubin, France). Next, the kinase assay was performed following the protocol indicated by the Omnia kit supplier: briefly, immunoprecipitated GSK3 β (2 or 5 μ l) was incubated at 30°C with the Sox fluorophore-chelated substrate peptide in kinase reaction buffer containing ATP. Fluorescence intensity was recorded every 30 s for 60 min by measuring the absorbance at 485 nm in a 96-well plate (Varioskan, Thermo Fischer Scientific, Villebon sur Yvette, France). Equal amounts of immunoprecipitated GSK3 β from the different assays were checked by Western blot.

RNA Interference

Caco-2 cells were trypsinized and incubated with 1 μ M human PAR₂ (F2RL1) small-interfering RNA (siRNA; Accell SMARTpool siRNA; GE Dharmacon, Lafayette, CO) in DMEM without serum in 12-well plates for 72 h at 37°C. Accell nontargeting pool was used as control. After, transfected cells were trypsinized and plated in Matrigel to form spheroids in the presence of 10% FCS, or lysed for RT-PCR analysis. Spheroids were observed until the 4th day of culture by microscopy and immune labeled with anti-PAR₂, anti-P-Ser⁹GSK3 β , or anti-Ki-67 at 48 h.

RT-PCR

Total RNAs were extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) or a NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions and were reverse transcribed using the Maxima first-strand kit (Fermentas; Thermo Fisher Scientific). cDNA (50–75 ng) was used as template for amplification quantitative PCR with the following specific primers: for human PAR₂ forward 5'-CAGTGGCACCATCCAAGGA-3' and reverse 5'-TGTGCCATCAACCTTACCAATAA-3', for human PAR₁ forward 5'-GCGGCCCGCTGTTGT-3' and reverse 5'-ATCTAAGGTGGCATTGTTGCTTT-3', for human/mouse hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (reference gene) forward 5'-TGGGAGGCCATCACATTGT-3' and reverse 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA-3', for mouse dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) forward 5'-GTTCTACCTGGAAGGTGGCT-3' and reverse 5'-TCCGTTGCACTATTGGGGTC-3'. Quantitative PCR was prepared with LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master reaction mix (Roche, Mannheim, Germany) and run in duplicate on a LightCycler 480 Instrument (Roche).

Immunoprecipitation and Western Blotting

CMT93 WT and CMT93 PAR₂ KO at confluence in 75-cm² flasks (10 × 10⁶ cells) were serum starved for 24 h and then stimulated for 1 h by 100 μM PAR₂ AP. After two washes in cold PBS plus Ca²⁺/Mg²⁺, cells were scraped in cold lysis buffer: 50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, antiprotease cocktail (Roche), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM EDTA. After 20 min of incubation on ice, samples were centrifuged at 12,000 g for 15 min, 4°C. An aliquot of supernatant was reserved for total lysate control, and preclearing with protein A-Sepharose was processed before overnight incubation at 4°C with β-arrestin 2 (clone C16D9) or Akt (clone 11E7) antibodies. Next, protein A-Sepharose was added to samples for 2 h at 4°C under gentle agitation. After centrifugation, an aliquot of the supernatant was reserved for immunoprecipitation supernatant control, and, after one wash in cold lysis buffer and two washes in cold PBS, Laemmli sample buffer was added.

After sonication and boiling for 10 min, proteins were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (membrane Hybond C-super; Merck Millipore). The membrane was blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffer saline (TBS) containing 0.5% fat-free milk and bovine serum albumin (BSA; Sigma). Next, membranes were probed overnight at 4°C with the appropriate antibodies in TBS-milk-BSA supplemented with 0.05% Tween. After incubation for 1 h at room temperature with either anti-mouse or anti-rabbit IgG antibody coupled to horseradish peroxidase, detection was achieved using a chemiluminescent substrate (SuperSignal; Amersham Pharmacia Biotech).

Immunostaining

Human samples of colon mucosae were obtained from patients undergoing a surgical resection for colon cancer or diverticulosis at Toulouse University Hospital, France. Samples were collected away from the tumor or diverticulosis, in normal area.

Histological sections from frozen mice (male C57BL/6, 8 wk) or human colons in optimum-cutting temperature compound were prepared. Tissues were fixed with 4% formaldehyde. After three washes (3 × 10 min) in PBS plus 0.5% Triton X-100 and 1% BSA, slides were incubated overnight in a humid chamber with primary antibodies in PBS-Triton X-100-BSA. After three washes in PBS-Triton X-100-BSA, slides were then incubated with appropriate secondary fluorescent-coupled antibodies for 2 h at room temperature. Slides were finally washed three times in PBS, mounted in Prolong Gold-DAPI (Invitrogen Molecular Probes), and analyzed by confocal laser scanning

using Zeiss LSM710 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Germany).

For immunocytochemistry, spheroids (colonospheres and tumor spheroids) were seeded in an eight-well Lab-Tek (Thermo Fisher Scientific). Spheroid culture conditions were as described above for 48-well plate seeding. Spheroids were fixed in 2% paraformaldehyde (20 min), washed three times in PBS (15 min), and then permeabilized in PBS plus 0.5% Triton X-100 (20 min). After two washes in PBS plus 100 mM glycine (20 min), blocking solution (7.7 mM Na₂S₂O₈, 1% BSA, 0.2% Triton X-100, and 0.05% Tween 20, in PBS) was added for 90 min. Primary antibody was incubated overnight at 4°C. After three washes in blocking solution (15 min), secondary antibody was incubated for 45 min. Next, after washes in PBS, slides were mounted in ProGold DAPI and observed by confocal laser scanning (Zeiss LSM710). Actin staining was performed by adding Acti-stain 670 (Cytoskeleton) for 30 min followed by three washes in PBS before mounting.

For each staining, controls were made in the same conditions with no antibody, secondary antibody only, mouse IgG_{2a} isotype control (BD), or preimmune rabbit serum in conjunction with secondary antibodies, as well as staining in PAR₂ KO tissue. Of note, comparison of Ki-67 staining between WT and PAR₂ KO colons was from littermate mice.

Statistical Analysis and Image Processing

Student's *t*-test was used for experiment analysis. Time-lapse image stacks from Apotome and confocal images were imported in Image J software for analysis.

RESULTS

PAR₁ and PAR₂ Are Expressed in Colon Stem/Progenitor Cells

We first investigated PAR expression in colon epithelial stem and progenitor cells. In human and mouse colons, PAR₁ and PAR₂ expression was detected in the entire crypt, including at the crypt bottom within the stem/progenitor cell zone immunoreactive for the cell adhesion receptor CD44 (Fig. 1A). Furthermore, PAR₁ and PAR₂ were expressed in Sox9-EGFP- and Lgr5-EGFP-positive cells that were shown to correspond to multipotent self-renewing stem cells (3, 44) (Fig. 1B). Localization analysis shows that PAR₁ and PAR₂ are mainly in apical location in cells of the crypt surface and in the basolateral position in bottom cells (Fig. 1C).

To investigate whether PAR₁ and PAR₂ have similar or distinct regulatory effects in normal and tumor epithelial stem/progenitor cells, we used two different 3D Matrigel-based culture systems that are more relevant than 2D cultures to study stem cell-related functions (51, 67). The first one corresponds to *ex vivo* 3D culture of crypt bottoms of murine normal/healthy colon that grow into multicellular structures called colonospheres and originate from stem/progenitor cell survival and expansion. The second model corresponds to *in vitro* 3D culture of dissociated single CRC Caco-2 cells whose fraction with stem cell-like abilities grows into multicellular structures that we will term here tumor spheroids. Confocal analysis showed that PAR₁ and PAR₂ are expressed in both colonospheres and Caco-2-derived tumor spheroids (Fig. 2A). Interestingly, PAR₁ and PAR₂ were also found mostly in basolateral location in spheroids (Fig. 2B).

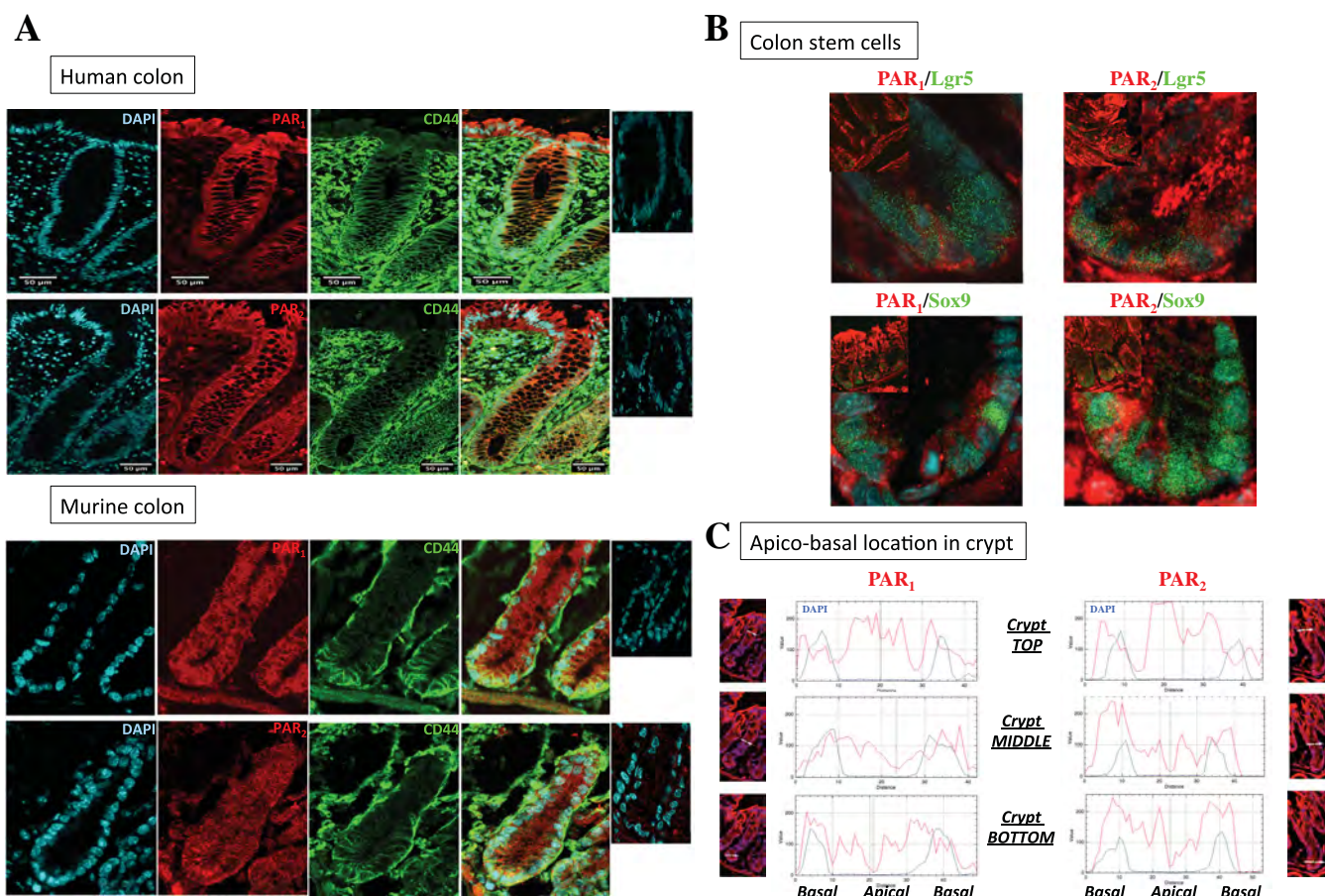


Fig. 1. Protease-activated receptors PAR₁ and PAR₂ are expressed in colon primitive cells. Histological sections of human or murine colon were labeled with PAR₁, PAR₂, or immaturity marker CD44 antibodies and analyzed by confocal microscopy. **A:** expression of PAR₁ and PAR₂ (red) and CD44 (green) in human and murine colonic crypts. Controls [preimmune serum, isotype monoclonal, and PAR₂ knockout (KO) tissue] are shown. Human and murine data are representative of assays from 8 individuals and 3 mice. **B:** $\times 20$ and $\times 63$ views of crypts from Sox9-green fluorescent protein (GFP) and Lgr5-GFP mice. Stem cell markers (Sox9 and Lgr5) are labeled in green, and PARs are labeled in red. Data are representative of 2 mice of each transgenic phenotype. **C:** apico-basal location of PARs along the crypt (*top*, *middle*, and *bottom*, white arrows) was analyzed by Image J software (Stack RGB images). A representative label profiling of PAR₁ and PAR₂ is shown ($n = 3$ independent experiments). Three individual crypts were analyzed in each experiment. For each crypt, four cells were analyzed at either bottom, middle, or top levels. Nuclear DNA staining with DAPI is shown in all panels.

PAR₂ Specifically Inhibits Colonosphere and Tumor Spheroid Growth

To study the impact of PAR activation on normal and tumor colon epithelial stem/progenitor cell function, PAR₁ and PAR₂ APs or control peptides were added daily from *day 2* to *day 6* of 3D cultures. Number and size of both colonospheres and tumor spheroids treated with PAR₂ agonist were decreased compared with controls (Fig. 3, *top* and *bottom*). By contrast, when treated with PAR₁ AP, 3D structures were larger and the number of PAR₁-stimulated colonospheres or tumor spheroids was increased compared with controls (Fig. 3, *top* and *bottom*). These data suggest that PAR₁ and PAR₂ oppositely impact the growth of normal and tumor colon stem/progenitor cells.

PAR₂ effects on colon epithelial cell proliferation were further assessed in colonospheres grown from PAR₂-deficient (PAR₂ KO) mice and in tumor spheroids from Caco-2 cells treated with siRNA targeting PAR₂ (80% decrease of mRNA expression; Fig. 4A). Importantly, expression of PAR₁ remains stable after PAR₂ knockdown (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, the number of Ki-67-positive cells was

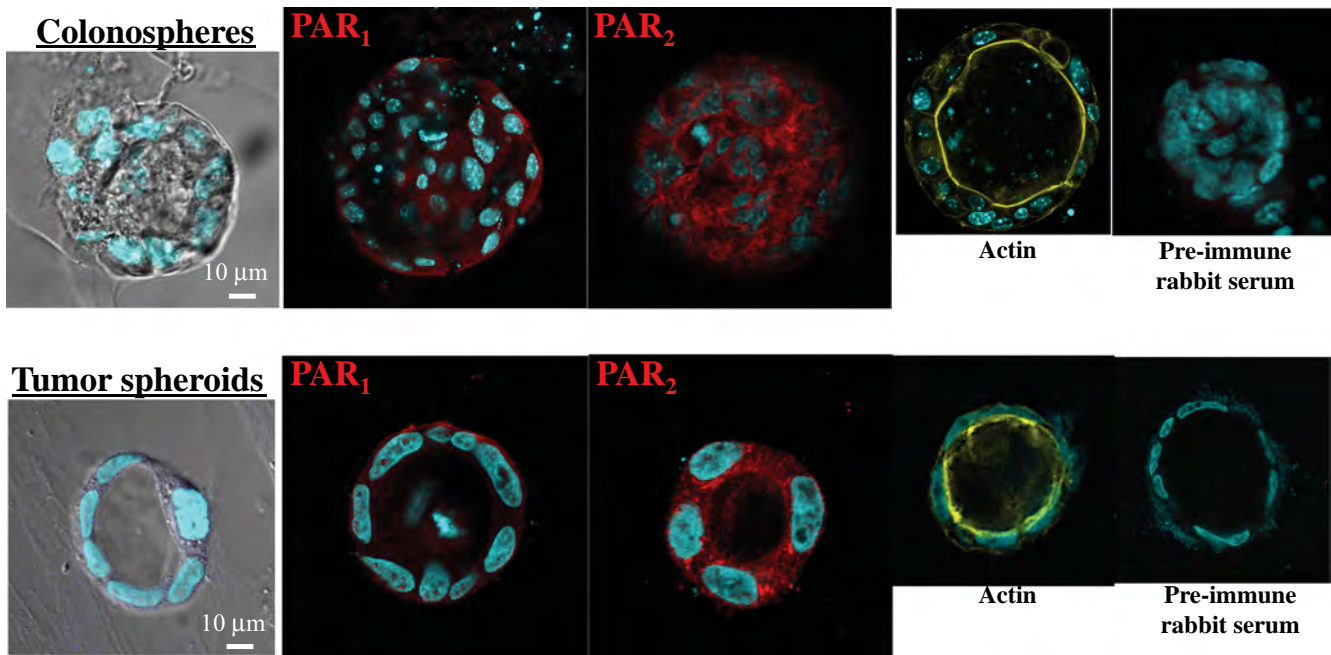
increased in both normal and tumor PAR₂-deficient spheroids compared with controls. Interestingly, an increase of Ki-67 staining was also measured in crypt bottoms of PAR₂ KO colons compared with WT, and associated with a decrease of the MAPK inhibitor DUSP6 [a major gene target of PAR₂ (52)] mRNA (Fig. 4C).

Altogether these data suggest that PAR₂ activation inhibits both normal and tumor stem/progenitor cell ability to proliferate and give rise to colonospheres and tumor spheroid, respectively, whereas PAR₁ activation stimulates it.

PAR₂ Enhances Survival in Colon Epithelial Stem/Progenitor Cells

We next investigated whether PAR₂ could impact intestinal stem/progenitor cell survival. Indeed, after 6 days of culture, numbers of colonospheres derived from PAR₂-deficient crypt units were significantly reduced compared with WT crypt units (Fig. 5A). This suggests that loss of PAR₂ impairs colonosphere-forming ability. Moreover, PAR₁ stimulation did not rescue PAR₂ KO colonosphere numbers (Fig. 5A), indicating that PAR₁ cannot compensate for the loss of PAR₂. Active

A Spheroids



B Apico-basal location in spheroid

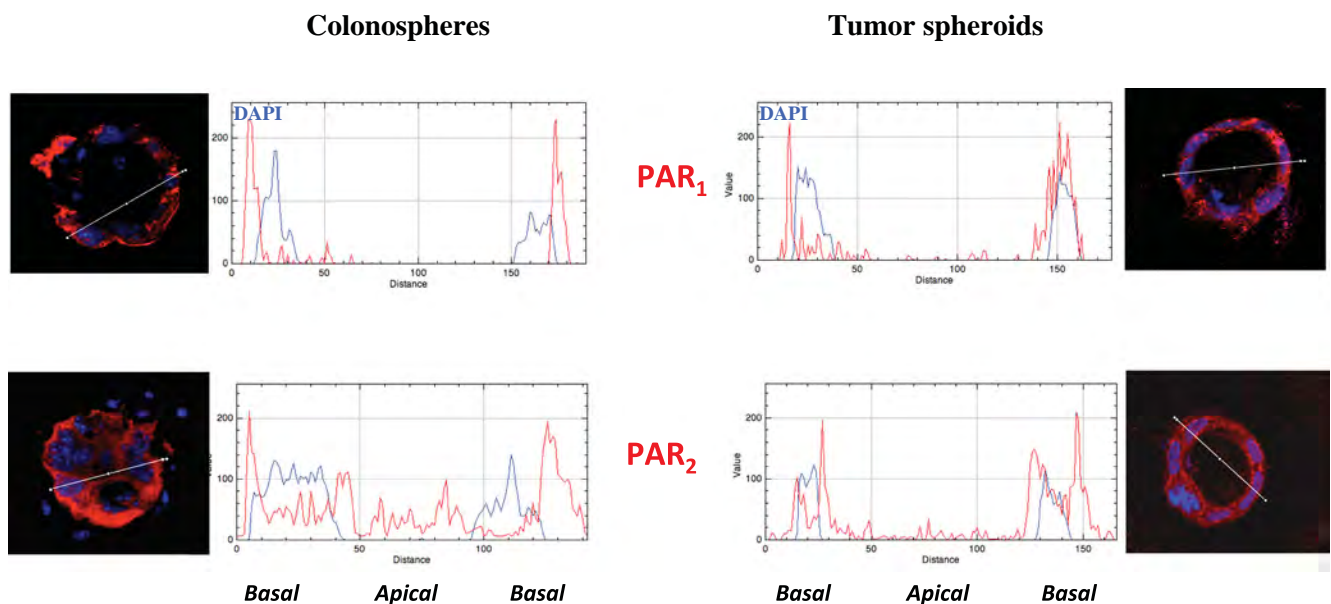


Fig. 2. PAR₁ and PAR₂ are expressed in colonospheres and tumor spheroids. Colonospheres from murine crypts and tumor spheroids from Caco-2 cells were labeled with PAR₁ or PAR₂ antibodies and analyzed by confocal microscopy. *A*: colonospheres and tumor spheroids have a round shape structure with a central lumen. They are polarized with actin (yellow) at the apical pole and express PAR₁ and PAR₂ (red). Nuclear DNA staining with DAPI and preimmune serum controls are shown. Data are representative of 3 independent experiments. *B*: apico-basal location of PARs in spheroids was analyzed by Image J software (white arrows, stack RGB images). A representative label profiling of PAR₁ and PAR₂ is shown (6 colonospheres and 6 tumor spheroids were analyzed from 3 independent experiments). Nuclear DNA staining with DAPI is shown.

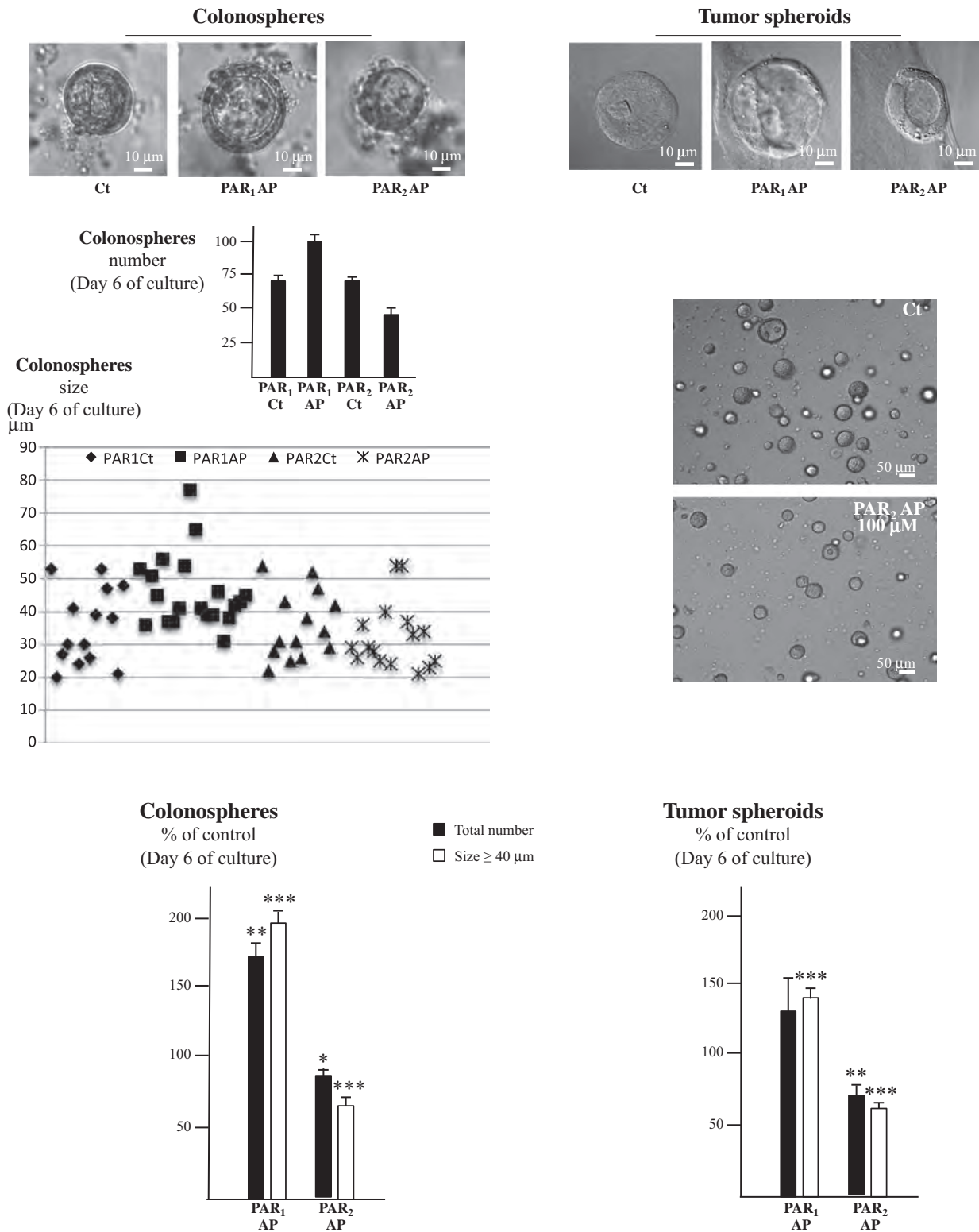


Fig. 3. PAR₁ and PAR₂ differentially control the growth of colon spheroids. Colonospheres and tumor spheroids were incubated daily with 100 µM AP specific for PAR₁ or PAR₂, or control peptides (Ct), during 6 days. Colonospheres and tumor spheroids were then counted at microscope and measured by Image J software. Representative microscope images and number/size variations of PAR-activated colonospheres and tumor spheroids are shown in *top*. Number of colonospheres is from two independent experiments performed in duplicate (mean ± SE). Size of 14–20 colonospheres was calculated for each condition. Statistical analysis of percentage variations in no. and size of colon spheroids is shown in *bottom*; n = 3 independent experiments, compared with the treatment with the respective control peptides of PAR₁ and PAR₂ agonists: mean ± SE. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001.

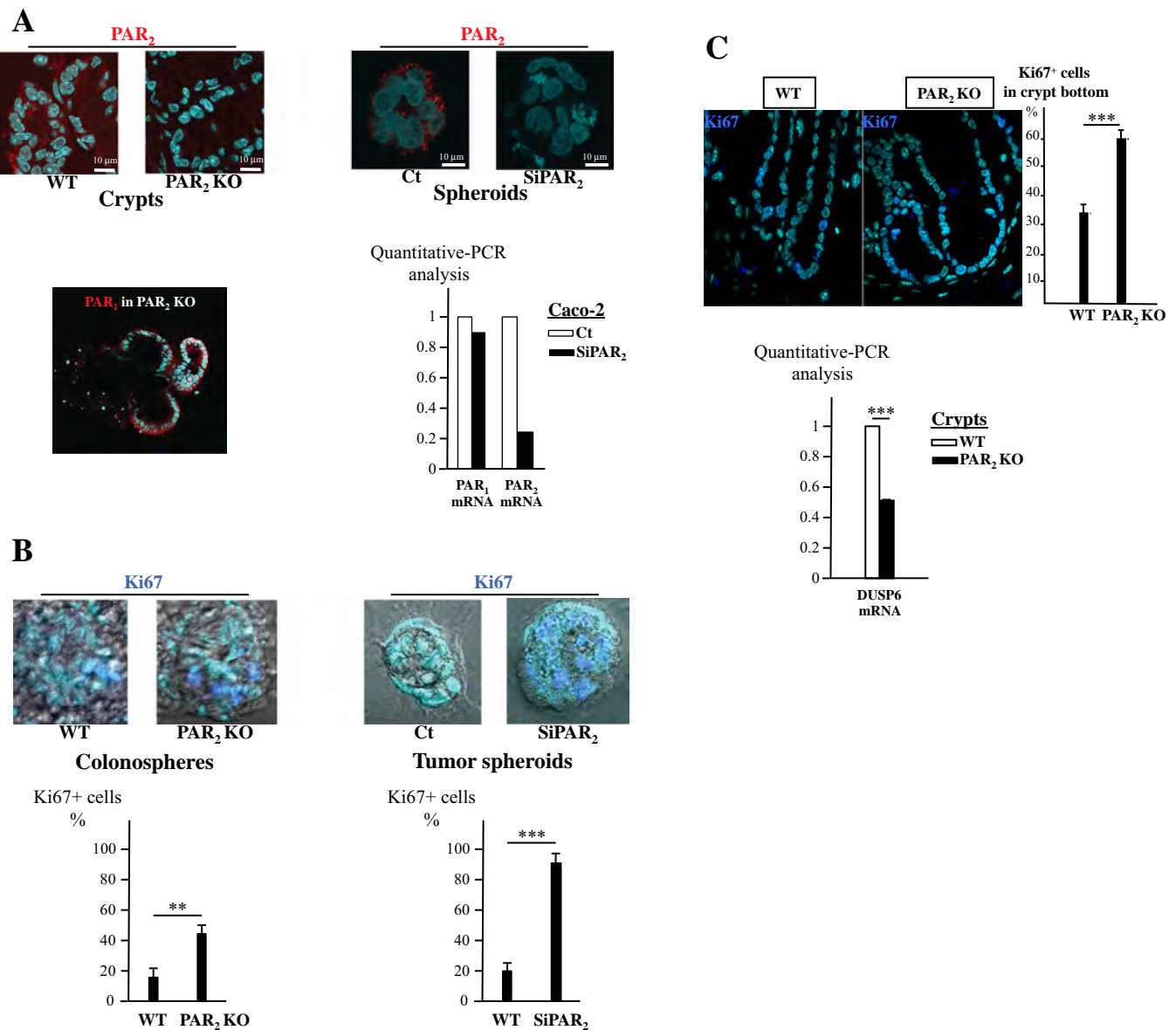


Fig. 4. PAR₂ deficiency increases cell proliferation of colon primitive cells. PAR₂-deficient colonospheres (from PAR₂ KO mice) and tumor spheroids (from PAR₂ siRNA-treated Caco-2 cells), as well as histological sections of colons from wild-type (WT) or PAR₂ KO littermate mice, were immunolabeled with Ki-67 antibody to study cell proliferation. **A**: immunofluorescence controls of PAR₂ knockdown in both types of spheroids and of PAR₁ expression in PAR₂ KO colonospheres are shown. In siRNA-treated Caco-2 cells, quantitative PCR analysis of siPAR₂ efficiency and of PAR₁ mRNA was realized (1 experiment performed in duplicate). **B**: Ki-67-labeled (blue) proliferative cells were counted in 8 WT and 8 PAR₂ KO colonospheres, and 8 WT and 8 siPAR₂ tumor spheroids, from 2 independent experiments. Data are shown as %Ki-67-positive (Ki-67⁺) cells compared with the total number of cells (counted with DAPI nuclear staining) in spheroids: mean \pm SE. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. **C**: Ki-67-labeled (blue) proliferative cells in WT and PAR₂ KO colon crypts. Quantification of Ki-67⁺ cells in crypt bottoms compared with 20 total cells/crypt bottom (counted with DAPI nuclear staining) from 9 crypts of 2 WT mice and 9 crypts of 2 PAR₂ KO mice: mean \pm SE. *** $P < 0.001$. Quantitative PCR analysis of dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) mRNA from WT and PAR₂ KO crypts is shown: mean \pm SE compared with WT, *** $P < 0.001$ of 2 independent experiments performed in triplicate.

caspase-3 staining revealed a large number of apoptotic cells in PAR₂-deficient colonospheres but not in control or PAR₂-stimulated colonospheres (Fig. 5B). These results strongly suggest that PAR₂ is crucial for colon stem/progenitor cell survival.

Impact of PAR₂ stimulation on cell survival was then investigated in 3D and 2D culture systems. First, after gentle dissociation and reembedding, we recovered 56 and 40% of control and PAR₁-stimulated colonospheres, respectively

(Fig. 5C). However, 70% of PAR₂-stimulated colonospheres were recovered after passaging (Fig. 5C). Similarly, serum starvation led to a decrease in the survival of the nontransformed and immature IEC-6 intestinal epithelial cell line, which was partially but significantly prevented by PAR₂ stimulation (Fig. 5D). This PAR₂-mediated enhancement of cell survival was associated with a decrease of active caspase-3 expression in colonospheres and in IEC-6 cells (Fig. 5, E and F).

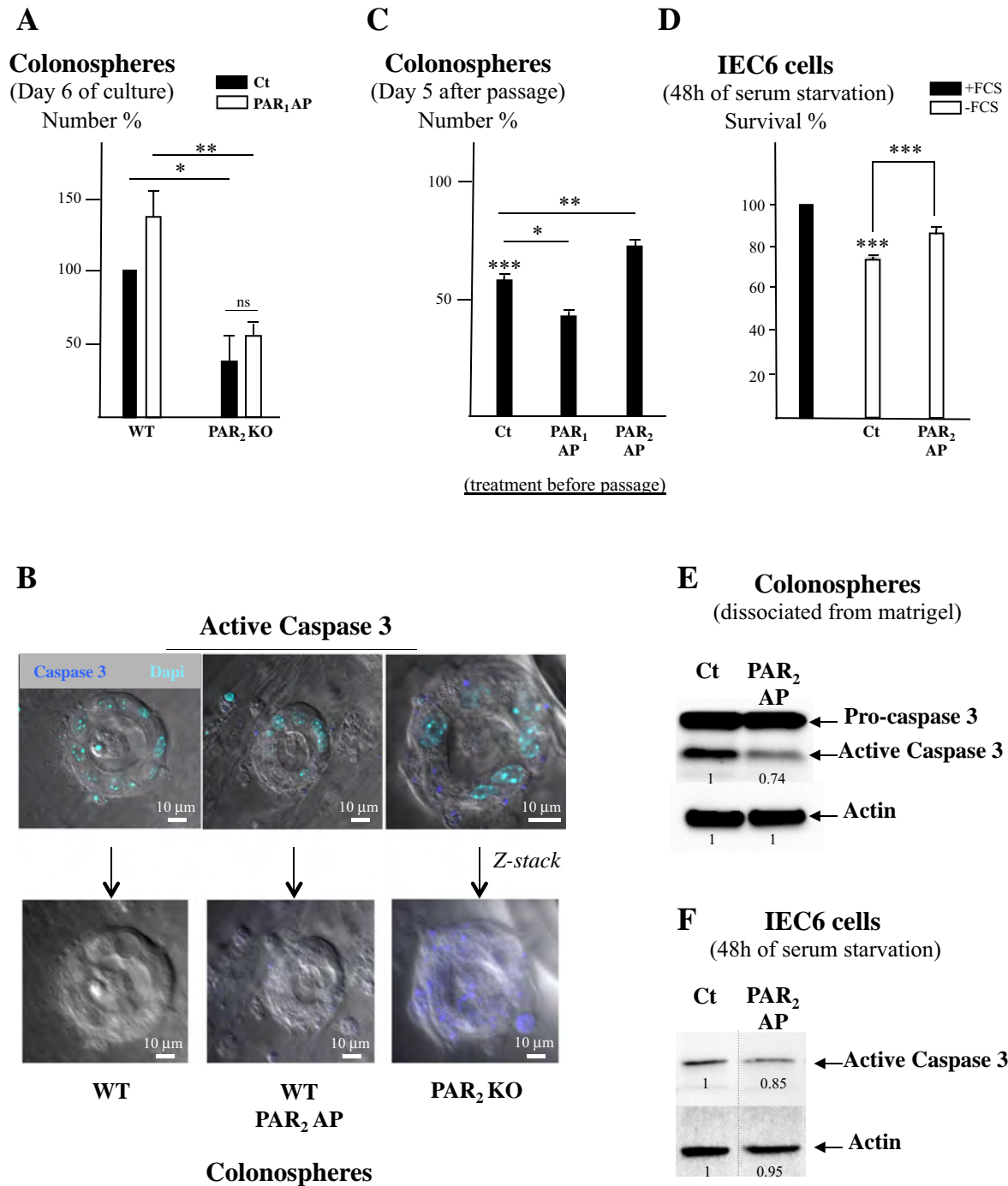


Fig. 5. PAR₂ enhances the survival of colon primitive cells. **A**: no. variation of colonospheres from PAR₂ KO mice, stimulated or not by PAR₁ agonist peptide (PAR₁ AP) compared with WT; *n* = 3 independent experiments performed in duplicate, compared with WT colonospheres: mean ± SE. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01. PAR₁ AP-treated PAR₂ KO assay was not statistically different from untreated PAR₂ KO. **B**: immunolabeling (blue) of active caspase-3 in colonospheres from PAR₂ KO mice compared with WT or PAR₂-stimulated WT colonospheres. Z-stack images and nuclear DNA staining with DAPI are shown. Representative of 3 independent experiments. **C**: control peptide (Ct) and PAR AP-stimulated colonospheres were processed for passage and counted at day 5 after reembedding in Matrigel; *n* = 3 independent experiments performed in duplicate compared with the treatment with the respective control peptides of PAR₁ and PAR₂ agonists: mean ± SE. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01. Only 56% of control passaged colonospheres were recovered at day 5 of culture (***P* < 0.001). **D**: serum (FCS)-starved IEC-6 cells in 2-dimensional (2D) culture were treated with 100 μM PAR₂ AP or control peptide, and their survival was measured at 48 h by MTS. A comparison with IEC-6 cells maintained in culture medium with serum is shown; *n* = 5 independent experiments performed in triplicate. ****P* < 0.001. **E**: control or PAR₂-stimulated colonospheres were dissociated from Matrigel and analyzed for the expression of active caspase-3 by Western blot. Actin is shown as loading control, and densitometric values are shown. Representative of 2 experiments. **F**: IEC-6 cells were serum starved and further stimulated with PAR₂ AP or control peptide for 24 h before treatment for Western blot and caspase-3 analysis. Selected cropped blots from the same experiment and processed in the same gel electrophoresis are shown, and a dashed line indicates arrangement. Actin is shown as a loading control, and densitometric values are shown. Representative of 2 experiments.

Together, these data indicate that PAR₂ promotes colon epithelial stem/progenitor cell survival.

PAR₂ Prosurvival Impact on Intestinal Epithelial Cells Is GSK3 β Dependent

We then assessed whether GSK3 β may be implicated in PAR₂-induced epithelial cell survival. First, in serum-starved IEC-6 cells, pharmacological GSK3 inhibition counteracted the prosurvival effect of PAR₂ stimulation (Fig. 6A). Furthermore, addition of GSK3 inhibitors (BIO or SB-216763) induced a significant decrease in the number of colonospheres and tumor spheroids (Fig. 6B). Importantly, PAR₂ AP pretreatment enhanced the inhibitory effects of the GSK3 inhibitor BIO (Fig. 6B).

Taken together, these data suggest that a PAR₂-dependent GSK3 β pathway sustains the survival of normal and tumor colon epithelial stem/progenitor cells.

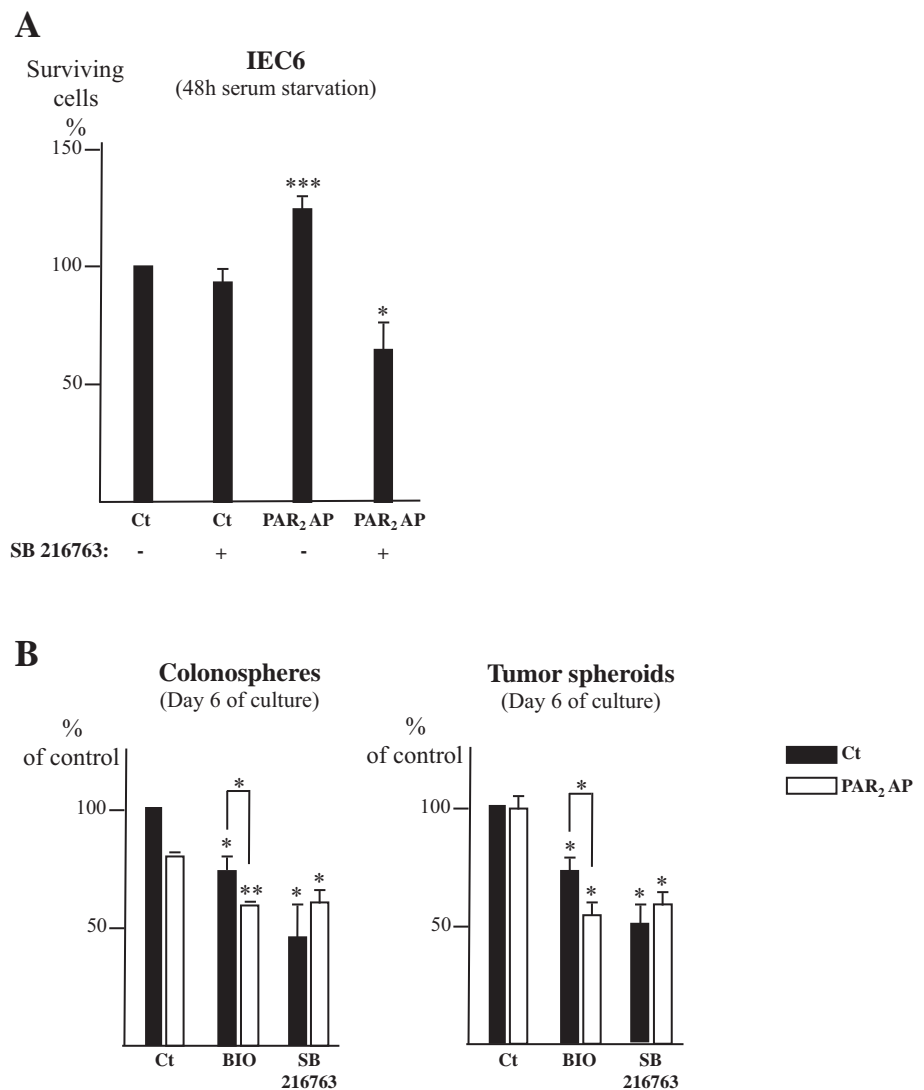
PAR₂ But Not PAR₁ Activates GSK3 β Through Its Serine-9 in Intestinal Epithelial Cells

Given the impact of GSK3 inhibition on spheroid survival, we assessed GSK3 β activation status in colonospheres and

tumor spheroids deficient for PAR₂ expression. PAR₂-deficient colonospheres and tumor spheroids exhibited a strong immunoreactivity for the nonactive form of GSK3 β (Ser-9-phosphorylated GSK3 β) compared with control (Fig. 7A), suggesting that PAR₂ loss leads to GSK3 β inactivation.

We then investigated the PAR₂-GSK3 β signaling pathway in nontransformed IEC-6 and Caco-2 cells and determined whether PAR₂ and/or PAR₁ can activate GSK3 β . We chose to use 2D cultures instead of 3D colonosphere and tumor spheroid cultures because of biological material quantity limitation in the latter system. Dose-response experiments at 1 h stimulation with PAR₁ or PAR₂ APs (Fig. 7B) showed that only PAR₂ AP at the dose of 100 μ M reproducibly triggered serine-9 dephosphorylation of GSK3 β , indicative of its activation. Of note, 100 μ M PAR₂ AP was the efficient concentration that we used in spheroid cultures. PAR₂ activation (1 h) did not impact the GSK3 β tyrosine-216 phosphorylation site, which also activates GSK3 β when phosphorylated, suggesting that PAR₂-mediated activation of GSK3 β may be specific to the serine-9 phosphorylation site in both IEC-6 and Caco-2 cells (Fig. 7B). Consistent with these data, PAR₂ activation led to increased GSK3 β kinase activity compared with control (Fig. 7C). In contrast,

Fig. 6. PAR₂ controls the survival of colon primitive cells through glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) activation. **A:** serum-starved IEC-6 in 2D culture were treated with 12.5 μ M SB-216763 1 h after stimulation with PAR₂ AP (100 μ M) or control peptide. Surviving cells were measured by MTS. Comparison with the treatment with DMSO (vehicle): $n = 7$ independent experiments performed in duplicate, mean \pm SE. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$. **B:** 48 h after initial embedding in Matrigel, colonospheres and tumor spheroids were treated with 100 μ M PAR₂ AP or control peptide for 1 h before addition of GSK3 inhibitors (0.5 μ M BIO or 12.5 μ M SB-216763) or 0.05% DMSO (vehicle): spheroids were counted at the microscope and compared with the control: $n = 3$ independent experiments performed in duplicate, mean \pm SE. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.



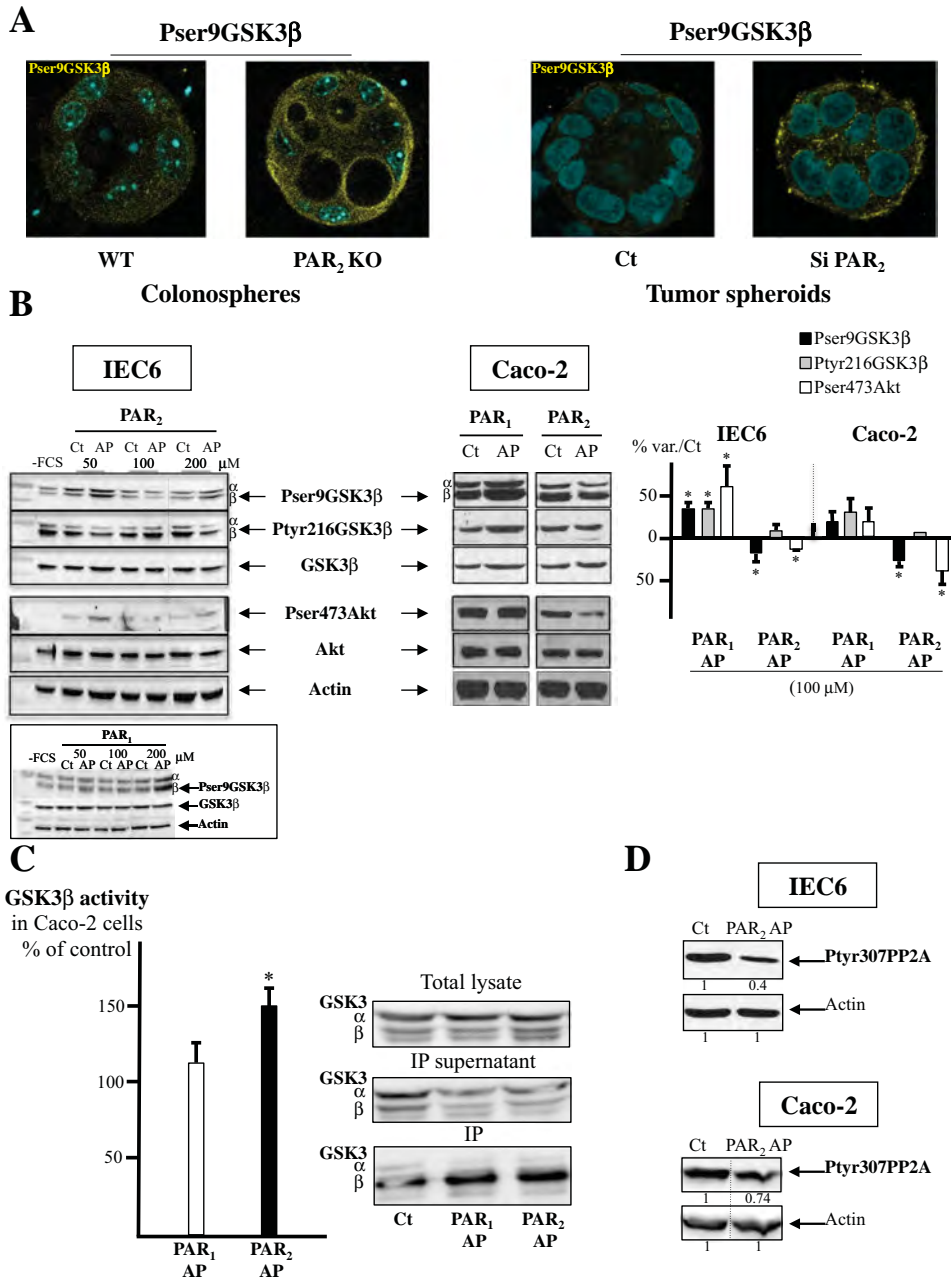


Fig. 7. PAR₁ and PAR₂ differentially regulate GSK3β in intestinal epithelial cells. **A:** Immunolabeling (yellow) of serine-9-phosphorylated GSK3β (inhibited form) in PAR₂-deficient colonospheres and tumor spheroids compared with controls. Nuclear DNA staining with DAPI is shown. Representative of 3 independent experiments. **B:** Nontransformed (IEC-6) and colorectal cancer [CRC (Caco-2)] intestinal epithelial cells were cultured in 2D and after serum starvation were stimulated by 100 μM or various concentrations of AP specific for PAR₁ or PAR₂, or control peptides, for 1 h. GSK3β and Akt regulation was then studied by Western blot. Selected cropped blots from the same gel electrophoresis are shown, and a broken line indicates arrangement. Densitometric analysis (right) of P-Ser⁹GSK3β, P-Tyr²¹⁶GSK3β, and P-Ser⁴⁷³Akt blots from all experiments is indicated. Total GSK3β and Akt is shown as well as loading control (actin); *n* = 6 compared with treatment with the respective control peptides of PAR₁ and PAR₂ agonists; mean ± SE. **P* < 0.05. **C:** Measurement of GSK3β activity in Caco-2 cells stimulated 1 h by 100 μM PAR₁ or PAR₂ APs. **Right**, equal amounts of GSK3β immunoprecipitated in the different conditions; *n* = 3 independent experiments performed in duplicate compared with the treatment with the respective control peptides of PAR₁ and PAR₂ agonists; mean ± SE. **P* < 0.05. **D:** As in **B**, IEC-6 and Caco-2 cells were PAR₂ stimulated (100 μM AP), and P-Tyr³⁰⁷PP2A was analyzed by Western blot. Selected cropped blots from the same experiment and processed in the same gel electrophoresis are shown, and a broken line indicates arrangement. Densitometric values are shown. Representative of 2 independent experiments.

PAR₁ activation (1 h) increased both P-Tyr²¹⁶GSK3β (GSK3β activation) and serine-9 phosphorylation (GSK3β inhibition) of the kinase in IEC-6, and there was a similar trend in Caco-2 cells (Fig. 7B, right). Consistent with this result, total GSK3β kinase activity was not increased upon PAR₁ stimulation compared with the nonstimulated control (Fig. 7C).

We then investigated whether PARs regulate Akt, which is an upstream regulator of GSK3β activity. As shown in Fig. 7B, variations of the P-Ser⁴⁷³ active form of Akt were similar to those of the serine-9 of GSK3β, a potential Akt substrate. Indeed, both P-Ser⁴⁷³ Akt and P-Ser⁹ GSK3β were decreased upon PAR₂ stimulation, suggesting that the inactivation of Akt may be implicated in GSK3β activation. Accordingly, the P-Tyr³⁰⁷ inactive form of phosphatase PP2A, which is an upstream regulator of both Akt and GSK3β, was found de-

creased upon PAR₂ activation in both IEC-6 and Caco-2 cells (Fig. 7D).

These results show that, in intestinal epithelial cells, PAR₂ but not PAR₁ activates GSK3β through serine-9 dephosphorylation.

A β-Arrestin2/PP2A/GSK3β Complex Supports the Cross Talk between PAR₂ and Rho Kinase in Intestinal Epithelial Cells

The above results suggested that GSK3β may be associated with Akt and PP2A in a complex downstream of PAR₂. Other work (40) has previously demonstrated such complex in association with β-arrestin 2, a known partner of PAR₂ signaling. We decided to use the CMT93 cell line that we built deficient

for PAR₂ expression to investigate both roles of PAR₂ in basal and activated states on that potential signaling complex.

We first checked by calcium flux analysis that CMT93 PAR₂ KO did not respond to PAR₂ AP (Fig. 8A). However, the PAR₂ KO cells remained responsive to PAR₁ AP (Fig. 8A). Next, the measure of P-Ser⁹ GSK3 β in PAR₂-stimulated CMT93 confirmed the specificity of PAR₂-induced activation of GSK3 β at 100 μ M AP compared with 50 μ M, and GSK3 β activation (serine-9 dephosphorylation) was not induced in the absence of PAR₂ (Fig. 8B).

The immunoprecipitation of β -arrestin 2 showed its constitutive association with GSK3 β and PP2A by contrast with Akt, which was not present in this complex (Fig. 8C). Under PAR₂ activation (100 μ M AP), inactive form of PP2A (P-Tyr³⁰⁷ PP2A) was decreased in the arrestin complex (Fig. 8C). Furthermore, PAR₂ deficiency induced a decrease of GSK3 β

association with β -arrestin 2 and an increase of the inactive PP2A in that complex (Fig. 8C). Altogether, these data strongly suggest that, downstream of PAR₂, a β -arrestin 2/PP2A/GSK3 β complex controls GSK3 β activation.

Our above results show that the PAR₂-dependent activation of GSK3 β may be crucial for cell survival in stress conditions such as serum starvation and deadhesion. It is known that these conditions implicate a reorganization of the cytoskeleton through the regulation of GTPases such as Rho. We have thus investigated the impact of Rho kinase inhibition on GSK3 β activation in CMT93 cells. As shown in Fig. 8D, the inactive form of GSK3 β (P-Ser⁹ GSK3 β) was increased at both 50 or 100 μ M PAR₂ AP but not significantly changed in PAR₂ KO cells. These results show that Rho kinase inhibition switched the response to PAR₂ AP from activation to inhibition of GSK3 β .

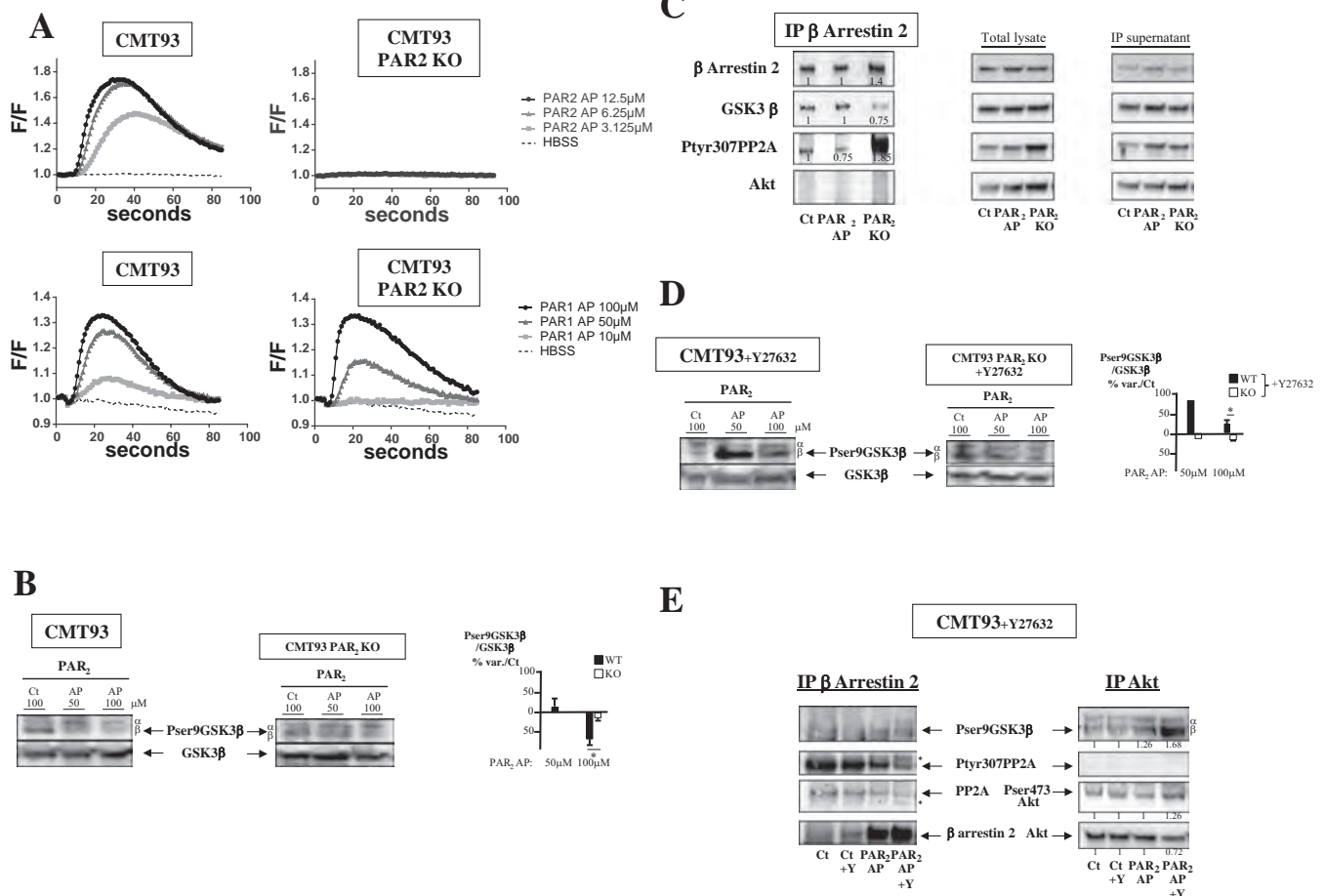


Fig. 8. PAR₂-dependent activation of GSK3 β is controlled by Rho kinase. The CMT93 cell line was transfected to knock down the expression of PAR₂. Next, CMT93 WT and CMT93 PAR₂ KO were serum starved and stimulated by PAR₂ AP or control peptide for 1 h before signaling studies. **A**: deficiency in PAR₂ was checked by measurement of calcium variations in response to various concentrations of PAR₂ AP as described in MATERIALS AND METHODS. CMT93 PAR₂ KO remained responsive to PAR₁ AP. **B**: P-Ser⁹GSK3 β was studied by Western blot in both WT and PAR₂ KO CMT93 stimulated with 50 or 100 μ M PAR₂ AP. Densitometric analysis is shown: $n = 3$, mean \pm SE comparison between WT and KO, $*P < 0.05$. **C**: immunoprecipitation (IP) of β -arrestin 2 from 100 μ M PAR₂ AP-stimulated CMT93 cells and from PAR₂ KO CMT93 cells was performed. Association of β -arrestin 2 with GSK3 β , PP2A, and Akt was analyzed by Western blot. *Right*, total lysates and IP supernatants as controls. Densitometric analysis is shown. Akt was not found associated to β -arrestin 2. Representative of 2 independent experiments. **D**: CMT93 WT and PAR₂ KO were treated with 10 μ M Rho kinase inhibitor (Y-27632) for 30 min and were then stimulated with PAR₂ AP as in **B**. Variations of P-Ser⁹GSK3 β were analyzed by Western blot, and densitometric analysis is shown: $n = 3$, mean \pm SE comparison between WT and KO, $*P < 0.05$. Data shown with 50 μ M PAR₂ AP are representative of 2 independent experiments. **E**: both β -arrestin 2 and Akt immunoprecipitates were performed from CMT93 pretreated with Rho kinase inhibitor before PAR₂ stimulation as in **D**. P-Ser⁹GSK3 β , P-Tyr³⁰⁷PP2A, and P-Ser⁴⁷³Akt were then analyzed in immunoprecipitates by Western blot. Potential ubiquitinated or degraded forms of PP2A are indicated (*). Densitometric analysis is shown. P-Tyr³⁰⁷PP2A was not detectable in Akt immunoprecipitate. Representative of 2 independent experiments.

We further investigated the relationship between Rho kinase and PAR₂-dependent regulation of GSK3 β by performing immunoprecipitates of β -arrestin 2 and Akt from Rho kinase inhibitor- and PAR₂ AP-treated CMT93 cells. As shown in Fig. 8E, whereas P-Ser⁹ GSK3 β was not significantly changed in β -arrestin 2 complex, it was clearly increased by PAR₂ AP associated with Rho kinase inhibitor, even compared with the slight increase due to PAR₂ AP alone, in Akt immunoprecipitate. According to the above results, this indicates that Rho kinase inhibition has switched the PAR₂ regulation of GSK3 β through its inhibition by Akt. Consistently, the activated form of Akt (P-Ser⁴⁷³Akt) was measured in these conditions (Fig. 8E). Interestingly, whereas PP2A was not present in Akt immunoprecipitate, in β -arrestin 2 complex, its ubiquitinated and degraded forms seem to be produced under both treatments by PAR₂ AP and Rho kinase inhibitor (Fig. 8E).

Altogether, our results show that a β -arrestin 2/PP2A/GSK3 β complex is regulated by both PAR₂ and Rho kinase in intestinal epithelial cells.

DISCUSSION

This study aimed to determine whether PAR₁ and/or PAR₂ impact normal and tumor colon stem/progenitor cells and whether this is mediated by GSK3 β . With the use of ex vivo/in vitro 3D cultures of murine whole crypts or single tumor epithelial Caco-2 cells, our work gives strong evidence for a dual role for PAR₂ in the regulation of stem/progenitor cell ability to grow into multicellular epithelial structures. On one hand, PAR₂ activation limits normal and tumor cell proliferation in 3D structures, but on the other hand PAR₂ is essential to sustain cell survival and stem/progenitor ability to grow into 3D structures. Our data further suggest that PAR₂ impact on stem/progenitor cell is mediated by GSK3 β activation. Of interest, our work also shows that PAR₁ exerts opposite effects on stem/progenitor cell proliferation and survival and does not impact overall GSK3 β activity.

Our results demonstrate that PAR₁ and PAR₂ are expressed in colon epithelial cells, including those at the bottom of the crypts. Colocalization of PAR₁ and PAR₂ with CD44, which is enriched in the stem cell zone, further demonstrates that intestinal stem and progenitor cells express the protease receptors. The role of PARs in stem cells is poorly documented (8), and our result reinforces their potential interest. Nevertheless, further in-depth work with sorted stem cells or cell lineage tracing technology needs to be performed to definitively conclude on the role of PARs in stem cell regulation.

One of our main findings is the dual role for PAR₂ in the control of normal and tumor stem/progenitor cells. First, our data demonstrate that activation of PAR₂ limits both normal and tumor stem/progenitor cell ability to form colono/tumorspheres and that loss of PAR₂ activates cell proliferation. This strongly suggests that PAR₂ inhibits stem/progenitor cell expansion in the context of normal crypts and CRC. Our results showing a decrease of DUSP6 mRNA associated with increased Ki-67 staining in PAR₂ KO crypts compared with WT are in favor of this hypothesis. Nevertheless, in breast cancer cells, PAR₂ controls PAR₁-driven tumorigenesis and the association between activated PAR₁ and Akt (25). Such requirement of combined activities of PAR₂ and other receptors has also been observed in matrix-driven squamous cell carcinoma

genesis (47) and suggests that PAR₂, as well as PAR₁, may promote cancer-initiating cells in CRC. However, our results showing that PAR₁ has opposite impact on normal and tumor epithelial cells compared with PAR₂ demonstrate that PAR₂ and PAR₁ do not have redundant functions, at least in intestinal stem/progenitor cells. The ratio PAR₂/PAR₁ may regulate the overall PAR-mediated cellular response to proteases and the transition toward the malignant epithelial phenotype.

Another part of our results demonstrates that whole crypt units derived from PAR₂-KO animals show impaired ability to give rise to colonospheres and that PAR₂ activation prevents caspase-3-mediated apoptosis. Despite the fact that we used essentially nonlittermate mice in this study, preliminary experiments with WT and PAR₂ KO littermate mice further confirm the deleterious effect of PAR₂ deficiency on colonosphere culture. This indicates that PAR₂ is essential to sustain stem/progenitor cell survival, at least in a normal setting. Consistently, PAR₂ has been shown to have antiapoptotic and pro-barrier functions in different cell types (22, 30, 42). Altogether our data seem to indicate that PAR₂ both favors stem/progenitor cell survival and limits their proliferation. It is thus tempting to speculate that PAR₂ may participate in stem cell quiescence.

In both nontransformed and tumor epithelial cells, our data show that activated PAR₁ and PAR₂ had opposite impact on GSK3 β phosphorylation at serine-9 and tyrosine-216 and that only PAR₂ induced increased GSK3 β activity. To our knowledge, this is the first evidence in intestinal epithelial cells demonstrating that a receptor, and more specifically PAR₂, can activate GSK3 β . PAR₁ and PAR₂ differential impact on GSK3 β activation further strengthens the concept that the two receptors exert distinct effects on intestinal epithelial cell functions and that the ratio PAR₁/PAR₂ may function as a rheostat to finely regulate stem/progenitor cell functions via the GSK3 β pathway.

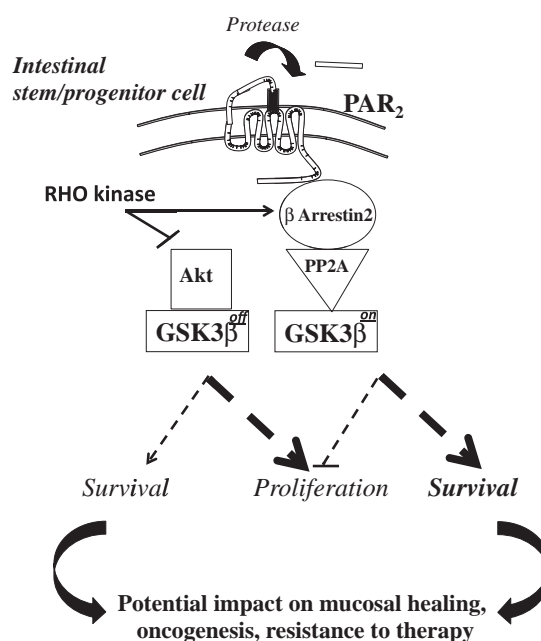


Fig. 9. Schematic representation of the PAR₂/GSK3 β pathway in intestinal stem/progenitor cells.

Our findings demonstrate that, in intestinal epithelial cells, PAR₂ promotes cell survival via GSK3 β . In 3D culture, the PAR₂-GSK3 β pathway was constitutively activated. This could occur either through autocrine activation linked to cell adhesion (8, 16) or Matrigel-bound proteases (28). The perinuclear localization of PAR₂ that we show in immunostaining experiments could result from constitutive internalization or from a reserve pool in the Golgi, suggesting that PAR₂ is in permanence activated and then degraded and must be synthesized de novo (2).

Also, PAR₂ has been shown to promote cell adhesion via β_1 -integrin (37), a putative marker of intestinal stem/progenitor cells (15), and our prior work showed that β_1 -integrin activation induced survival via GSK3 β in leukemic progenitors (4). In histological sections of crypt bottoms and 3D culture, PAR₂ seems to be mostly present in basolateral position where adherens junctions and GSK3 β are located (21). Conversely, PAR₂ is mainly apical in surface cells of the crypt. Because it has been shown different signaling pathways depending on PAR₂ basolateral or apical localization (31), and particularly basolateral PAR₂ was critical for tight junctions regulation, it is tempting to speculate that, in intestinal stem/progenitor cells, PAR₂ activates GSK3 β through a cross talk with β_1 -integrin that can associate with E-cadherins (62). Our data showing that Rho kinase controls a switch between GSK3 β activation in β -arrestin 2 complex and GSK3 β inhibition in Akt complex downstream of PAR₂ activation are in favor of this hypothesis. Of note β -arrestin mobilization has been shown to be a strong component of PAR₂ signaling cascades (20) and of a bidirectional cross talk with Rho impacting notably stress fiber formation and phosphatase and tensin homolog (12). Conversely, GSK3 β may also play a crucial role in the regulation of the epithelial barrier through the transcriptional regulation of adherens junction proteins (49). GSK3 β -induced stimulation of cell adhesion could lead to enhanced cell survival. This is consistent with our data showing increased recovery of passaged spheroids after pretreatment by PAR₂ AP.

Altogether our data suggest that the PAR₂-GSK3 β signaling pathway limits stem/progenitor cell expansion but favors their survival in tight coordination with cell adhesion status (Fig. 9). As a result, one can hypothesize that, in pathological situations associated with chronic activation of the PAR₂-GSK3 β pathway, this might result in impaired mucosal healing, and stem/progenitor cell resistance to genotoxic insult, mutation accumulation, and acquisition of oncogenic properties. This would be particularly relevant in IBD that have been associated with PAR₂ and GSK3 β (57, 63). The PAR₂/GSK3 β -induced stem cell survival and proliferation arrest, i.e., quiescence, could also participate in cancer stem cell resistance to therapy (32).

In conclusion, this work identifies PAR₂/GSK3 β as a novel pathway that plays a critical role in the regulation of stem/progenitor cell survival and proliferation in normal colon crypts and in tumors and whose deregulation is likely to be involved in IBD-associated defects in mucosal healing and oncogenic transformation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Michèle Allouche for critical reading of the manuscript, Alexandre Denadai-Souza for helpful scientific discussion, and Sophie Allart and Astrid Canivet from the Imaging platform of CPTP.

GRANTS

This work was supported by the Association de Recherche contre le Cancer (www.fondation-arc.org, no. SFI20121205496, N. Vergnolle), the Ligue Régionale contre le Cancer (www.ligue-cancer.net, 2013 Aude Comity, C. Racaud-Sultan), the Institut National du Cancer/Aviesan (www.e-cancer.fr, no. P029564, D. Bonnet), the Programme Hubert Curien Utique cooperation (www.egide.asso.fr, no. CMCU12G0821, R. Mezghani-Jarraya, C. Racaud-Sultan), the Région Midi-Pyrénées (www.midipyrenees.fr, no. 12050835, E d'Aldebert), and a European Research Council Starting Grant (erc.europa.eu, ERC_2012_StG_20111109, N. Vergnolle).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

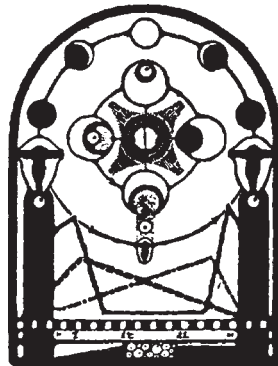
I.N., D.B., B.Z., E.D., S.K., M.Q., C.R., C.B., and C.R.-S. performed experiments; I.N., D.B., B.Z., E.D., S.K., M.Q., C.R., C.B., A.F., S.M., and C.R.-S. analyzed data; I.N., D.B., S.K., R.M.-J., M.Q., C.R., C.B., E.M., A.F., N.C., S.M., L.V.L., N.V., and C.R.-S. interpreted results of experiments; I.N., D.B., S.K., C.R., C.B., and C.R.-S. prepared figures; I.N., D.B., B.Z., E.D., R.M.-J., M.Q., C.B., E.M., A.F., N.C., S.M., L.V.L., N.V., and C.R.-S. edited and revised manuscript; I.N., D.B., B.Z., E.D., S.K., R.M.-J., M.Q., C.R., C.B., E.M., A.F., N.C., S.M., L.V.L., N.V., and C.R.-S. approved final version of manuscript; C.B., E.M., A.F., N.C., S.M., L.V.L., N.V., and C.R.-S. conception and design of research; L.V.L. and C.R.-S. drafted manuscript.

REFERENCES

- Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Holtenberg MD, Hooper JD. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther* 130: 248–282, 2011.
- Arora P, Ricks TK, Trejo J. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *J Cell Sci* 120: 921–928, 2007.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegbarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449: 1003–1007, 2007.
- Bertrand J, Despeaux M, Joly S, Bourogaa E, Gallay N, Demur C, Bonneville P, Louache F, Maguer-Satta V, Vergnolle N, Payrastra B, Racaud-Sultan C. Sex differences in the GSK3 β -mediated survival of adherent leukemic progenitors. *Oncogene* 31: 694–705, 2012.
- Beurel E, Jope RS. Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 283: 21934–21944, 2008.
- Bourogaa E, Bertrand J, Despeaux M, Jarraya R, Fabre N, Payrastra L, Demur C, Fournié JJ, Damak M, Feki AE, Racaud-Sultan C. Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. *Leuk Res* 35: 1093–1101, 2011.
- Cai WS, Shen F, Li JL, Feng Z, Wang YC, Xiao HQ, Xu B. Activated protease receptor-2 induces GATA6 expression to promote survival in irradiated colon cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 555–556: 28–32, 2014.
- Camerer E, Barker A, Duong DN, Ganesan R, Kataoka H, Cornelissen I, Darragh MR, Hussain A, Zheng YW, Srinivasan Y, Brown C, Xu SM, Regard JB, Lin CY, Craik CS, Kirchhofer D, Coughlin SR. Local protease signaling contributes to neural tube closure in the mouse embryo. *Dev Cell* 18: 25–38, 2010.
- Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 117: 636–647, 2007.
- Chang JH, Park JM, Kim SW, Jung CK, Kang WK, Oh ST. Expression of protease activated receptor-2 in human colorectal cancer and its association with tumor progression. *Dis Colon Rectum* 53: 1202–1208, 2010.
- Christensen J, El-Gebali S, Natoli M, Sengstag T, Delorenzi M, Bentz S, Bouzourene H, Rumbo M, Felsani A, Siissalo S, Hirvonen J, Vila MR, Saletti P, Aguet M, Anderle P. Defining new criteria for selection of cell-based intestinal models using publicly available databases. *BMC Genomics* 13: 274, 2012.
- Claing A. β -Arrestins: modulators of small GTPase activation and function. *Prog Mol Biol Transl Sci* 118: 149–174, 2013.

13. De Toni F, Racaud-Sultan C, Chicanne G, Mas VM, Cariven C, Mesange F, Salles JP, Demur C, Allouche M, Payrastra B, Manenti S, Ysebaert L. A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia. *Oncogene* 25: 3113–3122, 2006.
14. De Toni-Costes F, Despeaux M, Bertrand J, Bourogaa E, Ysebaert L, Payrastra B, Racaud-Sultan C. A new alpha5beta1 integrin-dependent survival pathway through GSK3beta activation in leukemic cells. *PLoS One* 5: e9807, 2010.
15. Fujimoto KI, Beauchamp RD, Whitehead RH. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology* 123: 1941–1948, 2002.
16. Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* 279: 55419–55424, 2004.
17. Ghosh JC, Altieri DC. Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3beta in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 11: 4580–4588, 2005.
18. Grassilli E, Narloch R, Federzoni E, Ianzano L, Pisano F, Giovannoni R, Romano G, Masiero L, Leone BE, Bonin S, Donada M, Stanta G, Helin K, Lavitrano M. Inhibition of GSK3B bypass drug resistance of p53-null colon carcinomas by enabling necroptosis in response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 19: 3820–3831, 2013.
19. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15: 103–113, 2009.
20. Hasdemir B, Murphy JE, Cottrell GS, Bunnett NW. Endosomal deubiquitinating enzymes control ubiquitination and down-regulation of protease-activated receptor 2. *J Biol Chem* 284: 28453–28466, 2009.
21. Hirakawa H, Nakayama T, Shibata K, Sekine I. Association of cellular localization of glycogen synthase kinase 3beta in the digestive tract with cancer development. *Oncol Rep* 22: 481–485, 2009.
22. Huang SH, Li Y, Chen HG, Rong J, Ye S. Activation of proteinase-activated receptor 2 prevents apoptosis of lung cancer cells. *Cancer Invest* 31: 578–581, 2013.
23. Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* 57: 1222–1229, 2008.
24. Iablokov V, Hirota CL, Peplowski MA, Ramachandran R, Mihara K, Hollenberg MD, MacNaughton WK. Proteinase-activated receptor 2 (PAR2) decreases apoptosis in colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 289: 34366–34377, 2014.
25. Jaber M, Maoz M, Kancharla A, Agranovich D, Peretz T, Grisar-Granovsky S, Uziely B, Bar-Shavit R. Protease-activated-receptor-2 affects protease-activated-receptor-1-driven breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 71: 2517–2533, 2013.
26. Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32: 577–595, 2007.
27. Karrasch T, Spaeth T, Allard B, Jobin C. PI3K-dependent GSK3β(Ser9)-phosphorylation is implicated in the intestinal epithelial cell wound-healing response. *PLoS One* 6: e26340, 2011.
28. Kedeshian P, Sternlicht MD, Nguyen M, Shao ZM, Barsky SH. Humatrix, a novel myoepithelial matrical gel with unique biochemical and biological properties. *Cancer Lett* 123: 215–226, 1998.
29. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8: e1000412, 2010.
30. Kuckleburg CJ, Newman PJ. Neutrophil proteinase 3 acts on protease-activated receptor-2 to enhance vascular endothelial cell barrier function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 275–284, 2013.
31. Lau C, Lytle C, Straus DS, DeFea KA. Apical and basolateral pools of proteinase-activated receptor-2 direct distinct signaling events in the intestinal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C113–C123, 2011.
32. Li L, Bhatia R. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res* 17: 4936–4941, 2011.
33. Lindner JR1, Kahn ML, Coughlin SR, Sambrano GR, Schauble E, Bernstein D, Foy D, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol* 165: 6504–6510, 2000.
34. Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer KL, Baldus SE, Huckenbeck W, Piekorz RP, Knoefel WT, Krieg A, Stoecklein NH. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One* 8: e59689, 2013.
35. Luo W, Wang Y, Reiser G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev* 56: 331–345, 2007.
36. Mai W, Kawakami K, Shakoori A, Kyo S, Miyashita K, Yokoi K, Jin M, Shimasaki T, Motoo Y, Minamoto T. Deregulated GSK3β sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clin Cancer Res* 15: 6810–6819, 2009.
37. Miyata S, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyazaki K. Trypsin stimulates integrin alpha(5)beta(1)-dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 275: 4592–4598, 2000.
38. Naldini A, Filippi I, Ardinghi C, Silini A, Giavazzi R, Carraro F. Identification of a functional role for the protease-activated receptor-1 in hypoxic breast cancer cells. *Eur J Cancer* 45: 454–460, 2009.
39. Namkung W, Han W, Luo X, Muallem S, Cho KH, Kim KH, Lee MG. Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 126: 1844–1859, 2004.
40. O'Brien WT, Huang J, Buccafusca R, Garskof J, Valvezan AJ, Berry GT, Klein PS. Glycogen synthase kinase-3 is essential for β-arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice. *J Clin Invest* 121: 3756–3762, 2011.
41. Ougolkov AV, Bone ND, Fernandez-Zapico ME, Kay NE, Billadeau DD. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 110: 735–742, 2007.
42. Peng Y, Zhang J, Xu H, He J, Ying X, Wang Y. Neuroprotective effect of protease-activated receptor-2 in the hypoxia-induced apoptosis of rat RGC-5 cells. *J Mol Neurosci* 50: 98–108, 2013.
43. Piana C, Toegel S, Guell I, Gerbes S, Viernstein H, Wirth M, Gabor F. Growth surface-induced gene and protein expression patterns in Caco-2 cells. *Acta Biomater* 4: 1819–1826, 2008.
44. Ramalingam SI, Daughtridge GW, Johnston MJ, Gracz AD, Magness ST. Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G10–G20, 2012.
45. Sakurai T, Kashida H, Watanabe T, Hagiwara S, Mizushima T, Iijima H, Nishida N, Higashitsuji H, Fujita J, Kudo M. Stress response protein cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *Cancer Res* 74: 6119–6128, 2014.
46. Salah Z, Maoz M, Pokroy E, Lotem M, Bar-Shavit R, Uziely B. Protease-activated receptor-1 (hPar1), a survival factor eliciting tumor progression. *Mol Cancer Res* 5: 229–240, 2007.
47. Sales KU, Friis S, Konkell JE, Godiksen S, Hatakeyama M, Hansen KK, Rogatto SR, Szabo R, Vogel LK, Chen W, Gutkind JS, Bugge TH. Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven premalignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis. *Oncogene* 34: 346–356, 2014.
48. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brik S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141: 1762–1772, 2011.
49. Severson EA, Kwon M, Hilgarth RS, Parkos CA, Nusrat A. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) influences epithelial barrier function by regulating occludin, claudin-1 and E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 397: 592–597, 2010.
50. Steinbrecher KA, Wilson 3rd W, Cogswell PC, Baldwin AS. Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 25: 8444–8455, 2005.
51. Stelzner M, Helmraath M, Dunn JC, Henning SJ, Houchen CW, Kuo C, Lynch J, Li L, Magness ST, Martin MG, Wong MH, Yu J, NIH Intestinal Stem Cell Consortium. A nomenclature for intestinal in vitro cultures. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G1359–G1363, 2012.
52. Suen JY, Gardiner B, Grimmond S, Fairlie DP. Profiling gene expression induced by protease-activated receptor 2 (PAR2) activation in human kidney cells. *PLoS One* 5: e13809, 2010.
53. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. Reciprocal targeting of Hath1 and beta-catenin by Wnt glycogen synthase

- kinase 3beta in human colon cancer. *Gastroenterology* 132: 208–220, 2007.
54. **Van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, Versteeg HH.** The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood* 119: 924–932, 2012.
 55. **Van Der Kraak L, Gros P, Beauchemin N.** Colitis-associated colon cancer: is it in your genes? *World J Gastroenterol* 21: 11688–11699, 2015.
 56. **Van Landeghem L, Santoro MA, Krebs AE, Mah AT, Dehmer JJ, Gracz AD, Scull BP, McNaughton K, Magness ST, Lund PK.** Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G1111–G1132, 2012.
 57. **Vergnolle N.** Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther* 123: 292–309, 2009.
 58. **Vermeulen L, Snippert J.** Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat Rev Cancer* 14: 468–480, 2014.
 59. **von Furstenberg RJ, Gulati AS, Baxi A, Doherty JM, Stappenbeck TS, Gracz AD, Magness ST, Henning SJ.** Sorting mouse jejunal epithelial cells with CD24 yields a population with characteristics of intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G409–G417, 2011.
 60. **Wang HL, Hart J, Fan L, Mustafi R, Bissonnette M.** Upregulation of glycogen synthase kinase 3 β in human colorectal adenocarcinomas correlates with accumulation of CTNBN1. *Clin Colorectal Cancer* 10: 30–36, 2011.
 61. **Wang Z, Iwasaki M, Ficara F, Lin C, Matheny C, Wong SH, Smith KS, Cleary ML.** GSK-3 promotes conditional association of CREB and its coactivators with MEIS1 to facilitate HOX-mediated transcription and oncogenesis. *Cancer Cell* 17: 597–608, 2010.
 62. **Weber GF, Bjerke MA, DeSimone DW.** Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci* 124: 1183–1193, 2011.
 63. **Whittle BJ, Varga C, Pósa A, Molnár A, Collin M, Thiemermann C.** Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *Br J Pharmacol* 147: 575–582, 2006.
 64. **Wood SR, Zhao Q, Smith LH, Daniels CK.** Altered morphology in cultured rat intestinal epithelial IEC-6 cells is associated with alkaline phosphatase expression. *Tissue Cell* 35: 47–58, 2003.
 65. **Yan B, Gu W, Yang Z, Gu Z, Yue X, Gu Q, Liu L.** Downregulation of a long noncoding RNA-ncRuPAR contributes to tumor inhibition in colorectal cancer. *Tumour Biol* 35: 11329–11335, 2014.
 66. **Yeung J, Esposito MT, Gandillet A, Zeisig BB, Griessinger E, Bonnet D, So CW.** β -Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer Cell* 18: 606–618, 2010.
 67. **Zahir N, Weaver VM.** Death in the third dimension: apoptosis regulation and tissue architecture. *Curr Opin Genet Dev* 14: 71–80, 2004.
 68. **Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW.** Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 67, 2014.





Anti-inflammatory and anticancer effects of flavonol glycosides from *Diplotaxis harra* through GSK3 β regulation in intestinal cells

Imen Nasri, Rachid Chawech, Cynthia Girardi, Emmanuel Mas, Audrey Ferrand, Nathalie Vergnolle, Nicolas Fabre, Raoudha Mezghani-Jarraya & Claire Racaud-Sultan

To cite this article: Imen Nasri, Rachid Chawech, Cynthia Girardi, Emmanuel Mas, Audrey Ferrand, Nathalie Vergnolle, Nicolas Fabre, Raoudha Mezghani-Jarraya & Claire Racaud-Sultan (2016): Anti-inflammatory and anticancer effects of flavonol glycosides from *Diplotaxis harra* through GSK3 β regulation in intestinal cells, *Pharmaceutical Biology*, DOI: [10.1080/13880209.2016.1230877](https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1230877)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1230877>



Published online: 22 Sep 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH ARTICLE

Anti-inflammatory and anticancer effects of flavonol glycosides from *Diplotaxis harra* through GSK3 β regulation in intestinal cells

Imen Nasri^{a,b}, Rachid Chawech^{a,c}, Cynthia Girardi^c, Emmanuel Mas^{b,d}, Audrey Ferrand^b, Nathalie Vergnolle^b, Nicolas Fabre^c, Raoudha Mezghani-Jarraya^{a*} and Claire Racaud-Sultan^{b*}

^aLaboratoire de Chimie des Substances Naturelles, UR11-ES74, Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, Sfax, BP, Tunisie; ^bIRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France; ^cUMR 152 Pharma-Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, France; ^dService de Gastroentérologie, Hépatologie et Nutrition, Hôpital des Enfants, Toulouse, France

ABSTRACT

Context and objective: *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. (Brassicaceae) is traditionally used as an antidiabetic, anti-inflammatory or anticancer agent. In these pathologies, the glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) is overactivated and represents an interesting therapeutic target. Several flavonoids can inhibit GSK3 β and the purpose of this study was to search for the compounds in *Diplotaxis harra* which are able to modulate GSK3 β .

Materials and methods: Methanol extracts from *D. harra* flowers were prepared and the bio-guided fractionation of their active compounds was performed using inflammatory [protease-activated receptor 2 (PAR₂)-stimulated IEC6 cells] and cancer (human Caco-2 cell line) intestinal cells. 50–100 μ g/mL of fractions or compounds purified by HPLC were incubated with cells whose inhibited form of GSK3 β (Pser9 GSK3 β) and survival were analyzed by Western blot at 1 h and colorimetric assay at 24 h, respectively. LC-UV-MS profiles and MS-MS spectra were used for the characterization of extracts and flavonoids-enriched fractions, and the identification of pure flavonoids was achieved by MS and NMR analysis.

Results: The methanol extract from *D. harra* flowers and its flavonoid-enriched fraction inhibit GSK3 β in PAR₂-stimulated IEC6 cells. GSK3 β inhibition by the flavonoid-enriched *D. harra* fraction was dependent on PKC activation. The flavonoid-enriched *D. harra* fraction and its purified compound isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside induced a 20% decrease of PAR₂-stimulated IEC6 and Caco-2 cell survival. Importantly, normal cells (non-stimulated IEC6 cells) were spared by these treatments.

Conclusion: This work indicates that flavonoids from *D. harra* display cytotoxic activity against inflammatory and cancer intestinal cells which could depend on GSK3 β inhibition.

ARTICLE HISTORY

Received 6 June 2016
Accepted 25 August 2016
Revised 18 August 2016
Published online 21 September 2016

KEYWORDS

Flavonoids; intestine; inflammation; cancer; glycogen synthase kinase 3 β

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) are frequent pathologies that result from the interaction between genetic factors and microbial and environmental cues. The patients with long-standing IBD, such as ulcerative colitis and Crohn's disease, have an increased risk of developing colorectal cancer (CRC) (Triantafyllidis et al. 2009). Even though anti-inflammatory therapies and colonoscopy surveillance have decreased the incidence of colitis-induced CRC, new therapeutic approaches are needed to avoid therapeutic resistance and complications.

Diet has been implicated in the development and therapy of IBD (Neuman & Nanau 2012). For example, diet low in fruits and vegetables leads to an increased risk of developing IBD and CRC (Pan et al. 2011). Important phytochemicals of the human diet such as flavonoids and isothiocyanates have chemoprotective effects in a number of animal models of experimental IBD and CRC (Pan et al. 2011; Dinkova-Kostova 2012). Dietary consumption of flavonoids has been inversely associated with the risk of CRC (Rossi et al. 2010).

Intestinal stem cells (ISC) homeostasis is impaired in IBD and CRC (Vermeulen & Snippert 2014). The serine-threonine kinase, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), plays a critical

role in the regulation of important ISC functions such as Wnt-related integration site (Wnt) proliferative response, NF κ B and telomerase survival pathways, and Hath1 differentiation activity (Steinbrecher et al. 2005; Tsuchiya et al. 2007; Mai et al. 2009). Also, GSK3 β influences barrier functions through the regulation of adherens junctions and Rho kinase (Severson et al. 2010). In IBD and CRC, GSK3 β is overexpressed/overactivated and its inhibition ameliorates colitis and CRC response to chemotherapy (Whittle et al. 2006; Wang et al. 2011; Grassilli et al. 2013). Interestingly, we recently demonstrated that both in inflammatory and cancer intestinal models, i.e., protease-activated receptor 2 (PAR₂)-stimulated colonospheres or IEC6 cells and Caco-2 spheroids, a PAR₂-GSK3 β pathway controls primitive cell survival and proliferation (Nasri et al. 2016).

We have previously shown that it is possible to specifically target pathological stem cells through the modulation of GSK3 β by glucoflavonoids. Indeed, in leukemic stem cells, flavonoids whose structure is close to rutin (quercetol-3-O-glucose-rhamnose) induce apoptosis through the enhancement of the Akt/GSK3 β pathway (Bourogaa et al. 2011). Interestingly, dietary rutin ameliorates experimental colitis and colon carcinogenesis through the attenuation of pro-inflammatory gene expression

and of biotransforming and bacterial enzymes activities (Kwon et al. 2005; Vinothkumar et al. 2014).

It has been shown that a mixture of flavonoids prevents intestinal polyps and reduces the recurrence of CRC after resection (Hoensch et al. 2008; Fini et al. 2011). Looking for compounds that could synergize with rutin in inflammation and cancer therapies, we have investigated the phytochemical composition of *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. (Brassicaceae). Indeed, *D. harra* is an edible plant used in traditional medicine for the treatment of various diseases such as anemia, hypercholesterolemia, diabetes and mainly inflammation and cancer (Bellakhdar 1997; Ghrabi 2005; Ramadan et al. 2009). The aerial parts of this medicinal plant have a high polyphenol content that could support anti-inflammatory and anticancer properties (Falleh et al. 2013; Kassem et al. 2013). Our purpose was to determine if compounds from *D. harra* could modulate epithelial GSK3 β activation in two *in vitro* models: PAR₂-stimulated IEC6 cells, mimicking inflammatory conditions (Li et al. 2015), and human colon cancer-derived Caco-2 cell line grown in 3D.

Materials and methods

Plant material

Diplotaxis harra (leaves, flowers and roots) was collected from Sidi Bouzid, in the center of Tunisia, in December 2011 and authenticated by Prof. Mohamed Chaieb, Biology Department, University of Sfax. A voucher specimen (LCSN130) was deposited in the Herbarium of the Laboratory of Chemistry of Natural Substances, Department of Chemistry, Faculty of Sciences of Sfax, Tunisia.

Extraction and isolation

The different parts of *D. harra* [leaves (800 g), flowers (220 g) and roots (2.4 kg)] were air-dried in shade, defatted with *n*-hexane and then macerated thrice during 24 h successively with ethyl acetate and methanol. For each extraction, the used solvent volumes were 1 L for leaves and flowers and 3 L for roots. After filtration, the solvent was evaporated using a rotary evaporator (Heidolph, Germany). Close examination of the extracts separated by thin layer chromatography (TLC, silica-gel 60 Å, 40–63 μ m) developed with ethyl acetate:butanol-1:water:acetic acid (5:4:0.5:0.5) solvent mixture and observed under UV light at 254 and 366 nm with the presence of ammonia vapour revealed the presence of spots of flavonoids in methanol extracts.

Flower methanol extract (6 g) was separated by column chromatography on silica gel (Kieselgel 60 Å (40–63 μ m, PF254) and eluted with mixtures of ethyl acetate:methanol of increasing polarity (100:0 \rightarrow 0:100) to yield 9 fractions pooled according to their TLC profiles (same TLC parameters as described above). LC-MS/MS analysis (see below for details) of all the fractions showed the presence of flavonoids in fractions 3 (F3) and 6 (F6). Fraction F6 (2 g) was chromatographed over a C18 silica gel column (RP-18 Silica 60 Å, 40–60 μ m) and eluted gradually with water:acetonitrile (100:0 \rightarrow 0:100), yielding isorhamnetin-3-*O*-glucoside (31 mg) and 13 sub-fractions (L1–L13). MS/MS analysis of all sub-fractions showed the presence of flavonoids in two sub-fractions (L7 and L12).

L12 (100 mg) was dissolved in 10 mL of methanol and then 1 mL of this solution was injected in preparative HPLC (see below for details). The major product of this fraction, isorhamnetin-3,7-di-*O*-glucoside (23 mg), was eluted isocratically at

3.89 min in a volume of 0.1% formic acid:acetonitrile (80:20). Purity of the isolated compound was 95% determined by UPLC/DAD analysis.

Identification of isorhamnetin mono- and di-glucosides was carried out by MS and 1D and 2D NMR analysis and the data compared with literature (Igarashi et al. 2008; Liu et al. 2010).

LC-MS/MS analysis

The identification of flavonoids in the extracts was performed by LC-MS using an ULTIMATE 3000 HPLC system coupled to an ion trap mass spectrometer (LCQ DECA XP Max, Thermo Finnigan) equipped with an electrospray source functioning in the negative ion mode. Extracts were separated on a Phenomenex column (Kinetex C18, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m) with a gradient from 90% (+0.1% formic acid) to 100% acetonitrile.

Preparative HPLC

Semi-preparative HPLC was performed on an auto purification system equipped with a Photodiode Array Detector (Waters). The column was a Waters X bridge C18 5 μ m (150 \times 19 mm). 0.1% formic acid and 100% acetonitrile were respectively employed as solvents A and B with a flow rate of 20.5 mL/min. The elution gradient was 6.5 min gradient run from 5% to 50% B in 6.5 min and then returned to initial conditions. The elution was monitored by UV detection at 254 and 355 nm. The collected fractions were pooled and analyzed by analytical UPLC on a UPLC Acquity system from Waters with an Acquity BEH C18 1.7 μ m (2.1 \times 50 mm) column at 40 °C. The isocratic conditions were water:acetonitrile (80:20). The flow rate was 0.6 mL/min and the detection was set at 254 nm.

Cell culture

IEC6 (ATCC-CRL-1592) cells from rat small intestine and Caco-2 (ATCC-HTB-37; LGC Standards authentication certificate) cells from human CRC were purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France) and were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Cat. No. 31966 with Glutamax and 1 mM sodium pyruvate) supplemented with 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS) without complement at 37 °C and 5% CO₂. Caco-2 culture medium was supplemented by 1% non-essential amino acids. All cell culture reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA). Once the cells reached 90% confluency, cells were used for experiments.

In 2D culture, IEC6 and Caco-2 cells were seeded in 12-well plates (0.5 \times 10⁶ cells) or 96-well plates (4 \times 10⁴ cells) and were incubated with DMEM and 10% FCS at 37 °C for 24 h.

In 3D Culture, 1 \times 10⁴ Caco-2 cells were embedded in 4 μ L Matrigel seeded on top of 20 μ L polymerized Matrigel in 48-well plates. Cells were cultured in DMEM and 10% FCS and 1% non-essential amino acids at 37 °C for 24 h. In these conditions, cells were growing as spheroids that we observed daily using an apotome microscope (Zeiss Axio-observer, HXP120).

After 24 h of 2D or 3D culture, cells were serum-starved for 24 h before stimulation by 100 μ M PAR₂ agonist peptide (PAR₂ AP, Genscript, Piscataway, NJ) or its inverted control (Ezbiolab Inc., Carmel, IN) for 1 h. Methanol extracts of *D. harra* organs and fractions F3 and F6 (solubilized in ethanol 10%, 10 mg/mL), and sub-fraction L12 and isorhamnetin-3-*O*-glucoside and isorhamnetin-3,7-di-*O*-glucoside (dissolved in DMSO 50%,

10 mg/mL) were then incubated with cells at 100 or 150 $\mu\text{g/mL}$ (fractions) or 10–50 $\mu\text{g/mL}$ (purified compounds). The protein kinase C (PKC) inhibitor Gö6976 (0.2 μM , Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was added 15 min before F6. In some experiments, GSK3 pharmacological inhibitors (SB216763 12.5 μM , BIO 500 nM or CHIR99021 2.5 μM , Tocris Bioscience, RD Systems, Lille, France) were incubated with cells in 3D culture. DMSO was used as solvent for pharmacological inhibitors and used at a maximal 0.05% final concentration. After 1 h of incubation, 12-well plates were processed to prepare cell lysates used for Western blot and after 24 h, 96-well and 48-well plates were incubated with MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) to measure surviving cells.

Western blot analysis

Cellular proteins were extracted from IEC6 and Caco-2 cells and subjected to Western blotting analysis (Nasri et al. 2016), to examine the regulation of GSK3 β using primary antibodies Pser9GSK3 β (diluted 1:1000) and Pser473Akt (diluted 1:1000) from Cell Signalling Technology (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France), GSK3 β (diluted 1:2500) from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), Ptyr307PP2A (diluted 1:1000) and actin (diluted 1:1000) from Abcam (Paris, France). Signals were detected using a chemiluminescent substrate (SuperSignal, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Cell survival/proliferation assay

Cells were incubated with MTS for 3 h, at 20 $\mu\text{L/well}$ (96-well plates) or 40 $\mu\text{L/well}$ (48-well plates). Then, absorbance was measured at 480 nm by spectrometry (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). The percentage of surviving cells was determined by comparing the absorbances of assays and controls (non-treated cells). The test was carried out by triplicate in 2D culture and by duplicate in 3D culture.

Statistical analysis

Student's *t*-test was used for the experiment's analysis.

Results

Diplotaxis harra flower methanol extract modulates GSK3 β

In search of flavonoids in *D. harra* able to modulate GSK3 β , we performed methanol extraction of flowers, roots and leaves. Extracts were then tested on the PAR₂ AP-stimulated IEC6 cell model. As shown in Figure 1(A), inhibited β isoform of GSK3 (Pser9 GSK3 β) was specifically increased compared to control by treatment of PAR₂ AP-stimulated IEC6 cells with flower or root methanol extracts. However, the flower extract seemed to be more efficient and we decided to pursue its purification.

A separation of compounds in *D. harra* flower methanol extract was performed by column chromatography using an ethyl acetate-methanol gradient. Fractions were then processed for TLC and a colorimetric analysis revealed that two methanol fractions, F3 and F6, were flavonoid-enriched fractions (not shown). As shown in Figure 1(B), F6 but not F3 fraction prevented Pser9

GSK3 β dephosphorylation (GSK3 β activation) triggered by PAR₂ AP treatment.

Altogether these data suggest that flavonoids from *D. harra* flowers might modulate GSK3 β .

Flavonoid-enriched fraction from Diplotaxis harra flowers modulates GSK3 β through PKC

We had previously shown that the phosphatase PP2A was implicated in the PAR₂-dependent activation of GSK3 β in IEC6 cells and that the modulatory kinase of GSK3 β , Akt, was concomitantly inhibited (Nasri et al. 2016). We thus investigated whether the flavonoid-enriched fraction F6 may regulate PP2A and Akt. As shown in Figure 2(A), treatment with F6 fraction did not

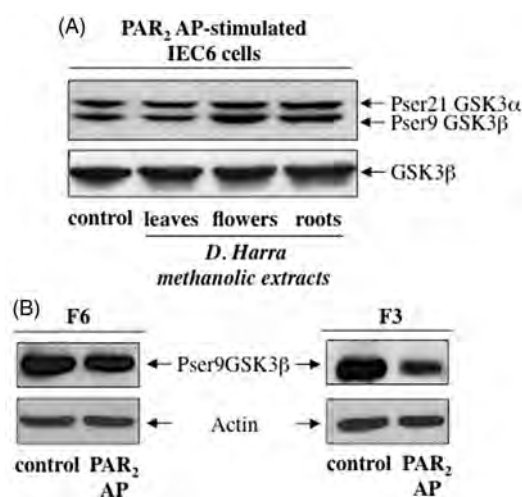


Figure 1. Flavonoids from *D. harra* flowers modulate GSK3 β . (A) Serum-starved IEC6 cells were stimulated with PAR₂ AP (100 μM) for 1 h and then incubated for 1 h with methanol extracts from *D. harra* leaves, flowers or roots (100 $\mu\text{g/mL}$) or ethanol/water (10%) as control. The variations of the inhibited form of GSK3 β (Pser9 GSK3 β) were analyzed with total protein GSK3 β by Western blot. Representative of three independent experiments. (B) Flavonoid-enriched fractions of *D. harra* flowers, F6 and F3 (100 $\mu\text{g/mL}$), were incubated with IEC6 cells as described in (A). Variations of Pser9 GSK3 β were analyzed after this treatment in IEC6 cells previously stimulated with PAR₂ AP or control peptide (100 μM). Actin is shown as loading control. Representative of two independent experiments.

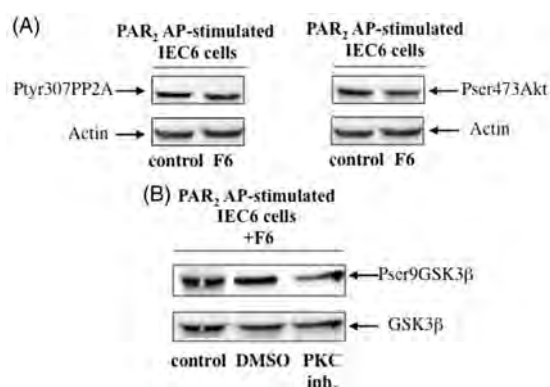


Figure 2. The flavonoid-dependent modulation of GSK3 β is regulated by PKC. Serum-starved IEC6 cells were stimulated with PAR₂ AP (100 μM) for 1 h and then incubated for 1 h with the flavonoid-enriched fraction F6 from *D. harra* flowers (100 $\mu\text{g/mL}$) or ethanol/water (10%) as control. In A, Ptyr307PP2A (inhibited form) and Pser473Akt (activated form) were analyzed by Western blot. Actin is shown as loading control. Representative of two independent experiments. In B, PAR₂ AP-stimulated IEC6 cells were treated with 0.2 μM PKC inhibitor Gö6976 or DMSO (solvent) for 15 min before F6 addition. Pser9 GSK3 β and total GSK3 β were analyzed by Western blot. Representative of two independent experiments.

change P_{tyr}307PP2A (inhibited form) and P_{ser}473Akt (activated form) in PAR₂-stimulated IEC6 cells, demonstrating that F6 does not modulate GSK3 β through PP2A and Akt.

Conversely, inhibition of PKC, another modulatory kinase of GSK3 β , prevented serine 9 phosphorylation of GSK3 β induced by F6 treatment in PAR₂-stimulated IEC6 cells (Figure 2(B)). Thus, F6 inhibits GSK3 β through PKC in PAR₂-stimulated IEC6 cells.

These results suggest that flavonoids from *D. harra* flowers might modulate GSK3 β through PKC regulation.

Flavonoid-enriched fraction from *Diplotaxis harra* flowers is cytotoxic for inflammatory and cancer intestinal cells

Given the implication of GSK3 β in intestinal inflammation and cancer, we have then investigated the impact of the flavonoid-enriched fraction F6 on cell survival in PAR₂-stimulated intestinal IEC6 cells and colon cancer Caco-2 cells. As shown in Figure 3(A), the percentage of surviving IEC6 cells decreased after 48 h of serum starvation. However, PAR₂ AP treatment

prevented partially this decrease and we have shown previously that the expression of active caspase 3 was concomitantly down-regulated suggesting a protective role of PAR₂ against serum starvation-induced apoptosis in IEC6 cells (Nasri et al. 2016). Interestingly, F6 treatment increased IEC6 cells survival in serum-starved conditions but decreased it upon pretreatment by PAR₂ AP (Figure 3(A)). Pharmacological GSK3 inhibition has been shown to induce cytotoxicity in colon cancer cells (Shakoori et al. 2007) and indeed Caco-2 cells cultured in 3D were strongly decreased after GSK3 inhibition using either Chir99021, BIO or SB216763 treatment (Figure 3(A)). F6 treatment also induced a 20% decrease in Caco-2 cells both in 2D and 3D culture conditions (Figure 3(A)). These results are in agreement with the pro-survival role of GSK3 β in inflammation and cancer and strongly suggest that the flavonoid-enriched fraction of *D. harra* flowers is cytotoxic for inflammatory and cancer intestinal cells through GSK3 β modulation.

We then analyzed F6 composition by LC-MS/MS in search of glucoflavonoids that we previously found active to target pathological cells through the modulation of GSK3 β . As shown in Figure 3(B), examination of the negative ion Total Ion Current

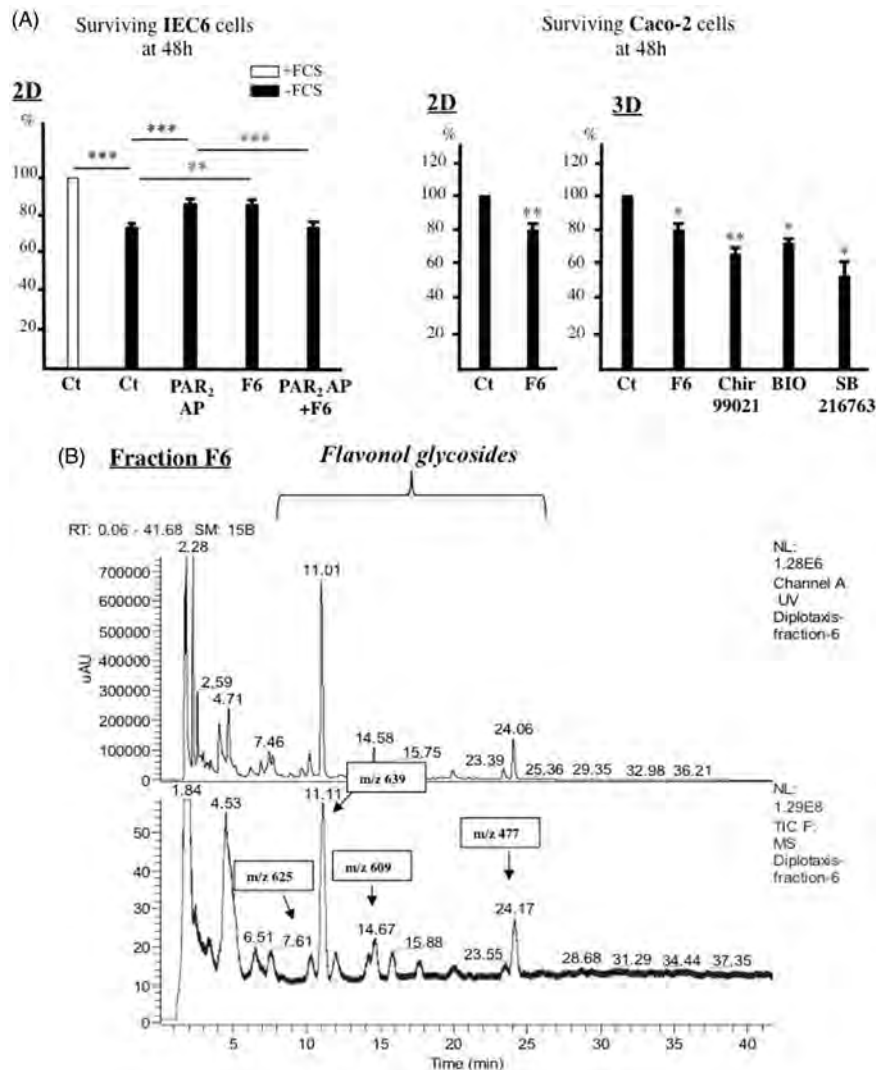


Figure 3. Flavonoids from *D. harra* are cytotoxic for inflammatory and cancer intestinal cells. (A)- IEC6 and Caco-2 cells in 2D or 3D culture conditions were serum-starved for 24 h before PAR₂ AP stimulation (100 μ M, 1 h) and/or F6 treatment (100 μ g/mL). In some experiments, GSK3 inhibitors (2.5 μ M Chir99021, 500 nM BIO, 12.5 μ M SB216763) were incubated with Caco-2 cells. 24 h after, surviving cells were measured by MTS. Surviving IEC6 cells in serum-supplemented culture conditions are shown. Data are mean \pm S.E.M. ($n = 2$ to 4), comparison to the control or between assays: $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$. (B) Total Ionic Current (TIC) chromatogram of the F6 fraction. (C) MS/MS spectra of main ions detected in F6.

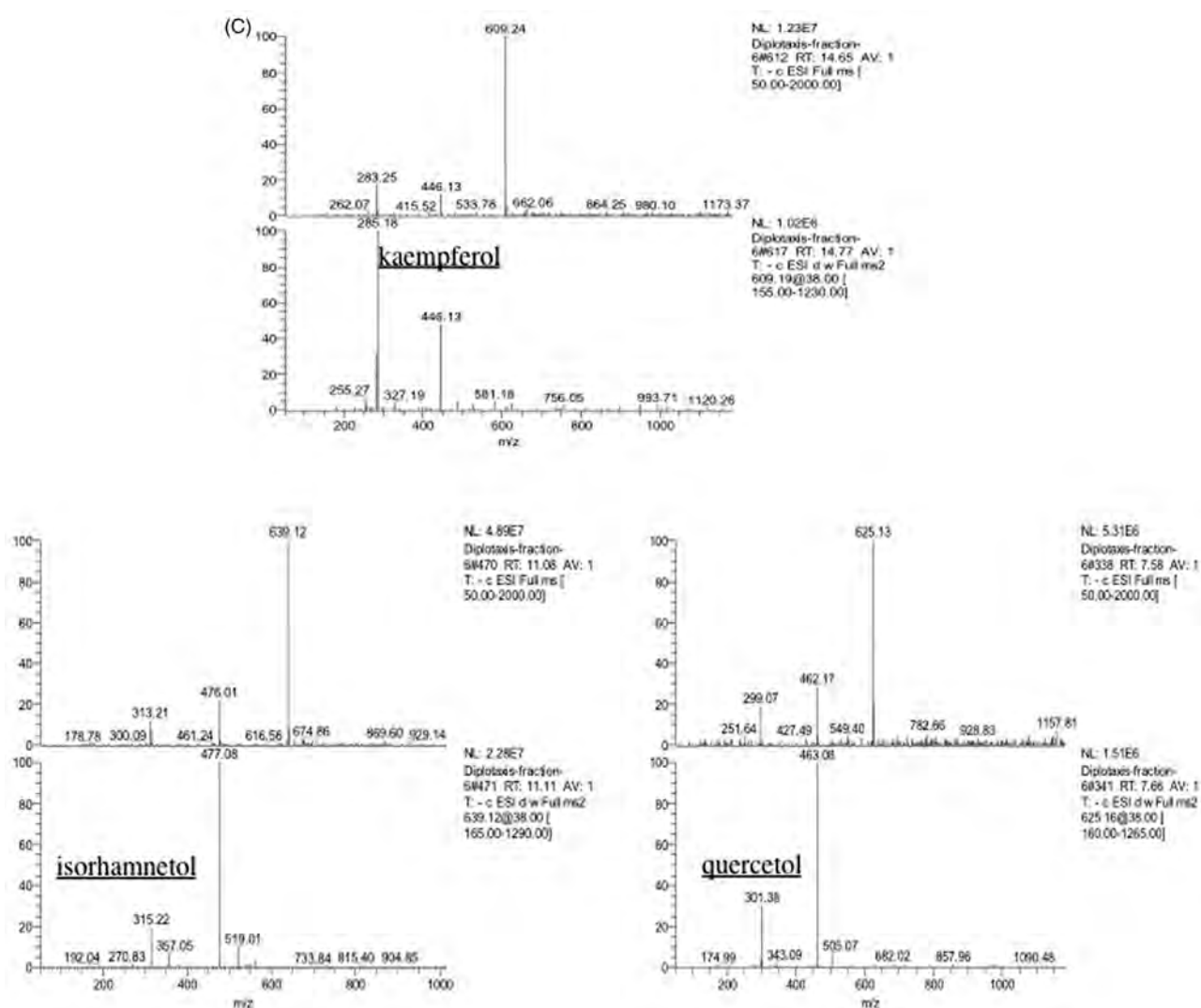


Figure 3. Continued.

(TIC) chromatogram of the flavonoid-enriched fraction F6 showed the presence of two major groups of glucoflavonoids. Close examination of MS-MS spectra (Figure 3(C)) of four main ions detected in F6 led us to propose the presence of mono- and di-heterosides possessing isorhamnetin (ion at m/z 315), kaempferol (ion at m/z 285) and quercetin (ion at m/z 301) as genins, all already described in *D. harra* (Atta et al. 2011; Kassem et al. 2013).

These results suggest that one or several glucoflavonoids present in F6 could trigger cytotoxicity in pathological intestinal cells through GSK3 β inhibition.

Isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside purified from *Diplotaxis harra* flowers has anti-inflammatory and anticancer properties in vitro

Further purification of compounds in fraction F6 was realized using column chromatography (water-acetonitrile gradient). As shown in Figure 4(A), one of sub-fractions obtained, L12, displayed interesting cytotoxicity, decreasing strongly cancer Caco-2 cells while sparing non-transformed IEC6 cells. The full MS spectrum [ESI(-)] of L12 (Figure 4(B)) displayed 2 main ions at m/z 639 and 477. Close examination of MS-MS spectra of these two main ions led us to propose the presence of isorhamnetin-glucosides

since they led to the same product ion at m/z 315 ($[M-H]^-$ of isorhamnetin) (Figure 4(B)).

Purification process using C18 reversed-phase silica gel HPLC led to the isolation of isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside (ion at m/z 639 $[M-H]^-$) and isorhamnetin-3-O-glucoside (ion at m/z 477 $[M-H]^-$), that were identified according to their MS and NMR spectral data and by comparison with those of literature. Both compounds have already been described in the whole plant *D. harra* (Kassem et al. 2013). Interestingly, isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside, but not isorhamnetin-3-O-glucoside (not shown), displayed cytotoxicity in PAR₂-stimulated IEC6 cells and Caco-2 cells (Figure 5).

Thus, these results show that isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside may be involved in anti-inflammatory and anticancer properties of *D. harra* flowers.

Discussion and conclusions

The main finding of this study elucidated the anti-inflammatory and anticancer effects of the medicinal plant *Diplotaxis harra* that could be partially supported by flavonol glycosides through GSK3 β regulation.

We found that a flavonoid-enriched fraction of *D. harra* flowers modulates GSK3 β . Previous studies have predicted that some

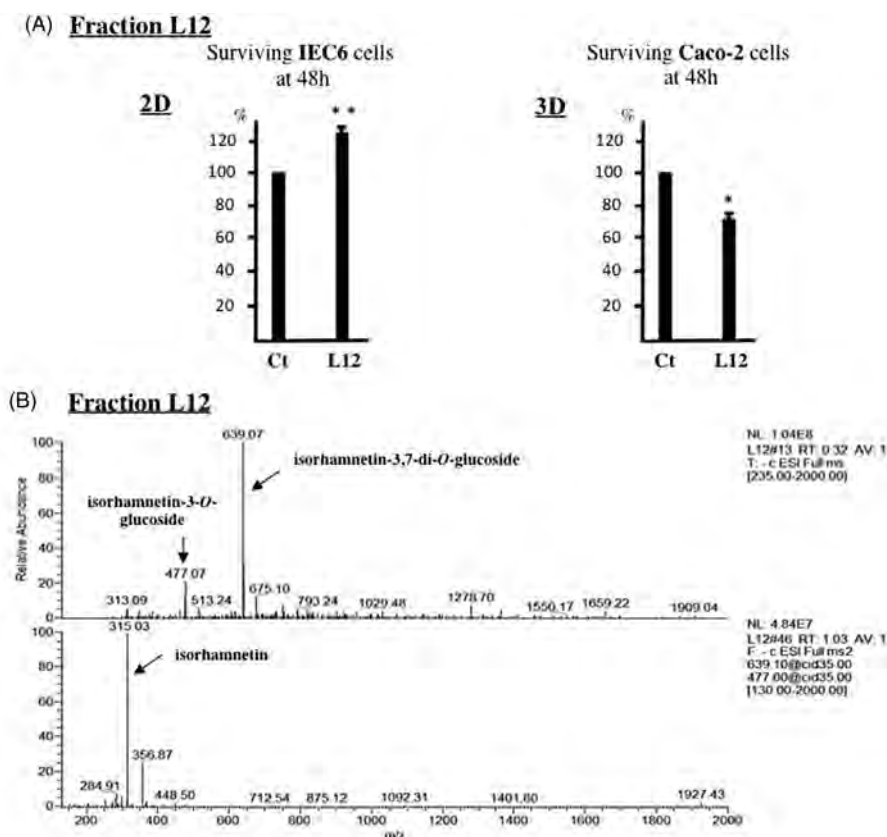


Figure 4. Flavonol glycosides from *D. harra* are cytotoxic for inflammatory and cancer intestinal cells. (A) The flavonol glycosides-enriched fraction L12 from F6 was incubated with serum-starved IEC6 and Caco-2 cells at 100 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. 24 h after surviving cells were measured with MTS. Data are mean \pm S.E.M. ($n = 2$ to 3), comparison to the control: $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$. (B) Full-MS spectrum of the L12 fraction and of its two main ions.

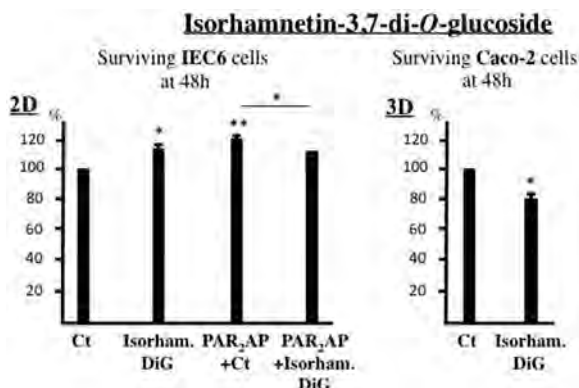


Figure 5. Isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside is cytotoxic for inflammatory and cancer intestinal cells. Isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) purified from L12 or DMSO/water (control, 0.25%) was incubated with serum-starved IEC6 and Caco-2 cells. 24 h after surviving cells were measured with MTS. Data are mean \pm S.E.M. ($n = 2$ performed in duplicate (3D) or triplicate (2D)), comparison to the control or between assays: $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$.

flavonoids could fit into the binding pocket of GSK3 β (Johnson et al. 2011). However, we show that in intestinal cells, PKC is implicated in the GSK3 β inhibition by flavonoids. Indeed, Gö6976, an inhibitor of PKC α and PKC β , impaired serine 9 phosphorylation (inhibition) of GSK3 β triggered by the flavonoid-enriched fraction of *D. harra* flowers. Interestingly, such PKC-dependent inhibition of GSK3 β has already been described in human colon cancer cells and correlated with increased cell proliferation (Wang et al. 2006). Thus, in our experimental conditions, the cytotoxic effect of flavonoids on inflammatory and cancer intestinal cells may be related to an exit from cell quiescence.

Also, PKC has been shown to play an important role in the cytoskeleton organization of intestinal cells (Fasano et al. 1995) and we have shown that the Rho kinase controls GSK3 β activity in PAR₂-stimulated intestinal cells (Nasri et al. 2016). Therefore, it is possible that flavonoids, through an impact on the cytoskeleton (Noda et al. 2013) and consequently on PKC activity, down-regulate GSK3 β . Importantly, treatment with the flavonoid-enriched fraction of *D. harra* flowers was not deleterious for non-inflammatory or non-transformed cells.

LC-MS/MS analysis of the flavonoid-enriched fraction F6 of *D. harra* flowers indicated the presence of seven flavonol glycosides displaying three kinds of aglycones (isorhamnetin, quercetin and kaempferol). According to their MS profiles, these heterosides were putatively identified as isorhamnetin-3-O-glucoside (ion at m/z 477 [M-H]⁻); isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside (ion at m/z 639 [M-H]⁻); quercetin-3,4'-di-O-glucoside (ion at m/z 625 [M-H]⁻); kaempferol-3,4'-di-O-glucoside (ion at m/z 609 [M-H]⁻); kaempferol-3-di-O-glucoside (ion at m/z 609 [M-H]⁻); isorhamnetin-4'-di-O-glucoside (ion at m/z 639 [M-H]⁻) and isorhamnetin-3,4'-di-O-glucoside (ion at m/z 639 [M]⁻) (Figure 6). Given our previous work showing that rutin is cytotoxic for leukemic progenitors (Bourogaa et al. 2011), these flavonol glycosides could be responsible for the GSK3 β -dependent cytotoxicity in pathological intestinal cells. This is in accordance with the results of Mohammed et al. (2013) showing cytotoxicity of isolated flavonol glycosides from *D. harra* (quercetin-3-O- β -glucoside, isorhamnetin-7-O- β -glucoside, apigenin-7-O- β -rhamnoside and kaempferol-3-O- β -glucoside) against the human colon cancer HCT116 cell line. However, for the first time, we show that the compound isorhamnetin-3,7-di-O-glucoside purified from

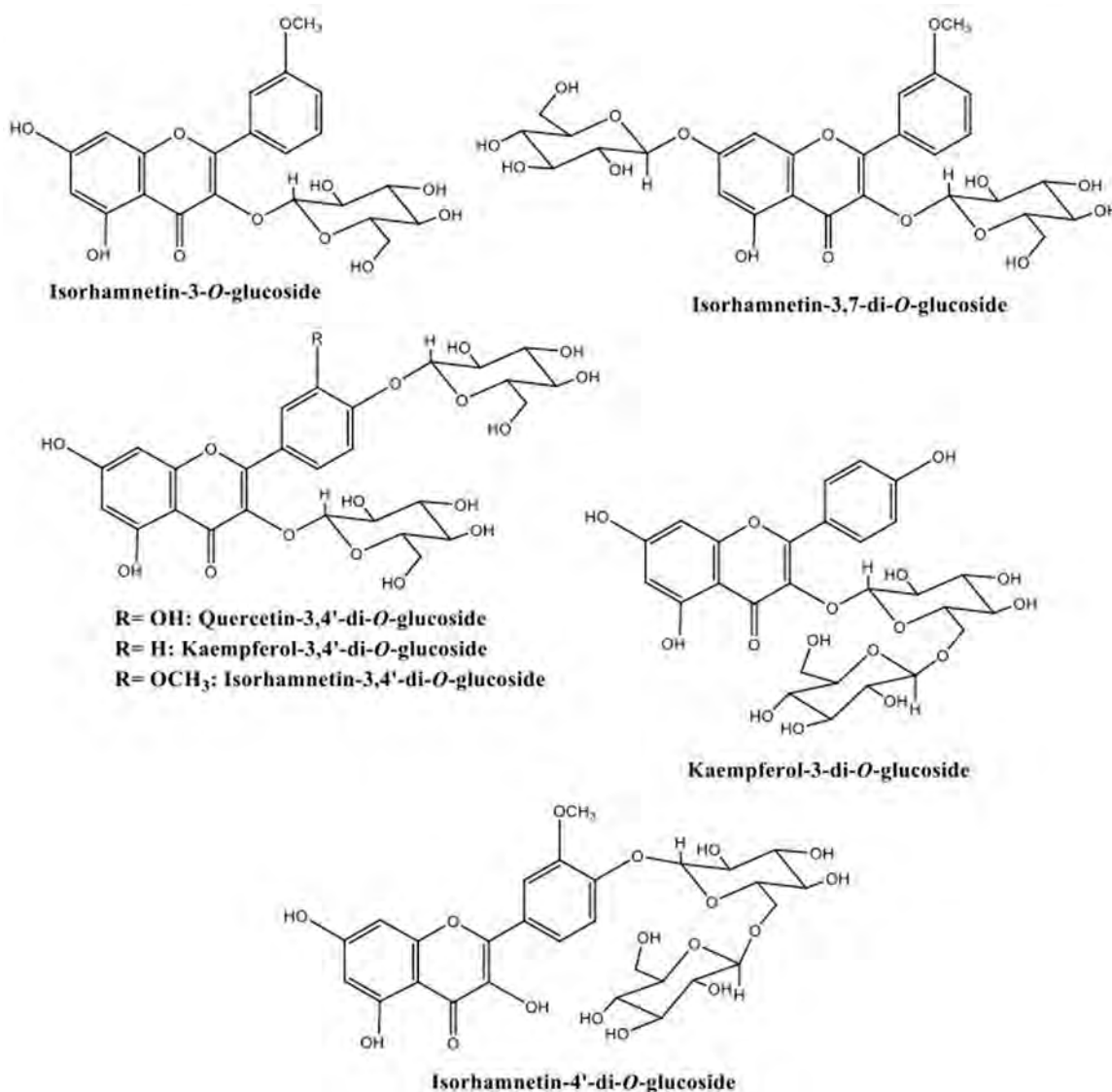


Figure 6. Chemical structure of flavonol glycosides in F6 fraction from *D. harra* flowers. Isorhamnetin-3-*O*-glucoside; isorhamnetin-3,7-di-*O*-glucoside; quercetin-3,4'-di-*O*-glucoside; kaempferol-3,4'-di-*O*-glucoside; kaempferol-3-di-*O*-glucoside; isorhamnetin-4'-di-*O*-glucoside and isorhamnetin-3,4'-di-*O*-glucoside.

D. harra flowers, has cytotoxic activities against cells displaying GSK3 β activation, namely here as an example cancer intestinal cells and intestinal cells under inflammatory signal conditions. As with the flavonoid-enriched extract from *D. harra* flowers, non-pathological cells were spared by this treatment.

We have previously shown (Bourogaa et al. 2011) that the GSK3 β -based cytotoxicity of flavonol glycosides requires either the association of glucose-rhamnose (= rutinoid) [rutin (= quercetin-3-*O*-rutinoside), isorhamnetin-3-rutinoside], or rhamnose (quercitrin), or galactose (hyperoside) in the position 3 of a flavonol structure. Indeed, in contrast to isorhamnetin-3,7-di-*O*-glucoside, we found that the second flavonol glycoside purified from *D. harra* flowers, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, was not cytotoxic for inflammatory and cancer intestinal cells. Moreover, in our previous data (Bourogaa et al. 2011), robinin (kaempferol-3-*O*-galactose-rhamnose-7-*O*-rhamnose), but not quercetin-7-*O*-glucoside, displayed cytotoxic activity as rutin, suggesting that the position 7 of flavonol structure is also of interest when associated with glycosylation in position 3. These results are in agreement with Antunes-Ricardo et al. (2014) who showed that glycosylation affects the anti-proliferative effect of the extract of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. var *Jalpa* (Cactaceae) and that the

isorhamnetin diglycosides were more cytotoxic than pure isorhamnetin aglycone against colon cancer HT-29 cells.

In conclusion, this study shows that GSK3 β can be targeted by natural compounds such as flavonol glycosides in inflammatory and cancer intestinal pathologies, and that isorhamnetin-3,7-di-*O*-glucoside is a new member of this GSK3 β -targeting flavonoid family.

Acknowledgements

We thank Isabelle Fabing from "Institut de Chimie de Toulouse" (ICT) for the technical assistance in semi-prep HPLC separations.

Disclosure statement

The authors report no declarations of interest.

Funding

This work was supported by the European Research Council Starting Grant [ERC_2012_StG_20111109], Ligue Régionale contre le Cancer

[2013 Aude Comity], Ministry of Higher Education and Scientific Research of Tunisia PHC Utique cooperation [N°CMCU12G0821], Association de Recherche contre le Cancer [N°SFI20121205496].

References

- Antunes-Ricardo M, Moreno-García BE, Gutiérrez-Urbe JA, Araújo-Hernández D, Alvarez MM, Serna-Saldivar SO. 2014. Induction of apoptosis in colon cancer cells treated with isorhamnetin glycosides from *Opuntia ficus-indica* pads. *Plant Foods Hum Nutr.* 69:331–336.
- Atta EM, Hashem AI, Ahmed AM, Elqosy SM, Jaspars M, El-Sharkaw ER. 2011. Phytochemical studies on *Diplotaxis harra* growing in Sinai. *Eur J Chem.* 2:535–538.
- Bellakhdar J. 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle: médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Paris: Ibis Press.
- Bourgoaa E, Despeaux M, Jarraya R, Fabre N, Bertrand J, Payrastra L, Demur C, Damak M, Fournié J, El Feki A, et al. 2011. *Hammada scoparia* flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. *Leuk Res.* 35:1093–1101.
- Dinkova-Kostova AT. 2012. Chemoprotection against cancer by isothiocyanates: a focus on the animal models and the protective mechanisms. *Top Curr Chem.* 329:179–201.
- Falleh H, Msilini N, Oueslati S, Ksouri R, Magne C, Lachaal M, Karray-Bourouai N. 2013. *Diplotaxis harra* and *Diplotaxis simplex* organs: assessment of phenolics and biological activities before and after fractionation. *Ind Crops Prod.* 45:141–147.
- Fasano A, Fiorentini C, Donelli G, Uzzau S, Kaper JB, Margaretten K, Ding Z, Guandalini S, Comstock L, Goldblum SE. 1995. Zonula Occludens Toxin (ZOT) modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, *in vitro*. *J Clin Invest.* 96:710–720.
- Fini L, Piazzì G, Daoud Y, Selgrad M, Maegawa S, Garcia M, Fogliano V, Romano M, Graziani G, Vitaglione P, et al. 2011. Chemoprevention of intestinal polyps in ApcMin/+ mice fed with western or balanced diets by drinking *Annurca* apple polyphenol extract. *Cancer Prev Res (Phila).* 4:907–915.
- Ghrabi Z. 2005. A guide to medicinal plants in North Africa. Malaga, Spain: IUCN Center for Mediterranean Cooperation.
- Grassilli E, Narloch R, Federzoni E, Ianzano L, Pisano F, Giovannoni R, Romano G, Masiero L, Leone BE, Bonin S, et al. 2013. Inhibition of GSK3B bypass drug resistance of p53-null colon carcinomas by enabling necroptosis in response to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 19:3820–3831.
- Hoensch H, Groh B, Edler L, Kirch W. 2008. Prospective cohort comparison of flavonoid treatment in patients with resected colorectal cancer to prevent recurrence. *World J Gastroenterol.* 14:2187–2193.
- Igarashi K, Mikami T, Takahashi Y, Sato H. 2008. Comparison of the preventive activity of isorhamnetin glycosides from atsumi-kabu (Red Turnip, *Brassica campestris* L.) leaves on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72:856–860.
- Johnson JL, Rupasinghe SG, Stefani F, Schuler MA, Gonzalez de Mejia E. 2011. Citrus flavonoids luteolin, apigenin, and quercetin inhibit glycogen synthase kinase-3 β enzymatic activity by lowering the interaction energy within the binding cavity. *J Med Food.* 14:325–333.
- Kassem ME, Afifi MS, Marzouk MM, Mostafa MA. 2013. Two new flavonol glycosides and biological activities of *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. *Nat Prod Res.* 27:2272–2280.
- Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. 2005. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 69:395–406.
- Li S, Guan J, Ge M, Huang P, Lin Y, Gan X. 2015. Intestinal mucosal injury induced by tryptase-activated protease-activated receptor 2 requires β -arrestin-2 *in vitro*. *Mol Med Rep.* 12:7181–7187.
- Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, Wang D, Han J, Yu Z, Yang F. 2010. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules.* 15:7933–7945.
- Mai W, Kawakami K, Shakoori A, Kyo S, Miyashita K, Yokoi K, Jin M, Shimasaki T, Motoo Y, Minamoto T. 2009. Deregulated GSK3 β sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clin Cancer Res.* 15:6810–6819.
- Mohammed MMD, El-Sharkawy ER, Matloub AA. 2013. Cytotoxic flavonoids from *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. growing in Sinai. *J Med Plants Res.* 7:19–23.
- Nasri I, Bonnet D, Zwarycz B, D'Aldebert E, Khou S, Mezghani-Jarraya R, Quaranta M, Rolland C, Bonnart C, Mas E, et al. 2016. PAR2-dependent activation of GSK3 β regulates the survival of colon stem/progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 311:G221–G236.
- Neuman MG, Nanau RM. 2012. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res.* 160:29–44.
- Noda S, Tanabe S, Suzuki T. 2013. Naringenin enhances intestinal barrier function through the expression and cytoskeletal association of tight junction proteins in Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res.* 57:2019–2028.
- Pan MH, Lai CS, Wu JC, Ho CT. 2011. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res.* 55:32–45.
- Ramadan MF, Amer MMA, Mansour HT, Wahdan KM, El-Sayed RM, El-Sanhoty S, El-Gleel WA. 2009. Bioactive lipids and antioxidant properties of wild Egyptian *Pulicaria incise*, *Diplotaxis harra*, and *Avicennia marina*. *J Verbr Lebensm.* 4:239–245.
- Rossi M, Rosato V, Bosetti C, Lagiou P, Parpinel M, Bertuccio P, Negri E, Vecchia CL. 2010. Flavonoids, proanthocyanidins, and the risk of stomach cancer. *Cancer Causes Control.* 21:1597–1604.
- Severson EA, Kwon M, Hilgarth RS, Parkos CA, Nusrat A. 2010. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) influences epithelial barrier function by regulating occludin, claudin-1 and E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 397:592–597.
- Shakoori A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, Kawakami K, Minamoto T. 2007. Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci.* 98:1388–1393.
- Steinbrecher KA, Wilson WIII, Cogswell PC, Baldwin AS. 2005. Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 25:8444–8455.
- Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. 2009. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res.* 29:2727–2738.
- Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. 2007. Reciprocal targeting of Hath1 and beta-catenin by Wnt glycogen synthase kinase 3beta in human colon cancer. *Gastroenterology.* 132:208–220.
- Vermeulen L, Snippert HJ. 2014. Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat Rev Cancer.* 14:468–480.
- Vinothkumar R, Vinoth Kumar R, Sudha M, Viswanathan P, Balasubramanian T, Nalini N. 2014. Modulatory effect of troxerutin on biotransforming enzymes and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon carcinogenesis. *Exp Mol Pathol.* 96:15–26.
- Wang HL, Hart J, Fan L, Mustafi R, Bissonnette M. 2011. Upregulation of glycogen synthase kinase 3 β in human colorectal adenocarcinomas correlates with accumulation of CTNNB1. *Clin Colorectal Cancer.* 10:30–36.
- Wang Q, Zhou Y, Evers BM. 2006. Neutensin phosphorylates GSK-3alpha/beta through the activation of PKC in human colon cancer cells. *Neoplasia.* 8:781–787.
- Whittle BJ, Varga C, Posa A, Molnar A, Collin M, Thiemermann C. 2006. Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *Br J Pharmacol.* 147:575–582.

RESUMÉ DE LA THÈSE EN FRANÇAIS

Les plantes médicinales *Diplotaxis harra* et *Diplotaxis simplex* occupent une place importante dans la pharmacopée traditionnelle grâce à leurs compositions variées en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes. Ces derniers jouent un rôle important dans plusieurs activités biologiques, notamment anti-inflammatoires et anti-cancéreuses.

Dans ce contexte, et à la recherche de molécules bioactives dans *D. harra* et *D. simplex*, nous avons mis au point un nouveau modèle d'étude *in vitro* des cellules souches à l'origine des pathologies inflammatoires et cancéreuses coliques où leur survie dépend de l'activation de la Glycogène Synthase Kinase 3beta (GSK3beta) en aval du récepteur de protéases inflammatoires PAR₂. Ce modèle a permis la purification bioguidée de glucoflavonoïdes à partir d'un extrait méthanolique des fleurs de *D. harra* capables d'inhiber GSK3beta *via* la voie PKC. Ainsi, l'Isorhamnétine-3,7-di-O-glucoside s'est révélé cytotoxique vis à vis des cellules inflammatoires ou cancéreuses coliques tout en épargnant les cellules normales.

D'autre part, en raison de l'intérêt grandissant porté aux fractions volatiles en thérapeutique, nous avons étudié les compositions chimiques et les activités antioxydantes des fractions volatiles des feuilles et des fleurs de *D. simplex*. En se basant sur la technique chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), nous avons montré que les deux fractions volatiles contiennent des quantités importantes de composés soufrés/azotés, parmi lesquels le 5-methylthiopentanenitrile et le 1-isothiocyanatobutane pourraient être impliqués dans l'effet antioxydant des fleurs de *D. simplex*.

En conclusion, nos travaux ont permis de révéler l'axe PAR₂/GSK3beta comme une nouvelle voie de survie des cellules souches coliques et l'intérêt thérapeutique des glucoflavonoïdes et des fractions volatiles de l'espèce *Diplotaxis*.