

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université de Jijel
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature
et de la vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة و علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
Option : Pharmacologie Expérimentale

Intitulé

***Évaluation du stress oxydatif cellulaire au cours
d'un cancer pulmonaire induit par benzo(a)pyrène
chez la souris***

Soutenu devant un jury composé de:

Présenté par

Dr Rechreche Hocine
Dr Lahouel Mesbah
Dr Sifour Mohamed

Président
Rapporteur
Examineur

Boudria Asma
Brihmouche Soumia



Année universitaire 2009-2010

Sommaire

	Page
Liste des abréviations	5
Introduction	6
Partie I. Etude Bibliographique	8
I.1. Induction des enzymes du métabolisme de B(a)P.....	8
I.2. Activation métabolique: Formation de métabolites toxiques.....	9
I.3. Le stress oxydatif.....	12
I.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	12
I.3.3. Dommages oxydatifs des biomolécules par le benzo(a)pyrène.....	15
I.3.3.1. Dommages oxydatifs de l'ADN nucléaire et mitochondriale.....	16
I.3.3.2. Peroxydation lipidique (LPO).....	18
I.3.4. le système anti-oxydant.....	20
I.3.4.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	20
I.3.4.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	22
Partie II. Matériel et Méthodes	24
II.1. Modèle animal du cancer du poumon.....	24
II.1.1. Entretien des animaux.....	24
II.1.2. Induction de la pathologie expérimentale	24
II.1.3. prélèvement des poumons.....	24
II.2. Evaluation du stress oxydatif.....	25
II.2.1. Dosage du glutathion cellulaire	25
II.2.2. Dosage du MDA.....	26
II.2.3. Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).....	27

II.2.4. Mesure de l'activité Glutathion S-Transférase.....	28
II.2.5. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase	28
II.3. Examen anatomopathologique.....	229
II.3.1. Examen macroscopique des poumons.....	29
II.3.2. Examen microscopique.....	29
II.3.2.1. Fixation et inclusion.....	29
II.3.2.2. Coupes histologiques et étalement.....	29
II.3.2.3. Déparaffinage et réhydratation.....	29
II.4. Analyse statistique.....	30
Partie III. Résultats et Discussion.....	31
Conclusion.....	39
Références bibliographiques	40

REMERCIEMENTS

A tous ceux qui nous ont aidé dans l'élaboration de ce mémoire:

- à notre guide et encadreur assidu, Dr LAHOUEL MESBAH pour ses conseils avisés et sa disponibilité;

-Aux membres du jury, les docteurs RECHRECHE HOCINE et SIFOUR MOHAMED qui nous font l'honneur d'évaluer ce travail;

-A tous nos professeurs qui nous ont accompagnés dans nos études;

-A tous les techniciens du laboratoire de biologie pour leurs encouragements et leur aide;

-A nos parents et à tous nos amis pour leur présence constante à nos côtés;

Nous exprimons nos plus vifs remerciements et leur témoignons notre profonde reconnaissance.

Liste des abréviations

AhR : Aryl Hydrocarbon Receptor,
AKR: Aldoketoréductases
ARNm : acide ribonucléique messenger
ADN : acide désoxyribonucléiques
B(a)P :benzo(a)pyrène,
BPD :benzo(a)pyrène dihydrodiol,
BPDE: (+)-anti-B(a)P-diol-époxyde,
BPQ: B(a)P-7,8-dione
CYP: cytochrome P450
CAT: catalase
CDNB: chlorodinitrobenzène
DD: dihydrodiol déshydrogénase,
DTNB: 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque)
DO: densité optiques
EGFR: epidermal growth factor receptor.
EH : époxyde hydrolase,
ERO : espèces réactive oxygénés
GSH: glutathione réduit
GST: glutathione S-transférase
GPx: glutathione peroxydase
GSSG: glutathion oxydé
HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques
IP: intrapéritonéale
LPO: peroxydation lipidiques
MDA: malondialdéhyde
NQO: NADPH quinone réductase
NBT: nitroblu-tétrazolium
SOD :superoxyde dismutase
TBA: acide thiobarbiturique
TBARS: substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
TCA: acide trichloracétique

Introduction

La cancérogenèse chimique peut être définie comme l'ensemble des phénomènes conduisant à des tumeurs résultant de l'exposition à un composé chimique, quelle que soit son origine. L'implication des produits chimiques dans le développement de cancers a été soupçonnée depuis fort longtemps puisque, dès le 18^{ème} siècle, on avait fait la relation d'une part entre cancer et consommation tabagique et, d'autre part, entre cancer du scrotum et exposition à la suie.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont une famille de composés chimiques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure des molécules comprend au moins deux cycles aromatiques condensés. Ce sont des polluants environnementaux ubiquitaires. Ils sont classés, selon le nombre de cycles, en HAP légers (jusqu'à trois cycles) ou lourds (au-delà de trois cycles), et ont des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques très différentes. L'un de ces HAP, le benzo(a)pyrène (B[a]P) a été largement étudié à cause de sa capacité à induire des cancers chez l'homme et l'animal en particulier les rongeurs (Rajendran et *al.*, 2008; Anandakumar et *al.*, 2009)

Le benzo(a)pyrène (B(a)P) est formé à partir de la combustion incomplète de différents produits. Il est formé de 5 anneaux aromatiques accolés, sa formule brute est $C_{20}H_{12}$ et sa masse molaire est de 252,3093 g·mol⁻¹. Lorsqu'il est pur, il se présente sous forme de cristaux ou d'une poudre jaune pâle sans odeur à température ambiante. Comme tous les HAP à l'exception du naphthalène, le B(a)P est très hydrophobe, et donc sa solubilité dans l'eau est faible. Le B(a)P présente des effets mutagènes marqués sur de nombreuses espèces (Glatt et *al.*, 1981), Il est le premier à avoir été reconnu pour présenter une activité cancérigène chez la souris et à être impliqué dans le cancer du poumon chez l'homme. Il est reconnu comme cancérogène par l'IARC (*International Association for Research on Cancer*).

Le poumon est un organe très complexe, la très grande surface alvéolaire (environ 70m²) facilite aussi la pénétration d'agents potentiellement toxiques. Cet organe est composé d'au moins 40 types de cellules. La balance entre enzymes activantes et

désactivantes ainsi que leur co-facteurs dans un type de cellules en particulier peut déterminer sa spécificité pour un toxique donné.

L'exposition des souris au benzo(a)pyrène par voie orale induit des papillomes et des carcinomes des cellules squameuses gastriques ainsi qu'une augmentation de l'incidence des adénomes pulmonaires et des leucémies (Rigdon et Neal, 1966). Une autre étude, réalisée chez la souris, montre la survenue d'adénomes dans les poumons et le thymus, de lymphomes et de leucémies (Rigdon et Neal, 1969). L'absorption du B[a]P par voie orale est incomplète, elle dépend de la présence d'huile et de graisses dans le tractus gastro-intestinal.

Même si B(a)P est plus connu pour sa capacité à induire la carcinogenèse pulmonaire à travers des mutations médiées par la formations d'adduits à l'ADN, il est aussi capable de générer un stress oxydatif cellulaire qui à son tour peut de provoquer ou exacerber les lésions mutagènes qui causent la transformation maligne des cellules. Notre étude vise à déterminer l'ampleur de ce stress oxydatif dans les tissus pulmonaires atteints de cancer, de situer le degré de sa participation dans le processus cancéreux dans le poumon et de permettre de comparer le statut oxydatif entre cellule normale et cellule cancéreuse afin de pouvoir dégager les cibles potentielles au cours des traitements ou des essais anticancéreux.

Partie I: Etude Bibliographique

I.1. Induction des enzymes du métabolisme de B(a)P

Les HAPs induisent significativement les différentes enzymes du métabolisme des xénobiotiques par une voie de transduction du signal dans laquelle l'*Aryl Hydrocarbon receptor* (AhR) joue un rôle pivot. Ce dernier régule l'expression d'un grand nombre de gènes codants pour les enzymes du métabolisme comme la glutathion S-transférase, l'UDP-glucuronyltransférase, l'aldéhyde déshydrogénase, la NADPH quinone oxydoréductase (NQO1) ainsi que les CYP1A1 et CYP1B1 (Shimada et al., 2002; Mc.Millan et Brodfield, 2007; Morigushi et al., 2003). En absence de ligand, le AhR est retenu inactif dans le cytoplasme sous forme d'un complexe protéique qui consiste en un dimère de (Hsp90*heat shock protein 90*), d'un monomère d'une protéine appelée *AhR interacting protein* (AIP) et de l'AhR lui-même. Après son passage dans le cytosol, le B(a)P se fixe sur le complexe protéique de l'AhR. De ce fait, le monomère d'AIP est largué dans le cytosol permettant au reste complexe ligand-récepteur de se transloquer dans le noyau (Fig.1).

Une fois dans le noyau, le dimère de Hsp 90 se dissocie du reste du complexe protéique et permet, de ce fait, l'interaction entre le AhR et l'*Aryl Hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT). Le complexe hétérodimérique AhR-ARNT devient alors capable d'interagir avec l'ADN (Fig.1); il reconnaît un motif classique contenant la séquence consensus 5'-T/GNGCGTGA/CG/CA-3' dans l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) ou *drug response element* (DRE). Le résultat final est une réponse adaptative qui consiste en l'induction des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, Parmi elle, les CYP sont les principales induites et jouent un rôle de première importance dans le métabolisme du B(a)P (Lin et al., 2003).

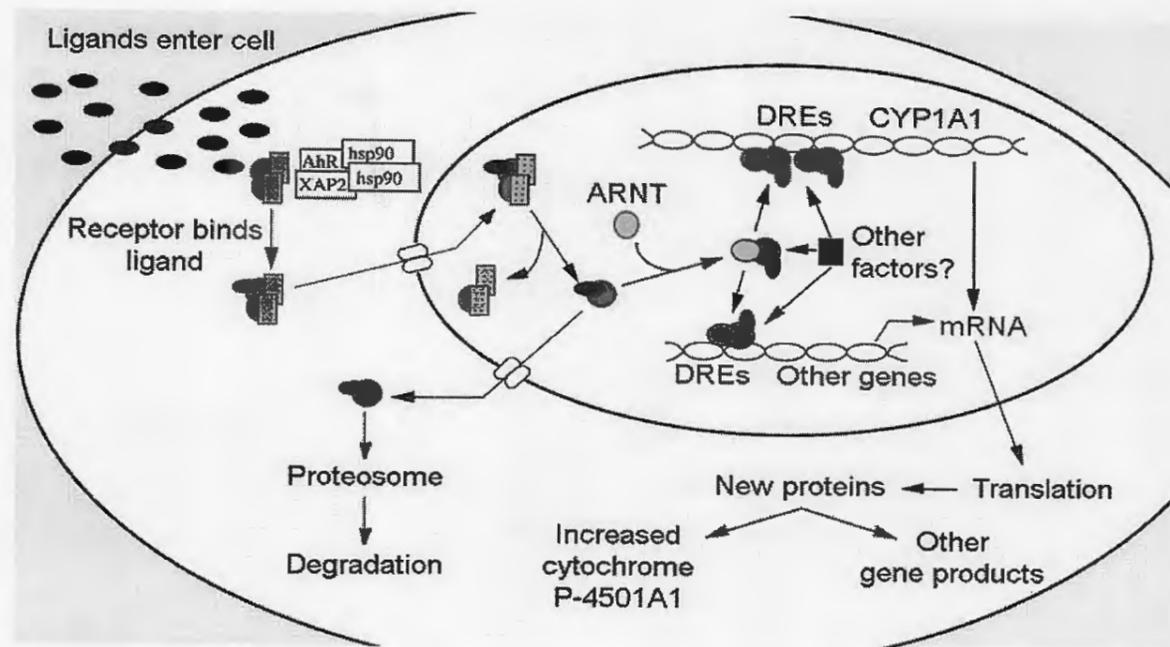


Fig.1. Induction des CYPs par la voie AhR (Denison et Nagy, 2003)

I.2. Activation métabolique: Formation de métabolites toxiques

Le benzo(a)pyrène B(a)P subit diverses réactions d'oxydation, réduction ou hydrolyse dont le résultat est l'addition ou l'exposition d'un groupement fonctionnel (par exemple: -OH ou -COOH) qui pourra plus tard subir les réactions de conjugaison de phase II.

Les réactions d'oxydations de B(a)P sont principalement effectuées dans les fractions microsomales cellulaires (Pezzuto et al., 1976; Prough et al., 1979). Ces réactions sont catalysées par les oxydases à fonction mixte microsomales en particulier par le cytochrome P450 (Rasmussen et Wang, 1974 ; Cohen, 1990). Plus précisément, les isoenzymes P450 les plus impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques dans les poumons, sont les CYPs extra-hépatiques 1A1 et 1B1. L'induction de ces deux CYPs par le benzo(a)pyrène via la voie AhR peut aboutir à une génotoxicité, à une mutagenèse et à l'initiation tumorale (Nerbert et al., 2004). Des études menées sur des souris déficientes en AhR ont montrées que celles-ci sont incapables d'exprimer des niveaux significatifs de CYP1A1 et montrent une résistance à la tumorigenèse induite par le B(a)P (Shimada et al., 2002).

Dans les poumons atteints ou non de tumeurs, l'expression du CYP1B1 est très largement supérieure à celle du CYP1A1. Même si ces CYP1 sont tous les deux induits par B(a)P, le CYP1B1 est induit de manière constitutionnelle et en grande quantité, alors que l'expression basale de CYP1A1 est négligeable en absence d'inducteur. Par contre, on détecte des concentrations relativement hautes après induction par un HAP comme le B(a)P (Nerbert et al., 2004), et on a remarqué que le CYP1A1 est souvent surexprimé dans une multitude de cancers dont celui du poumon (Akhillu et al., 2005).

Avant que le benzo(a)pyrène ne puisse exercer une quelconque toxicité, il doit être métaboliquement activé. Trois parcours ont été proposés pour son activation métabolique. (Palakhal et al., 2002; Caino et al., 2007; Jiang et al., 2007; Park et al., 2008).

La première voie implique la formation de (-)-*trans*-Benzo(a)Pyrène-7,8-dihydrodiol aussi appelé B(a)P-dihydrodiol (BPD) à partir du parent B(a)P sous l'action combinée des CYP1A1/1B1 et de l'époxyde hydrolase (EH). Une seconde époxydation catalysée par les CYP1A1/1B1 a pour conséquence la formation de régions baies transformant le BPD, métabolite proximal du B(a)P, en métabolite ultime de B(a)P (+)-*anti*-benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzopyrène (Philpot et Smith, 1984), plus couramment appelé (+)-*anti*-B(a)P-diol-époxyde (BPDE) qui est un métabolite hautement mutagène et tumorigène car, comme tous les diol époxydes formés à partir de HAPs, il forme des adduits covalents avec l'ADN, en position exocyclique N2 des résidus guanines et en N6 des adénines (Smith et al., 2000), cela aboutit à l'apparition de transversions G→T.

La seconde voie implique une dihydrodiol déshydrogénase (DD) membre de la superfamille des aldo-keto réductases (AKRs) qui oxyde le BPD pour générer l'o-quinone, B(a)P-7,8-dione (BPQ) (Penning, 2004). Le BPQ forme des adduits stables et hydratés en N2-dG, N6-dA ainsi que des adduits apuriniques en N7-dG. Les adduits de type N7-dG donnent lieu à des transversions G→T observées dans le proto-oncogène *ras* et aussi dans le suppresseur de tumeur *p53* (Jiang et al., 2007). Le BPQ est capable de générer des cycles redox futiles, sources d'espèces réactives oxygénées (ERO) délétères. ✕

La troisième voie implique la formation d'un radical cation catalysé par la P450 peroxydase. Ces radicaux cations forment des adduits à l'ADN, dont la conséquence est la

création de sites abasiques. Le radical cation très réactif et alkyle l'ADN (Penning, 2004), les radicaux cations de B(a)P génèrent des adduits apuriniques comprenant B(a)P-6-C8-Guanosine, B(a)P-6-N7-guanoine et B(a)P-N7-Adenine (Jiang et al., 2007). La formation des ces adduits cause des transversions G→T, notamment dans le proto-oncogène ras (Palkhal et al., 2002; Jiang et al., 2004). Les métabolites dérivés des radicaux cations, B(a)P-1,6- et B(a)P-3,6-dione peuvent aussi activer l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Paz-Elizur et al., 2003) via la génération de peroxyde d'hydrogène conduisant à l'augmentation de la prolifération cellulaire, ce qui suggère un rôle potentiel dans la promotion tumorale.

Des études sur la formation des métabolites du B(a)P ont montré que les taux de BPD total formé ont été supérieurs avec les microsomes des poumons qu'avec ceux provenant du foie. Les taux élevés dans les microsomes des poumons ont été attribués aux concentrations relatives en époxyde hydrolase. la même constatation a été faite chez les rongeurs où une plus grande proportion de BPD est produite dans les poumons en comparaison avec le foie et que le BPD est produit en plus grandes quantités que les autres métabolites (Prough et al., 1979).

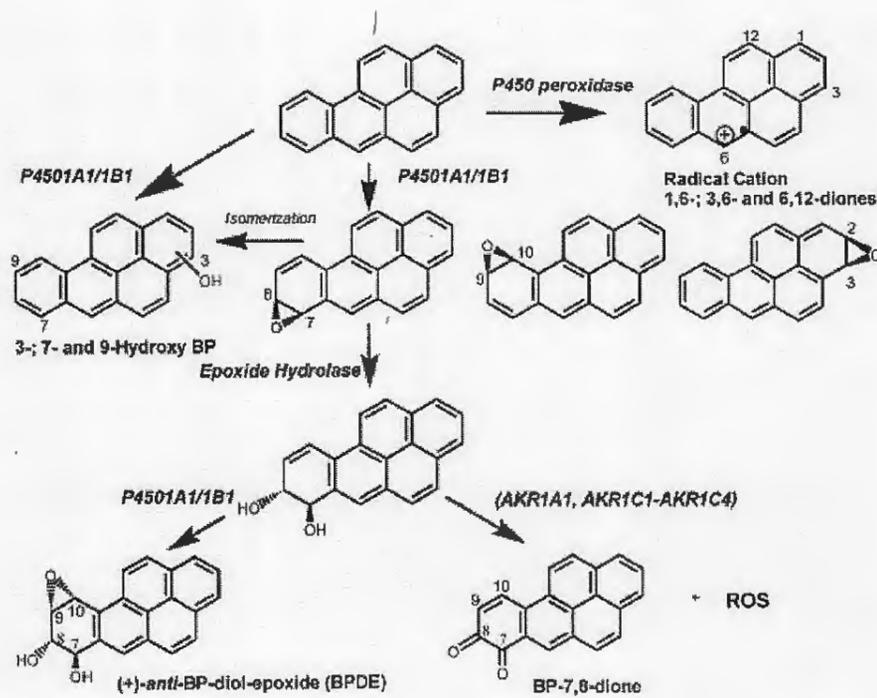


Figure 2: Les trois voies d'activation du benzo(a) pyrène en métabolites toxiques (Jiang et al., 2007)

La détoxification de ces métabolites se fait par des réactions de conjugaison, ceci consiste généralement en l'addition de petits composés endogènes aux xénobiotiques ou à leurs métabolites. Plusieurs réactions ont été démontrées dans les poumons: la glucuronidation, la sulfation, méthylation, acétylation et glutathion conjugaison.

Les voies majeures de conjugaison des métabolites du benzo(a)pyrène dans le poumon sont la glucuronidation, et la sulfation, cette dernière est la voie prédominante dans les tissus humains normaux. En effet, on a montré sur des cellules bronchiales humaines en culture que la voie majeure de conjugaison des métabolites de B(a)P était la sulfation. Des quantités importantes de glutathion conjugués ont été observées chez les différentes espèces lors de la conjugaison des métabolites dérivés du B(a)P (Cohen, 1990). Les enzymes qui catalysent ces réactions de détoxification sont induite à partir d'un mécanisme dépendant de la liaison B(a)P-AhR (Dertinger et al., 2001)

I.3. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre de la balance anti-oxydants /pro-oxydants en faveur de ce dernier.

I.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Un radical libre est une espèce chimique contenant un électron non apparié au niveau de son orbitale électronique externe, ce qui lui confère une grande instabilité et une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Les ERO sont des molécules très réactives dérivées de l'oxygène. Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) ou le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2). Dans les systèmes vivants, il existe une production physiologique continue d'ERO pendant différentes réactions métaboliques. On parle de stress oxydatif lors d'une surproduction de ces espèces réactives.

I.3.2. Le Stress oxydatif induit par benzo(a)pyrène

Le stress oxydatif est le résultat de la production de ERO au cours du métabolisme du BPD via la voie AKRs. Cette voie du métabolisme représente une voie potentielle de toxicité alternative à la voie promutagène de la formation du BPDE (Burczynski et

Penning, 2000), elle a pour conséquence la génération d'anion super oxyde, de radical hydroxyle ainsi qu'un o-quinone dérivé de B(a)P, le Benzo(a)pyrène-7,8-dione, métabolite hautement mutagène.

Les AKRs sont une famille d'oxydoréductases NADPH-dépendantes cytosoliques et monomériques qui catalysent l'interconversion des aldéhydes et des cétones en alcools au cour du métabolisme des xénobiotiques. Elles jouent un rôle central dans le métabolisme des xénobiotiques, et leur fonction est aussi importante que celle des CYPs microsomaux. La 3 α -HSD/DD (AKR1C9) du rat catalyse l'oxydation du BPD en o-quinone avec production concomitante de ERO délétères. Chez l'homme les 4 membres de la sous-famille AKR1C sont capables d'oxyder le BPD en BPQ.

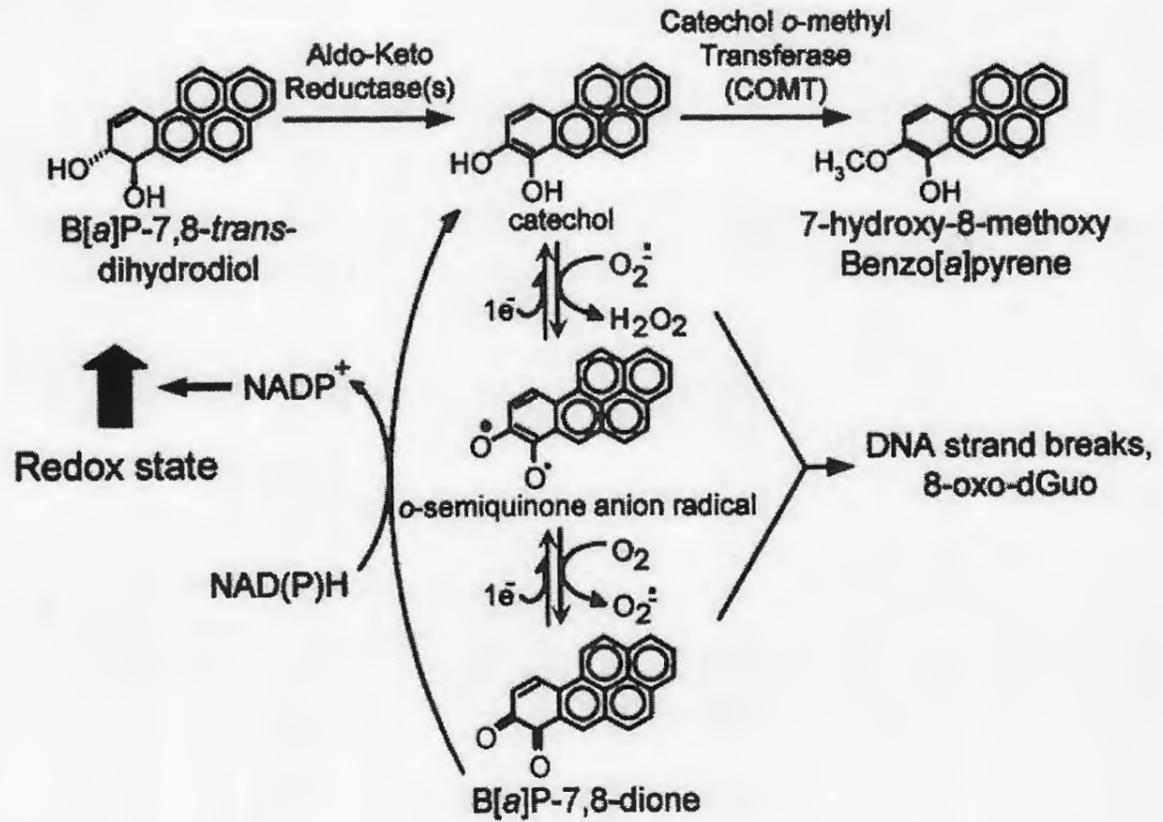


Figure 3. Activation métabolique de BPD par les AKRs et formation de ERO (Park et *al.*, 2008)

La formation de BPQ requiert les actions combinées des CYPs (1A1/1B1), de l'époxyde hydrolase (EH) et des AKRs (Fig.3). Le BPD est oxydé par les aldoketo-réductases humaines (AKR1A1, 1C1-1C4) pour former un céto (ou ketol en anglais) qui par réarrangement spontané donne un catéchol. Le catéchol est un composé instable qui

subit par la suite une auto-oxydation à 1 électron pour former un radical anion, l'o-semiquinone. Ce dernier va subir une seconde auto-oxydation à 1 électron afin de générer un accepteur, le B(a)P-7,8-dione ainsi que des ERO. Le BPQ peut être réduit par réaction enzymatique ou non enzymatique en catéchol, établissant ainsi un cycle redox dont le résultat est la génération et l'amplification des ERO jusqu'à épuisement de l'équivalent réducteur cellulaire (Jiang et al., 2007). BPQ est un métabolite électrophile, il est considéré comme étant un agent cytotoxique modéré (Burczynski et al., 1999). La formation de BPQ aboutit à deux types de conséquences, chimiques et génétiques :

Les conséquences chimiques consistent principalement en l'établissement d'un cycle redox futile (*redox cycling*). Ce cycle à répétition va provoquer un phénomène d'amplification des ERO et provoquer un stress oxydatif endogène.

Les conséquences génétiques se traduisent principalement par l'induction des enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques. En effet, il existe parmi les xénobiotiques une classe de composés électrophiles appelés inducteurs monofonctionnels. Ce sont des composés électrophiles qui activent l'expression de certains gènes (GST Ya, NQO1, γ GCS) ayant un *cis*-élément EpRE/ARE (Burczynski et al., 1999). Bien qu'il soit probable que la capacité des xénobiotiques à signaler à travers la voie EpRE/ARE soit en relation avec leur électrophilie.

Le B(a)P est un inducteur bifonctionnel car il peut induire l'expression génétique à travers deux mécanismes distincts, Soit le B(a)P non métabolisé se lie directement au AhR et active les gènes contenant le XRE (par exemple les CYPs), soit il est métabolisé en intermédiaires électrophiles non identifiés. Ces derniers activent une voie de transduction du signal par un mécanisme qui n'est pas encore complètement caractérisé et induisent la transcription à partir de l'ARE (*Anti-oxydant Response Element*) ou bien l'EpRE (*Electrophilic Response Element*) tous deux présents dans les régions régulatrices des gènes codants pour les enzymes de détoxification de phase II, comme : NQO1, GST, γ GCS par exemple. (Burczynski et Penning, 2000). Récemment, on a découvert que les BPQ sont eux-mêmes des inducteurs fonctionnels qui, contrairement au B(a)P, ne requièrent pas de métabolisme afin d'induire simultanément les enzymes de détoxification de phase II via la voie EpRE/ARE à cause de leur nature électrophile/redox active, et les enzymes d'activation de phase I via la voie AhR/XRE à cause de la restauration de leur structure plane (Burczynski and Penning, 2000).

Les AKRs sont induites de manière coordonnée avec les enzymes de phase II du métabolisme des xénobiotiques à travers la voie EpRE/ARE et non la voie XRE (Burczynski et al., 1999).

L'AKR1C1 et le CYP1A1 humains sont en compétition pour le BPD et transforment respectivement ce carcinogène proximal en BPQ ou en BPDE. Une fois les CYPs induits par le B(a)P et qu'ils catalysent la conversion de B(a)P en BPD, toutes les molécules de BPD qui entrent dans le compartiment cytosolique seront disponibles en tant que substrats pour l'AKR1C1 au repos, non induite. Il apparaît que sous des conditions de stress oxydatif chronique provoqué par la génération de métabolites électrophiles comme les o-quinones, on observe une induction sélective de AKR1C1 par rapport au CYP1A1 et par conséquent, une augmentation de la conversion de BPD en BPQ et ainsi exacerber les dommages cellulaires causés par les ERO, ce qui implique que les BPQ créent un feedback du gène AKR1C1.

Il existe des preuves selon lesquelles l'état redox intracellulaire régule une gamme de gènes en réponse au stress oxydatif via l'induction et/ou la stabilisation des ARNm. Le stress oxydatif peut influencer la transcription par l'activation de facteurs de transcription comme le NFkB qui peut être activé par le H₂O₂ (Shi et al., 1994). Une étude de Burdick et al. (2003) montre que le H₂O₂ produit durant le Cycle redox de BPQ active l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) et augmente la prolifération cellulaire, cela aurait un rôle particulièrement important dans la promotion.

I.3.3. Dommages oxydatifs des biomolécules par le benzo(a)pyrène

Les propriétés toxiques du B(a)P ainsi que sa mutagénicité et sa carcinogénicité ne se résument pas à l'action promutagène de son métabolite ultime BPDE, la formation de radicaux libres qui causent des dommages aux macromolécules et altèrent ainsi les fonctions cellulaires, constitue aussi une voie majeure qui participe à la transformation maligne des cellules

I.3.3.1. Dommages oxydatifs de l'ADN nucléaire et mitochondriale

Le BPQ possède un profil toxicologique indésirable par la formation d'adduits avec l'ADN, l'ARN, les protéines et le glutathion qui sont généralement, des adduits stables apuriniques. On a suggéré que la co-localisation cytosolique des AKR et du AhR fournis un mécanisme par lequel les HAP o-quinones générées dans le cytosol peuvent être ciblées vers le noyau avec spécificité. La libération locale du o-quinones à proximité du génome qui est connu pour contenir du cuivre va augmenter le cycle redox en présence d'équivalents nucléaires réducteurs et fournissent un mécanisme pour les dommages oxydatifs observés avec le parent B(a)P (Burczynski et Penning, 2000).

Les lésions causées lors d'un cycle redox médié par le cuivre (Cu (II)), sont produites par l'oxygène singulet, alors qu'en présence d'un cycle redox médié par le fer (Fe (III)) les lésions sont causées par le radical hydroxyle (Park et *al.*, 2006). Cette étude de Park et *al.* (2006) montre qu'en absence de cycle redox, les PAH o-quinones produisent un nombre modeste d'adduits apuriniques labiles. En présence de NADPH et de Cu (II), BP-7,8-dione produit des quantités significatives de sites abasiques, de 8-oxo-dG (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine) et de pyrimidines oxydées.

Les ERO produits par les o-quinones des HAP peuvent aussi oxyder le désoxyribose conduisant à la formation de bases-propenal qui peuvent réagir pour former des adduits M1-dGuo. Des sites abasiques pourraient découler de l'action de l'oxygène singulet par une abstraction non spécifique d'un atome d'hydrogène en position C-1', C-2' ou C-4' du désoxyribose (Park et *al.*, 2006). L'abstraction en C-1' aboutit à l'hydrolyse de la liaison N-glycosidique et forme un site abasique. L'abstraction en C-4' conduit à un réarrangement de Criege et production de bases-propenal. L'abstraction en C-2' résulte en l'ouverture du cycle du désoxyribose. De plus, la 8-oxo-Guo formée sous ces conditions peut subir une seconde oxydation conduisant à la déstabilisation de la liaison N-glycosidique et production de sites abasiques (Park et *al.*, 2006).

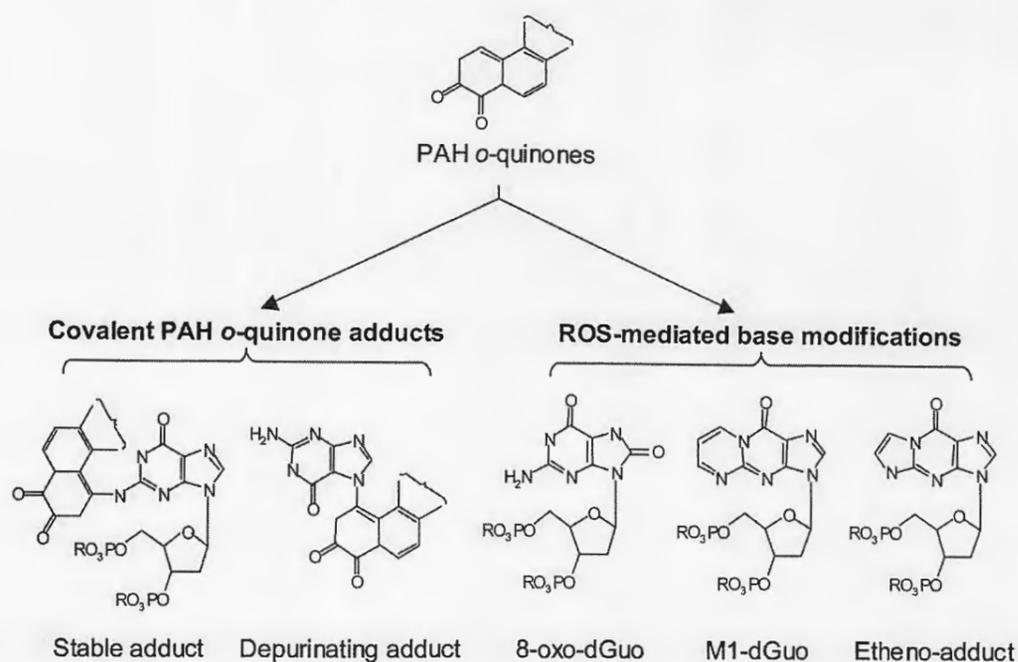


Figure 4. Spectre des modifications de l'ADN causées par BPQ (Park et *al.*, 2006)

L'altération génétique la plus fréquente dans les cancers humains est la mutation du gène suppresseur de tumeurs TP53 (chromosome 17p13). Son produit, la protéine p53, est un facteur de transcription apparenté à une famille de protéines essentielles à la différenciation et à la morphogenèse épithéliale, mais spécialisé dans la réponse à un large spectre de stress physiques, chimiques ou biochimiques. Les mutations de TP53 sont principalement des substitutions faux-sens qui inactivent la protéine en empêchant son repliement dans une conformation active (Pfeifer et *al.*, 2002). la plupart des mutations surviennent dans les séquences qui encodent les domaines de liaison de la protéine p53 à l'ADN. (Smith et *al.*, 2000), dans les cancers pulmonaires, elles sont caractéristiques par un excès de transversions G→T (Wei et *al.*, 1993; Hainaut et Pfeifer, 2001).

Le BPDE se fixe préférentiellement sur certaines guanines dans les codons 157, 158, 245, 248 et 273,. Ces guanines endommagées sont à l'intérieur de dinucléotides méthylée CpG (Hecht et *al.*, 2000), ceci constitue la signature moléculaire indiquant la mutagenèse induite par B(a)P. le codon 157 est une mutation commune uniquement dans les cancers du poumon (Denissenko et *al.*, 1997; Smith et *al.*, 2000). La méthylation de la cytosine permet une augmentation de la stabilité de l'hélice résultant en l'accroissement de l'hydrophobie et la polarisation moléculaire et c'est peut être ces caractéristiques qui entraînent l'augmentation de la réactivité de BPDE dans ce sites (Weisenberger et Romano, 1999)

Une étude de Rodin et Rodin (2000) suggère qu'il y'a une sélection de mutations préexistantes dans le TP53 dans les cancers des poumons plus souvent chez les fumeurs que chez les non-fumeurs, cette hypothèse n'est pas soutenue par Hainaut et Pfeifer (2001) qui, sans nier catégoriquement le rôle de la sélection, pensent que ces mutations sont directement induites par B(a)P.

Les mutations des membres de la famille RAS (HRAS, KRAS2, NRAS) sont communes dans de nombreux types de cancers. Dans les cancers broncho-pulmonaires, 90 % de ces mutations affectent le gène *KRAS*. Elles sont presque systématiquement localisées au codon 12. Les protéines ras jouent un rôle de relais et d'amplificateur des signaux intracellulaires déclenchés par l'activation des récepteurs tyrosine kinase tels que l'EGFR. Dans les cellules normales au repos, Ras est présente à la face cytoplasmique de la membrane plasmique sous une forme inactive, liée au GDP. Suite à la stimulation par un signal extracellulaire, Ras est recrutée au niveau du récepteur et interagit avec des facteurs d'échange des nucléotides guanidiques entraînant sa conversion en une forme active, liée au GTP. L'hydrolyse du GTP ramène l'activité au niveau de base et la répétition rapide de ce cycle permet la démultiplication intracellulaire du signal généré par l'activation du récepteur. La mutation au codon 12 bloque la protéine K-ras en configuration active, entraînant la production d'un signal constitutif, indépendant de l'activation des récepteurs en amont. En accord avec cette observation, les mutations de KRAS interviennent généralement dans les tumeurs dépourvues de mutations de l'EGFR. En effet, les deux protéines agissent de façon séquentielle dans les mêmes cascades et les conséquences de ces mutations pourraient donc être au moins partiellement identiques. (Le Calvez et coll., 2005).

I.3.3.2. Peroxydation lipidique (LPO)

Il est bien connu que la génération des ERO médiée par les métaux résulte en l'attaque non seulement de l'ADN mais aussi d'autres composants cellulaires y compris les résidus acides gras polyinsaturés des phospholipides qui sont extrêmement sensibles à l'oxydation. Le mécanisme proposé plus de deux décennies plus tôt par Butcher et al. implique la formation d'espèces $Fe(II)-O_2-Fe(III)$ et que le taux maximal de peroxydation lipidique est observé quand le rapport $Fe(II) : Fe(III)$ est de 1 :1. Leurs résultats suggèrent

que les mitochondries sont des cibles préférentielles de la peroxydation médiée par le fer (Valko *et al.*, 2000).

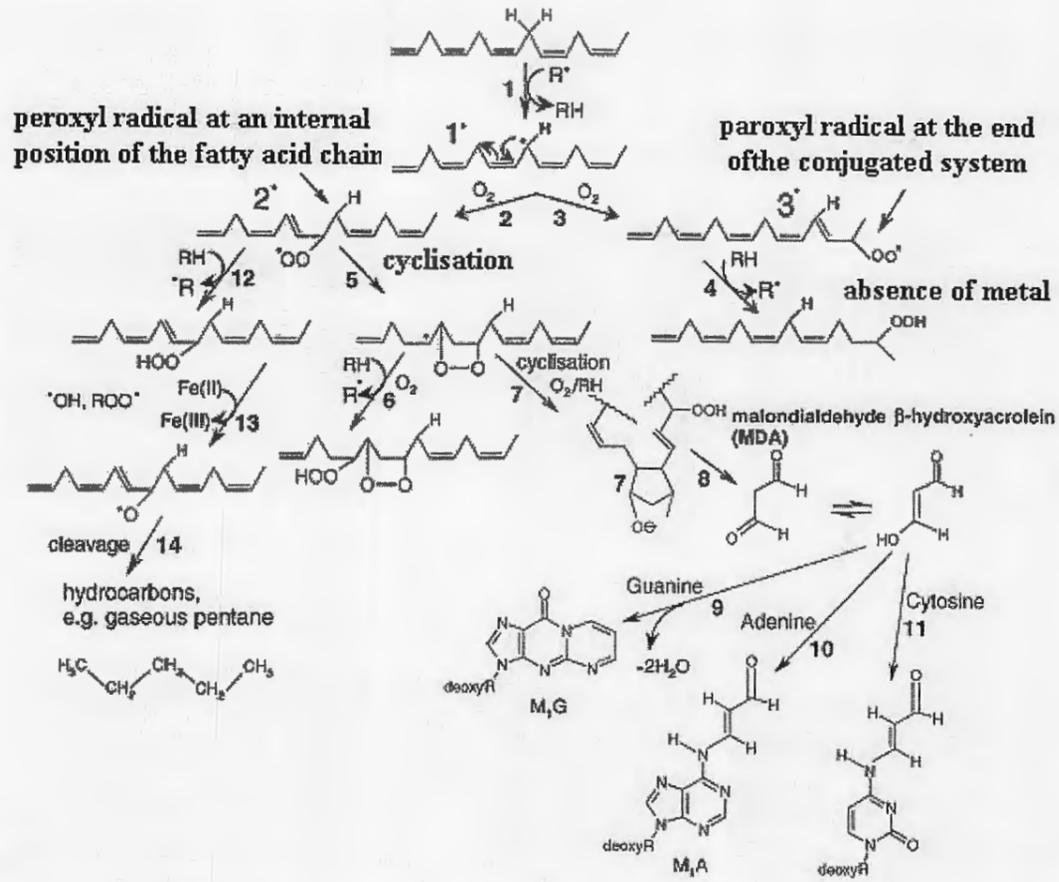


Fig.5. cascade de peroxydation lipidique et dommages à l'ADN induits par le MDA

Les ERO produits attaquent aussi les acides gras polyinsaturés. Une fois formé le radical peroxy ROO° peut être réarrangé par réaction de cyclisation en endopéroxyde (précurseur du malondialdéhyde) avec le MDA comme produit final de la lipoperoxydation (LPO) (Valko *et al.*, 2000). Le produit aldéhyde majeur de la peroxydation lipidique autre que le MDA est le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) et le 4-oxo-2-nonenal qui forment respectivement des adduits etheno ou heptano-etheno- à l'ADN (Park *et al.*, 2006).

Le MDA peut réagir avec les bases G, A, et C de l'ADN et former des adduits M1G, M1A, et M1C (3-(2'-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)one) respectivement, qui sont des lésions mutagènes. Ces fréquences de mutations sont comparables à celles observées avec la 8-oxo-dG. M1G subit une ouverture rapide du cycle et forme la N2-oxopropenyl-G lorsqu'il est présent dans l'ADN double brin et non

dans l'ADN simple brin, l'interconversion du M1G en N2-oxopropenal-dG dans l'ADN conduit à la formation de cross-links inter-brin ADN-ADN ou ADN-protéine (Valko et al., 2000).

I.3.4. le système anti-oxydant

Les radicaux libres sont continuellement produits au sein de notre organisme. La protection cellulaire contre les effets toxiques de ces ERO est assurée par des systèmes antioxydants. Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages cellulaires.

I.3.4.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes du système antioxydant endogène ont pour fonction de protéger les cellules des dommages oxydatifs en diminuant la quantité d'ERO, produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal, et des produits d'oxydation dans les principaux systèmes enzymatiques comprennent la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase.

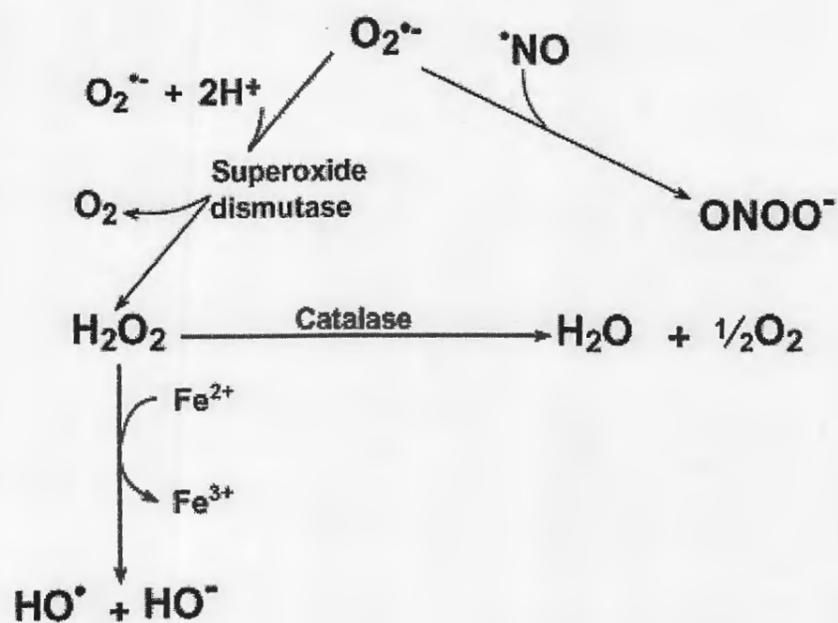
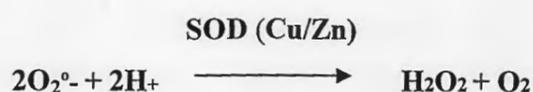


Figure 6: action des enzymes antioxydantes SOD et catalase sur les ERO

La toxicité de l'anion superoxyde se manifeste particulièrement à travers la réaction de Haber-Weiss selon laquelle il peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène, pour donner le radical hydroxyle hautement réactif. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène.



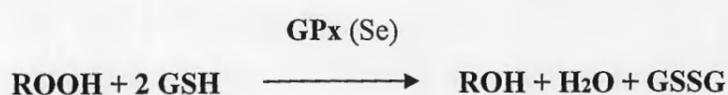
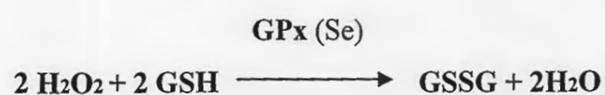
Trois formes de SOD existent chez les mammifères : une forme extra-cellulaire (Ec-SOD), une forme mitochondriale utilisant le manganèse comme cofacteur (Mn-SOD), et une forme cytosolique utilisant le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Cu/Zn-SOD).

Afin d'éviter l'accumulation nocive du peroxyde d'hydrogène produit par les SOD, celui-ci doit être rapidement métabolisé par la catalase et la glutathion peroxydase (Rahman *et al.* 2006).

La catalase (CAT), est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes.



La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoenzyme présente dans le sang, les membranes et le cytosol. En présence de glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène, elle réduit l' H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH). Il s'en suit la formation du glutathion oxydé (GSSG)



La glutathion S-transférase (GST) réduit les hydroperoxydes en alcools mais ne réduit pas H₂O₂.

Les GST sont une famille complexe d'enzymes multifonctionnelles qui catalysent la conjugaison du glutathion réduit avec une variété de composés électrophiles. Les différentes classes de la GST qui existent chez l'homme et d'autres organismes présentent différentes propriétés catalytiques.

I.3.4.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Afin de se défendre contre les agressions causées par les métabolites électrophiles et les radicaux libres, les cellules disposent de nombreuses voies de détoxification impliquant plusieurs molécules et qui constituent le système antioxydant non-enzymatique.

Les métallothionéines sont des métalloprotéines caractérisées par une forte teneur en cystéine, une absence totale d'acides aminés aromatiques, une absence de pont disulfure et un contenu élevé en métaux. Ces protéines protégeraient les cellules contre le stress oxydatif, et sont connues pour avoir un effet protecteur des dommages à l'ADN causés par B(a)P (Takaishi et *al.*, 2009).

Le glutathion (GSH) est un tripeptide ubiquitaire essentiel (L- γ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine) contenant un groupement sulfhydryle. C'est un puissant nucléophile et inactive les composés électrophiles réactifs par conjugaison directe non enzymatiques ou par une réaction enzymatique catalysée par la glutathion S-transférase (GST). Dans les poumons, le GSH apparaît comme un mécanisme de défense fondamental contre les dommages pulmonaires induits par l'oxydation et l'inflammation (Rahman et Mc. Nee, 1999).

Les poumons sont l'une des plus importantes zones de stockage du GSH (6,1-17,5 nmol/mg de poumon). Le fluide extracellulaire de l'épithélium de revêtement est riche en GSH (200-400 μ M), soit environ 100 fois supérieur à celui du plasma (2-4 μ M), ce qui lui confère un rôle important dans la protection des macrophages alvéolaires, des cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires contre stress oxydatif et aide au maintien fonctionnel du surfactant pulmonaire.

Partie II: Matériel et Méthodes

II.1. Modèle animal du cancer du poumon

II.1.1. Entretien des animaux

Les animaux utilisés au cours de cette étude sont des souris mâles de souche Swiss albinos d'un poids moyen d'environ 21g. Après une mise en quarantaine de 10 jours, les animaux ont été stabulés en cage polystyrène ayant libre accès à la nourriture et à l'eau. L'évolution pondérale des animaux a été suivie durant toute la période de traitement. Les animaux ont été ainsi pesés aux délais de J0, J15, J28, J60, J134.

II.1.2. Induction de la pathologie expérimentale

Nous avons induit le cancer broncho-pulmonaire chez la souris par administration de benzo(a)pyrène pur. 15 souris ont été utilisées dans cette étude et ont été réparties en 3 groupes de 5 animaux chacun:

- Le groupe 1 (témoin) a servi de témoin en recevant par gavage 0.5 ml d'huile d'olive (excipient de dissolution du benzopyrène) à raison de 3 administrations consécutives par semaine pendant 4 semaines.
- Le groupe 2 (traité IP) regroupant les souris recevant une dose unique de benzo(a)pyrène de 100 mg/kg dissout dans l'huile d'olive et administrée par voie intrapéritonéale.
- Groupe 3 (traité G), les souris ont reçu par gavage 50 mg/kg de benzo(a)pyrène dissout dans l'huile d'olive à raison de 2 administrations consécutives par semaine pendant 4 semaines.

II.1.3. Prélèvement des poumons

Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale après 14 semaines du début du traitement, durée suffisante à la croissance de la tumeur.

Au moment du sacrifice, le poumon droit de chaque souris est prélevé, lavé dans une solution de NaCl 9 %, pesé, et soumis à un examen macroscopique à la recherche d'éventuels signes d'inflammation ou de cancérisation, puis stocké à - 40°C jusqu'à

l'analyse du stress oxydatif cellulaire. Le poumon gauche est prélevé, lavé dans une solution de NaCl 9 %, pesé puis plongé dans le liquide fixateur (E.A.F.S.) pour l'étude histologique.

II.2. Evaluation du stress oxydatif

II.2.1. Dosage du glutathion cellulaire

La méthode que nous avons employé (Akerboom et Sies, 1981) est basée sur l'évaluation du contenu -SH par spectrophotométrie en utilisant (DTNB). Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfures S-S. Le principe du dosage des groupements -SH est basé sur leur réaction avec le réactif d'Ellman, le 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) pour former des quantités stoechiométriques de TNB (thionitrobenzoate), un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à $\lambda = 412 \text{ nm}$.

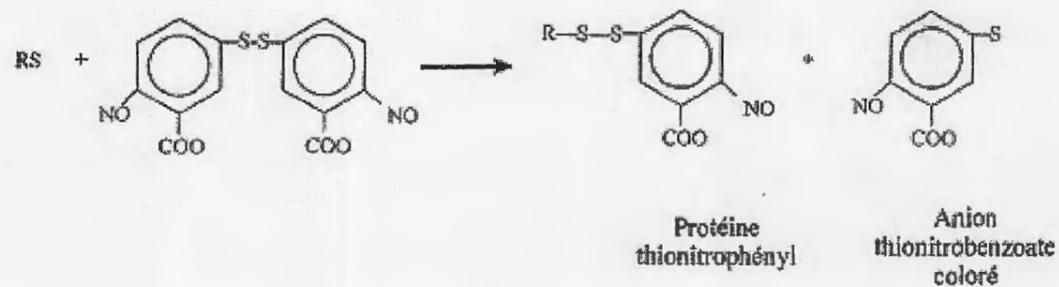


Fig.6. Schéma de la réaction entre le DTNB et les groupements -SH

On a préparé un homogénat de 0.5g de poumon dans 3 volumes de tampon d'homogénéisation (100 mM KH_2PO_4 , 2 mM d'EDTA, 5% de triton x100) dans un potter en verre. Ensuite, on a centrifugé cet homogénat à 2000 xg, puis on a récupéré le surnageant.

On procède d'abord à un fractionnement éthanol/chloroforme dans le but d'obtenir une fraction cytosolique partiellement purifiée en éliminant les protéines de haut poids moléculaire présentes dans le surnageant, 1 ml de surnageant est prélevé, on y ajoute 1.05 ml d'éthanol absolu Froid (-20°C) et 80 μl de chloroforme (PNUE/RAMOGE, 1999). Passer quelques secondes au vortex puis centrifuger à 6000 g pendant 10 min à 4°C . Puis le surnageant est récupéré.

50 μ l de ce surnageant sont additionnés à 10 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH=8. Après agitation, on a prélevé 3 ml de ce mélange auquel on a ajouté 20 μ l d'une solution de DTNB 0.01M. Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante l'absorbance est lue à 412 nm.

Le taux de GSH est déduit à partir d'une courbe standard de référence préparée dans les mêmes conditions, et dans laquelle l'absorbance est une fonction linéaire de la concentration en GSH (μ mol/ml). Les résultats seront exprimés en μ mol/mg de tissu.

II.2.2. Dosage du MDA

La réaction de dosage du malondialdéhyde repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques.

Le résultat du dosage du malondialdéhyde par l'acide thiobarbiturique est donc la somme du malondialdéhyde préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du malondialdéhyde, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du malondialdéhyde s'est substituée la notion de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (thiobarbituric acid reactive substances ou TBARS). L'extraction du dérivé MDA-(TBA)₂ est réalisée par le n-butanol à pH acide, cette opération permet d'éliminer en partie les interférents dans la réaction des TBARS.

On a procédé selon la méthode décrite par Okhawa *et al.* (1979). En résumé, 0.5 g de poumon sont broyés dans un potter en verre dans une solution de KCl 1.15 M. Puis, 0.5 ml de cet homogénat est récupéré et additionné de 0.5 ml de TCA 20% et 0.5 ml de TBA 0.67%. Ce mélange est ensuite incubé pendant 15 min au bain-marie à 100°C, puis refroidit. Lorsque le mélange est froid, il est additionné de 4 ml de n-butanol puis centrifugé à 3000 xg pendant 15 min. Le surnageant est ensuite récupéré et son absorbance mesurée à 530 nm.

Le taux de MDA est déduit à partir d'une droite d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions que les échantillons avec de 1, 1, 3, 3-tetraméthoxypropane. La concentration en MDA est exprimée en nmol/mg/ml.

II.2.3. Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD):

L'activité enzymatique de la SOD est évaluée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Le principe de la méthode repose sur la capacité de l'enzyme à inhiber la réaction entre le nitroblu-tétrazolium (NBT) et l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine. La réduction du NBT par l'anion superoxyde en Formazan peut être suivie par spectrophotométrie à 560 nm. Une unité d'activité de la SOD est définie en tant que la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% de la réduction de NBT.

0.5g de poumon a été homogénéisé dans 3 volumes d'un tampon contenant du KH_2PO_4 0.1 M, pH 7.4 et du KCl 1.17%. On a ensuite centrifugé cet homogénat à 2000xg pendant 15 min à 4°C, puis on a récupéré le surnageant et on l'a centrifugé à 9600 xg pendant 30 min à 4°C, et on a prélevé le surnageant, qui représente la fraction cytosolique de l'homogénat et servira de source enzymatique pour le dosage des 3 enzymes SOD, catalase et GST.

On a préparé un milieu réactionnel contenant: 1 ml de cyanide de Sodium (NaCN) 0.01 M, 0.1 ml d'une solution de NBT 0.176 mM, 1ml d'EDTA 66 mM, 0.1 ml d'une solution de riboflavine 0.002 mM et du tampon phosphate (KH_2PO_4) pH 7.2.

Puis, on a ajouté à ce milieu réactionnel 5 μl de fraction cytosolique et 0.1 μl d'une solution de méthionine 1M. Un tube contrôle est préparé avec du tampon phosphate dans les mêmes conditions que les échantillons. Le mélange est irradié par une lampe de 15 watts pendant 10 minutes, et l'absorbance est mesurée à 560 nm dans des cuves en quartz. L'activité de la SOD est déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition:

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{DO}_{\text{contrôle}} - \text{DO}_{\text{échantillon}} / \text{DO}_{\text{contrôle}}) \times 100$$

L'activité de la SOD (UI/ml) est déduite en multipliant le pourcentage d'inhibition par 6.35. Les résultats sont exprimés en UI/g de protéines.

II.2.4. Mesure de l'activité Glutathion S-Transférase

L'activité de la GST a été évaluée selon la méthode de Habig et al. (1974) qui consiste à fournir à l'enzyme un substrat, en général du chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et de glutathion. Un mélange de 850 µl de tampon phosphate 0.1 M pH 6.5 et de 50 µl de CDNB 20 Mm a été préparé, et a été incubé à 37°C pendant 10 min. la réaction est déclenchée par l'addition à ce mélange de 50 µl d'une solution de GSH 20 mM et 50 µl de fraction cytosolique. Un contrôle est préparé dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm toutes les minutes pendant 5 min. Les résultats sont calculés selon la formule suivante :

$$K = (DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{contrôle}}) \times 100 / (9.6 \times 0.05)$$

Les résultats sont exprimés en UI/g de protéines.

II.2.5. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode de Clairbone 1985. Le principe de cette méthode est basé sur la disparition du H₂O₂ en présence de la source enzymatique à 25°C. 1 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH 7.2 a été additionné de 0.95 ml de peroxyde d'hydrogène 0.019 M et 25 µl fraction cytosolique. Puis l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 240 nm pendant 2 minutes.

La cinétique de la catalase n'obéissant pas au model Michaelien, on a pas utilisé la loi de Beer-Lambert. La constante de vitesse de la catalase est définie par la relation:

$$K = 2.3 / \Delta t \times \log_{10} (DO_0 / DO_t)$$

L'activité enzymatique est exprimée en en unités UI/g de protéines.

DO₀ : absorbance à 0 min

DO_t : absorbance au moment "t"

Δt : intervalle de temps

K: UI

II.3. Examen anatomopathologique

II.3.1. Examen macroscopique des poumons

Au moment du sacrifice, les poumons sont rapidement prélevés et plongés dans une solution de NaCl 9 ‰. Un examen minutieux sous binoculaire a été effectué à la recherche des signes de cancérisation.

II.3.2. Examen microscopique

II.3.2.1. Fixation et inclusion

La fixation est réalisée immédiatement après prélèvement des organes à température ambiante dans de l'EAFS (ethanol-acetic acid-formol saline fixative) : Ethanol absolu, acide acétique, formaldéhyde (40%), NaCl (0.9%) (40:5:10:45 v/v) pH 3.5 (Harrison, 1984). La durée minimale de fixation est de 48 H. les organes sont ensuite déshydratés dans des bains successifs de 20 minutes chacun dans l'éthanol 70°, de l'éthanol 90°, de l'éthanol absolu puis deux bains de xylène. Enfin l'organe est prêt pour son inclusion dans la paraffine et la réalisation des blocs de paraffine.

II.3.2.2. Coupes histologiques et étalement

Chaque bloc de paraffine est débité à l'aide d'un microtome en coupes de 5µm d'épaisseur, les coupes sont étalées et collées sur des lames avec un gel de gélatine 2% puis séchées pendant une nuit dans une étuve réglée à une température entre 35-42°C.

II.3.2.3. Déparaffinage et réhydratation

Le déparaffinage des coupes est réalisé avec deux bains successifs de 15 minutes chacun dans du xylène suivis de deux autres bains de même durée d'éthanol absolu. Les coupes sont réhydratées en les plongeant dans des bains successifs d'éthanol 95°, deux bains d'éthanol 70° et un bain d'eau distillée.

II.3.2.4. Coloration et montage des coupes

Les coupes sont colorées par l'hématoxyline de Groat 1% suivie de l'éosine. Brièvement, les lames sont plongées et laissées dans des bains successifs de : 5 minutes dans de l'hémalun 2%, 3 minutes dans l'eau, 5 secondes dans l'éthanol - HCl, 2 minutes dans l'eau.

Les lames sont ensuite plongées dans un bain d'éosine pendant 2 minutes suivie d'un bain d'eau distillée de 20 secondes. Les lames sont alors plongées dans une solution de bicarbonate de soude 1% pendant 20 secondes pour bleuir l'hémalun avant une déshydratation dans deux bains d'alcool absolu et deux autres de xylène.

II.4. Analyse statistique

Les données obtenues ont été analysées par une analyse de la variance à un facteur suivie d'un test à posteriori de Dunnett afin de comparer les groupes traités par le benzo(a)pyrène au groupe témoin. Les résultats sont considérés comme significatifs pour $p < 0.05$.

Partie III: Résultats et Discussion

Plusieurs études ont démontré que les espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres organiques formés par de nombreux carcinogènes sont impliqués dans l'initiation et la promotion tumorale. Le benzo(a)pyrène est un puissant cancérigène dont les métabolites capable de produire de grandes quantités de radicaux libres, qui réagissent avec les constituants cellulaires formant des produits de l'oxydation à pouvoir mutagène (par exemple: la 8-OHdG et le malondialdéhyde).

Le but de notre travail est de déterminer le statut oxydatif de la cellule cancéreuse pulmonaire, pour cela nous avons d'abord induit un cancer du poumon chez les souris Swiss albinos selon deux protocoles expérimentaux. L'un consiste en deux administrations hebdomadaires de 50 mg/kg de B(a)P par voie intragastrique pendant 4 semaines, l'autre consiste en une injection intrapéritonéale unique de 100 mg/kg de B(a)P. Après 14 semaines, les animaux ont été sacrifiés et le diagnostic du cancer vérifié.

Afin de déterminer le statut oxydatif des tissus atteints de cancer, cinq paramètres ont été évalués. Les résultats du dosage de glutathion cellulaire, des activités enzymatique de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion S-transférase, ainsi que des taux de malondialdéhyde dans les tissus pulmonaires des groupes témoins et expérimentaux sont représentés dans les figures 8 à 12.

Les résultats obtenus montrent que les animaux atteints du cancer du poumon montrent une baisse dans les antioxydants enzymatiques (SOD, catalase, GST), non enzymatiques (GSH) et une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA). Ces résultats sont en accord avec la bibliographie (Emret et *al.*, 2007; Kim et Lee, 1997). Les variations du statut oxydatif entre les groupes traités par voie intrapéritonéale et intragastrique sont attribuées aux variations relatives à la toxicocinétiques de B(a)P, à sa biodisponibilité, à la dose administrée et à la fréquence d'exposition.

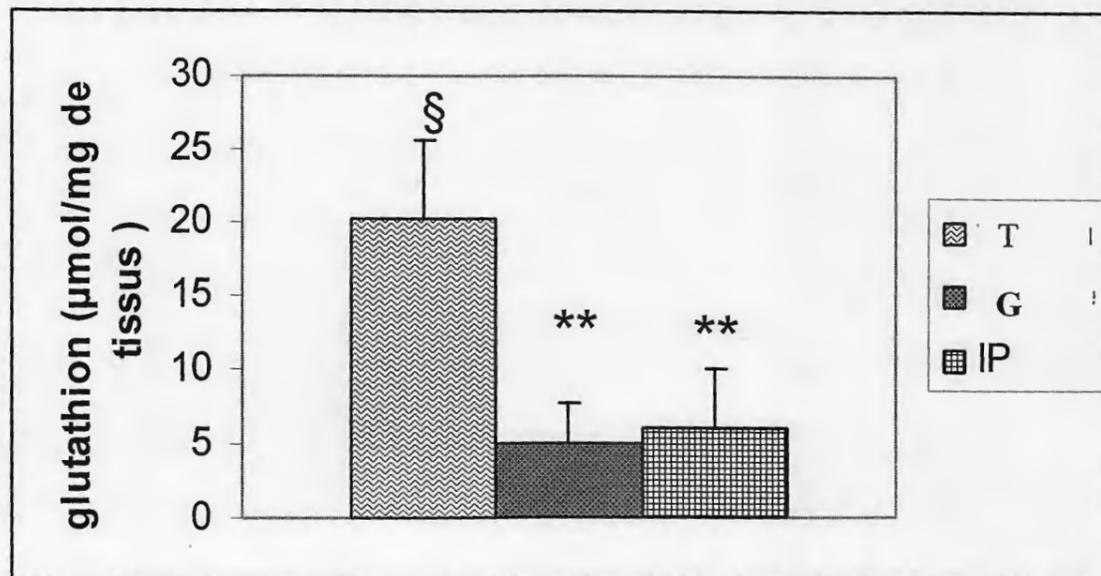


Fig. 8. Effet du B(a)P sur la teneur en GSH dans les poumons des souris des groupes expérimentaux. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique $p < 0.05$. T: témoin, G: traités par gavage, IP: traités par injection intrapéritonéale. $p < 0.05$: significatif (*), $p < 0.01$: très significatif (**), NS (non significatif), référence (§)

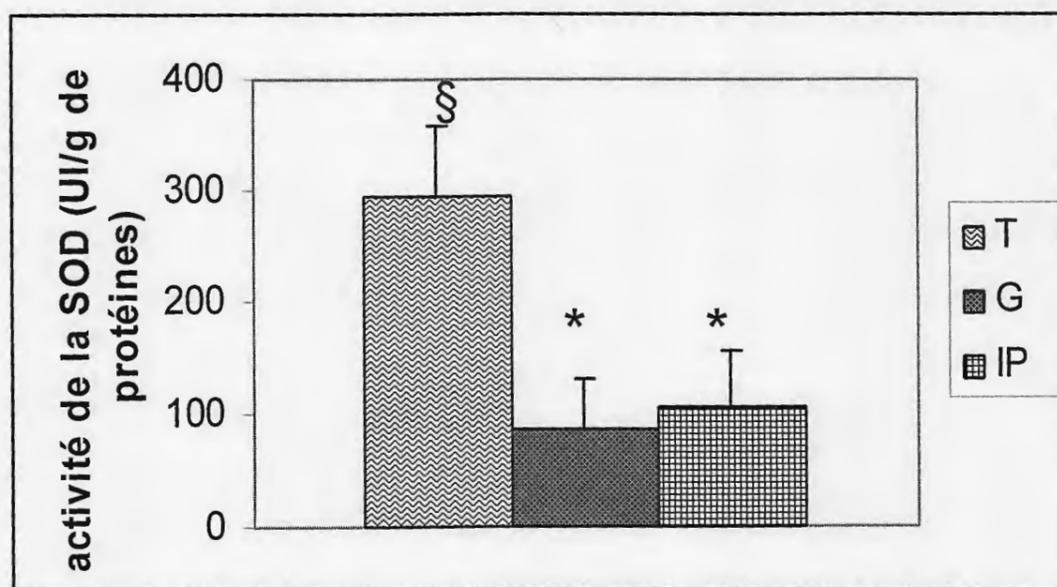


Fig.9. Effet du B(a)P sur l'activité de la SOD dans les poumons des souris des groupes expérimentaux. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique $p < 0.05$. T: témoin, G: traités par gavage, IP: traités par injection intrapéritonéale. $p < 0.05$: significatif (*), $p < 0.01$: très significatif (**), NS (non significatif), référence (§)

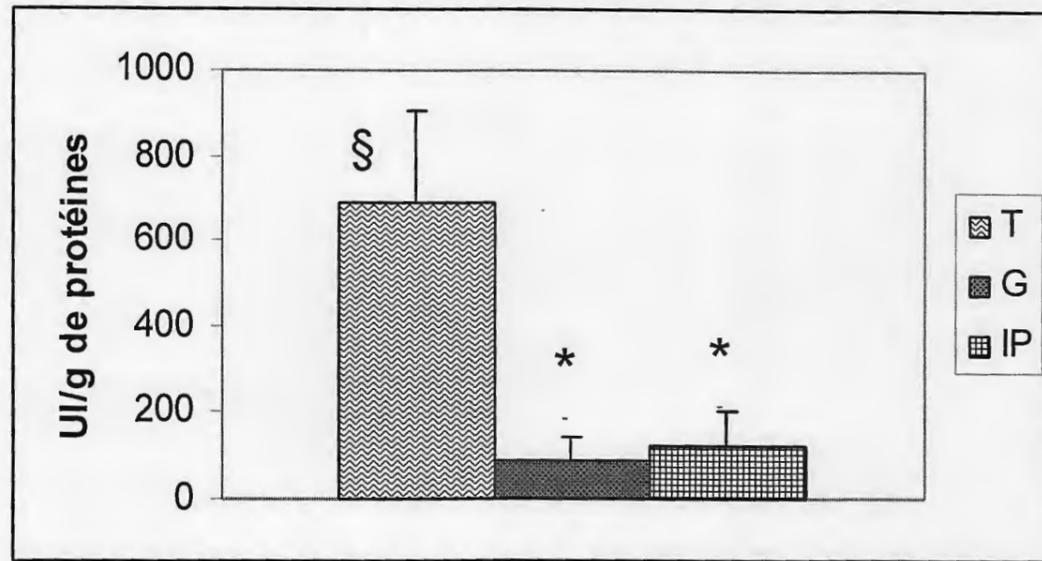


Fig.10. Effet du B(a)P sur l'activité de la catalase dans les poumons des souris des groupes expérimentaux. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique $p < 0.05$. T: témoin, G: traités par gavage, IP: traités par injection intrapéritonéale. $p < 0.05$: significatif (*), $p < 0.01$: très significatif (**), NS (non significatif), référence (§)

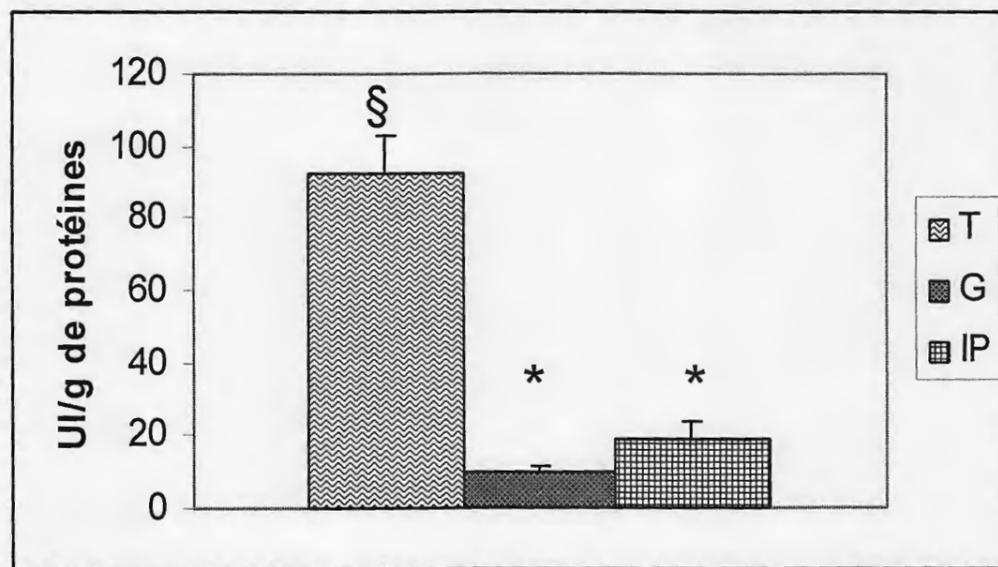


Fig. 11. Effet du B(a)P sur la glutathione S-transferase dans les poumons des souris des groupes expérimentaux. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique $p < 0.05$. T: témoin, G: traités par gavage, IP: traités par injection intrapéritonéale. $p < 0.05$: significatif (*), $p < 0.01$: très significatif (**), NS (non significatif), référence (§)

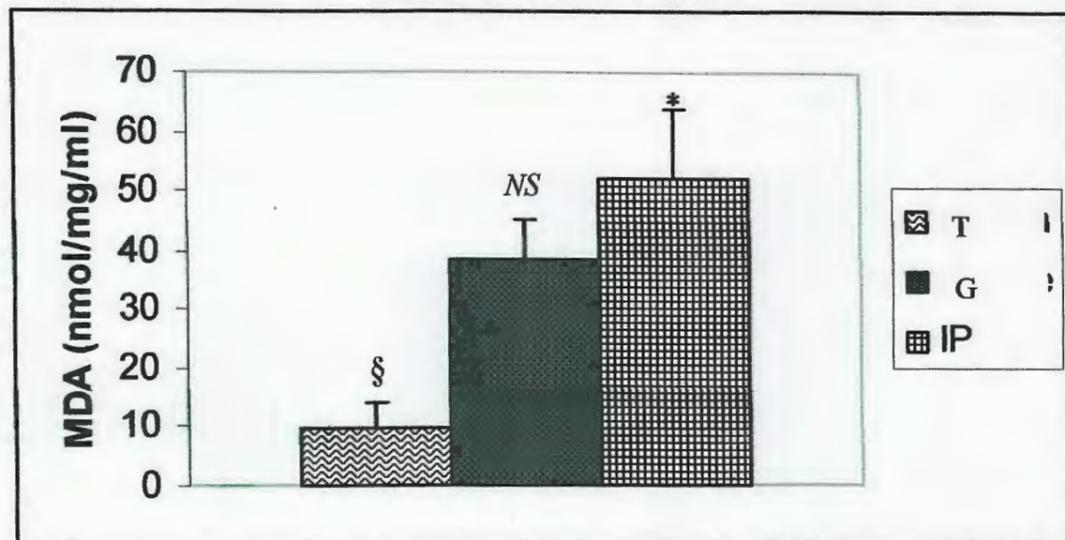


Fig. 12. Effet du B(a)P sur les concentrations du MDA dans les poumons des souris des groupes expérimentaux. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique $p < 0.05$. T: témoin, G: traités par gavage, IP: traités par injection intrapéritonéale. $p < 0.05$: significatif (*), $p < 0.01$: très significatif (**), NS (non significatif), référence (§)

L'examen macroscopique des poumons des groupes traités montre la présence de nodules sur les poumons des deux groupes, deux cas tumeur généralisée caractérisée par la fusion des lobules pulmonaires ont été observés.



Fig.13. examen macroscopique des poumons des souris appartenant aux 3 lots, T: témoin, G: gavés, IP: traités par voie intrapéritonéale. Les flèches indiquent les nodules.

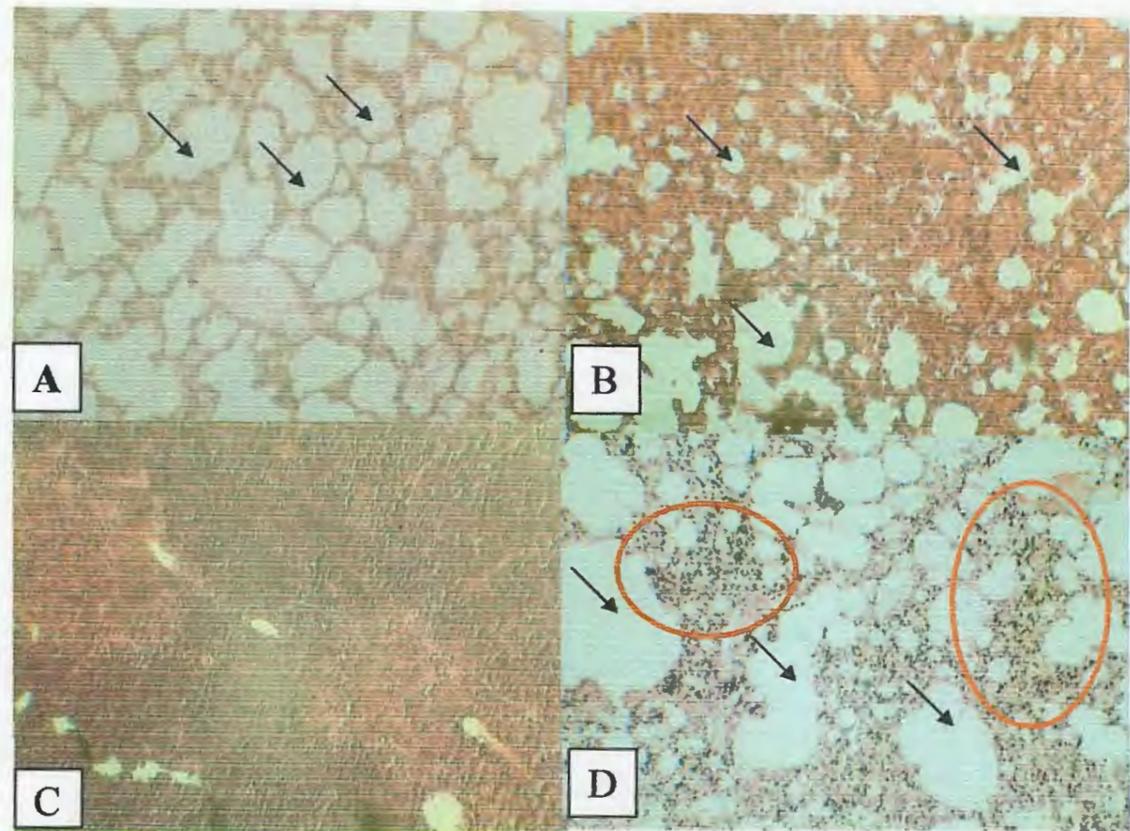


Fig.14. examen des coupes histologiques des différents groupes observées au microscope optique G x10. Les flèches désignent les espaces alvéolaires, les cercles rouges indiquent les zones où l'infiltration de cellules inflammatoires est la plus importante. A: coupe réalisée sur le poumon de souris du groupe témoin, B: coupe réalisée sur le poumon de souris du groupe traité par voie intragastrique. C et D: coupe réalisée sur le poumon de souris du groupe traité par voie intrapéritonéale.

L'examen microscopique des coupes histologique réalisées sur des poumons normaux montre des espaces alvéolaires de dimensions régulières alors que ceux des lot traité sont caractérisé soit par un dilatement du à la disparition du septum interalvéolaire (Fig.14.D) soit par un rétrécissement causé par l'envahissement de l'espace alvéolaire par les cellules cancéreuses (Fig.14.B), ceci est associé à un épaississement du septum interalvéolaire. Des zones hyperprolifératives de hautes densité cellulaire sont également observables chez la souris traités par benzo(a)pyrène (Fig.14.C), il n'est pas possibles d'y distinguer les structures histologiques du poumon, ceci est le signe le plus en faveur du cancer.

Le glutathion est présent en grande quantité dans les cellules, il est la source non protéique de thiol la plus abondante. Il a plusieurs rôles physiologiques vitaux comme la

Le glutathion est présent en grande quantité dans les cellules, il est la source non protéique de thiol la plus abondante. Il a plusieurs rôles physiologiques vitaux comme la détoxification des xénobiotiques, le transport des acides aminés et la protection cellulaire contre les attaques des radicaux libres. Une baisse très significative ($p < 0.01$) des concentrations de glutathion chez les deux groupes traités par (fig.8) B(a)P est observable par rapport au groupe témoin. La déplétion de GSH est certainement due à sa consommation lors des réactions de conjugaison avec les métabolites de B(a)P, avec les produits de la peroxydation lipidique et avec le peroxyde d'hydrogène (Rahman et MacNee, 1999). Il a été prouvé que l'altération du rapport 2GSH/GSSG par déplétion de GSH et l'accumulation de glutathion oxydé dans la cellule entraînent une oxydation des groupements -SH des protéines entraînant la formation de ponts disulfures intra- ou extra-moléculaires, et par conséquent une altération de la conformation spatiale et de la fonction des protéines (Valko et al, 2006).

Les deux figures 9 et 10 montrent respectivement une baisse significative ($p < 0.05$) de l'activité de la SOD chez les deux groupes expérimentaux comparés au groupe témoin et de façon très significative pour l'activité catalase ($p < 0.01$). La SOD et la catalase sont des enzymes du système anti-oxydant, la fonction principale de la SOD est de protéger la cellule des dommages oxydatifs causés par l'anion superoxydes et de la peroxydation lipidique médiée par le peroxyde d'hydrogène. Une baisse d'activité de la SOD a été observée dans de nombreux types de tumeurs, cette baisse d'activité pourrait avoir plusieurs origines. Elle pourrait être liée à une augmentation des dommages oxydatifs de l'ADN et des protéines (Kim et Lee, 1997) ou à l'accumulation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène ce qui entraînerait une consommation de cette enzyme.

La catalase catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène généré au cours de stress oxydatif dans la cellule tumorale. Une diminution du taux de catalase dans les cellules tumorales a été observée (Alexandre et al., 2006). Cette baisse de l'activité de la catalase dans les cancers pourrait être attribuée à la consommation de cette enzyme suite à la production excessive de peroxyde d'hydrogène dans les cellules cancéreuses (Padmavathi et al., 2006). Cependant, la plupart des auteurs penchent pour l'hypothèse selon laquelle la diminution des taux de la superoxyde dismutase et de la catalase serait due à une augmentation de la peroxydation lipidique (Ramakrishnan et al., 2007; Vinodhkumar et al., 2006). Il est plus probable que cette baisse soit due à la combinaison de tous ces facteurs.

La diminution très significative ($p < 0.01$) de l'activité glutathion S-transferase chez les deux groupes traités par le B(a)P en comparaison avec le groupe témoin, est imputable à la formation, au cours du métabolisme oxydatif, de produits réactifs tels que des alcènes, des dérivés époxyde et des hydroperoxydes organiques, qui sont des substrats pour GST (Mannervik et Danielson, 1988).

Il y a une augmentation des taux de MDA chez les souris des deux groupes traités par B(a)P, même si cette augmentation n'est pas statistiquement significative chez le groupe traité par voie intragastrique. Il est bien établi que le MDA est un très bon indicateur de la peroxydation lipidique, l'augmentation de MDA s'explique par une production excessive de radicaux libres, en particulier le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le malondialdéhyde, produit final de la LPO, est capable de former des adduits stables à l'ADN, c'est pour cette raison qu'on a émis l'hypothèse selon laquelle le LPO jouerait un rôle dans la phase précoce de la tumorigenèse (Padmavathi et al., 2006)

La cancérogenèse peut être définie comme un déséquilibre entre les signaux pro-apoptotiques et les signaux de prolifération, en faveur de ces derniers. A des concentrations physiologiques (faibles), les ERO jouent un rôle dans la transduction du signal dans la cellule, ils influencent le statu redox cellulaire à cause de leur nature oxydante. Une diminution de l'activité superoxyde dismutase aurait pour résultat l'accumulation de l'anion superoxyde dans la cellule. En plus de l'effet toxique que pourrait exercer ce radical sur les structures cellulaires, il est aussi capable de stimuler la prolifération cellulaire en activant les signaux de survie (Valko et al, 2006).

Une baisse du taux de GSH et de GST entraîne une baisse des capacités de détoxification dans les poumons, ce qui a pour conséquence une accumulation cellulaire de radicaux libres oxygénés, de produits de la peroxydation lipidique et des produits dérivés du métabolisme de B(a)P. La présence en grandes quantités d'agents oxydants ou électrophile contribue en grande partie à la promotion tumorale.

De nombreuses études ont pris le stress oxydatif comme cible pharmacologique dans le but de réduire l'impact du cancer. Des efforts ont été fait dans le domaine de la chimioprévention du cancer par l'administration d'agents antioxydants (Cook et al., 1984; Selvendiran et al., 2004 ;Kamaraj et al., 2007) ou par induction de leur synthèse (Takaishi

et al., 2009) . Bien que les résultats de ces études montrent une régression significative des tumeurs pulmonaires, on reste quand même loin de la guérison des sujets traités. De plus ces agents anti-oxydants semblent être plus efficaces en tant que traitements préventifs de la cancérogenèse qu'en tant que traitements curatifs. Cependant, il est fort probable que l'association de ces agents anti-oxydants avec les médicaments utilisés en chimiothérapie pourrait améliorer leur effet anticancéreux.

Conclusion

Afin d'exercer des effets toxiques, le benzo(a)pyrène doit être métaboliquement activé. Le résultat de ce métabolisme est la formation de métabolites plus ou moins actifs capables de causer des lésions mutagènes, et donc, d'agir comme agents initiateurs de la carcinogenèse pulmonaire. Bien que la carcinogénecité de B(a)P soit principalement représentée par la formation de métabolite mutagène, certaines investigations nous poussent à croire que le stress oxydatif joue un rôle tout aussi important dans l'induction et le développement du cancer.

La présente étude a clairement démontré un changement dans le statut oxydatif des poumons atteints de cancer, une baisse des anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques, ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique. Ces variations sont révélatrices d'un stress oxydatif intense. L'environnement pro-oxydatif constaté dans les poumons atteints de tumeurs est accompagné par la présence d'un état inflammatoire. Nous ne pouvons pas, cependant, nous prononcer sur le fait que le stress oxydatif soit une cause ou une conséquence de cette inflammation, d'autres travaux sont nécessaire afin d'éclaircir ce point.

Enfin, Cette étude démontré que les cellules du cancer pulmonaire induit par benzo(a)pyrène sont soumises à un stress oxydatif marqué. Un tel niveau d'oxydation du milieu cellulaire devrait induire les cellules en apoptose ou en nécrose, pourtant ces cellules réussissent à survivre dans de telles conditions de stress. D'autres études sont nécessaires afin d'élucider les mécanismes de cette résistance des cellules cancéreuses au stress oxydatif.

Références Bibliographiques

1. Akerboom T. P. et Sies H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*; 77:373– 382.
2. Aklillu E., Øvrebø S., Botnen I. V., Otter C., et Ingelman-Sundberg M. (2005). Characterization of Common CYP1B1 Variants with Different Capacity for Benzo[a]pyrene-7,8-Dihydrodiol Epoxide Formation from Benzo[a]pyrene. *Cancer Res*; 65: 5105- 5111.
3. Alexabdre J., Nicco C., Chéreau C., Laurent A., Weill B., Goldwasser F. et Batteux F. (2006). Improvement of the therapeutic index of anti-cancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafordipir. *J.Natl.cancer Inst.*; 98:236-244.
4. Alexandrov K., Cascorbi I., Rojas M., Bouvier G., Kriek E., et Bartsch H. (2002). *CYP1A1* and *GSTM1* genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. *Carcinogenesis*; 23: 1969– 1977
5. Anandakumar P., Kamaraj S., Jagan S., Ramakrishnan G, Devaki T. (2009). Lysosomal abnormalities during benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis – defensive role of capsaicin. *Fundam. Clin. Pharmacol.*; 23:97-103
6. Beauchamp C. et Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*; 44 (1): 276-287.
7. Biswal S., Maxwell T., Rangasamy T. et Kehrer JP. (2003). Modulation of benzo[a]pyrene-induced p53 DNA activity by acrolein. *Carcinogenesis*; 24(8):1401-1406
8. Burczynski M. E., Lin H-K., et Penning T. M. (1999). Isoform-specific Induction of a Human Aldo-Keto Reductase by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Electrophiles, and Oxidative Stress: Implications for the Alternative Pathway of PAH

Activation Catalyzed by Human Dihydrodiol Dehydrogenase. *Cancer Res.*; 59, 607–614

9. Burczynski M. E. et Penning T. M. (2000). Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon *ortho*-Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer Res.*; 60: 908–915
10. Burdick A. D., Davis J. W. , Liu K. J., Hudson L. G., Shi H., Monske M. L., et Burchiel S. W. (2003). Benzo(*a*)pyrene Quinones Increase Cell Proliferation, Generate Reactive Oxygen Species, and Transactivate the Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Epithelial Cells. *Cancer Res.*; 63: 7825–7833
11. Caino M. C., Oliva J. L., Jiang H., Penning T. M., Kazanietz M. G. (2007). Benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol Promotes Checkpoint Activation and G2/M Arrest in Human Bronchoalveolar Carcinoma H358 Cells. *Mol. Pharmacol.*; 71:744–750
12. Clairbone A. (1985). Catalase activity. In R.A. Greewald (ed.) handbook for methods for oxygen radical research. pp 283-284
13. Cohen G. M. (1990). Pulmonary metabolism of foreign compounds: its role in metabolic activation. *Environ. Health. Perspect.*; 85:31-41
14. Cook J.R., Huang D.P., Burkhardt A.L., Goldman M.E., Carrola M, Bresnick E., et Chiu J.-F. (1984). Assessment of the anti-tumor potential of glutathione. *Cancer Letters*. 21 : 277-283
15. Denison MS, Nagy SR (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 43: 309–34.
16. Denissenko M. F., Chen J. X., Tang M-S, et Pfeifer G. P. (1997). Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human *P53* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 94: 3893- 3898

17. Dertinger S.D., Nazarenko D.A., Silverstone A.E., et Gasiewicz T.A. (2001). Aryl hydrocarbon receptor signaling play a significant role in mediating benzo(a)pyrene- and cigarette smokecondensate- induced cytogenetic damage *in vivo*. *Carcinogenesis*; 22: 171-177
18. Emre M. H., Aktay G., Polat A, et Vard N. (2007). Effects of Benzo(a)pyrene and Ethanol on Oxidative Stress of Brain, Lung Tissues and Lung Morphology in Rats. *Chinese Journal of Physiology*; 50(3): 143-148, 2007
19. Foth H., Kahl R. et Kahl G.F. (1988). Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food Chem. Toxicol.*; 26 : 45-51.
20. Gackowski D., Speina E., Zielinska M., Kowalewski J., Rozalski R., Siomek A, Paciorek T., Tudek B., et. Olinski R (2003). Products of Oxidative DNA Damage and Repair as Possible Biomarkers of Susceptibility to Lung Cancer. *Cancer Res.*; 63: 4899-4902
21. Glatt H. R., Billings R., Platt K. L., et Oesch F. (1981). Improvement of the Correlation of Bacterial Mutagenicity with Carcinogenicity of Benzo(a)pyrene and Four of Its Major Metabolites by Activation with Intact Liver Cells Instead of Cell Homogenate. *Cancer Res.*; 41: 270-277
22. Habig, W. H., Pabst, M. J. et Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.. *J. Biol. Chem.*; 249: 7130-7139
23. Hainaut P. et Pfeifer G. P. (2001). Pattenrn of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis*; 22:367-374
24. Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100 : 57-70
25. Hardie L. J., Briggs J. A., Davidson L. A., Allan J. M., King R.F.G.J., Williams J. I., et Wild C. P. (2000). The effect of hOGG1 et glutathione peroxydase I genotype and 3p

- chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis*; 21: 167-172
26. Harrison P. T. C. (1984). An ethanol-acetic acid-formol saline fixative for routine use with special application to the fixation of non-perfused rat lung. *Laboratory Animals*; 18: 325-331
27. Hecht S. S. (2000). Metabolically Activated Carcinogens and Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene in Lung Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* ; 92, 782-783
28. Jiang H., Gelhaus S. L., Mangal D., Harvey R. G., Blair I. A., et Penning T. M. (2007). Metabolism of Benzo[a]pyrene in Human Bronchoalveolar H358 Cells Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol*; 20 (9): 1331–1341.
29. Kamaraj S., Vinodhkumar R., Anandakumar P., Jagan S., Ramakrishnan G. et Devaki T. (2007), The effect of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a)pyrene; *Biol. Pharm. Bull.* 30(12): 2268-2278
30. Kim K.B. and Lee B.M. (1997) Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.*; 113: 205-212.
31. Kohno T., Shinmura K., Tosaka M, Tani M., Kim S., Sugimura H., Nohmi T., Kasai H. et Yokota J. (1998). Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*; 16: 3219-3225
32. Lan Q., Mumford J. L., Shen M., De Marini D. M., Bonner M. R, He X., Yeager M., Welch R., Chanock S., Tian L., Chapman R. S., Zheng T., Keohavong P., Caporaso N. and Rothman N. (2004). Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis*; 25: 2177—2181

33. Lin P., Chang H., Tsai W-T., Wu M-H, Liao Y-S., Chen J-T., et Su J-M. (2003). Overexpression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Lung Carcinomas. *Toxicol. Pathol.*; 31: 22-30
34. Le Calvez F., Mukeria A., Hunt J. D., Kelm O., Hung R. J., Philippe Tanie`re, Paul Brennan, Boffetta P., Zaridze D. G., and Hainaut P. (2005). TP53 and KRAS Mutation Load and Types in Lung Cancers in Relation to Tobacco Smoke: Distinct Patterns in Never, Former, and Current Smokers. *Cancer Res.*; 65: (12): 5076- 5083
35. Le Marchand L., Donlon T., Lum-Jones A., Seifried A., et Wilkens L. R. (2002). Association of the *hOGG1* Ser326Cys Polymorphism with Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prevent.* ;11: 409-412
36. Mannervik B. et Danielson U.H. Glutathione transferases (1988). Structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*; 23: 283-337
37. McMillan B. J. et Bradfield C. A. (2007). The Aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *PNAS*; 104: 1412-1417
38. Moriguchi T., Motohashi H., Hosoya T., Nakajima O., Takahashi S., Ohsako S., Aoki Y., Nishimura N., Tohyama C., Fujii-Kuriyama Y., et Yamamoto M. (2003). Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse. *PNAS*; 100: 5652-5657
39. Nebert D. W., Dalton T. P., Okey A. B., et Gonzalez F. J. (2004) Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer; *J. Biol Chem*; 279: 23847-23850
40. Besarati Nia A., Van Schooten F.J., schilderman P.A.E.L, De Kok T.M.C.M, Haenen G.R., Van Herwinjnen M.H.M., Van Agen E., Pachen D., et Kleinjans J.C.S. (2001). A multi-biomarker approach to study the effect of smoking on oxidative DNA damage and repair and oxidative defense mechanisms; *Carcinogenesis*; 21: 395-401
41. Okhawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical biochemistary*; 95: 351-358

42. Padmavathi R, Senthilnathan P, Chodon D, Sakthisekaran D. (2006). Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Life Sci.* ; 78(24): 2820-2825.
43. Palackal N. T., Lee S. H., Harvey R. G., Blair I. A., et Penning T. M. (2002) Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon *trans*-Dihydrodiol Proximate Carcinogens by Human Aldo-keto Reductase (AKR1C) Enzymes and Their Functional Overexpression in Human Lung Carcinoma (A549) Cells. *J Biol Chem* ;277: 24799–24808,
44. Park J-H. , Troxe A. B., Harvey R. G., et Penning T.M. (2006). PAH *o*-quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chem. Res Toxicol.*; 19(5): 719–728.
45. Park J-H., Mangal D., Tacka K. A., Quinn A. M., Harvey R. G., Blair I. A., et Penning T. M. (2008). Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic *trans*-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *PNAS*; 105: 6846–6851
46. Paz-Elizur T., Krupsky M., Blumenstein S., Elinger D., Schechtman E., Livneh Z. (2003). DNA Repair Activity for Oxidative Damage and Risk of Lung Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*; 95: 1312- 1319
47. Pezzuto J. M., Lea M. A., et Yang C. S. (1976). Binding of Metabolically Activated Benzo(a)pyrene to Nuclear Macromolecules. *Cancer Res.*; 36:3647-3653
48. Penning T. M.(2004) Aldo-Keto Reductases and Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon *o*-Quinones. *Methods Enzymol.*; 378: 31–67.
49. Pfeifer GD, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. (2002) Tobacco smoke carcinogens, DNA-damage and p53 mutations in smoking-associated lung cancers. *Oncogene*, **21**: 7435-7451

50. Philpot R. M. et Smith B. R. (1984). Role of Cytochrome P-450 and Related Enzymes in the Pulmonary Metabolism of Xenobiotics. *Environ. Health Perspect.*; 55: 359-367
51. PNUE/RAMOGÉ: Manuel sur les biomarqueurs recommandés pour le programme de biosurveillance du MED POL. PNUE, Athènes, 1999.
52. Prough R. A., Patrizi V. W., Okita R.T., Masters B. S. S., et Jakobsson S. W. (1979). Characteristics of Benzo(a)pyrene Metabolism by Kidney, Liver, and Lung Microsomal Fractions from Rodents and Humans. *Cancer Res.*; 39: 1199-1206
53. Rahman I. et MacNee W. (1999). Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*; 277:1067-1088
54. Rajendran P., Venugopal R., Ekambaram G., Aadithya A. et Sakthisekaran D., Rehabilitating Activity of Mangiferin in Benzo(a) Pyrene Induced Lung Carcinogenesis, *Asian Journal of Biochemistry* ;3: 118-125
55. Ramakrishnan G., Raghavendran H.R., Devaki T. (2006), Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem. Biol. Interact.*;161(2):104-14.
56. Rasmussenet R. E. et Wang I. Y. (1994). Dependence of Specific Metabolism of Benzo(a)pyrene on the Inducer of Hydroxylase Activity. *Cancer Res*; 34: 2290-2295
57. Rodin S. N et Rodin A. S. (2000). Human lung cancer and p53: The interplay between mutagenesis and selection. *PNAS*; 97: 12244–12249
58. Rigdon R.H. et Neal J. (1966). Gastric carcinomas and pulmonary adenomas in mice fed benzo[a]pyrene. *Tex. Rep. Biol. Me.*, 24: 195-207.
59. Rigdon R.H. et Neal J. (1969) .Relationship of leukemia to lung and stomach tumors in mice fed benzo[a]pyrene. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; 130: 146-148.

60. Shi M. M., Kugelman A., Iwamoto T., Tiant L., et Formane H. J. (1994). Quinone-induced Oxidative Stress Elevates Glutathione and Induces γ -Glutamylcysteine Synthetase Activity in Rat Lung Epithelial L2 Cells. *J Biol Chem*; 269: 26512-26517

61. Shimada T., Inoue K., Suzuki Y., Kawai T., Azuma E., Nakajima T., Shindo, M. Kurose K., Sugie A., Yamagishi Y., Fujii-kuriyama Y., et Hashimoto M. (2002). Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*; 23: 1199-1207

62. Singh S.V., Hu X., Srivastava S.K., Singh M., Xia H., Orchard J.L. at Zaren H.A. (1998). Mechanism of inhibition of benzo(a)pyrene induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin; *carcinogenesis*, 19(8): 1357-1360

63. Smith G. B. J., Harper P. A., Wong J. M. Y., Lam M. S. M Reid., K. R., Petsikas D et T. E. Massey. (2001). Human Lung Microsomal Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) Activities: Impact of Smoking Status and CYP1A1, Aryl Hydrocarbon Receptor, and Glutathione S-Transferase M1 Genetic Polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*; 10 : 839-853

64. Smith L. E., Denissenko M.F., Bennett W. P., Li H., Amin S., Tang M., Pfeifer G.P. (2000). Targeting of Lung Cancer Mutational Hotspots by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* ; 92: 803-811

65. Takaishi M., Suzuki J. S., Satoh M. et H. Nagase. (2009). The protective role of metallothionein in benzo(a)pyrene induced DNA damage. *J. Toxicol. Sci.*; 34: 449-458

66. Valko M., Rhodes C.J., Moncola J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* ;160 : 1-40

67. Vinodh Kumar R., Ravikumar V., Shivashangari K.S., Kamaraj S. et Devaki T. (2006). Chemopreventive Role of Lycopene and D-arginine in Benzo (a) Pyrene Induced Lung Cancer with Reference to Lipid Peroxidation, Antioxidant System and Tumor Marker Enzymes, *Int. J.cancer Res.*; 2 : 224-233.

68. Wei S-J. C., Chang R. L., Bhachech N., Cui X. X., Merkler K. A., Wong C-Q., Hennig E., Yagi H., Jerina D. M, and Conney A. H. (1993). Dose-dependent Differences in the Profile of Mutations Induced by (+)-7/R,8S-Dihydroxy-9S,10R-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene in the Coding Region of the Hypoxanthine (Guanine) Phosphoribosyltransferase Gene in Chinese Hamster V-79 Cells. *Cancer Res*; 53. 3294-3301.
69. Weisenberger D. J. and Romano L. J. (1999). Cytosine Methylation in a CpG Sequence Leads to Enhanced Reactivity with Benzo[a]pyrene Diol Epoxide That Correlates with a Conformational Change. *J Biol Chem*; 274: 23948-23955

هناك العديد من المواد الكيميائية التي يمكنها أن تسبب بدء السرطان في خلايا الشعب الهوائية أو السنخية عند الإنسان. الكربوهيدرات العطرية المتعددة الحلقات تعتبر عوامل قوية مسببة للسرطان من بينها البنزو (أ) بيرين الذي قد درس حتى نطاق واسع لقدرته على إحداث أورام خبيثة في الرئة لدى الثوران. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد مدى الأوكسدة في أنسجة سرطان الرئة ، لتحديد مدى مشاركتها في عملية السرطنة، والمقارنة بين حالة التأكسد في الخلايا السرطانية والخلايا الطبيعية لتحديد الأهداف الخلوية والجزيئية الصيدلانية المحتملة أو اختبار الأدوية المضادة للسرطان . لقد أظهرت نتائج هذه الدراسة انخفاض ملحوظ في مضادات الأوكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية في خلايا سرطان الرئة وزيادة في أكسدة الدهون بالمقارنة مع الأنسجة الطبيعية لحيوانات المجموعة الشاهدة.

المصطلحات: الإجهاد التأكسدي ، البنزو(أ)بيرين ، حالة التأكسد، المواد المسببة للسرطان، مضادات الأوكسدة

Résumé

De nombreux agents cancérigènes peuvent induire l'initiation des cellules bronchiques ou alvéolaires et favoriser leur progression chez l'homme. Les HAP sont des agents cancérigènes très puissant dont le B(a)P a été largement étudié pour sa capacité à induire les tumeurs pulmonaires chez la souris. L'objectif de cette étude est de déterminer l'ampleur de ce stress oxydatif dans les tissus pulmonaires atteints de cancer, de situer le degré de sa participation dans le processus cancéreux dans le poumon et de permettre de comparer le statut oxydatif entre cellule normale et cellule cancéreuse afin de dégager les cibles potentielles au cours des traitements ou des essais anticancéreux. Les résultats montrent une diminution significative des défenses antioxydantes enzymatiques et non-enzymatiques dans les cellules des poumons atteints de cancer et une augmentation de la peroxydation lipidique, en comparaison avec les tissus normaux des animaux du lot témoin.

Mots clé: stress oxydatif, benzo(a)pyrène, statut oxydatif, cancérigènes, antioxydants

Abstract

Many carcinogens can induce the initiation of bronchial or alveolar cells and promote their growth in humans. PAHs are very potent carcinogens. Among them, B(a) P has been widely studied for its ability to induce lung tumors in mice. The objective of this study is to determine the extent of oxidative stress in lung tissue of cancer, to define the extent of its participation in the cancer process in the lung and to compare the oxidative status between normal cells and cancer cell to identify potential targets in lung cancer or testing drugs used in treatment of lung cancer. The results show a significant decrease in enzymatic and non-enzymatic antioxidants in lung cancer cells and increased lipid peroxidation compared with normal tissues of animals in the control group.

Key words: oxidative stress, B(a)P, oxidative status, carcinogens, antioxidants