



Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

## Thèse

Présentée par

**BENCHOUIEB Ilham**

En vue de l'obtention du Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle (LMD)

Spécialité : Biologie

Option: Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème

**Etude *in vivo* des toxicités hépato-pulmonaires induites  
par le benzo(a)pyrène : modulation par l'acide gallique  
et association avec l'expression des galectines 3 et 8**

Soutenue le : 04/11/2020

Membres de jury

Président : Pr SIFOUR Mohamed, Université MSB de Jijel

Rapporteur : Pr RECHRECHE Hocine, Université MSB de Jijel

Examineurs : Pr DEMMOUCHE Abbassia, Université DL de Sidi Bel Abbes

Dr ALYANE Mohamed, ENSB Tawfik Khaznadar de Constantine

Dr SEGUENI Narimene, Université de Constantine 3

Invité : Pr LAHOUEL Mesbah, Université MSB de Jijel

Année universitaire 2019/2020

## Remerciements

La préparation d'une thèse de doctorat est un travail de longue haleine qui nécessite une entière implication et qui n'aurait pu aboutir sans l'aide de beaucoup de personnes et d'institutions ; je tiens donc à remercier ici toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé et soutenu dans mon parcours de doctorat et dans mon parcours universitaire de manière générale.

Je commence naturellement par remercier le rapporteur de cette thèse Pr RECHRECHE Hocine pour avoir proposé ce sujet d'intérêt, pour son encadrement et pour ces conseils et corrections pertinentes tout au long de ces années. Un grand merci au Pr SIFOUR Mohamed de nous faire l'amitié de présider le jury, je remercie vivement les chers membres du jury, Pr DEMMOUCHE Abbassia, Dr ALYANE Mohamed et Dr SEGUENI Narimène qui me font l'honneur de considérer mon travail et d'avoir accepté d'évaluer ma thèse doctorale. Je suis, par ailleurs, particulièrement heureuse et honoré que le Pr LAHOUEL Mesbah ait accepté notre invitation. Je remercie le laboratoire de recherche de Biologie Moléculaire et Cellulaire, le département du même nom et la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour nous avoir permis d'entamer cette aventure et de nous essayer à l'exercice de l'enseignement et d'acquérir assez tôt une expérience certaine de l'enseignement supérieur : particulièrement le département du tronc commun et le département de Biologie Moléculaire et Cellulaire.

J'adresse mes meilleurs remerciements et mes meilleurs sentiments aux directeur/rice ainsi qu'à tous les membres du laboratoire de Toxicologie Moléculaire pour m'avoir accueilli, moi et mes chères collègues et amies doctorantes qui savent toute l'importance de leurs encouragements et leur amitié tissée au cours de ces dernières années ainsi que de tout les bons moments partagés ensemble. Je remercie sans faute, la directrice Dr DIAZ-PERALES Araceli, ainsi que toute l'équipe du Laboratoire d'Allergènes de l'Université Polytechnique de Madrid qui m'a permis de réaliser la majeure partie de ma recherche et d'avancer dans ma thèse. Enfin, je n'oublie pas non plus, de remercier les membres de l'administration de l'université qui m'ont souvent facilité les choses à différentes reprises, de même que toutes les personnes que je n'ai pas citées mais qui se reconnaîtront, je l'espère. Tout cela, n'aurait pu se faire sans l'amour, l'aide et le soutien inconditionnel de ma famille et de mes proches, à qui le mot 'merci' ne saurait suffire !

## Liste des figures

<b>Fig. 1.</b> Schéma général d'activation des substances génotoxiques .....	05
<b>Fig. 2.</b> Schéma simplifié de l'induction des gènes cyp1a1 par le BaP .....	07
<b>Fig. 3.</b> Principales voies de métabolisation du BaP .....	08
<b>Fig. 4.</b> Mécanisme d'activation du BaP par le cytochrome P450 et l'époxide hydrolase.....	09
<b>Fig. 5.</b> Voie des quinones .....	10
<b>Fig. 6.</b> Principaux adduits du BPDE .....	11
<b>Fig. 7.</b> Mécanisme de formation de la 8-oxodGuo.....	12
<b>Fig. 8.</b> Localisation cellulaire et spécificité des lectines animales .....	16
<b>Fig. 9.</b> Structures chimiques des différents types de Gals.....	17
<b>Fig. 10.</b> Fonctions et pathologies liées aux changements d'expressions des Gals.....	24
<b>Fig. 11.</b> Structure chimique des PPs.....	31
<b>Fig. 12.</b> Les principales voies de production de l'AG.....	38
<b>Fig. 13.</b> Structure chimique de l'AG et de ses dérivés .....	39
<b>Fig. 14.</b> Principaux usages de l'AG et de ses dérivés .....	40
<b>Fig. 15.</b> Variation de l'activité de la CAT au cours de l'intoxication aigüe .....	58
<b>Fig. 16.</b> Variation de l'activité de la GST au cours de l'intoxication aigüe.....	59
<b>Fig. 17.</b> Variation du taux de GSH au cours de l'intoxication aigüe .....	60
<b>Fig. 18.</b> Variation du taux de MDA au cours de l'intoxication aigüe.....	61
<b>Fig. 19.</b> Effet de l'AG sur l'activité de la CAT pulmonaire au cours de l'intoxication aigüe ...	63
<b>Fig. 20.</b> Effet de l'AG sur l'activité de la GST pulmonaire au cours de l'intoxication aigüe....	64
<b>Fig. 21.</b> Effet de l'AG sur le taux de GSH pulmonaire après intoxication aigüe.....	65
<b>Fig. 22.</b> Effet de l'AG sur le taux de MDA hépatique au cours de l'intoxication aigüe.....	67
<b>Fig. 23.</b> Effet de l'AG sur l'activité de la CAT hépatique au cours de l'intoxication aigüe.....	67
<b>Fig. 24.</b> Effet de l'AG sur l'activité de la GST hépatique au cours de l'intoxication aigüe.....	69
<b>Fig. 25.</b> Effet de l'AG sur le taux de GSH hépatique après intoxication aigüe .....	70
<b>Fig. 26.</b> Effet de l'AG sur le taux de MDA au cours de l'intoxication aigüe .....	72

<b>Fig. 27.</b> Mécanisme de l'autooxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet .....	73
<b>Fig. 28.</b> Expression pulmonaire de l'ARNm de la Gal 8 .....	77
<b>Fig. 29.</b> Expression hépatique de l'ARNm de la Gal 8 .....	78
<b>Fig. 30.</b> Comparaison tissulaire de l'expression de l'ARNm Gal 8 .....	80
<b>Fig. 31.</b> Expression pulmonaire de l'ARNm de la Gal 3 .....	82
<b>Fig. 32.</b> Expression hépatique de l'ARNm de la Gal 3 .....	83
<b>Fig. 33.</b> Comparaison de l'expression tissulaire de l'ARNm Gal 3 .....	84
<b>Fig. 34.</b> Profils de purification de la Gal 3 hépatique par chromatographie d'affinité .....	87
<b>Fig. 35.</b> Analyse par Western blot de Gal 3 hépatique purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne d'asialoféuin-Sepharose .....	89
<b>Fig. 36.</b> Expression pulmonaire des ARNm Gals 3 et 8. ....	92
<b>Fig. 37.</b> Expression hépatique des ARNm Gals 3 et 8 .....	93
<b>Fig. 38.</b> Aspect macroscopique des foies des rats .....	96
<b>Fig. 39.</b> Photomicrographies de l'évaluation histopathologique, traduisant l'effet de l'AG sur l'hépatotoxicité induite par le BaP .....	98
<b>Fig. 40.</b> Effet de l'AG sur l'activité des enzymes hépatique CAT, SOD et GST après intoxication par le BaP .....	103
<b>Fig. 41.</b> Effet de l'AG sur le taux du GSH et du MDA hépatiques après intoxication chronique .....	104
<b>Fig. 42.</b> Mécanismes généraux des maladies hépatiques induites par le stress oxydatif .....	106

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Localisation, substrats et inducteurs des différents CYP450 métabolisant des xénobiotiques.....	09
<b>Tableau 2</b> : Classification des lectines dans les organismes vivants.....	15
<b>Tableau 3</b> : Expression des Gals dans les différents tissus et organes .....	20
<b>Tableau 4</b> : Effet de l'AG sur le taux des transaminases sériques .....	100

## Liste des abréviations

**AG** : Acide gallique

**AhR** : Aryl hydrocarbon receptor

**ALT** : Alanine aminotransférase

**APAP** : Acétaminophène

**ASF** : Asialofétuine

**AST** : Aspartate aminotransférase

**BaP** : Benzo(a)pyrène

**BPDE** : 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyrène 9,10-oxyde

**CAT** : Catalase

**BrCN** : Bromure de cyanogène

**CRD** : Carbohydrates recognition domain

**CRP** : C reactive protein

**CYP450** : Cytochromes P450

**EH** : Epoxyde-hydrolase

**ERK** : Extracellular-signal regulated kinase

**Gal** : Galectine

**Gal 3** : Galectine 3

**Gal 8** : Galectine 8

**GSH** : Glutathion

**GST** : Glutathion-S-transférase

**HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

**IL** : Interleukine

**IP** : Intra péritonéale

**LDL** : Low density lipoprotein

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase

**MDA** : Malonyldialdéhyde

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor kappa B

**NO** : Oxyde nitrique

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PPs** : Polyphénols

**RL** : Radicaux libres

**ROS** : Reactive oxygen species

**SOD** : Superoxyde dismutase

**TNF $\alpha$**  : Tumor necrosis factor  $\alpha$

INTRODUCTION.....	01
<b>I. Synthèse Bibliographique</b>	
I.1. Généralités.....	04
I.1.1. Benzo(a)pyrène.....	04
I.1.2. Métabolisme et mécanismes d'action.....	05
I.1.2.1. Mécanismes d'induction des gènes de phase I et de phase II.....	06
I.1.2.2. Voies de métabolisation du benzo(a)pyrène.....	07
I.1.2.2.1. Voie des CYP.....	08
I.1.2.2.2. Voie des quinones.....	10
I.1.3. Toxicité et dommages causés à l'ADN.....	11
I.1.3.1. Adduits à l'ADN.....	11
I.1.3.2. Espèces réactives de l'oxygène.....	12
I.1.4. Mutagénèse et cancérogenèse.....	13
I.2. Galectines.....	14
I.2.1. Historique et généralités.....	14
I.2.1.1. Structure et classification.....	17
I.2.1.1.1. Galectines de type prototypes.....	18
I.2.1.1.2. Galectines de type chimère.....	18
I.2.1.1.3. Galectines de type en tandem.....	18
I.2.1.2. Localisation.....	19
I.2.2. Fonctions cellulaires physiologiques des galectines.....	21
I.2.2.1. Galectines intracellulaires.....	21
I.2.2.1.1. Epissage des ARNm.....	21
I.2.2.1.2. Régulation du cycle cellulaire.....	22
I.2.2.1.3. Rôle dans l'apoptose.....	22
I.2.2.2. Galectines extracellulaires.....	23
I.2.2.2.1. Adhésion cellulaire.....	23



I.2.2.2.2. Défense immunitaire .....	23
I.2.3. Galectines et processus pathologiques .....	25
I.2.3.1. Galectines et maladies cardiovasculaires .....	25
I.2.3.2. Galectines et cancers .....	26
I.3. Substances bioactives d'origine végétale .....	29
I.3.1. Polyphénols .....	30
I.3.1.1. Acides phénoliques .....	31
I.3.1.2. Flavonoïdes .....	32
I.3.1.3. Lignanes .....	33
I.3.1.4. Stilbenes .....	33
I.3.1.5. Biodisponibilité et métabolisme des polyphénols.....	33
I.3.1.6. Effets biologiques des polyphénols.....	35
I.3.2. Acide gallique .....	36
I.3.2.1. Introduction .....	36
I.3.2.2. Origine et biosynthèse de l'acide gallique .....	37
I.3.2.3. Biodisponibilité et dérivés de l'acide gallique .....	39
I.3.2.4. Activités pharmacologiques de l'acide gallique .....	40
I.3.2.4.1. Activité antioxydante .....	41
I.3.2.4.2. Activité anti-tumorale .....	41

## **II. Matériel et Méthodes**

II.1. Produits chimiques.....	44
II.2. Animaux.....	44
II.3. Modèles expérimentaux.....	44
II.3.1. Modèle expérimental de toxicité aiguë induite par le benzo(a)pyrène.....	44
II.3.2. Modèle expérimental de toxicité subaiguë induite par le benzo(a)pyrène.....	45
II.3.3. Modèle expérimental de toxicité chronique induite par le benzo(a)pyrène.....	46
II.4. Préparation de la fraction cytosolique .....	47

II.5. Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase .....	47
II.6. Mesure de l'activité de la catalase. ....	48
II.7. Mesure de l'activité de la glutathion-S-transférase .....	49
II.8. Dosage du taux de glutathion .....	49
II.9. Dosage du taux de malonyldialdéhyde .....	50
II.10. Préparation des ARN totaux .....	50
II.11. Préparation de l'ADN complémentaire .....	51
II.12. Analyse par PCR quantitative .....	51
II.13. Extraction des protéines totales .....	52
II.14. Purification des galectines par chromatographie d'affinité .....	52
II.14.1. Préparation de la colonne chromatographique et couplage de ligand .....	53
II.14.2. Chromatographie d'affinité.....	54
II.15. SDS PAGE.....	54
II.16. Western Blot .....	55
II.17. Analyse macroscopique et histopathologique.....	55
II.18. Mesure des activités des transaminases .....	56
II.19. Analyse statistique .....	56

### **III.RESULTATS ET DISCUSSION**

III.1. Modulation différentielle par l'acide gallique du stress oxydatif aigüe induit par le benzo(a)pyrène .....	57
III.1.1. Poumons et foie: sièges d'un stress oxydatif cellulaire .....	57
III.1.2. Effet prooxydant de l'acide gallique dans les poumons.....	62
III.1.3. Effet antioxydant de l'acide gallique dans le foie .....	67
III.1.4. Conclusion.....	73
III.2. Modulation de l'expression des galectines 3 et 8 par l'acide gallique dans la toxicité subaigüe du benzo(a)pyrène .....	75
III.2.1. Expression de l'ARNm de la galectine 8 .....	76

III.2.1.1. Induction par le BaP de la surexpression hépatopulmonaire de la galectine 8 .....	76
III.2.1.2. Modulation contrastée par l'acide gallique de l'expression hépato-pulmonaire de l'ARNm galectine 8.....	79
III.2.2. Expression de l'ARNm de la galectine 3.....	81
III.2.2.1. Modulation hépato-pulmonaire synergique de galectine 3 induite par le benzo(a)pyrène .....	82
III.2.2.2. Induction par l'acide gallique de la sous-expression pulmonaire de l'ARNm galectine 3.....	84
III.2.2.3. Expression de la protéine galectine3 dans le foie intoxiqué par le benzo(a)pyrène....	85
III.2.3. Comparaison des profils d'expression des galectine 3 et 8 .....	91
III.2.4. Conclusion.....	94
III.3. Effet protecteur de l'acide gallique contre l'hépatotoxicité chronique induite par le benzo(a)pyrène .....	95
III.3.1. Effets du benzo(a)pyrène et de l'acide gallique sur la fonction hépatique.....	96
III.3.2. Effet de l'acide gallique sur le stress oxydatif chronique induit par le benzo(a)pyrène	100
III.3.2.1. Amélioration des capacités antioxydantes par l'acide gallique.....	101
III.3.2.2. Recouvrement du glutathion et diminution de la peroxydation lipidique .....	103
III.3.3. Conclusion.....	105
CONCLUSION GENERALE .....	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	110
ANNEXES .....	124

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent une part importante des polluants organiques persistants émis dans l'environnement. Ils proviennent de la combustion incomplète des matières organiques (Charbon, mazout, carburants, bois, tabac, etc.) et parviennent dans l'air ambiant. Nous produisons donc des HAP chaque fois que nous brûlons une matière organique, par exemple en fumant, en circulant en voiture ou même en faisant une grillade. La structure moléculaire de certains types d'entre eux les amène à être transformés dans l'organisme en composés extrêmement toxiques, appelés époxydes qui réagissent très facilement avec l'ADN, ce qui peut entraîner des mutations génétiques menant parfois au cancer (Abdel-Shafay et Mansour, 2016). Ces effets ont été démontrés en expérimentation animale, mais le risque existe également pour l'Homme. L'agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) a classé 16 HAP dans sa liste des polluants prioritaires, se trouvant sous forme de mélanges complexes, les analyses se limitent même, souvent, au seul benzo(a)pyrène (BaP) puisqu'il se trouve toujours en proportion relativement constante (10% des mélanges). Le BaP est particulièrement toxique puisque ses effets cancérogènes sont prouvés pour l'Homme et il est aussi considéré comme mutagène et tératogène. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a réévalué les HAP en 2006 et en a classé 12 parmi les substances cancérogènes, probablement ou possiblement cancérogènes pour l'Homme (CIRC, 2010). L'étude de Ladjji et al. (2013) a démontré la présence des HAP, fortement associés aux particules ultrafines, en zone urbaine et industrielle de la Willaya d'Alger (Algérie) due principalement aux activités anthropogéniques tels que les émissions automobiles, avec un potentiel carcinogène, en équivalence de BaP de 90% de l'effet toxique global des HAP dans l'air respirable et pénétrant aisément dans les alvéoles des poumons. Le BaP compte parmi les composants les plus nocifs du tabac, reconnu comme étant un facteur de risque majeur dans le développement des cancers. Il est en cause des 22% du total des décès dus au cancer (GBD Risk Factors Collaborators, 2016) et de 71% des décès dus au cancer pulmonaire (Kasala et al., 2015). Ce dernier connaît une dangereuse progression dans notre pays, en effet, l'Algérie a enregistré 2382 cas de décès par cancer du poumon en 2012 et 2852 cas en 2015 et se place en tête des cancers les plus répandus, notamment, chez les hommes, avec un taux de 13,6% soit 3271 personnes atteintes, en 2018. Sur le plan mondial et d'après les dernières données, le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018 (IARC, 2018).

Il est clair que la reconnaissance de l'étiologie et la compréhension de la pathogenèse de ce type de maladies humaines constitue le principal processus de développement des

traitements. Etant donné que la somme des altérations temporelles dans les protéines favorise ou reflète l'état de la maladie particulière, les protéines représentent un ensemble de marqueurs potentiels (Chaurand et al., 2004). Typiquement, les galectines (Gals) qui regroupent les lectines animales spécifiques des  $\beta$ -galactosides sont des protéines qui sont intensivement étudiées. Elles jouent un rôle important dans divers processus cellulaires tel que l'épissage de pré-ARNm, la régulation de la croissance cellulaire, l'adhésion cellulaire, l'inflammation, la réponse immunitaire, l'apoptose et la cancérogenèse (Ghazarian et al., 2010). Ainsi l'élucidation des mécanismes moléculaires des fonctions des Gals peut ouvrir de nouvelles voies non seulement dans la recherche biomédicale et dans la compréhension des mécanismes impliqués dans les intoxications induites par ces polluants environnementaux.

En dehors de la cancérogénèse pulmonaire, l'administration de BaP peut conduire à la formation de tumeurs chez des modèles animaux sur divers organes, notamment, le tractus gastro-intestinal, les glandes mammaires et le foie. Ainsi, des études épidémiologiques ont suggéré une association entre les adduits HAP-ADN et le risque élevé de carcinome hépatocellulaire, même, chez l'Homme. En effet, l'exposition environnementale à des niveaux élevés de BaP augmente le risque de cancer par le biais d'intermédiaires toxiques issus de son métabolisme par les enzymes du cytochrome P450 (Su et al., 2014). Les tissus hépatiques ayant la plus grande capacité de biotransformation, seraient alors plus sensibles à l'exposition au BaP (Ba et al., 2015). Cependant, à ce jour, il existe encore peu de travaux sur les effets toxiques du BaP chez les modèles murins.

Par ailleurs, au cours de ces dernières années un intérêt particulier a été attribué aux effets protecteurs de diverses substances naturelles bioactives contre de nombreuses pathologies humaines. De plus, des preuves scientifiques solides suggèrent que la consommation régulière de fruits et de légumes est négativement associée au risque de développer des maladies chroniques (Liu, 2013). Parmi ces composés nous retrouvons l'acide gallique (AG), un acide polyphénolique naturel largement retrouvé dans les plantes et les fruits. Il possède d'innombrables activités biologiques : activité antibactérienne, antivirale, antifongique, antiulcéreuse, anti-inflammatoire (Yoon et al., 2013), antioxydante et même anticancéreuse (Badhani et al., 2015).

Le principal objectif de notre travail est d'étudier les mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans les effets toxiques inflammatoires et/ou cancérogènes induits par le BaP chez le rat et la souris, notamment, au niveau du foie et des poumons. De plus, nous

avons tenté d'évaluer les effets antioxydants et protecteurs de l'AG contre les méfaits du BaP. Pour ce faire, nous avons procédé à la réalisation de modèles expérimentaux de toxicités induites par le BaP (En présence et en absence de l'AG) et cela, à court, moyen et long terme. Ainsi, nous avons évalué les effets induits par le BaP à travers, d'une part, la caractérisation du stress oxydatif induit par le BaP par l'analyse des activités d'enzymes impliquées dans le processus oxydant ainsi que l'évaluation de la présence de protéines marqueurs de l'inflammation ou autre dysfonctionnement et l'examen histologique des tissus du foie, organe cible au cours de ces intoxications, d'autre part. En outre, nous avons étudié le rôle joué par les Gals, dans la toxicité hépatique et pulmonaire du BaP, en particulier, nous avons analysé leur profil d'expression par PCR quantitative. Le profil d'expression d'un gène étant une information très utile lors de la recherche de gènes candidats potentiellement impliqués dans des fonctions physiologiques ou des situations pathologiques.

## I.1. Généralités

Les HAP sont une sous famille des hydrocarbures aromatiques, c'est à dire des molécules constituées d'atomes de carbone et d'hydrogène, mais dont la structure contient au moins deux cycles de benzène accolés (Cycles aromatiques). Ils proviennent de la combustion incomplète de matières organiques (Charbon, carburants, bois, tabac, ...etc.) et parviennent dans l'atmosphère pour, ensuite, se disperser dans les autres compartiments environnementaux (Freitas et al., 2013) ; les plus légers sont à l'état gazeux, les plus lourds (Plus de six cycles aromatiques) sont à l'état particulaire (Walker et al., 2008 ; Sheu et al., 1997). En raison de leur caractère hydrophobe, liposoluble et volatil, ils ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides et, en particulier, sur les matières organiques et se retrouvent ainsi dans l'environnement sous forme de mélanges complexes. De ce fait, seuls certains HAP peuvent être identifiés par des méthodes analytiques.

La population générale y est exposée via trois voies principales, la voie digestive, par ingestion d'aliments contaminés ; la voie pulmonaire lié au tabagisme et à la pollution atmosphérique, et enfin, la voie cutanée, en touchant à des matériaux contaminés dans le milieu professionnel. La principale voie d'exposition est la voie pulmonaire par inhalation d'air contenant de très fortes concentrations, pouvant être parfois 5000 fois plus élevées que dans l'environnement. Dans les années quatre vingt, l'Agence de Protection de l'Environnement des USA (EPA, 1977) a classé 16 HAP dans sa liste des polluants prioritaires. Aujourd'hui, ils font également partie des listes de l'Organisation Mondiale de la Santé, la Communauté Européenne et par le Centre International de la Recherche sur le Cancer (CIRC) pour leur cancérogénicité. Le BaP est le HAP le plus toxique, il est le seul classé dans le groupe 1 des substances cancérigènes du classement IARC (IARC, 2010).

### I.1.1. Benzo(a)pyrène

De formule chimique  $C_{20}H_{12}$ , le BaP est un HAP à cinq cycles aromatiques, de masse molaire de 252,31 g/mol (Hyp et al., 1968). A température ambiante, il se présente sous forme de cristaux jaunes inodores, aisément soluble dans de nombreux solvants organiques, aromatiques ou chlorés, mais, de faible solubilité dans l'eau. Il est formé, lors, de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matériaux organiques. Sa présence dans l'environnement est d'origine anthropique : raffinage du pétrole, utilisation du goudron et du

charbon, fumée de cigarettes, vapeurs d'échappement des automobiles et des aliments fumés ou grillés au charbon du bois (Bonnard et al., 2007).

Le BaP est certainement le plus connu et le mieux étudié des HAP quant à sa cancérogénicité. Il serait impliqué dans le développement de cancers du poumon, chez l'homme par la formation d'adduits à l'ADN, notamment, au niveau du gène de la protéine p53. Des études font état d'une plus grande mutagénicité de mélanges des HAP, lorsque, la proportion en BaP est plus importante. De même que l'exposition à des concentrations élevées de BaP peut causer des dommages au niveau du système immunitaire et augmenter la susceptibilité à de nombreuses maladies (Respiratoires, gastro-intestinales, dermique..etc) (Hégazy et al., 2012). De manière générale, cette toxicité attribuée au BaP est liée aux dommages causés à l'ADN (Engendrés par le biais de ces métabolites intermédiaires) et aux dommages oxydatifs causés par les espèces réactives oxygénées (ROS) (Hussein et al., 2016).

### I.1.2. Métabolisme et mécanismes d'action

Le BaP, comme les autres HAP, est un pro-carcinogène, c'est-à-dire qu'il nécessite une activation métabolique par des enzymes spécifiques qui lui permettent d'acquérir des propriétés électrophiles et de générer ses effets toxiques. Cette bioactivation qui normalement a pour but la détoxification de l'organisme, transforme ces molécules inertes en métabolites réactifs ayant la capacité de réagir avec différentes biomolécules comme par exemple, l'ADN (Fig. 1) (Miller et al., 2001).

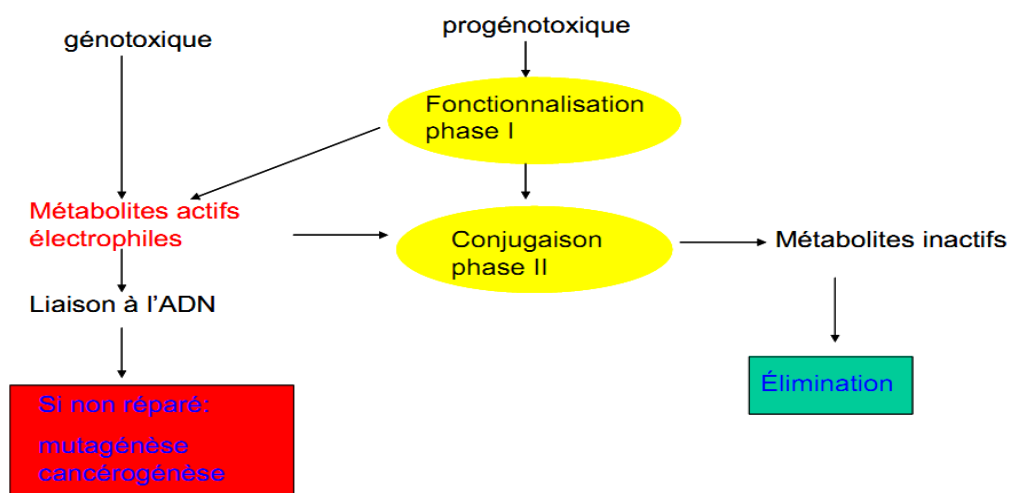


Fig. 1. Schéma général d'activation des substances génotoxiques (Miller et al., 2007)



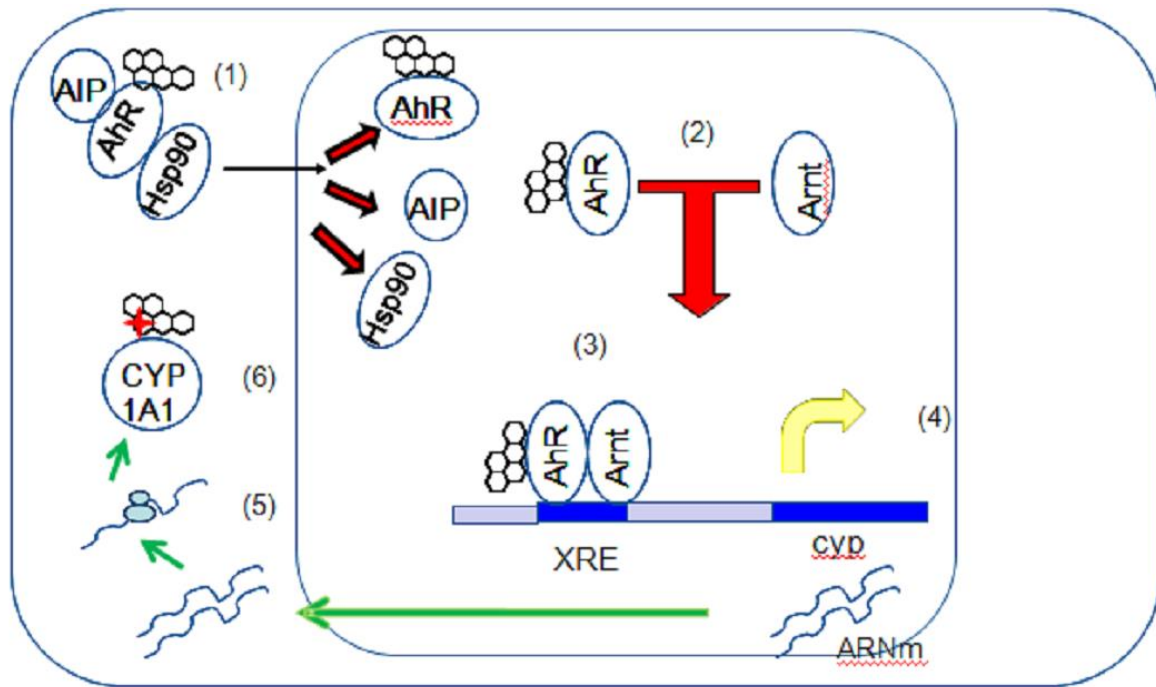
Il existe deux catégories d'enzymes chargées de la biotransformation des xénobiotiques dans l'organisme. Les enzymes de phase I parmi lesquelles on retrouve : les CYP 450, les époxyde-réductases et époxyde-hydrolases (EH) alors que les enzymes de phase II comprennent la glutathion-S-transférase (GST), l'UDP-glucuronyl transférase et la sulfotransférase.

Les enzymes de phase I modifient ou introduisent des groupements fonctionnels au niveau des xénobiotiques par des réactions d'oxydation, d'hydrolyse, etc, afin de les rendre plus hydrosolubles et faciliter leur conjugaison par les enzymes de phase II et leur élimination dans les urines, les fèces et la bile. Les enzymes de phase II réalisent la conjugaison des substances chimiques modifiées par les enzymes de phase I, pour permettre à ces substances d'être éliminées via des pompes ou des transporteurs. Il s'agit par exemple de réactions de glucurono-conjugaison ou de sulfo-conjugaison, médiées respectivement par la UDP-glucuronyl-transférase et la sulfotransférase, ou des réactions de conjugaison au glutathion (GSH) (Shimada et al., 2006).

### **I.1.2.1. Mécanismes d'induction des gènes de phase I et de phase II**

Les HAP ont la particularité d'être des substrats, mais, également des inducteurs des CYP450 et des enzymes de phase II. Cette induction est régulée par le récepteur aryl hydrocarbon (AhR) qui est spécifique des composés aromatiques plans. Il fait partie de la famille bHLH/PAS (Basic Helix-Loop-Helix/Per-Arnt-Sim) présente dans le cytosol. Il permet l'expression des gènes des CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2, ainsi que, d'autres enzymes de la métabolisation après avoir formé un complexe avec un de ses ligands.

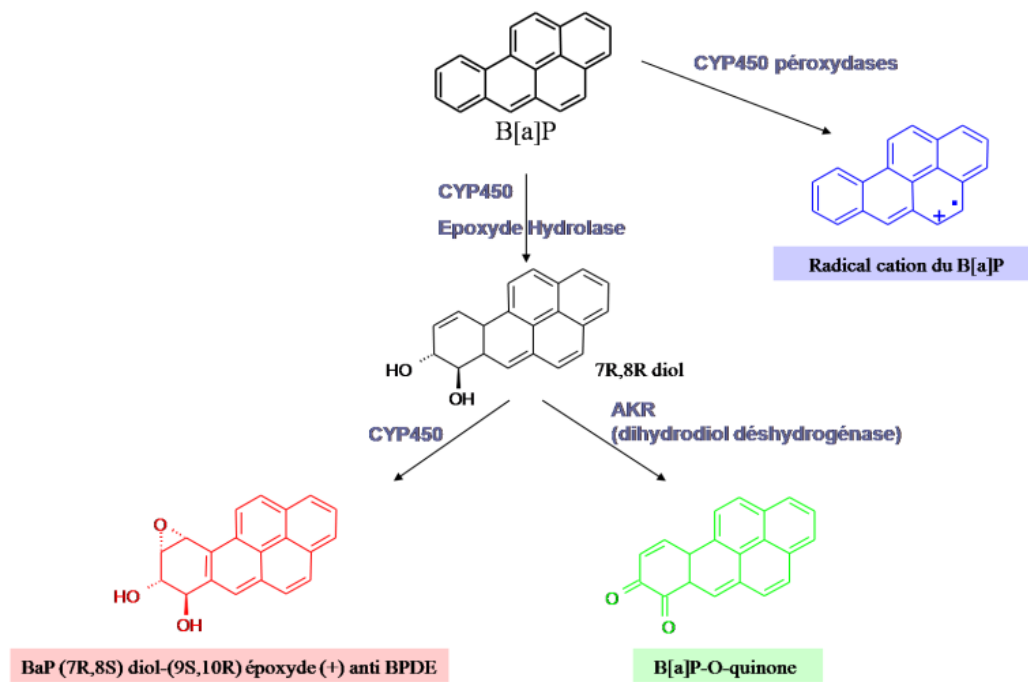
Le BaP se lie directement à l'AhR une fois lié, ce dernier se dissocie de la protéine Heat shock 90 et est rapidement transloqué dans le noyau, où il forme un complexe avec son partenaire Arnt (Ah receptor nuclear translocator) pour former l'hétérodimère 6S. Le complexe AhR/Arnt active l'expression d'une batterie de gènes contenant l'élément de réponse aux xénobiotiques dans leur région régulatrice (CYP1A1 et CYP1B1). Le BaP est activé par le métabolisme CYP1A1 en composés électrophiles. Ces derniers activent à leur tour d'autres composés qui lient et activent des éléments de réponse (AREs ou EpREs) en amont de gènes de détoxification de phase II (Fig. 2) (Shimada et al., 2006).



**Fig. 2. Schéma simplifié de l'induction des gènes CYP1a1 par le BaP.** (1) Liaison du BaP au AhR : Translocation du complexe AhR/Hsp90 dans le noyau et sa dissociation ; (2) Dimérisation du AhR avec l'Arnt ; (3) Fixation du complexe AhR/Arnt au niveau d'un élément de réponse aux xénobiotiques XRE ; (4) Transcription des gènes CYP ; (5) Translocation de l'ARNm dans le cytoplasme et traduction par les ribosomes pour donner une protéine CYP1A1 ; (6) Métabolisation d'une molécule de BaP par la protéine néo-synthétisée.

### I.1.2.2. Voies de métabolisation du benzo(a)pyrène

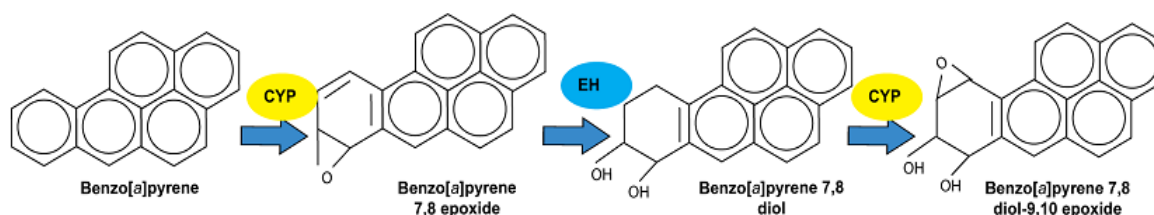
Il existe trois voies principales de métabolisation du BaP, la plus importante implique la famille des cytochromes P450 (CYP450) qui catalyse la mono-oxygénation du BaP en époxyde. La deuxième voie repose sur la formation d'un radical cationique, suite à l'oxydation à un électron du BaP, catalysée par des cytochromes P450 peroxydases (Fig. 3). Enfin, une voie mise en évidence plus récemment implique la formation d'o-quinones à partir de catéchols, elle est catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases (Xue et al., 2005).



**Fig. 3. Principales voies de métabolisation du BaP (Xue et al., 2005).** Les trois Principales voies de métabolisation du BaP par les Cytochromes P450 (CYP450) : voie du Radical cation, par le biais des CYP450 peroxydases ; voie des quinones via une dihydrodiol déshydrogénase et voie des CYP, via l'EH puis des CYP450 pour former le BPDE.

#### I.1.2.2.1. Voie des CYP

Les cytochromes P450 réalisent une mono-oxygénation du BaP en époxyde sur les carbones C7 et C8. L'hydrolyse de cet époxyde par une EH conduit à la formation d'un dihydrodiol. Ce dernier subit une nouvelle époxydation sur les carbones C9 et C10 par les CYP 450 pour donner un diol époxyde ou 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyrène 9,10-oxyde (BPDE), métabolite terminal du BaP extrêmement réactif vis-à-vis de l'ADN. Des expériences menées avec des CYP 450 recombinantes humaines montrent que le BaP et le BaP-7,8-diol sont métabolisés avec un meilleur rendement par les CYP 1A1 suivi par les CYP 1B1, puis, les CYP 1A2 (Tableau 1). La voie des CYP 450 aboutit à la formation du BPDE, métabolite ultime du BaP, qui forme des adduits avec certaines bases de l'ADN (Fig. 4) (Muñoz et Albores, 2011).



**Fig. 4. Mécanisme d'activation du BaP par le cytochrome P450 et l'époxide hydrolase (Muñoz et Albores, 2011).**

**Tableau 1. Localisation, substrats et inducteurs des différents CYP450 métabolisant des xénobiotiques (Preissner et al., 2013).**

CYP	Localisation	Substrats types	Inducteurs types
1A1	Poumons, foie, cerveau, tractus gastrointestinal, Cœur, glandes mammaires, prostate, uterus, thymus, lymphocytes...	HAP	HAP, dioxines
1A2	Foie	HAP, amines aromatiques, caféine	HAP, cigarette, naphthoflavone
1B1	Reins, uterus, glandes mammaires, ovaires, thymus, prostate, rate, colon, intestins, cerveau, hypophyse, <b>poumons</b>	HAP	Dioxines
2A6	Foie	Coumarines, stéroïdes	Barbituriques, dexamethasone
2B1/2	Cerveau	Morphine	Nicotine
2B6	Foie, cœur	Nicotine	Barbituriques
2C8	Foie, reins	Rétinoides, taxol	-
2C9/10	Foie	Tolbutamide, diclofenac	Barbituriques, rifampicine
2C19	Foie, cœur	Omeprazol, diazepam	Barbituriques, rifampicine
2D6	Foie, cerveau, cœur	Antidépresseurs, $\beta$ bloquants	-
2E1	Foie, poumons, cerveau, endothélium, cœur, moelle osseuse	Ethanol, nitrosamine, Acétaminophène	Ethanol, barbituriques
2F	Poumons	Coumarines	-

### I.1.2.2.2. Voie des quinones

La voie métabolique des quinones met en jeu des dihydrodiol déhydrogénases, enzymes appartenant à la superfamille des aldo-céto réductases. La métabolisation du BaP-diols par ces enzymes produit un catéchol qui subit deux oxydations à un électron avec la production concomitante d'espèces réactives de l'oxygène pour former des HAP o-quinones (Smithgall et al., 1988). La première oxydation produit un anion o-semiquinone et du peroxyde d'hydrogène, suivi, par une deuxième oxydation qui conduit à la formation de o-quinone et d'un anion superoxyde. En présence d'équivalents réducteurs cellulaires (Ex: NADPH), les HAP o-quinones peuvent, aussi, être réduites en catéchols entraînant des cycles rédox supplémentaires qui amplifient la production d'espèces réactives de l'oxygène  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  (Penning et al., 1996). En présence de métaux redox tels que :  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$ ,  $H_2O_2$  peut donner  $OH^-$ .

Dans l'ADN, ces espèces réactives conduisent à la génération de bases oxydées notamment au niveau de la guanine (7,8-dihydro-8-oxo-guanine). De plus,  $OH^-$  est à l'origine de cassures de brins (Penning et al., 1999). Dans les membranes, une augmentation de la peroxydation lipidique (Augmentation de la formation de malondialdéhyde) est observée. Les HAP o-quinones sont à l'origine d'une production des ROS mais peuvent également former des adduits à l'ADN (Fig. 5).

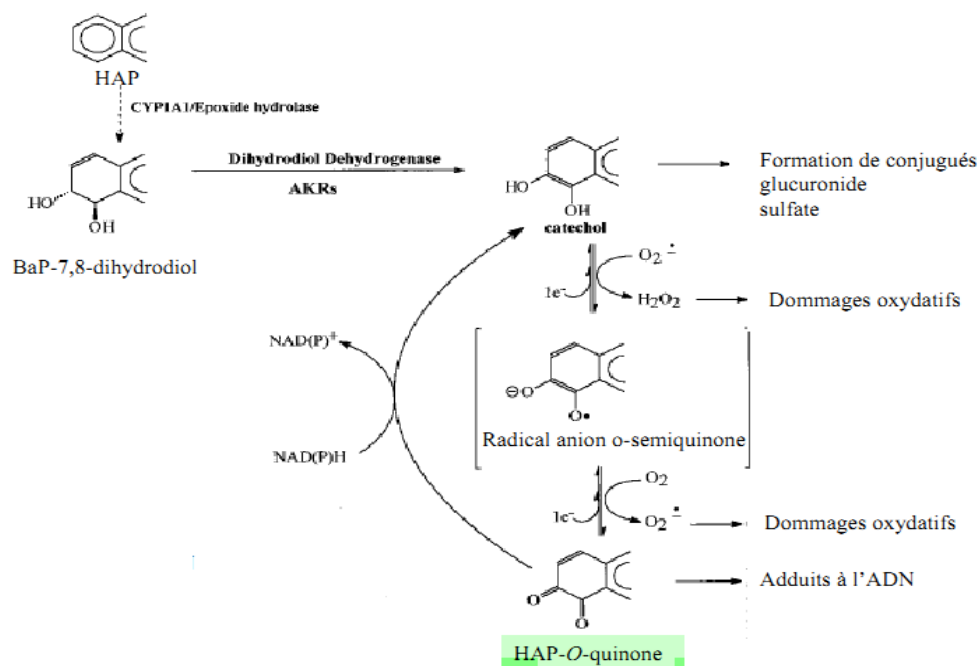


Fig. 5. Voie des quinones (Smithgall et al., 1988).

### I.1.3. Toxicité et dommages causés à l'ADN

Les dommages proviennent principalement de la formation d'adduits stables du BPDE qui restent fixés à l'ADN, à moins, d'être pris en charge par les systèmes de réparation. Ces adduits se forment en position N7 des purines produisant des sites abasiques (Cavaliere et al., 1992). De façon indirecte, des phénomènes de cycles redox donnent naissance à des ROS qui peuvent également endommager l'ADN à travers la formation de bases oxydées ou de cassures simples brins à l'ADN.

#### I.1.3.1. Adduits à l'ADN

Le BPDE se lie préférentiellement aux groupes amino exocycliques de la dGuo et dAdo de l'ADN, les adduits principaux du BPDE se forment sur les atomes N2 de la dGuo, N6 de la dAdo (Fig. 6) (Marie et al., 2008), de façon minoritaire en position N4 de la dCyd (Wolfe et al., 2004), et dans une moindre mesure sur l'atome N7 de la Gua. *In vivo*, la formation des adduits BPDE à l'ADN au niveau des différents organes dépend de la voie d'entrée du BaP. Plusieurs expériences menées sur des rats exposés au BaP par voie intra péritonéale montrent des niveaux d'adduits maximum au niveau des poumons. La demi-vie de ces adduits est estimée entre 22 jours et 25 jours pour le poumon et 9 à 13 jours pour le foie. C'est dans cet organe que l'élimination des adduits est la plus courte, suivi par la rate, les cellules mononucléaires du sang périphérique et enfin le poumon (Qu et Stacey, 1996).

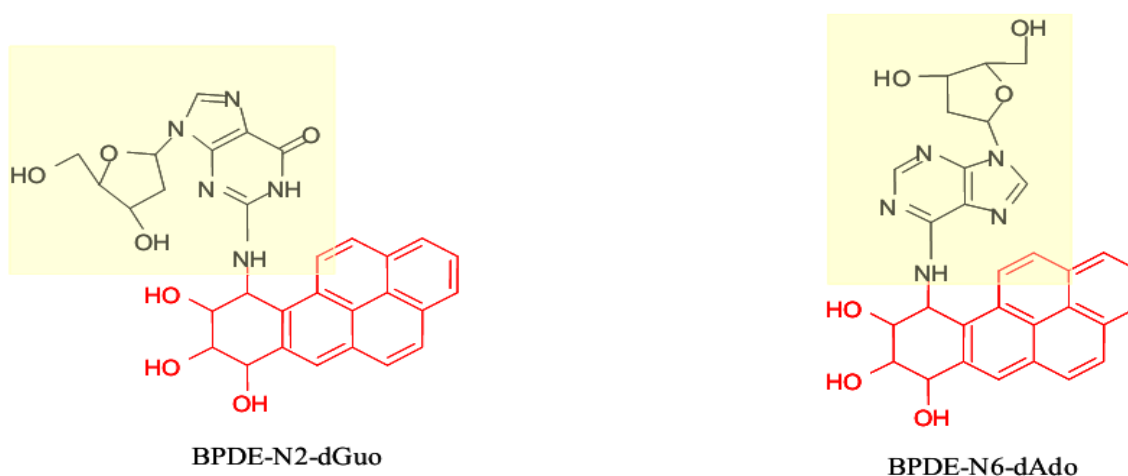


Fig. 6. Principaux adduits du BPDE (Marie et al., 2008).

### I.1.3.2. Espèces réactives de l'oxygène

Les ROS sont générées lors du cycle redox des quinones, mais, les CYP1A1 peuvent également en produire, au cours de leur activité catalytique (Baulig et al., 2003). Ces ROS entraînent des cassures simple brins, double brins, ainsi que, des modifications au niveau des purines ou pyrimidines ou du désoxyribose (Klaunig et al., 2004). Parmi elles, le radical hydroxyl ( $\text{OH}^\bullet$ ) peut attaquer la liaison entre la base et le sucre générant un site abasique ou réagir avec le 2-désoxyribose, ce qui conduit à la formation de cassures de chaînes d'ADN par arrachement d'un atome d'hydrogène. Le  $\text{OH}^\bullet$ , ainsi que d'autres ROS, sont à l'origine d'oxydation de bases, la plus fréquente survient en position 8 de la guanine, ce qui donne naissance à la 8-oxo-7,8-dihydro-2'désoxyguanosine (Fig. 7).

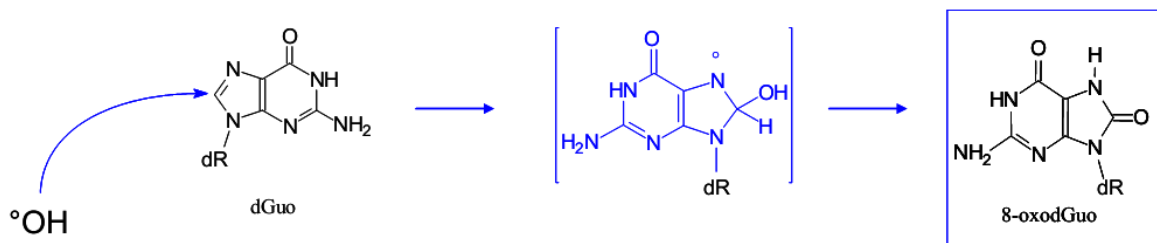


Fig. 7. Mécanisme de formation de la 8-oxodGuo (Marie et al., 2008).

Afin de prendre en charge les différents types de dommages à l'ADN susceptibles de se produire, plusieurs voies de réparation ont été mises en place par la cellule. Les réparations induites par l'exposition aux HAP (Adduits et sites abasiques) impliquent majoritairement les voies NER (Nucleotide Exision Repair) et BER (Base Exision Repair) et celle de l'apoptose. La mort cellulaire programmée est liée à une accumulation de p53 dans les cellules hepa1c1c7 et nécessite l'induction des protéines du CYP1. En plus de ces signaux pro-apoptotiques, il a été démontré que le BaP induisait également des signaux anti-apoptotiques favorisant la survie cellulaire (Solhaug et al., 2005). L'induction de ces deux voies semblerait dépendre du taux de métabolisation du BaP et du type de métabolites formés.

#### I.1.4. Mutagénèse et cancérogénèse

Les dérivés métaboliques du BaP ont une action tumorigène, car, ils sont capables d'induire des dommages de l'ADN et des mutations au niveau des gènes de contrôle du cycle cellulaire tels que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Ces dommages génotoxiques ont un rôle dans la phase d'initiation du processus de cancérogénèse. La formation d'adduits stables de l'ADN, au niveau des groupes exocycliques des bases puriques génère des mutations ponctuelles au niveau des dGuo et dAdo suite au franchissement de lésions opérées par certaines polymérases au cours de la réplication. Des mutations de nucléotides tels que des transversions GT sont détectées au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et de l'oncogène Ras (Demarini et al., 2001). En particulier, l'exposition des cellules épithéliales bronchiales avec du BPDE génère ce type de transversions dans le gène p53 au niveau des codons 157, 248 et 249 (Hussain et al., 2001). Ces codons sont également retrouvés mutés dans les cancers du poumon des fumeurs soulignant le rôle étiologique du BaP dans le cancer du poumon lié au tabagisme (Denissenko et al., 1996).

L'émission de ROS peut être à l'origine de bases oxydées dont certaines comme la 8-oxodGuo sont mutagènes. Ainsi, dans des organismes bactériens et des cellules, la présence de 8-oxodGuo se traduit par des transversions GT dans l'ADN, du fait de l'incorporation fautive de désoxyadénosine monophosphate (dAMP) en face de la 8-oxodGuo par les ADN polymérases. Ce type de mutation est retrouvé fréquemment au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Il semblerait que les ROS aient également un rôle dans la phase de promotion du cancer à travers la dérégulation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose (Franco et al., 2008 ; Mates et al., 2008).

Il faut noter qu'en plus d'avoir un rôle dans la phase d'initiation, le BaP a aussi un rôle dans la phase de promotion (Albert et al., 1991) ce qui le classe parmi les cancérogènes complets. Les mécanismes de promotion sont mal connus, mais, ils pourraient impliquer les HAP o-quinones (Penning et al., 1996) à travers la formation de ROS pouvant avoir un effet sur la prolifération des cellules initiées ou encore en entraînant la translocation et l'activation de la protéine kinase C.



## I.2. Galectines

### I.2.1. Historique et généralités

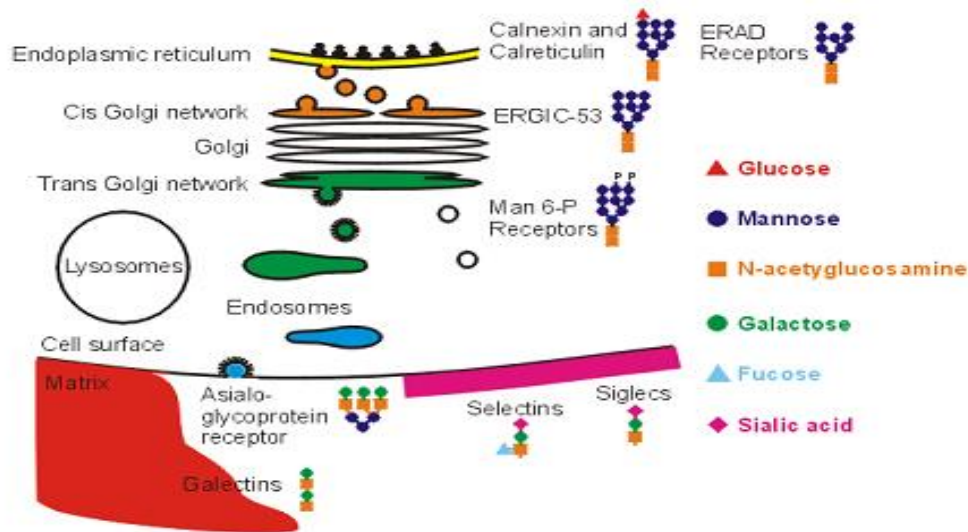
Le mot lectine dérive du verbe latin *legere* qui veut dire «sélectionner» ou «choisir», un nom bien approprié pour cette très importante classe de protéines. Les lectines ont été définies comme des protéines d'origine non-immune qui se lient spécifiquement et de façon réversible aux sucres et ne montrent aucune activité enzymatique pour ces substrats (Kocourek et Horejsi, 1981). Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (Virus, bactéries), chez les plantes, les insectes et les animaux. Elles sont aussi appelées agglutinines, car, elles sont capable d'agglutiner les cellules, tels que les érythrocytes et les glycoconjugués. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes.

Les premières lectines furent identifiées chez les plantes au début du vingtième siècle, mais, la communauté scientifique ne commença à s'intéresser à cette classe de protéines qu'à partir des années soixante, en concomitance avec la naissance de la glycobiologie. L'intérêt majeur qui pousse, aujourd'hui, la recherche sur les lectines est lié, sans doute, à leur capacité unique de «lire» l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont, en fait, les récepteurs spécifiques pour les interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clé dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire. Les lectines animales ont des rôles, particulièrement, importants dans la croissance et dans le développement des organismes supérieurs. La toute première interaction qui s'effectue pendant les processus de fertilisation est la reconnaissance entre une lectine du spermatozoïde (Spermadhesine) et un glycoconjugué, présent sur la surface des ovocytes (Topfer-Petersen et al., 1998). Les exemples qu'on pourrait citer sont très nombreux et cette grande variation de fonction pour chaque classe de lectines est bien évidente (Tableau 2).

**Tableau 2. Classification des lectines dans les organismes vivants (Cioci, 2006).** *Les lectines ont été classées en plusieurs types, selon leur origine bactérienne, virale, végétale ou animale et jouent différents rôles dont les principaux sont l'adhésion, la défense et la réponse immunitaire.*

Lectines	Roles
<b>Bactéries</b>	
<b>Lectines fimbriales</b>	Adhésion, infection
<b>Lectines solubles</b>	Adhésion, infection, formation de biofilm
<b>Toxines</b>	Adhésion, infection
<b>Virus</b>	
<b>Influenza haemagglutinine</b>	Adhésion, infection
<b>Amoeba</b>	
<b>Lectines de surface</b>	Adhésion
<b>Plantes</b>	
<b>Légumineuses</b>	Défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote
<b>Autres</b>	
<b>Animaux</b>	
<b>Calnexine</b>	Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines
<b>M-type</b>	Dégradation des protéines dans le RE
<b>L-type</b>	Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines
<b>P-type</b>	Régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose ; régulation du cycle cellulaire ; modulation des interactions cellules-cellules et cellule-subsrat.
<b>C-type</b>	Adhésion cellulaire (séléctines), clairance des glycoprotéines, réponse immunitaire (Collectines)
<b>Galectines</b>	Reconnaissance des glycannes dans la matrice extracellulaire
<b>I-type</b>	Adhésion cellulaire dans le CNS(siglecs)
<b>R-type</b>	Ciblage des enzymes, régulation du turnover des hormones

Il est intéressant de noter que la plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans les cellules et sur leur surface, surtout sous forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité: celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent, exclusivement, des oligosaccharides (Sharon et Halina, 2003). Parmi les monosaccharides le plus souvent reconnus par les lectines, on retrouve le mannose, le fucose, le galactose/GalNAc et la N-acetylglucosamine. Un concept important sur la structure moléculaire des lectines est celui du domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD), introduit pour la première fois chez les lectines animales (Drickamer, 1988). Il s'agit généralement d'une séquence peptidique invariante ou très bien conservée qui forme le domaine structural minimal nécessaire à la reconnaissance du ligand (Fig. 8).



**Fig. 8. Localisation cellulaire et spécificité des lectines animales (Cioci, 2006).**

Les lectines animales ont été regroupées en trois grandes familles ayant en commun des caractéristiques structurales : les Gals, lectines de type C et lectines de type-I (siglecs). Les siglecs reconnaissent l'acide sialique et leur CRD adopte un repliement de type immunoglobuline (Crocker, 2002). La grande famille des lectines du type C est formée par les lectines dont l'interaction sucre-protéine se fait par l'intermédiaire d'un atome de calcium (Drickamer, 1999). Enfin, la famille des Gals regroupe des lectines solubles qui reconnaissent le  $\beta$ -galactose et sont caractérisées par la présence d'un domaine très bien conservé appelé domaine de reconnaissance des carbohydrates type -S dont l'intégrité semble indispensable à l'activité de la lectine (Leffler et al., 2004).

Les Gals sont des protéines possédant un CRD qui reconnaît les résidus  $\beta$ -galactosides, il s'agit d'un motif de séquence conservée (Leffler et al., 2004). On connaît à ce jour, environ 15 Gals chez les mammifères avec un ou deux CRDs, les Gal 1, 3, 8 et 9 sont largement distribuées dans différents, types cellulaires, tandis que d'autres comme les Gal 2, 4, 7 ont une distribution plus restreinte (Hirashima et al., 2004 ; Huflejt and Leffler, 2004 ; Lahm et al., 2004). Même si les Gals sont synthétisées, typiquement, comme toutes les protéines cytosoliques, elles atteignent la surface des cellules et l'espace extracellulaire (Brewer, 2002 ; Nieminen et al., 2007) par une voie de sécrétion non classique (Baptiste et al., 2007 ; Cederfur et al., 2008).

Elles jouent, également, un rôle de régulation dans l'inflammation, l'immunité et le cancer via des effets de modulation de l'adhésion cellulaire et l'induction de l'apoptose ainsi que d'autres voies de signalisation. On suppose que ces effets sont médiés par la liaison aux glycoconjugués contenant des résidus  $\beta$ -galactosides d'où l'intérêt majeur de la spécificité de liaison de leur CRD (Almkvist and Karlsson, 2004 ; Ideo et al., 2005 ; Dumic et al., 2006 ; Rabinovich et al., 2007).

### I.2.2. Structure et classification

Les Gals ont en commun un motif de séquence hautement conservé d'environ 130 acides aminés (Gruson et Ko, 2012) organisés en deux feuillets- $\beta$  qui forment un sillon sur la partie concave. Ce dernier représente le CRD, constitué de cinq sous-sites (A-E) (Leffler et al. 2004), le sous site C est responsable de la spécificité aux résidus  $\beta$  galactosides et ayant les positions 6 et 4 libres. Les autres sous sites déterminent une spécificité variable pour les saccharides de plus grand poids moléculaire. Cependant, il existe peu de connaissances sur la façon dont cette spécificité détermine la liaison aux ligands naturels et les effets biologiques qui en découlent (Cederfur et al., 2008; Stillman et al., 2006 ; Stowell et al., 2008).

Les Gals sont divisées en trois groupes selon leur organisation structurale : le prototype qui contient un seul CRD constitué de deux homodimères liés de façon non covalente (Gal 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 et 15) ; Type répétition en tandem (tandem-repeat-type) qui contient deux CRD souvent différents (Gal 4, 6, 8, 9 et 12) ; les Gals de type chimère formé d'un seul membre (Gal 3) composé d'un domaine non lectine lié à un CRD et peut précipiter sous forme de pentamère (Fig. 9) (Gruson et Ko, 2012).

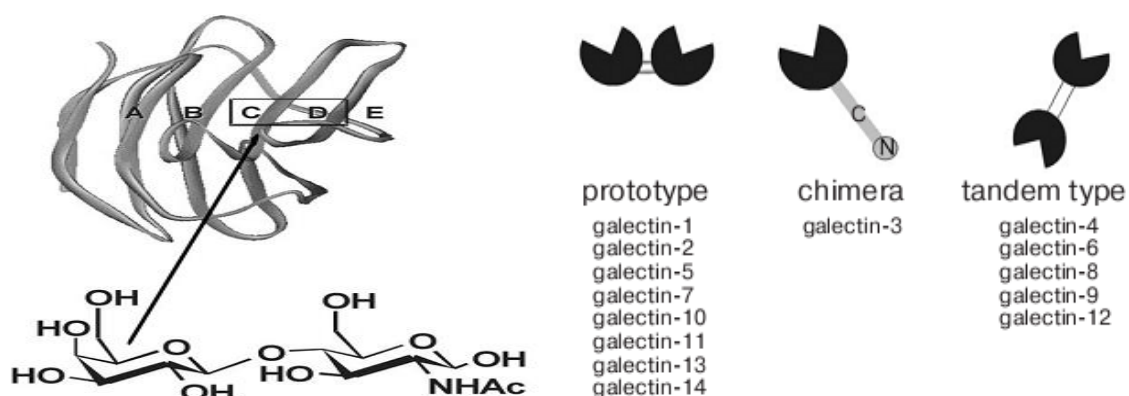


Fig. 9. Structures chimiques du CRD et des différents types de Gals (Rapoport et al., 2008).

### **I.2.2.1. Galectines de type prototypes**

La séquence des Gals de type prototypes comprend plusieurs résidus de cystéine (Cys2, Cys16, Cys42, Cys60, Cys88 et Cys130 dans la Gal 1), toutes situées au-delà du site de liaison aux glucides. Au cours de l'isolement des Gals, les groupements SH sont oxydés par la production de ponts disulfures intramoléculaires qui influent sur la configuration spatiale de la protéine, la dimérisation est due à l'interaction des régions hydrophobes des monomères situés dans la rainure, cette région est formée par des chaînes d'acides aminés Leu4, Val5, Ala6, Leu9 (Chaîne S1) et aussi par Ile128, Lys129, Val131 et Phe133 (Chaîne F1) situés, respectivement, sur les extrémités N et C terminales. Les CRDs sont situés à l'extrémité opposée du dimère. Huit résidus d'acides aminés conservés sont responsables de la liaison lectine-sucres : His44, Asn46, Arg48, Val59, Asn61, Trp68, Glu71, Arg73 (Rapoport et al., 2008).

### **I.2.2.2. Galectines de type chimère**

La Gal 3 est constituée de deux domaines fonctionnels: un domaine régulateur N terminal (100-150 acides aminés) qui contient des séquences de collagène répétées et possède une grande mobilité et un domaine CRD C terminal de 135 acides aminés. Le CRD de la Gal 3 humaine est constitué de 118-250 acides aminés, organisés en Cinq (F1-F5) et six (S1-S6) plis  $\beta$  emballés en un feuillet  $\beta$ -sandwich. Le CRD est formé par les chaînes S4-S6 et forme un sillon à deux extrémités ouvertes ; Le résidu de galactose du LacNAc est profondément immergé dans le sillon de liaison du CRD. Le groupement OH en position 4 du galactose joue un rôle clé dans la liaison en formant des liaisons hydrogène avec His158, Asn160, and Arg162 (Seetharaman et al., 1998).

### **I.2.2.3. Galectines de type en tandem**

Les Gals type en tandem possèdent deux CRDs, localisés près des parties N et C terminales de la protéine et séparés par un petit (25-35 acides aminés) peptide 'linker' riche en proline et glycine. L'organisation spatiale du N-CRD de la Gal 9 a été réalisée par cristallographie en rayons X, il est similaire à celle des Gals prototypes et de type chimère,

cependant, la partie C du CRD n'a pas pu être cristallisée en raison de sa faible solubilité (Nagae et al., 2006).

### **I.2.3. Localisation**

Les membres de la famille des Gals sont retrouvés à l'intérieur des cellules (cytoplasme et noyau) et à la surface de la membrane (Liu, 2005). Les Gal 1 et Gal 3 ont été les premières isolées à partir des tissus de mammifères (Leffler et al., 2004), les Gal 1, 4, 6, et 9 sont exprimés dans les épithéliums, les endothéliums et les cellules immunitaires, les Gal 5, 10, 14 sont détectés dans différentes populations cellulaires (Chiariotti et al., 2004).

Les Gals ne possèdent pas de séquences signal et sont secrétées à travers une voie atypique, qui échappe au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi. Elles sont exportées en dehors des cellules, grâce à, des vésicules (Exosomes) produites par invagination d'une partie la membrane où s'accumulent les Gals. Certains facteurs souvent associés au stress comme l'inflammation et la transformation maligne, induisent la destruction de ces vésicules et la libération de ces protéines dans l'espace intercellulaire (Nickel, 2003). Le mécanisme de transfère des Gals vers la membrane cellulaire et la destruction conséquente des vésicules reste méconnue, cependant, les HSP «Heat shock proteins», les calciums ionophores et les monensines semblent être impliqués dans ce transfert des Gals vers la surface membranaire. Les Gals présentant une mutation ponctuelle sont incapables de se lier aux saccharides et ne sont pas transférés à la membrane, ni secrétées dans l'espace intercellulaire. Les glycolipides et glycoprotéines de la membrane agissent donc comme des chimio-attractants des Gals (Delacour et al., 2005 ; Seelenmeyer et al., 2005) qui se lient à différents antigènes et récepteurs de surface (Integrines, laminine, fibronectine, CD45, CD43, CD7, membrane cellulaire, glycoprotéines et glycolipides, glycosphingolipides ou onco-antigènes) de manière dépendante des hydrates de carbones. Elles sont, de ce fait, impliquées dans les interactions protéine-protéine et ont pour récepteurs cellulaires: H-Ras, K-Ras, Bcl-2, les cyclines, les facteurs de transcription et les cytokeratines. Ainsi, elles jouent un rôle extracellulaire de modulateur de l'adhésion et de la signalisation cellulaire (Chiariotti et al., 2004).

La majorité des Gals sont localisées sur des chromosomes dont la structure des gènes qui les codent est déjà établie. Dans certains cas les éléments régulateurs sont représentés par

les sites de liaison aux facteurs de transcription (Sp1, NFκB, p53, retinoic acid, cAMP), requis pour l'expression des gènes codant les Gals. Certains auteurs suggèrent que le degré de méthylation des sites CpG de l'ADN soit important dans la régulation de l'expression de ces gènes (Cooper, 2002; Chiariotti et al., 2004).

Les membres de la famille des Gals sont exprimés dans différents types cellulaires et tissulaires (Tableau 3), par exemple, la Gal 1 est identifiée dans les muscles squelettiques, les neurones, les reins et le placenta. La Gal 3 est exprimée dans les macrophages activés, les mastocytes, l'épithélium gastrointestinal, les voies respiratoires et les reins. La Gal 8 est détectée dans les poumons, le foie, le cœur et le cerveau, alors que la Gal 9 est spécifique du foie, des poumons, du cœur et de l'intestin grêle (Chiariotti et al., 2004)

**Tableau 3. Expression des Gals à la surface cellulaire des différents tissus et organes (Rapoport et al., 2008).** *Les 14 Gals sont réparties dans différents types cellulaires et tissulaires, parfois communs à plusieurs Gals. De même que certaines d'entre elles partagent le même poids moléculaire.*

Galectine	Poids moléculaire	Cellules, tissus et organes
1	14-15	Squelette, muscles, cœur, neurones, placenta, reins, poumons, macrophages, tissu lymphoïde
2	14	Tractus gastrointestinal
3	27-36	Macrophages activée, granulocytes, mastocytes, épithélium des voies respiratoires, neurones, reins
4	36	Epithélium de la cavité orale et tractus gastrointestinal
5	17	Réticulocytes, érythrocytes de rats
6	33	Epithélium intestinal
7	15	Kératinocytes
8	34	Foie, poumons, reins, cœur, cerveau
9	36	Thymus, reins, muscles, foie, intestin grêle, poumons
10	16,5	Eosinophiles, basophiles
11	14	Lentille oculaire
12	35	Adipocytes
13	16	Placenta
14	18	Eosinophiles

#### **I.2.4. Fonctions physiologiques des galectines**

À l'heure actuelle, il n'existe pas de preuves directes expliquant la liaison des Gals *in vivo*. Mais les études sur protéines recombinantes ou à des cellules qui expriment les Gals suggèrent que certaines molécules peuvent être des récepteurs naturels des Gals. (Ici, le terme «récepteur» fait référence à toute biomolécule capable de se lier à une Gal, à l'intérieur ou à l'extérieur de la surface de la cellule en présence ou en absence de CRD, le terme "ligand" se réfère à un glycan capable de se lier au CRD de la Gal). Les Gals sont situées dans le cytoplasme mais sont également trouvées sur la surface cellulaire si la cellule est sous une contrainte, comme l'inflammation ou transformation oncogénique (Fig. 10). Les Gals interagissent avec les intégrines, les protéines et les glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire (Liu, 2005). Les chaînes glucidiques des glycoprotéines et des glycolipides des cellules immunitaires, épithéliales et endothéliales agissent comme des ligands pour les Gals. A l'intérieur de la cellule, les Gals sont impliquées dans les interactions protéine-protéine. La liaison à l'intérieur de la cellule avec des chaînes glucidiques de Gal-protéines est méconnu, bien que nous savons que certaines protéines telles que les protéines du choc thermique et les cytokératines soient glycosylées (Rapoport et al., 2008).

##### **I.2.4.1. Galectines intracellulaires**

Certaines études par co-immunoprécipitation avec des protéines nucléaires ou cytoplasmiques ont révélé des récepteurs intracellulaires de la Gal 1 et de la Gal 3, bien que les protéines de la famille des Ras et Bcl ne soient pas glycosylées, les CRD de la Gal-1 et le domaine N domaine régulateur de la Gal 3 sont impliqués dans cette interaction (Elola et al., 2005 ; Wang et al., 2006). Les Gals intracellulaires sont impliquées dans de nombreuses activités cellulaires, tels que l'épissage des ARNm, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose.

###### **I.2.4.1.1. Epissage des ARNm**

Comme composants de l'épissosome, les Gals interagissent avec les petits ARN nucléaires et la protéine Gemin4 et sont impliquées dans l'épissage du pré-ARNm. Certaines données indiquent le rôle de la Gal 3 dans la régulation de la transcription des gènes en se liant aux facteurs de transcription Sp1 et CREB (Dumic et al., 2006).



### I.2.4.1.2. Régulation du cycle cellulaire

Les Gals régulent le cycle cellulaire par la liaison avec des protéines de signalisation qui induisent ou inhibent l'apoptose. Ainsi, les Gal 1 et 3 se lient directement avec la protéine Ras qui est normalement impliquée dans la transmission de signaux mitogènes. Cette interaction conduit à la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. L'augmentation de l'expression (ou la mutation de ces protéines) a été détectée dans de nombreuses tumeurs (McGeady et al, 1995). Les Gals sont censées interagir avec la forme associée à la membrane à la Ras-activée, en raison de la production d'un pont disulfure entre les résidus cystéine de la Gal et l'oncoprotéine. La liaison des Gal 1 et 3 avec Ras-activée entraîne la stimulation des effecteurs de Ras-sérine-thréonine kinase Raf et phosphoinositol-3 kinase P13K.

Enfin, il a été démontré que les Gals régulent le cycle cellulaire à travers l'activation des protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK). Le mécanisme de cette régulation n'est pas connu en détails, mais, la co-précipitation *in vitro* des Gals avec des CDK du lysat cellulaire a été démontrée. De plus, les Gal 3 et 12 inhibent l'activité des cyclines E, A, D1 et provoquent l'arrêt de cycle cellulaire en phase G1 (Kim et al., 1999 ; Yang et al., 2001).

### I.2.4.1.3. Rôle dans l'apoptose

La Gal 3 peut agir à la fois comme inducteur et inhibiteur de l'apoptose. D'une part, elle se lie à la protéine Ras, ce qui active l'apoptose et d'autre part, la protéine mitochondriale Bcl-2, un suppresseur de l'apoptose, est un récepteur de Gal 3. Cette liaison est due également en raison de la présence de la séquence Asn-Trp-Gly-Arg dans son domaine BH1, et cette séquence est située dans le domaine de la régulation de la Gal 3 : la substitution de l'alanine par la glycine dans ce domaine abolit l'activité anti-apoptotique de la lectine. Bien que la protéine Bcl-2 ne soit pas glycosylée, elle peut inhiber sa liaison au lactose, cela explique l'emplacement de l'Asn-Trp-Gly-Arg à proximité du CRD de la Gal 3 (Akahani et al, 1997). Les Gal 1 et 7 sont des régulateurs positifs de l'apoptose. Le mécanisme d'activation de l'apoptose est peu clair, mais, dans l'induction *in vitro* de l'apoptose des cellules tumorales, la Gal 7 semble être associée à l'activation de la caspase-8 (Kuwabara et al., 2001).

Les informations sur les récepteurs des Gals intracellulaires sont très limitées. Seules les Gal 1 et 3 peuvent interagir directement avec les récepteurs. Il reste possible que la

fonction principale des Gals cytoplasmique soit l'interaction avec les protéines impliquées dans le transport et l'expression de ces dernières sur la surface cellulaire où les Gals fonctionnent sous forme de protéines de liaison aux glucides (Shalom-Feuerstein et al., 2005).

#### **I.2.4.2. Galectines extracellulaires**

Contrairement à ce qui a été précédemment décrit concernant les Gals intracellulaires, les Gals de la surface cellulaire sont impliquées dans l'interaction protéines-carbohydrates (Liu, 2005). Sur la surface cellulaire, ces Gals sont impliquées dans l'adhésion, l'apoptose, la prolifération cellulaire et dans la régulation du système immunitaire au cours de l'inflammation et la transformation oncogénique.

##### **I.2.4.2.1. Adhésion cellulaire**

Les Gals médient l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire en se liant à des chaînes de polylactosamine des glycoprotéines. A la surface cellulaire, les récepteur des Gals représentent les protéines de la matrice intracellulaire (La laminine, fibronectine, vibronectine et thrombospondine), l'actine, les intégrines, les protéines des membranes lysosomales LAMP 1 et 2 ainsi que, les gangliosides et d'autres glycosphingolipides. La Gal-1 par exemple se lie aux glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire (Moiseeva et al., 2003). Ces interactions entraînent une cascade de réactions de signalisation, qui contrôlent la prolifération cellulaire et l'apoptose. En effet, la Gal 8 interagit avec les intégrines et entraîne l'activation de la Tyrosine kinase FAK (Focal adhesion kinase) qui joue un rôle clé dans les signaux médiés par les intégrines.

##### **I.2.4.2.2. Défense immunitaire**

Récemment, il a été démontré que les Gals et leurs ligands étaient des régulateurs importants de l'homéostasie de la cellule immunitaire. Certaines telles que Gal 3 agissent comme des amplificateurs de la cascade inflammatoire, alors que d'autres comme la Gal 1, au contraire, bloquent les fonctions effectrices des lymphocytes T, en déclenchant des signaux d'homéostasie (Rabinovic et al., 2002). La Gal 1 se lie donc, aux N-glycanes des protéines CD 45, CD43, CD47 de la surface des cellules T activées, ce qui résulte en l'isolement de ces dernières et le déclenchement de l'apoptose (Hernandez et al., 2006). La Gal 3 interagit avec

les glycoprotéines CD29, CD7 et CD95 et initie l'apoptose par la formation du complexe CD29/CD7. La Gal-2 active l'apoptose des lymphocytes T par interaction avec les chaînes de polygalactosamine de l'intégrine B1.

Les Gals participent au processus de phagocytose, médié par les lectines, c'est le cas de la Gal 3 du macrophage qui se lie au fragment N-Glycane LacdiNac des cellules des helminthes et augmente leur phagocytose par les macrophages. La Gal 1 se lie aux composants du complément C3 et augmente l'exposition de la phosphatidylserine de la membrane de la cellule tumorale sans provoquer l'apoptose, ces cellules sont alors rapidement éliminées par les macrophages péritonéaux.

Les Gal 3 et 9 agissent comme chimioattractants des neutrophiles et des éosinophiles, respectivement, et ont pour récepteurs les glycoprotéines CD66a et CD66b des neutrophiles et les molécules d'adhésion CD69 et VLA-4. Par ailleurs, certaines données affirment que ces Gals se lient aux chaînes d'oligolactosamine des N-glycanes (Dumic et al., 2006). Le cross linking par les Gals des ligands des carbohydrates provoque leur agrégation et la formation d'amas glucidiques, c'est le cas des amas d'antigènes CD45, CD7 et CD43 résultants de la liaison de leur partie glycanne avec la Gal 1 (Hernandez et al., 2006). La Gal 3 a la capacité de former des complexes protéiques avec des récepteurs intra- et extra-cellulaire et cela par liaison du domaine N-régulateur avec les protéines cytoplasmiques, d'une part et d'autre part, par liaison du CRD aux glycanes cellulaires. Cette liaison permettrait le transport de la Gal 3 de la surface de la membrane nucléaire à la membrane cytoplasmique.

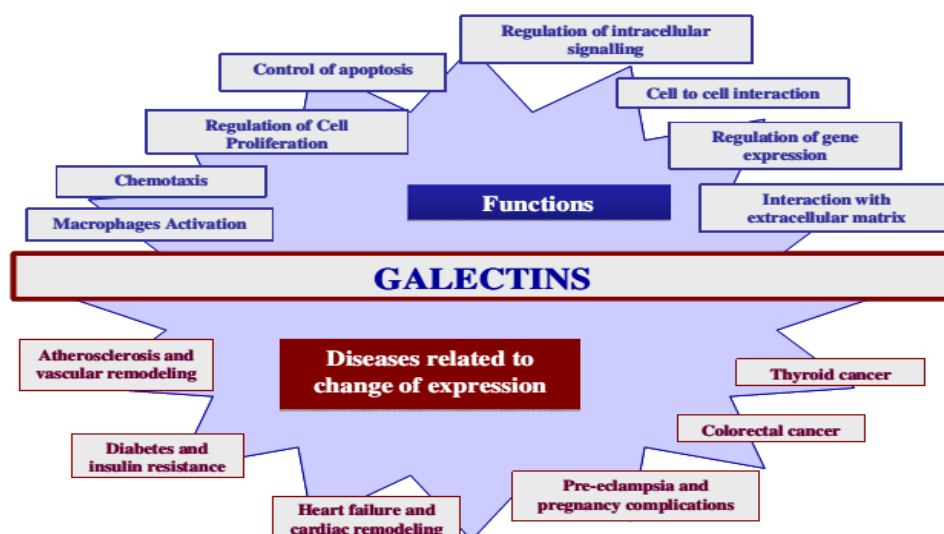


Fig. 10. Fonctions et pathologies reliées aux changements d'expressions des Gals (Gruson et Ko, 2012).

### **I.2.5. Galectines et processus pathologiques**

Les Gals ont suscité d'une part un grand intérêt pour leur rôle dans la physiopathologie de plusieurs maladies et cancers, d'une part, et peuvent représenter, d'autre part, des biomarqueurs pertinents pour le diagnostic et le pronostic de plusieurs troubles. Les Gals sont impliquées dans de multiples fonctions cellulaires et biologiques liées à la physiopathologie de plusieurs maladies. La disponibilité des tests des Gals a généré un grand intérêt pour le diagnostic et la stratification des risques pour ces maladies avec l'identification des patients présentant un risque accru, d'une issue défavorable ou de décès à long terme. Les tests de Gals devraient soutenir le traitement guidé par biomarqueurs et pourront être intégrés dans les stratégies multimarqueurs combinant des biomarqueurs de la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique et les données cliniques devraient également être pris en considération pour l'approche de soins personnalisés. Par conséquent, beaucoup de promesses sont liées à l'émergence des Gals, plusieurs défis sont encore à l'essai, mais, ceci ouvrent la voie devant une traduction potentielle des pratiques cliniques quotidiennes (Gruson et Ko, 2012).

#### **I.2.5.1. Galectines et maladies cardiovasculaires**

Les maladies cardiovasculaires demeurent l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde et il est encore nécessaire de développer de nouveaux biomarqueurs pour prédire les résultats négatifs et de nouvelles stratégies thérapeutiques pour réduire le fardeau de ces maladies. En effet, Gal 1 est impliquée dans l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, et une partie caractéristique du développement de l'athérosclérose. La Gal 3, est sécrétée par les macrophages activés et pourrait agir sur les cellules endothéliales pour induire la chimiotaxie. Ainsi, ces cellules peuvent sécréter la Gal 3, un chimioattractant puissant pour les monocytes et les macrophages, qui permet d'améliorer le recrutement de ces cellules dans la paroi artérielle. De plus, il a été démontré que la migration des monocytes induite par la Gal 3 était inhibée par des anticorps monoclonaux spécifiques et bloquée par le lactose et un fragment du domaine C-terminal de la protéine (Revkin et al., 2007).

Le diabète est associé à un risque plus élevé de développer des complications cardiovasculaires et microangiopathies; étant une maladie hétérogène et multifactorielle. Sa

physiopathologie est associée à une altération des niveaux de plusieurs protéines plasmatiques rendant les biomarqueurs circulants de plus en plus utiles pour les patients. Les Gals pourraient donc être contestée en tant que biomarqueurs de risque, et même fournir de nouvelles cibles thérapeutiques, étant donné, qu'ils ont été associés à la physiopathologie du diabète et de la sécrétion de l'insuline. En effet, chez le modèle animal, la Gal 1 a été signalé pour réguler négativement la réponse des lymphocytes T qui détruisent les cellules bêta pancréatiques. En outre, l'administration de Gal 1 est capable d'inverser l'auto-immunité des cellules bêta et l'hyperglycémie chez les souris diabétiques non obèses et atteint de diabète de type 1. Par ailleurs, une étude a rapporté que la perturbation ciblée du gène Gal 3 entraîne une diminution de la sensibilité au diabète chez les souris. De plus, son expression élevée au cours du diabète de type 2 est concomitante avec l'élévation de la protéine récréative (CRP) et négativement corrélée avec l'hémoglobine glyquée. Enfin, la réponse au traitement est associée à une diminution de la concentration de la Gal 3 circulante (Perone et al., 2009).

La Gal 3 est augmenté dans l'insuffisance cardiaque, le même groupe a montré que la perfusion avec Gal 3 dans le sac péricardique de rats en bonne santé a entraîné une dysfonction ventriculaire gauche associée à un trouble cardiaque, la prolifération des fibroblastes, l'augmentation de l'expression et de l'augmentation de la cycline D1 et du rapport collagène I/collagène III. Plusieurs voies intracellulaires sont impliquées dans ces effets cardiaques de Gal 3 tels que Akt, NADPH oxydase, ERK, PI3k, conduisant à une régulation de l'expression génique profibrotique et la modulation de l'activité de plusieurs métalloprotéases. Les niveaux circulants de Gal 3 ont, également, été liés à la survie dans le cas de l'insuffisance cardiaque (Gruson et Ko, 2012).

### **I.2.5.2. Galectines et cancers**

Les Gals sont également apparues comme des modulateurs importants de la progression du cancer en contribuant dans la transformation néoplasique, la survie des cellules cancéreuses, l'angiogenèse et les métastases tumorales. En effet, ces protéines peuvent moduler les réponses immunitaires et inflammatoires liées aux macrophages associés au cancer, une caractéristique de la néo vascularisation du cancer (Liu et Rabinovitch, 2005). L'expression ou la surexpression des Gals dans les cancers et/ou le tissu qui les entoure doit être considéré comme un signe de progression et de diffusion de la tumeur maligne. Il est également intéressant de noter que les Gal 1 et 8, et particulièrement la Gal 3, sont associées à

des voies intracellulaires qui favorisent le développement et la progression du cancer (Camby et al., 2006).

En effet, la Gal 3 joue un rôle essentiel dans la cancérogenèse du colon à travers l'accumulation de la  $\beta$  catenine nucléaire et la régulation de la  $\beta$  glycogène synthase kinase dans les cellules cancéreuses humaines du colon. Quatre Gals (Gal 1, 3, 4 et 8) sont exprimées dans le rectum, le colon humain, toutefois, la Gal 1 et 3 participent dans la promotion de l'adhésion cellulaire, la prolifération endothéliale, la croissance cellulaire et l'angiogénèse tumorale. La Gal 1 est faiblement exprimée dans l'épithélium du colon normal mais est surexprimée dans l'inflammation et le cancer en corrélation avec une augmentation des métastases de cancer colorectal (Hittelet et al., 2003). L'expression de la Gal 3 au cours de ce cancer est variable selon les stades, elle est plus élevée dans les stades avancés et métastatiques comparativement aux tumeurs primaires. Aussi une étude a reporté qu'une expression diminuée de la Gal 3 avant l'inoculation de tumeur cellulaire chez la souris est associée à la réduction de la colonisation et la formation de métastases dans le foie. Par ailleurs, des valeurs élevées des Gal 4 et Gal 8 sériques ont été reportés au cours des cancers colorectaux (Gruson et Ko, 2012).

Plusieurs éléments de preuve suggèrent un rôle pour la Gal 3 dans la lutte contre la prolifération et la progression tumorale dans le cancer de la thyroïde. La Gal 3 s'est révélée, significativement, surexprimée dans le compartiment nucléaire du carcinome papillaire thyroïdien humain à prolifération rapide. Dans le noyau, Gal 3 peut agir comme un régulateur de l'activité transcriptionnelle du facteur 1 de transcription thyroïdien et contribue, ainsi, à l'état hautement prolifératif de ces cellules. L'activité stimulante jouée par Gal 3 par rapport à TTF-1 représenterait un potentiel moléculaire possible dans le mécanisme par lequel la Gal contrôle la prolifération cellulaire. Aussi, l'activité antiapoptotique liée à la fonction Gal 3 peut être partiellement inversée par l'inhibition de la voie PI3K-Akt, suggérant, que Gal 3 agit en partie sur l'axe PI3K-Akt (Gruson et Ko, 2012).

Le niveau de preuve pour un rôle des Gals dans la physiopathologie du cancer du sein augmente également, les Gals peuvent permettre l'identification des glycoformes spécifiques du cancer du sein qui peuvent non seulement contribuer à une meilleure compréhension de la pathologie, mais, fournir de nouveaux biomarqueurs pour ce cancer (Carlsson et al., 2011). Des travaux récents ont suggéré un rôle pour l'interaction entre les Gals et les glycoprotéines dans la progression du cancer du sein. Récemment, une étude d'affinité de liaison a révélé que

Gal 1 permet la détection d'un nouveau type de biomarqueur fonctionnel pour le cancer, un type spécifique de glycoforme de l'haptoglobine. Carlsson et al. (2012) ont évalué les différentes fractions de glycoprotéines sériques humaines liées aux Gal 1 et 8, en fonction de leurs ratios du cancer du sein et de la maladie inflammatoire métastatique. Ils ont montré que dans le sérum de patients atteints de cancer, le niveau des glycoprotéines liées à Gal 1 étaient plus élevées alors que celui des glycoprotéines liées à Gal 8 était plus bas comparativement aux volontaires sains et à d'autres troubles inflammatoires. Par conséquent, le rapport des glycoprotéines liées à Gal 1/Gal 8 lié pourrait représenter un outil plus discriminatoire.

Enfin, des tests de Gals chez des patients atteints de cancer de la tête et du cou peuvent également contribuer à surveiller le traitement efficace et à sélectionner des approches thérapeutiques personnalisées. Saussez et al. (2008) ont examiné le niveau d'expression de Gal 3 en utilisant une immunohistochimie quantitative dans les carcinomes épidermoïdes hypopharyngés en comparaison avec les épithéliums normaux. Leurs résultats ont montré que Gal 3 était surexprimé dans le cancer de la tête et du cou et corrélée à la progression du cancer. Le même groupe a également comparé les niveaux sériques des Gal 1, 3 et 7 dans des cas de carcinomes à cellules squameuses, à ceux, des volontaires sains. La Gal 7 n'était pas détecté dans le sérum de patients atteints de cancer et d'individus en bonne santé, en revanche, les niveaux sériques des Gal 1 et 3 ont pu discriminer les patients atteints de cancer. La mesure des niveaux circulants de la Gal 1 et 3 pourrait donc être utilisée pour surveiller la progression de leur maladie ou leur réponse au traitement.

### I.3. Substances bioactives d'origines végétale

Les progrès de la recherche scientifique font régulièrement émerger, dans le grand public, de nouvelles connaissances sur les bienfaits ou les inconvénients supposés de tel ou tel aliment ou nutriment, quand ils ne leur prêtent pas d'authentiques propriétés curatives. Au premier rang des effets bénéfiques que l'on peut attendre d'une alimentation appropriée figure désormais la lutte contre le vieillissement cellulaire. Un phénomène lié notamment à l'action délétère des RL -dérivés très agressifs- sur les membranes de nos cellules constituées de phospholipides, qui est heureusement contrarié ou du moins atténué par tous les composés de notre alimentation aux propriétés dites antioxydantes. Raison pour laquelle les chercheurs mettent de plus en plus à l'honneur des molécules telles que les polyphénols (PPs) qui sont de puissants antioxydants (Betti-Cusso, 2013).

Les scientifiques ont notamment découvert les bienfaits du resvératrol, des curcuminoïdes et de la quercétine. Ces PPs suscitent un intérêt grandissant depuis que les recherches ont montré qu'ils avaient une activité antioxydante, anti-inflammatoire, mais aussi une action préventive contre le cancer et les maladies neurodégénératives ainsi qu'un effet sur la longévité, parce qu'ils activent des enzymes dites sirtuines. Celles-ci protègent les cellules en réparant leur ADN. Alors que les études sur le sujet foisonnent, les Américains ont récemment établi un indice dit oxygen radical absorbance capacity (Orac) qui mesure et classe les aliments en fonction de ce pouvoir de piéger les radicaux libres oxygénés. Les baies rouges, les myrtilles, les framboises, les fraises, les pommes, les tomates cuites ou crues y occupent une place de choix, mais aussi les épinards, les aubergines, le chou rouge cru, le chou vert, le brocoli ou encore la cannelle, le clou de girofle, le curcuma, le gingembre et le thym. Un régime alimentaire tout venant apporte au maximum 2000 unités Orac par jour (Betti-Cusso, 2013). On considère qu'il est souhaitable qu'il procure chaque jour entre 3000 et 5000 unités Orac, réparties dans la journée, pour prévenir l'effet du stress oxydant dans l'organisme. C'est d'autant plus indispensable si l'on est soumis à un stress oxydant important, du fait de la pollution, du tabagisme, des médicaments, du surmenage. La prévention des grandes pathologies (Maladies cardio-vasculaires, cancers, diabète, rhumatismes, maladies inflammatoire) passe donc aussi par le fait de privilégier certains aliments, car contenant ce type de composés biologiques aux diverses propriétés, dits: «substances bioactives» (Zhong et Shahidi, 2015).



### I.3.1. Polyphénols

Le terme «polyphénol» date des années 1980 où il a remplacé le terme «tanin végétal». Les PPs sont des molécules caractérisées par la présence de nombreux groupes phénoliques arrangés en des structures complexes. En effet, tous ont en commun la présence de plusieurs noyaux benzéniques comportant des fonctions hydroxyle qui peuvent se présenter sous la forme de molécules simples (Hydroquinone, AG) de polymères à haut poids moléculaire (Tanins). Au nombre de plus de 500, ils appartiennent à plusieurs familles classées, selon leur structure (Nombre de cycles aromatiques et groupements fonctionnels), en quatre classes : flavonoïdes, acides phénoliques, lignanes et stilbenes (Fig. 11) (Tangney et Rasmussen, 2013).

Les PPs représentent un nombre important de composés présents chez les végétaux, notamment dans les fruits et les légumes dont ils représentent les métabolites secondaires qui jouent un rôle de défense contre les rayons ultraviolets et les agressions de pathogènes. Ces micronutriments possèdent de nombreuses propriétés dont l'activité antioxydante est la plus importante pour contrer les ROS. Il a été démontré, il y a une trentaine d'années que le vin rouge a un potentiel antioxydant plus important que la vitamine E, ce pouvoir a été mis en évidence avec le resvératrol– leur abondance dans notre alimentation permet leur rôle dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif comme les cancers et maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. De ce fait, les chimistes analytiques, les épidémiologistes et les nutritionnistes en santé humaine ont embarqué dans un tourbillon scientifico-médiatique après avoir démontré une diminution de 50% des risques de ces maladies dans le cas d'un régime alimentaire riche en PPs, cependant, ces effets dépendent de la quantité consommée et de leur biodisponibilité (Manach et al., 2004).

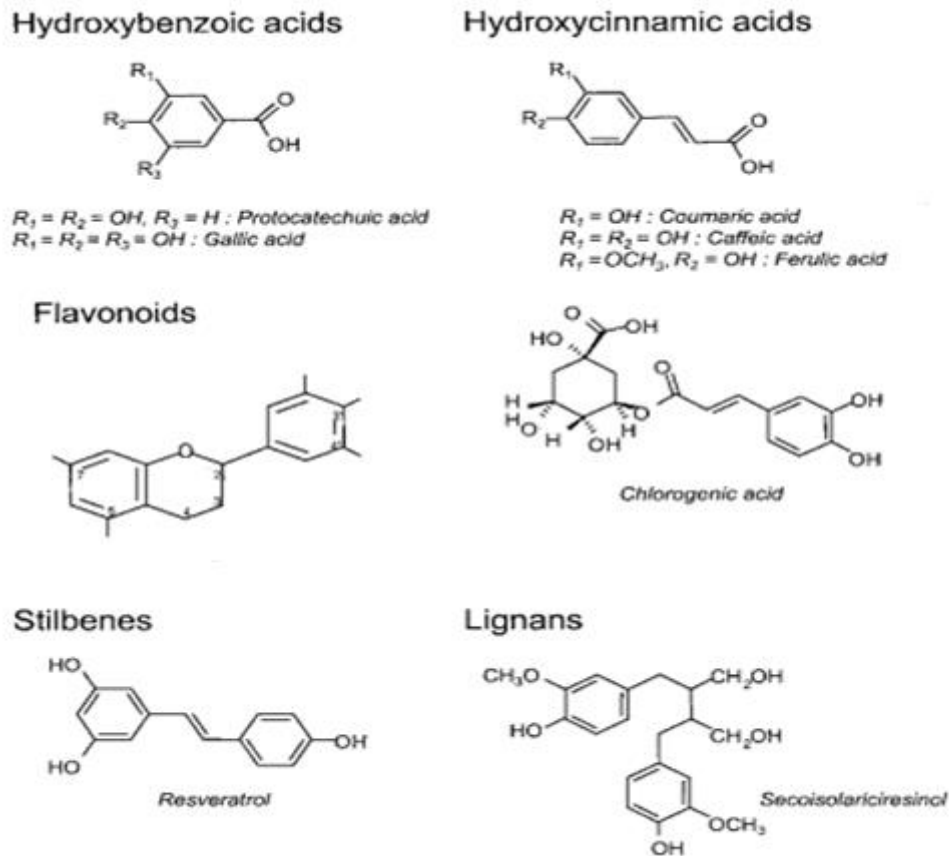


Fig. 11. Structures chimique des PPs (Manach et al., 2004).

### I.3.1.1. Acides phénoliques

Nous pouvons distinguer deux classes d'acides phénoliques : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. L'acide hydroxybenzoïque par exemple est présent en faible quantité chez les plantes sauf dans les fruits rouges et les oignons. Par contre, l'AG est présent en forte quantité dans les feuilles de thé. Les acides hydroxybenzoïques peuvent former des structures complexes sous forme de tannins hydrolysables, comme les gallotannins qu'on retrouve dans les mangues et les ellagitannins retrouvés dans les fruits rouges (Fraises, framboises et mures), cependant, leur présence dans l'alimentation humaine demeure limitée, ceci explique le nombre limité des études portant sur leur intérêt nutritionnel. Les acides hydroxycinnamiques sont donc plus communs que les acides hydroxybenzoïques et sont représentés principalement par l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide ferulique et l'acide sinapique. Ils sont rarement retrouvés sous forme libre mais plutôt sous forme de dérivés glycosilés ou d'esters de l'acide shikimique ou

tartarique. Ils sont présents dans toutes les parties des fruits mais en plus grande proportion sur la partie externe du fruit mur (Tomas-Barberan et Clifford, 2000).

### **I.3.1.2. Flavonoïdes**

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus omniprésents dans les aliments et dont les plus connus sont la quercétine et le kaempferol. Ils sont retrouvés dans les oignons, le poireau, le brocoli, les myrtilles ainsi que dans le vin rouge et le thé, dont ils s'accumulent dans la partie externe et aérienne (peau et feuilles) étant donné que leur biosynthèse est stimulée par la lumière. Ils sont présents sous forme glycosilée, le plus souvent attachés à du glucose ou du rhamnose (Manach et al., 2004).

Les flavones sont moins communs dans les fruits et les légumes, leur principale source est le céleri et le persil. Ils sont représentés principalement par les glycosides de luteoline et de l'apigénine. Il existe aussi des flavones polyméthoxylés tel que : la tangerétine, la nobiletine et la sinensétine (Plus de 6,5 g/L dans l'huile essentielle de mandarine) (Shahidi et Naczki, 1995) ce sont les flavonoïdes les plus hydrophobes. Dans la nourriture humaine, les flavanones sont retrouvés dans les tomates, la menthe et en grande concentration dans les agrumes où l'on retrouve les principaux flavanones aglycones tel que : la naringénine (Pamplemousse), l'hespéridine (Oranges) et l'ériodictyole (Citrons).

Les isoflavones (Genistéine, daidzéine et glycitéine) présentent une structure similaire aux œstrogènes, ce ne sont pas des stéroïdes, cependant, ils possèdent des groupements hydroxyles en position 7 et 4', une configuration analogue à celle des groupements hydroxyles de la molécule d'œstradiol, ce qui confère à ces composés des propriétés pseudo-hormonales (Capacité à se lier aux récepteurs des œstrogènes), ce sont, donc, des phyto-œstrogènes. Les isoflavones sont exclusivement retrouvés dans les légumineuses et en particulier dans le soja et ses dérivés (Lakenbrink et al., 2000).

Les flavanols contrairement aux autres classes de flavonoïdes ne sont pas glycosilés et existent sous deux formes: monomère (Catéchines) et polymère (Proanthocyanidines). On retrouve les catechines en majeure partie dans le thé vert (Gallocatéchines et épigallocatéchines et catéchines gallates) et le chocolat ainsi que dans divers types de fruits comme les abricots (Catéchines et épicatechines). Les proanthocyanidines plus connus sous le nom de tanins condensés sont des dimères, oligomères et polymères de catechines. Ils sont

responsables du goût amer du chocolat ainsi que du caractère astringent de certains fruits, à travers la liaison aux protéines salivaires. Enfin, les anthocyanines sont des pigments dissouts dans les vacuoles du tissu épidermique des fleurs et des fruits auxquelles ils donnent différentes couleurs (Arts et al., 2000).

### **I.3.3. Lignanes**

Les lignanes sont formées de deux unités de phenylpropane, leur source la plus importante est les graines de lin mais ils sont présents dans certaines céréales, graines, fruits et légumes (Sous forme de traces). Ils sont métabolisés par la microflore intestinale en enterodiol et enterolactone. Une étude a confirmé que la principale source des lignanes est les graines de lin et que les algues, les légumineuses (Lentilles), les céréales, les légumes (Asperges, carottes) et les fruits (Poires et prunes) sont des sources mineures. Leur contribution comparée à la prise totale des PPs est faible étant donné la limitation de leurs sources et les faibles quantités consommées (Heinonen et al., 2001).

### **I.3.4. Stilbenes**

Les stilbenes sont retrouvés en faibles quantités dans la diète humaine, le plus connu et le plus étudié de ces composés est le resveratrol. Il a démontré un rôle anti-carcinogénique et anti-inflammatoire en étant présent en faible quantité dans le vin rouge (0,3-7 mg aglycones/L et 15 mg glycosides/L) (Bertelli et al., 1998 ; Vitrac et al., 2002). Cependant, sa présence en faible quantité dans la diète ne peut démontrer d'effet protecteur dans des conditions nutritionnelles normales.

### **I.3.1.5. Biodisponibilité et métabolisme des polyphénols**

Les effets des PPs sur la santé dépendent en grande partie de leur apport et de leur biodisponibilité (Très variables). Il est important de savoir que les PPs les plus abondants dans la diète humaine ne sont pas, nécessairement, les plus actifs au niveau de l'organisme, peut être en raison d'une activité intrinsèque réduite, d'une faible absorption intestinale, d'une métabolisation élevée, ou encore, d'une élimination rapide (Manach et al., 2004).

De plus, les métabolites résultants de l'activité digestive et hépatique, et retrouvés dans le sang et les organes cibles différent des substances initiales, en termes, d'activité biologique. En effet, même si les proanthocyanidines sont très abondantes dans notre alimentation, elles sont très faiblement ou pas du tout absorbées, leur action est donc restreinte à l'intestin. L'apport des flavonols, flavones et flavanols monomériques est relativement faible et les concentrations plasmatiques excèdent rarement 1  $\mu\text{mol/L}$  à cause d'une absorption limitée et d'une élimination rapide. Les flavanones et les isoflavones présentent le meilleur profil de biodisponibilité avec des concentrations plasmatiques atteignant 5  $\mu\text{mol/L}$ , toutefois, leur distribution est réduite au soja et aux agrumes. En règle générale, les métabolites des PPs sont rapidement éliminés du plasma, ce qui implique qu'une consommation quotidienne de plantes est nécessaire pour le maintien d'une grande quantité de ces métabolites dans le sang (Manach et al., 2004).

De plus, les métabolites des PPs ne se trouvent pas sous forme libre dans le sang, mais sont liés à diverses protéines plasmatiques selon leur structure chimique et l'affinité pour telle ou telle protéine, comme l'albumine. Cette forme liée resterait accessible aux agents oxydants (Comme les RL) et pourrait même préserver son activité antioxydante (Dangles et al, 1999). Par ailleurs, les concentrations plasmatiques ne sont pas en corrélation directe avec les concentrations tissulaires, qui dépendent de la dose administrée (Ou l'apport nutritionnel) et du tissu considéré, bien que, de fines quantités aient été détectées chez le rat et la souris, au niveau du cerveau, des cellules endothéliales, du cœur, des reins, des glandes mammaires et de la prostate, il est cependant difficile d'affirmer que les polyphénols s'accumulent dans des organes cibles spécifiques (Manach et al., 2004).

Cela dit, le métabolisme des PPs (Ayant lieu au niveau intestinal et hépatique) devrait avoir un effet considérable sur l'activité antioxydante, la glucuronidation et la sulfation (La méthylation étant le 3<sup>ème</sup> type de conjugaison des PPs) rendent ces molécules plus hydrophiles, affectant, ainsi, leur site d'action et leur interaction avec d'autres antioxydants. Selon les études de Day et al. (2000) et Moon et al. (2001), l'effet antioxydant des dérivés conjugués de la quercétine sur l'oxydation des LDL *in vitro* correspond à la moitié de celui de la forme aglycone, de même que le 3'-O-methylcatechine et 4'-O-methylcatechine ont une plus faible capacité à protéger les LDL de l'oxydation que la catéchine. Il semblerait donc que la conjugaison diminue l'activité spécifique de ces PPs, cependant, vu le nombre réduit d'études sur ce sujet, il est difficile de tirer des conclusions.

Par ailleurs, les PPs peuvent agir de manière indirecte sur la santé car ils suivent les mêmes voies métaboliques que de nombreux xénobiotiques et hormones endogènes. Ils jouent alors le rôle de substrats enzymatiques comme c'est le cas pour les sulfoconjugués de la quercétine et de la daidzeine, exerçant le rôle d'inhibiteur des sulfotransférases et affectant la fonction des hormones thyroïdes. Certaines flavonoïdes peuvent même inhiber les cytochromes P450 et augmenter la biodisponibilité des médicaments (Naringenine, inhibiteur des CYP 3A4 intestinale), alors que, les isoflavones interagissent avec les transporteurs de médicaments tel que : la P-glycoprotéine et les transporteurs canaliculaires multi-spécifiques organiques et anioniques. Par conséquent, les PPs peuvent affecter la biodisponibilité de nombreux carcinogènes et médicaments, en affectant l'activité des enzymes impliquées dans leur propre métabolisme (Manach et al., 2004).

#### **I.3.1.6. Effets biologiques des polyphénols**

Il est admis que les PPs jouent un rôle bénéfique dans la lutte contre les inflammations chroniques et aiguës à travers différents mécanismes expliquant l'effet anti-inflammatoire dont les principaux sont l'action antioxydante et scavenger des RL et la régulation des activités des cellules impliquées dans le processus inflammatoire et leurs cibles moléculaires. Un nombre élevé d'études a démontré et décrit les propriétés antioxydantes des PPs largement attribuées à leurs groupements hydroxy-phénols. L'activité antioxydante est médiée d'une part, par la capacité à neutraliser les radicaux libres de l'oxygène et du nitrogène, empêchant l'action pro-inflammatoire de ces derniers et d'autre part, par la stimulation de l'activité des enzymes antioxydantes comme la catalase (CAT), par exemple (Simonetti et al., 1997).

La production des RL tels que l'oxyde nitrique (NO) provoque l'oxydation du LDL induisant une forte réponse inflammatoire et constitue un premier élément pour le développement de pathologies endothéliales. Des études *in vitro* sur le resveratrol ont démontré sa capacité à augmenter l'expression de la thioredoxine (Protéine réductase cellulaire, responsable du maintien du statut redox) dans les cellules du myocarde. Il protège également les cellules des muscles lisses cardiaques et aortiques du stress oxydatif, en induisant l'expression d'enzymes antioxydantes endogènes notamment: la superoxyde dismutase (SOD), la CAT et la GSH peroxydase (Hollman et Arts, 2000). Des études suggèrent que ceci est le résultat de changement dans l'activité transcriptionnelle du facteur-2 relié au facteur-2 érythroïde de transcription nucléaire (Nrf2) et d'autres gènes associés : la

quinone oxidoreductase I,  $\gamma$ -glutamylcystéine synthetase et la hème oxygenase. Les flavonoïdes comme la quercétine réduisent l'oxydation du LDL en inhibant la myeloperoxydase, d'autres, modulent l'oxydation des macrophages pendant que les proanthocyanidines ont une capacité 'scavenger' dose-dépendante et sont plus efficaces que les vitamines C et E et le resveratrol (Joshi et Johnson, 2012).

Le mécanisme anti-inflammatoire des PPs se fait en influençant les réseaux de transcription et les cascades de signalisation qui modulent l'expression des gènes responsables de la promotion des médiateurs anti-inflammatoires et de la production du NO notamment impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires. La propriété des PPs s'exerce en inhibant ou en sous-régulant la voie du Nf- $\kappa$ B dans le but de réduire la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF $\alpha$ ) ainsi que la p-selectin. En effet, l'extrait phénolique de l'huile d'olive et de noix (Très présents dans notre régime méditerranéen) a montré des modifications dans les molécules d'adhésion et les cytokines pro-inflammatoires sur plus de 722 sujets après mois de cette diète à travers notamment la réduction des taux de CRP circulante, de l'IL-6 et de l'E-selectine. Certains PPs contenus dans le chocolat et le thé noirs peuvent également agir comme des vasodilatateurs, effet associé à la diminution du risque d'avènement d'accident cardiovasculaire (Manach et al., 2004).

### **I.3.2. Acide gallique**

#### **I.3.2.1. Introduction**

En 1945, Bucher décrivait la capacité de l'AG à protéger contre la rancidité de l'huile de saumon, puis, Thompson et al. (1953) reportaient l'activité antimalariale de l'AG et des composés de structures chimiques similaires. Mahadevam et Reddy. (1968) ont démontré l'activité antifongique de l'AG et du catéchol parmi d'autres molécules. Dans la même année, l'activité antibactérienne des dérivés synthétiques de l'AG contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* a été démontré. En 1970, Frolov et Mishenkova décrivaient son activité anti-influenza *in vivo* et *in vitro*, démontrant une réduction dans la mortalité des singes exposés au virus en réduisant le développement de la pneumonie. Toutes ces découvertes ont permis d'ouvrir un nouveau scénario pour cette molécule naturelle par l'établissement de ces différentes activités de grande importance.

Plus récemment, les études de Kawada et al. (2001) ont montré que l'AG était capable d'induire l'apoptose dans les lignées cellulaires humaines de cancer du poumon. De plus, l'association de l'AG à la cisplatine a montré une augmentation de l'apoptose de ces cellules tumorales comparées à celle des cellules recevant seulement la cisplatine. Ces données prouvent, donc, que la combinaison de l'AG à d'autres médicaments anticancéreux pourrait être efficace dans les essais de traitement du cancer pulmonaire, ainsi que, dans la résistance intrinsèque ou acquise de ces cellules au médicament.

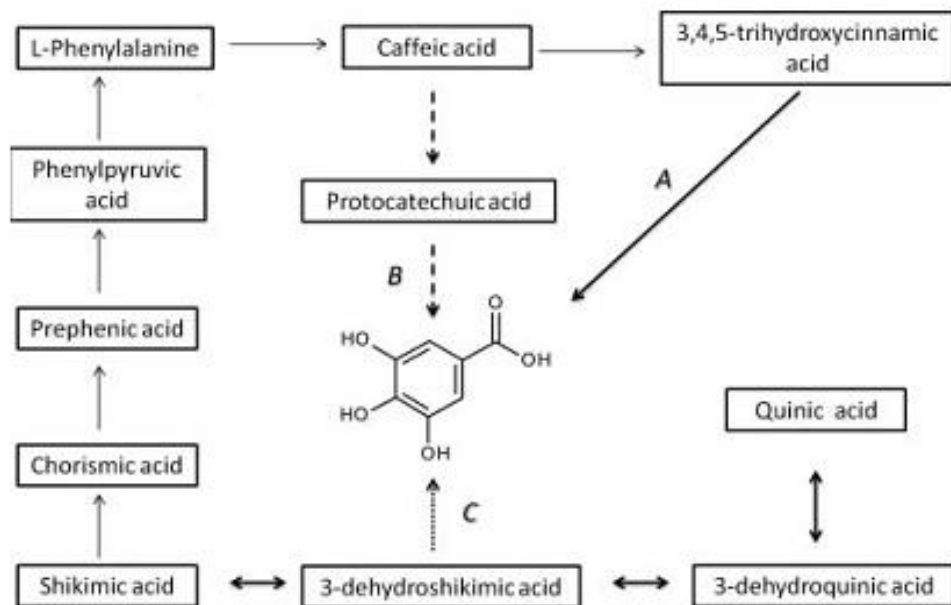
Bien que la toxicité de l'AG soit exprimée dans les cellules tumorales, des chercheurs ont rapporté que l'AG ne présente pas de cytotoxicité contre les cellules lymphocytaires humaines non-tumorales «saines» à des concentrations supérieures à 4,17 mM, suggérant ainsi une certaine sélectivité pour les cellules tumorales. Par ailleurs, des études *in vivo* ont démontré qu'aucun effet toxique n'était observé chez les rats traités par l'AG à 120 mg/kg/jour (Yang et al., 2001). Locatelli et al. (2012) a montré que la toxicité du tetradecyl gallate (Dérivé de l'AG) n'était pas évidente chez les souris traitées par 3,7 mg/kg poids du corps pendant 28 jours. L'AG peut induire la mort programmée de différentes lignées cellulaires tumorales comme celles du colon, l'estomac, les poumons et la leucémie, tout en présentant une excellente activité antioxydante. Par conséquent, l'AG ainsi que ces dérivés peut constituer une bonne alternative pour le traitement des cancers grâce à sa faible toxicité et sa bonne sélectivité d'une part et d'autre part, un moyen stratégique et naturel dans la protection contre les effets néfastes provoqués par différents carcinogènes (Locatelli et al., 2013a).

### **I.3.2.2. Origine et biosynthèse de l'acide gallique**

Considéré comme un composé majeur parmi les acides phénoliques, l'AG ou acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque est un acide benzoïque, formé par la voie de l'acide shikimique, une voie importante de production des métabolites secondaires de structure aromatique chez les plantes et certains microorganismes (Fig. 12). Elle est responsable de la production de composés importants comme les polyphénols, les alcaloïdes et les coumarines en utilisant des acides aminés (La l-phenylalanine) comme points de départ. On distingue trois voies possibles dans la synthèse de l'AG:



- A. Par conversion initiale de la phenylalanine en acide caféique puis en acide 3,4,5 trihydroxycinnamique et enfin en l'AG.
- B. De manière direct, à partir de l'acide 3,4,5 trihydroxycinnamique mais ceci n'a jamais été rencontré dans la nature. Les chaines latérales proviennent donc de la formation de l'acide protocatechuique à partir de l'acide caféique.
- C. Enfin, par action d'une dehydrogenase sur l'acide shikimique et formation de l'acide 3-dehydroshikimique, qui suivi d'une aromatisation spontanée, résulte dans la production de l'AG (Fernandes et Salgado, 2016).



**Fig. 12.** Les principales voies de production de l'AG (Fernandes et Salgado, 2016).

A l'échelle industrielle, il est produit par action enzymatique sur l'acide tannique d'une glycoprotéine estérase, appelée «tannase» issue de plusieurs microorganismes particulièrement les fungi du genre *Aspergillus* et *Penicillium* par procédés de fermentation (Melo et al., 2013). Ou de manière plus simple, cet acide phénolique est obtenu par hydrolyse acide des tannins hydrolysables (Locatelli et al., 2013a ; Locatelli et al., 2013b).

### I.3.2.3. Biodisponibilité et dérivés de l'acide gallique

Le métabolisme des PPs chez l'être humain n'est pas tout à fait clair, cependant, il apparaît que l'AG a une meilleure absorption comparé aux autres PPs. Les formes glucuronidées et l'acide 4-Omethylgallique sont les principaux métabolites plasmatiques de l'AG. Après ingestion de 50 mg d'AG, les concentrations sanguines de ses métabolites atteignent la concentration de 4  $\mu\text{M}$  et l'excrétion urinaire est estimée à 37% de la dose ingérée (Daglia et al., 2014).

Il est important de savoir que les dérivés esters et particulièrement les alkyls esters ont démontrés des propriétés pharmacologiques favorables et dans certains cas, plus importants que celles de l'AG lui-même. Par exemple, les activités antivirale, antifongique, antioxydante et anticancéreuse des dérivés synthétiques avec huit ou plus atomes de carbone sur la chaîne latérale étaient plus forte que celle de l'AG (Fig. 13) (Choubey et al., 2015).

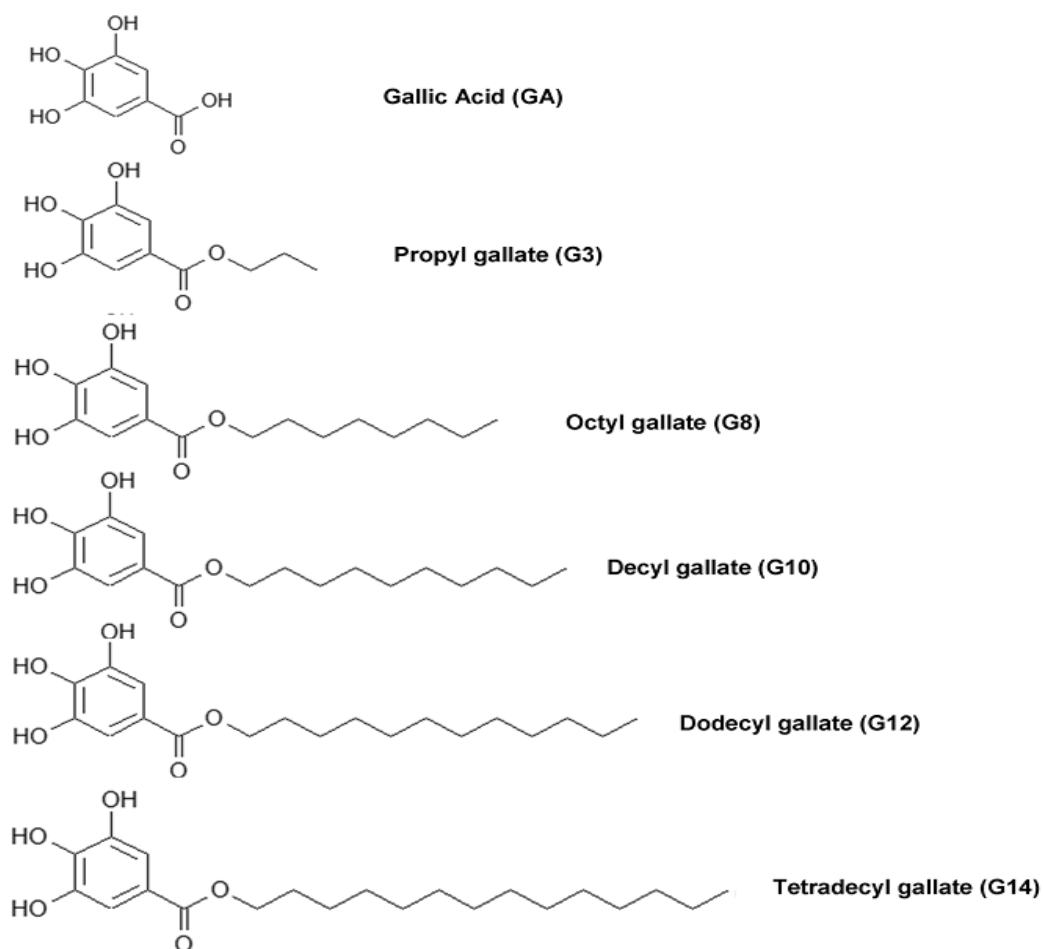


Fig. 13. Structure chimique de l'AG et de ses dérivés (Locatelli et al., 2013a).

### I.3.2.4. Activités pharmacologiques de l'acide gallique

L'AG et ces dérivés, largement distribué chez de nombreuses plantes, ont fait l'objet de nombreuses études qui ont démontré que cette classe de molécules est très prometteuse, quant à ses différentes propriétés pharmacologiques (Fig. 14). En effet, les effets protecteurs de l'AG et de ses dérivés ont commencé à être étudiés à partir des années 90 quand l'activité anti-mutagénique du thé vert fut attribuée au flavan-3-ol et ses dérivés galloyl. Dès lors, plusieurs propriétés ont été attribuées à l'AG car elles affectent de nombreuses voies biochimiques et possèdent des activités pharmacologiques liées principalement à leurs activités antioxydante et anti-inflammatoire. Le potentiel anti-tumoral et l'effet neuro-protecteur sont parmi les propriétés les plus étudiées. Par ailleurs, l'AG et ses dérivés montrent des propriétés antimicrobiennes, antiallergiques, analgésiques et hépato-protectrices (Daglia et al., 2014).

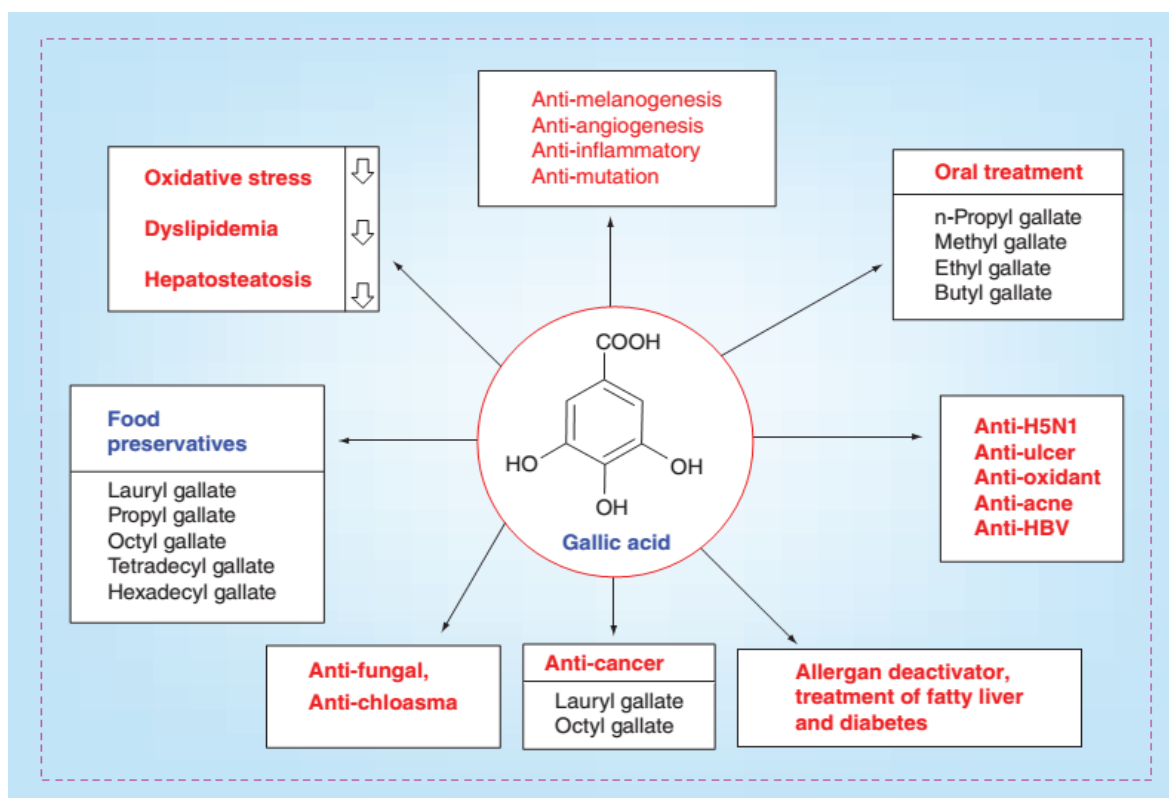


Fig. 14. Principaux usages de l'AG et de ses dérivés (Choubey et al., 2015)

#### **I.3.2.4.1. Activité antioxydante**

Bon nombre de désordres et de pathologies sont associés à l'exposition aux ROS et leur habilité à induire des dommages oxydatifs de l'ADN, des protéines, des lipides membranaires et autres macromolécules. Même si l'organisme dispose de systèmes de défense antioxydante et de réparation, le déséquilibre de la balance entre la production des ROS et les systèmes antioxydants provoque le stress oxydatif, la mort cellulaire, les dommages tissulaires et conduit à d'importants désordres au niveau de l'organe puis de tout l'organisme (Locatelli et al., 2013a).

Il a été rapporté que l'AG exerce, à la fois, un rôle antioxydant et pro-oxydant. En effet, ce composé phénolique a été associé à la mort cellulaire causée par le stress oxydatif engendré par une production élevée de ROS et un dysfonctionnement mitochondrial (Inoue et al., 2000) l'étude démontrait que la production de ROS était augmentée après seulement 30 minutes d'exposition des cellules cancéreuses des poumons à l'AG. La même étude rapportait une diminution de la production de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) en présence de l'AG avec une concentration de 100  $\mu$ M à 400  $\mu$ M, mais, cette diminution est néanmoins légère autour de 50  $\mu$ M. les auteurs suggèrent que l'AG peut jouer un rôle pro-oxydant dépendant de la concentration utilisée, du type cellulaire et du temps d'incubation (Ou d'exposition) (You et al., 2010).

D'une autre part, l'AG est très bien connu pour son rôle d'antioxydant naturel impliqué dans l'effet inhibiteur et piègeur de RL, protecteur de l'ADN et préventif de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires. Cette activité est assurée à travers son caractère hydrophobe et son interaction stérique qui permettent l'établissement d'une relation «structure-activité» de l'AG et de ses dérivés (Lu et al., 2006).

#### **I.3.2.4.2. Activité antitumorale**

Un certain nombre d'études, à la fois, *in vivo* et *in vitro*, ont démontré l'activité anticancéreuse potentielle de l'AG et ses dérivés. Ce n'est pas l'activité antioxydante, mais, l'activité pro-oxydante des composés gallates qui est responsable de leur puissante propriété anticancéreuse et inductrice d'apoptose. Les ROS générées par les gallates ont été affirmées

comme étant responsable de la mort cellulaire apoptotique et nécrotique. Ceci permet d'affirmer que les gallates induisent l'apoptose, sélectivement, dans les cellules tumorales à croissance rapide, laissant les cellules saines intactes. Cette cytotoxicité sélective envers les cellules cancéreuses a été proposée en raison de la capacité des cellules normales de résister à l'apoptose induite par l'AG à travers, la production de certains inhibiteurs, contrairement aux cellules tumorales qui ne peuvent produire en quantité suffisante ces inhibiteurs. Ainsi, les cellules cancéreuses sont plus sensibles à l'apoptose induite par l'AG que les cellules saines «Normales». L'activité anticancéreuse de l'AG a été signalée dans les cancers, tels que : les leucémies, le cancer de la prostate, le cancer du poumon, de l'estomac et du côlon (Badhani et al., 2015).

Plusieurs études ont démontré que l'effet inhibiteur de l'AG sur la carcinogénèse est médié par la régulation de multiples voies de signalisation. En raison des lignées cellulaires utilisées, l'AG peut induire la mort cellulaire ou l'arrêt du cycle cellulaire de différentes manières. Mais un mécanisme commun est associé avec le stress oxydatif, dérivé des espèces réactives de l'oxygène, un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation du niveau intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ . Considérant que la mort cellulaire induite par l'AG est médiée par les ROS et le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Parmi les ROS générés par l'AG, le peroxyde d'hydrogène, induisant la mort cellulaire dans les cellules de l'hépatome du rat. Puisque la catalase est responsable de la dégradation du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , les cellules normales sont insensibles à la génération de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mentionnée qui peut être traitée par l'enzyme CAT. Cependant, en raison de l'absence de système de protection adéquat dans les cellules tumorales, elles sont incapables de se défendre contre les effets délétères du  $\text{H}_2\text{O}_2$  entraînant la mort cellulaire (Serrano et al., 2010).

La chimie de Fenton, impliquant la production du radical  $\text{OH}^\cdot$  à partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et le cuivre (Cu) (II), est généralement considérée comme la cause de la lésion oxydante de l'ADN dans les cellules tumorales. Ce dommage de l'ADN médié par le cuivre est initié par la coordination préférentielle de l'ion Cu (II) à N7 de la base guanine de l'ADN, suivie par la réduction du Cu (II) à Cu (I) par les gallates. L'ion Cu (I) réduit alors l' $\text{O}_2$  moléculaire en anion superoxyde, puis en peroxyde d'hydrogène avec la formation de Cu (II). L'interaction entre le peroxyde d'hydrogène et le Cu lié à l'ADN entraîne alors la production de radicaux hydroxyles dangereux, qui provoquent des ruptures de brins d'ADN et la dégradation prononcée des bases de guanine avec formation de 8-hydroxy-20-désoxyguanosine (8-

OHDG), un produit d'adduction de guanine en position C-8, comme marqueur d'un endommagement de l'ADN oxydatif (Strlic et al., 2002).

Étant donné que le sérum, les tissus et les taux de cuivre dans les cellules cancéreuses sont très élevés dans diverses tumeurs malignes, les cellules cancéreuses sont peut-être plus soumises au transfert d'électrons entre des ions de cuivre et des PPs, entraînant une formation de ROS. En plus de la génération des ROS, ces composés peuvent également induire une apoptose dans les cellules cancéreuses en inhibant les protéines tyrosinase kinases (PTK), une des protéases vitales pour les processus cellulaires normaux. Les gallates ont montré une excellente activité inhibitrice contre les PTK. Ces dérivés de l'AG ont affiché une activité inhibitrice beaucoup plus élevée que les inhibiteurs de PTK, largement, utilisés. Le gallate de lauryl, par exemple, s'est révélé être un bon inhibiteur de la PTK de la rate humaine (Hadi et al., 2007).

L'administration de l'AG pourrait également inhiber la formation et la croissance des métastases. La P-sélectine est une protéine exprimée par plusieurs cellules tumorales pancréatiques avancées, a un rôle dans la métastase, en favorisant la croissance tumorale. Une P-selectin déficiente est, ainsi, accompagnée d'une croissance réduite des cellules de carcinome implanté et d'une formation réduite en métastases. L'AG pourrait se lier et antagoniser la P-sélectine sous la forme statique et dans des conditions dynamiques, entraînant des effets avantageux dans des conditions telles que la maladie coronarienne, la thrombose et le cancer. En outre, la concentration requise est facilement accessible par le thé vert ou le cacao (Badhani et al., 2015).

## II.1. Produits chimiques

BaP (pureté > 96% HPLC), Anti-Galectin 3 (Antibody produced in rabbit), IgG-phAK (Secondary antibody), Sepharose 4B, Asialofétine (ASF), acide trichloroacétique (TCA), acide thiobarbiturique (TBA) ( $\geq 98\%$ ), solution de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (30-31%) et n-butanol proviennent de Sigma Aldrich Co (St Louis, USA). L'AG provient de Merk (Darmstadt, Germany). Le 1-chloro-2, 6-dinitrobenzène (CDNB) provient de Fluka Analytical (Munich, Allemagne), le glutathion (GSH) et le 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) d'Alfa Aesar (Haverhill, USA). Enfin, le chlorure de potassium (KCl) d'Emsure (Darmstadt, Germany) et les tampons de phosphate proviennent de Carlo Erba Reagents S.A.S (Val de Reuil, France).

## II.2. Animaux

Afin d'étudier la toxicité du BaP, ainsi que, l'effet de la substance bioactive choisie (AG), *in vivo*, nous avons choisit de produire des modèles d'expérimentation animale, afin de prédire ce qui pourrait éventuellement se passer chez l'homme, et ceci, par l'utilisation des rats et des souris. Ces derniers ont été fournis par le service animalerie de l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie). Ils sont âgés de 10 à 12 semaines et proviennent d'un élevage de type conventionnel, à ce titre ils sont maintenus dans des conditions d'élevage et d'entretien en accord avec ce type d'élevage. Ils étaient à statut holoxénique et ne présentaient aucun signe clinique de pathologies, au moment de leurs mises à dispositions.

## II.3. Modèles expérimentaux

### II.3.1. Modèle expérimental de toxicité aigüe induite par le benzo(a)pyrène

L'étude de la toxicité aigüe induite par le BaP a été réalisé sur des souris fournies par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie) et maintenus dans des cages en plastiques, à une température ambiante de  $22 \pm 2^\circ C$  avec un cycle jour/nuit : 12 h/12 h en ayant accès libre à la nourriture standard et l'eau. L'induction chimique de ce modèle d'intoxication a été conduite selon le modèle d'étude de Gao et al. (2011). Elle a été réalisé sur un nombre total de 30 souris, pesant entre 20 et 25 g, par injection intra-péritonéale (IP) d'une suspension de BaP (> 96,0 % HPLC, Sigma-Aldrich, USA) dissout dans 1 ml d'huile de tournesol, à la dose finale

de 50 mg/kg, en plus de l'administration de l'AG (Merk, Germany) véhiculé dans du NaCl 0,9%. Pour ce faire, les animaux ont été répartis comme suit :

Groupe témoin (Contrôle) : 6 souris recevant 0,2 ml de NaCl 0,9% par voie orale, un jour avant l'injection de 0,2 ml d'huile de tournesol par voie IP.

Groupe intoxiqué (BaP) : 12 souris recevant une dose unique de BaP à 50 mg/kg par voie IP et divisé en 3 sous-groupes, selon le délai de sacrifice :

- Intoxiqué 1 : 4 souris sacrifiées 24 h après l'administration du BaP.
- Intoxiqué 2 : 4 souris sacrifiées 48 h après l'administration du BaP.
- Intoxiqué 3 : 4 souris sacrifiées 72 h après l'administration du BaP.

Groupe pré-traité (BaP+AG) : 6 souris recevant une dose unique d'AG de 100 mg/kg par voie orale, un jour avant l'injection IP de 50 mg/kg de BaP.

Groupe (AG) : 6 souris recevant seulement, une dose unique d'AG à 100 mg/kg par voie orale.

Mis à part, les trois sous groupes intoxiqués sacrifiés dans les délais respectifs de 24 h, 48 h et 72 h, après injection IP du BaP ; Les groupes de souris témoins, prétraitées et AG sont tous sacrifiés, 24 h après leurs administrations respectives, par anesthésie par l'éther. Le foie et les poumons ont été collectés, lavés à plusieurs reprises, dans le NaCl 0,9% et imbibés de papier buvard pour débarrasser le sang, pesés et soumis à un examen macroscopique. Par la suite, les organes ont été stockés à -40°C pour l'évaluation des paramètres de stress oxydatif.

### **II.3.2. Modèle expérimental de toxicité subaigüe induite par le benzo(a)pyrène**

L'étude de la toxicité subaigüe du BaP a aussi été réalisée sur des souris fournies par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie) et maintenues dans des cages en plastiques, selon, le même protocole employé pour produire le modèle de toxicité aigüe. L'induction chimique de cette intoxication a été réalisée selon Gao et al. (2011). Un nombre total de 24 souris, pesant entre 20 et 25 g, a été injecté par voie IP par une suspension de BaP à 50 mg/kg (véhiculé dans 1 ml d'huile de tournesol), en plus de l'administration de l'AG. Les animaux ont été répartis en quatre groupes, comme suit :



Groupe témoin (Contrôle) : 6 souris recevant par voie orale 0,2 ml de la solution de NaCl 0,9% par jour, pendant trois jours. Puis, cinq jours après, reçoivent une injection IP unique de 0.2 ml d'huile de tournesol.

Groupe intoxiqué (BaP) : 6 souris recevant une dose unique de BaP à 50 mg/kg par voie IP.

Groupe prétraité (BaP+AG) : 6 souris recevant par voie orale d'AG à 100 mg/kg par jour pendant trois jours consécutifs. Puis, cinq jours après la dernière administration de l'AG, les souris ont reçu une injection IP unique de BaP à 50 mg/kg.

Groupe (AG) : 6 souris recevant seulement, 100 mg/kg d'AG par jour, pendant trois jours consécutifs, par voie orale.

Les groupes de souris témoins, intoxiquées, prétraitées et AG ont été sacrifiés, 28 jours après injection du BaP, après anesthésie par l'éther. Le foie et les poumons ont été collectés, lavés à plusieurs reprises dans le NaCl 0,9% et imbibés de papier buvard pour débarrasser le sang, pesés et soumis à un examen macroscopique. Par la suite, les organes ont été stockés à -40°C pour l'isolement et la caractérisation des Gals.

### **II.3.3. Modèle expérimental de toxicité chronique induite par le benzo(a)pyrène**

L'étude de la toxicité chronique induite par le BaP a été réalisée sur des rats Wistar Albinos fournis par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie). Maintenus dans des cages en plastiques, selon le même protocole employé pour produire le modèle de toxicité aiguë. L'induction chimique de l'intoxication chronique a été réalisée, en concordance avec l'étude de (Lariche et al., 2017). 24 rats Wistars Albinos pesant entre 120 et 180 g, ont été injectés par voie IP par une suspension de BaP à raison de 100 mg/kg (véhiculé dans 1 ml d'huile de tournesol), en plus de l'administration de l'AG. Pour ce faire, les animaux ont été répartis en quatre groupes, comme suit :

Groupe témoin (Contrôle) : 6 rats recevant 1 ml d'huile de tournesol par voie IP et 1 ml de solution de NaCl 0,9%.

Groupe intoxiqué (BaP) : 6 rats recevant une dose unique de BaP à 100 mg/Kg par voie IP.

Groupe post-traité (BaP+AG) : 6 rats recevant une injection IP unique de BaP à 100 mg/Kg, et après 24 semaines, ont reçu par voie orale l'AG à 100 mg/kg par jour, pendant cinq jours consécutifs.

Groupe (AG) : 6 rats recevant seulement, l'AG à 100 mg/kg par jour, pendant cinq jours consécutifs, par voie orale.

Les groupes de rats témoins et intoxiqués ont été sacrifiés 24 semaines après le jour de l'injection IP au BaP. Les rats post-traités et AG ont été sacrifiés 3 jours après le dernier jour d'administration de l'AG, par anesthésie par l'éther. Le foie a été collecté, lavé, à plusieurs reprises, dans le NaCl 0,9% et imbibé de papier buvard pour débarrasser le sang, pesés et soumis à un examen macroscopique. En suite, une partie de l'organe est plongée dans du formol (10%) pour l'analyse histologique. La partie restante a été conservée à -40°C pour l'évaluation des paramètres de stress oxydatif.

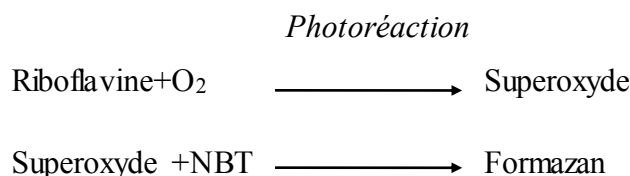
#### **II.4. Préparation de la fraction cytosolique**

La mesure des capacités antioxydantes enzymatiques s'est faite à partir de la fraction cytosolique du foie (Toxicité aigüe et chronique) et/ou des poumons (Toxicité aigüe). La préparation de cette dernière a été réalisée selon un protocole modifié de la méthode de Iqbal et al. (2003) : 0,2 g de foie et 0,2 g de poumons ont été homogénéisés dans 1,8 ml d'un tampon contenant du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M, pH=7,4) et du KCl (1,15 M). Ce homogénat a ensuite été centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse (SIGMA 3-16PK, Germany) à 4000 rpm, pendant 10 min, à 4°C, puis le surnageant a été récupéré et centrifugé de nouveau à 10000 rpm, pendant 30 min, à 4°C. Le nouveau surnageant obtenu représentait la fraction cytosolique et a été conservé jusqu'à son utilisation dans le dosage des protéines totales par la méthode de Bradford (1976) et des enzymes SOD, CAT et GST.

#### **II.5. Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase**

L'activité enzymatique de la SOD a été déterminée selon la méthode de Friedrich et Beauchamp (1971). Elle dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitrobleu-tetrazolium (NBT) par 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, selon la réaction suivante :



La réduction du NBT par l'anion superoxyde en Formazan a été suivie à 560 nm. Une unité d'activité de la SOD a été définie comme étant la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT de 50%.

Pour ce faire, nous avons préparé 2 ml d'un milieu réactionnel contenant: 0,1 ml de cyanide de Sodium 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 0,7ml du tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) pH=7,8. Ensuite, nous avons ajouté 5  $\mu\text{L}$  de la fraction cytosolique et 0,1 ml d'une solution de méthionine  $10^{-2}$  M. Le mélange a été irradié par une lampe de 15 watts pendant 10 minutes, et l'absorbance a été mesurée à 560 nm dans des cuves en quartz. Un tube contrôle a été préparé avec du tampon phosphate dans les mêmes conditions que les échantillons. L'activité de la SOD (UI/ml) a été déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition suivant et son activité déduite en multipliant le pourcentage d'inhibition par 6,35.

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

## II.6. Mesure de l'activité de la catalase

Nous avons déterminée l'activité de la CAT par la méthode de Claiborne (1985). Le principe est basé sur la disparition de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en présence de la source enzymatique à 25°C.



La cuve de mesure contenait 1 ml de tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M, pH=7,2), 0,95 ml peroxyde d'hydrogène (0,019M) et 0,025 ml de la fraction cytosolique. La lecture de la densité optique (DO) a été effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité totale a été exprimée en UI selon la relation suivante :

$$\text{Activité totale (UI)} = (2,3033 / T) \cdot \log A_1 / A_2$$

Sachant que:  $\left\{ \begin{array}{l} A_1: \text{Absorbance au temps 0 min.} \\ A_2: \text{Absorbance après 1 min.} \\ T : \text{Intervalle de temps en min.} \end{array} \right.$

## II.7. Mesure de l'activité de la glutathion-S-transferase

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 GSH. Un mélange de 850  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 0,1 M, pH=6,5 et de 50  $\mu\text{L}$  de CDNB 20 mM a été préparé puis incubé à 37°C pendant 10 min. la réaction est déclenchée par l'addition à ce mélange de 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de GSH 20 mM et 50  $\mu\text{L}$  de fraction cytosolique. Nous avons préparé un contrôle dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M, PH=6,5. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 340 nm toutes les minutes pendant 5 min. Les résultats ont été calculés selon la formule ci-dessous et exprimés en UI.

$$K=(\text{DO}_{\text{échantillon}}-\text{DO}_{\text{control}})\text{X}100/(9,6\text{X}0,05)$$

## II.8. Dosage du taux de glutathion

Le principe du dosage des groupements -SH est basé sur leur réaction avec le réactif d'Ellman, le 5,5'-dithio-bi-2-acide nitrobenzoïque (DTNB) pour former des quantités stoechiométriques de thionitrobenzoate (TNB), un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à 412 nm (Ellman, 1959).

Nous avons homogénéisé 0,2 g de foie et/ou 0,2 g de poumons dans trois volumes de TCA 5% à l'aide d'un broyeur de Dounce (Glass company, New Jersey, USA). Puis, nous avons centrifugé l'homogénat à 2000 rpm (SIGMA 1-14, Germany) pendant 15 min. Ensuite, nous avons dilué 50  $\mu\text{L}$  de surnageant dans 2 ml de tampon phosphate (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 8). Enfin, nous avons additionné 4  $\mu\text{L}$  de DTNB (0,01 M, dilué dans du méthanol absolu) à 0,6 ml du mélange de dilution. La lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5% et les concentrations ont été

exprimées en mmoles de GSH/g de tissu. Elles ont été déduites à partir d'une gamme étalon de GSH préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

## II.9. Dosage du taux de malonyldialdéhyde

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres. Son dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C), par réaction entre le MDA et deux acides thiobarbituriques (TBA), d'un pigment coloré absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

Pour ce faire, nous avons additionné à 0,2 g de foie et/ou 0,2 g de poumon 0,6 ml de solution de KCL (1,15 M) puis broyé le tout par un homogénéiseur de Dounce. À 250 µL de l'homogénat, nous avons additionné 250 µL d'acide trichloracétique 20% et 500 µL de TBA (0,67%). Nous avons chauffé le mélange à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 2 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm (SIGMA 1-14, Germany), la densité optique a été déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm et le taux du MDA exprimée en nmol/g de tissu (Ohkawa et al., 1979).

## II.10. Préparation des ARN totaux

L'ARN total est extrait des tissus hépatiques et/ou pulmonaires en utilisant un kit Gen elute™ (Merk, USA). Pour ce faire, 20 mg de tissu congelé a été broyé dans du nitrogène liquide avec 400 µL de tampon de lyse contenant (0,2 M tris-HCl, pH=9, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1% SDS) et 400 µL de phénol. Les échantillons ont été placés dans la glace et soumis périodiquement au vortex. Nous avons centrifugé l'échantillon pendant 5 min à température ambiante et gardé le surnageant (Phase aqueuse) puis recommencé l'extraction, en ajoutant 400 µL de phénol et en centrifugeant pendant 5 min, en gardant la phase aqueuse. Une troisième extraction a été réalisée avec 300 µL de chloroforme, en suivant les étapes précédentes. 1/3 du volume total de de LiCl 8 M y était ajouté, mélangé, puis gardé durant une nuit à -80°C.

En suite, une centrifugation à 4°C, pendant 30 min a été réalisée et le culot a été dissout dans 300 µL d'H<sub>2</sub>O puis précipité dans de l'éthanol 100%, à -80°C, pendant une

heure. Une autre centrifugation à 4°C, pendant 20 min, a été réalisée puis nous avons lavé le culot avec de l'éthanol 80% et centrifugé pendant 5 min, séché, suspendu dans 50 µL d'H<sub>2</sub>O et gardé, à -80°C, le produit obtenu. L'ADN présent dans le lysat a été débarrassé par traitement avec 1 µL de tampon ADNase et 1 µL d'ADNase (Roche, Suisse) et incubé à 37°C, pendant 30 min puis incubé une deuxième fois à 85°C, pendant 10 min. La concentration de l'ARN a été déterminée par un spectrophotomètre microvolume et les échantillons d'ARN gardés à -80°C avant usage.

### II.11. Préparation de l'ADN complémentaire

L'ADN complémentaire (ADNc) a été préparé à partir de l'ARN correspondant en utilisant le kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Thermofisher, Angleterre). Pour chaque échantillon, nous avons dilué 2 µg d'ARN dans l'eau, dans un microtube pour un volume final de 10 µL, puis 1 µL d'oligo dT et 1 µL de dNTP 10 mM ont été ajoutés au tube. Le mélange a été incubé à 65°C, pendant 5 min et refroidi, en le plaçant dans de la glace, pendant 3 min.

En suite, nous avons ajouté 10 µL du mélange réactionnel (2 µL tampon RT 10×, 4 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µL DTT 0,1 M, 1 µL RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor) et laissé incubé l'ensemble à 42°C pendant 2 min. Puis, nous avons ajouté 1 µL (50 unités) du SuperScript II RT au mélange et incubé à 42°C pendant 50 min. La réaction a été terminée par une incubation à 70°C pendant 15 min et l'ADNc final a été conservé à -80°C.

### II.12. Analyse par PCR quantitative

Après obtention de l'ADNc, les gènes d'intérêt ont été amplifiés par une réaction en chaîne de polymérase avec les amorces spécifiques. Les amorces sens et anti-sens pour les gènes (GAPDH, Gal 3 et Gal 8) ont été manufacturées par Sigma Aldrich, USA. Les détails des cycles thermiques sont présentés en annexe et les amorces utilisées pour la PCR sont les suivants:

GAPDH (5'CATGGCCTTCCGTGTTCTCA-3', 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'), β-Actine (5'-AAATCTGGCACCACACCTTC-3', 5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA-3'), Gal-3 (5'-TTGAAGCTGACCACTTCAAGGTT-3', 5'-AGGTTCTTCATCCGATGGTTGT-3'), Gal-8 (5' GTT GTC CTT AAA CAA CCT ACA G

3', 5' TAA CGA CGA CAG TTC GTC CAG 3'). La réaction en chaîne de polymérase lors de la réalisation de l'expression génétique des Gal 3 et Gal 8 s'est faite selon les conditions de thermo-cyclage suivantes : 1 minute à 95°C, 45 secondes à 55°C et enfin, 1 minute à 72°C, avec 40 répétitions.

### II.13. Extraction des protéines totales

Chaque fragment de foie a été rincé avec un tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7,2) contenant 75 mM NaCl, 75 mM, 2 mM EDTA, 4 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,3 M lactose (Tampon A). Le tissu a été coupé en petits morceaux et additionné de 5 volumes de tampon d'extraction et homogénéisé à 4°C, à l'aide d'un broyeur. L'homogénat a été centrifugé à 15 000 xg à 4°C, pendant 30 min et le surnageant a été recueilli et stocké à 4°C.

Afin d'éliminer le lactose de l'extrait brute obtenu, des colonnes PD-10 pour filtration sur gel ont été équilibrées avec un deuxième tampon contenant 75 mM NaCl, 75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7,2), plus 2 mM EDTA et 4 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol (Tampon B). Le surnageant contenant les protéines totales solubles a été déposé sur une colonne PD-10 (Filtration sur gel), en appliquant 1 ml et collectant 2 ml. Alternativement, les échantillons ont été débarrassés du lactose par dialyse contre le tampon B, durant toute une nuit. Ainsi, l'extrait exempt de lactose était prêt à être appliqué sur la colonne d'asialoféuine-sépharose (Franco-fraguas et al., 2003).

### II.14. Purification des galectines par chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est abondamment utilisée pour isoler des protéines, elle est particulièrement employée dans le cas où l'on veut isoler une protéine ayant une affinité particulière pour un ligand, le ligand fixé par liaison covalente sur un support insoluble. Au cours de la chromatographie, la protéine sera fixée au ligand et sera retenue sur la colonne. Un simple lavage récupère les protéines contaminantes non fixées. Pour récupérer la protéine d'intérêt, on utilise une solution contenant le ligand soluble en forte concentration. Cela va permettre la dissociation et l'éluion de la protéine voulue. Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie d'affinité dans le but de purifier les Gals à partir du foie

préalablement congelé, appartenant aux différents groupes de souris du modèle de toxicité sub aigüe induit par le BaP.

#### II.14.1. Préparation de la colonne chromatographique et couplage de ligand

Le Sepharose 4B activé par bromure de cyanogène (BrCN) est un milieu pré-activé pour l'immobilisation de ligands contenant des amines primaires. Il fournit un moyen très pratique d'immobiliser les ligands par la méthode au BrCN. La réaction de couplage est spontanée, rapide et facile à réaliser. Le domaine d'application couvre l'immobilisation des protéines, des peptides et des acides nucléiques. Le Sepharose 4B activé par BrCN a été fourni lyophilisé en présence d'additifs. Ces additifs doivent être éliminés par lavage à pH faible (pH=3) avant de coupler le ligand désiré, car, l'utilisation de ce pH préserve l'activité des groupes réactifs qui s'hydrolysent à pH élevé. Nous avons donc pesé la quantité requise de la poudre (1 g de poudre lyophilisée donne environ 3,5 ml de volume final de milieu) et l'avons mis en suspension dans du HCl 1 mM. Le milieu a gonflé immédiatement et a été lavé pendant 15 minutes avec de l'HCl 1 mM sur un filtre en verre fritté (porosité G3). Nous avons utilisé environ 200 ml de HCl 1 mM par gramme de poudre lyophilisée, ajoutés en plusieurs aliquotes.

D'abord, nous avons dissout le ligand, à coupler : l'asialofétuine (ASF) (Sigma Algrich, USA) dans un tampon de couplage ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, pH 8,3 contenant 0,5 M de NaCl) et utilisé environ 5 ml de solution de couplage/g de poudre lyophilisée. Environ 5 à 10 mg de protéines par ml de milieu ont été employés. Puis, nous avons ajouté la solution de couplage contenant le ligand avec la suspension moyenne dans un récipient bouché et le mélange a été agité pendant 1 h à température ambiante. L'excès de ligand a ensuite été lavé avec au moins 5 volumes de tampon de couplage. Enfin, pour bloquer tous les groupes actifs restants, nous avons transféré le milieu dans du tampon TrisHCl 0,1 M, pH=8,0 et laissé reposer pendant 2 h.

La colonne a été équilibrée avec des tampons visqueux à des débits réduits à la température, à laquelle, la chromatographie sera réalisée. Puis, la suspension moyenne a été dégasée. Nous avons versé la suspension dans la colonne sous un mouvement continu sur une tige de verre maintenue contre la paroi de la colonne afin de minimiser l'introduction de bulles d'air. Immédiatement après, le reste de la colonne a été remplie avec le tampon et la colle



monté sur la partie supérieure de la colonne et connecté la colonne à une pompe. Enfin, nous avons ouvert la sortie inférieure de la colonne et réglé la pompe sur le débit souhaité. Le Sepharose 4B lyophilisé par BrCN a été conservé en dessous de 8°C. Le milieu couplé gonflé a été conservé à 4°C.

#### II.14.2. Chromatographie d'affinité

0,7 ml d'extrait débarrassé de lactose (Filtré et dialysé) a été dilué dans un même volume de tampon B, puis appliqué sur une colonne contenant 9 ml de gel (ASF-Sepharose tassé), à un débit de 15 ml/h et des fractions de 2 ml ont été collectées. La colonne a été lavée par le tampon B jusqu'à ce que l'absorbance de l'effluent à 280 nm soit négligeable. La désorption de la lectine liée a été effectuée par élution contenant 30 mM de lactose (Tampon B). Les fractions ont été collectées et filtrées à travers les colonnes PD-10 comme, précédemment, décrit. Les fractions ont été regroupées et concentrées avec un ultrafiltre amicon-10 et la quantité de protéines établie. Le concentré protéique gardé à 4°C, a été par la suite utilisé pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS PAGE).

#### II.15. SDS PAGE

Le gel de séparation de polyacrylamide, en présence de dodecylsulfate de sodium (SDS) est préparé pour la séparation des protéines de différentes tailles provenant de l'extrait total de protéines. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodecylsulfate de sodium (SDS-PAGE) a été réalisée suivant la procédure décrite par (Laemmli, 1970), en utilisant le dispositif Mini-protean II apparatus (BioRad; Hercules, USA) sur des plaques de gel contenant 12,5% du gel polyacrylamide de séparation et 4% de gel polyacrylamide de concentration (stacking gel). Les protéines issues de la purification ont été solubilisées dans 20  $\mu$ L d'un tampon contenant 0.88 M de Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 1% bleu de bromophénol et 12% de glycerol. Ce mélange a été soumis à un chauffage à 95°C pendant 5 min puis mis dans de la glace pendant 1 min. Les échantillons refroidis ont été déposés dans des puits du gel de concentration et laissés migrer dans le gel sous l'effet d'un courant électrique de 30 mA, pendant environ une heure, de même que les standards de poids moléculaire avec une échelle de protéines étendue (de 10 à 260 KDa). Enfin, les bandes ont été visualisées par coloration au Bleu Brillant de Coomassie.

## II.16. Western Blot

Les protéines séparées sur le gel ont été transférées sur une membrane Immun-Blot en PVDF dans un tampon de transfert, en utilisant une tension électrique constante de 20 V à 4°C pendant la nuit. La membrane a été retirée et lavée brièvement dans du PBS et incubée dans un tampon de blocage (5% caséine dans du PBS). Elle a été brièvement lavée avec du PBS, puis incubée avec l'anticorps primaire anti-Gal-3 (Sigma Aldrich, USA) pendant une heure à 4°C sous une agitation douce. La membrane liée à l'anticorps a été soigneusement lavée avec du PBS, 3 fois consécutives, pendant 10 min. Elle a ensuite été incubée avec un anticorps secondaire (IgG-phAK) (Sigma Aldrich, USA) pendant 1 h à température ambiante sous agitation et la procédure de lavage suscitée a été répétée après incubation avec l'anticorps secondaire. Le Tampon de lavage excessif a été éliminé et enfin, le substrat de l'enzyme ajouté et l'ensemble incubé à température ambiante pendant 1 min.

## II.17. Analyse macroscopique et histopathologique

Les foies fraîchement prélevés à partir des rats appartenant aux différents groupes du modèle de toxicité chronique induit par le BaP ont été lavés et soumis à un examen à l'œil nu, afin de vérifier l'intégrité et la présence ou l'absence de modifications morphologiques macroscopiques.

En suite, les fragments de foie, immédiatement, fixés après prélèvement des organes dans du formol à température ambiante pour une durée de 48 h ont ensuite été déshydratés dans des bains successifs de 20 min chacun dans l'éthanol 70°, l'éthanol 90° et l'éthanol absolu. Puis, ils ont été soumis à deux bains de xylène afin de préparer le tissu à son inclusion dans la paraffine et la réalisation des blocs dont chacun a été débité à l'aide d'un microtome (Coupes de 5 µm d'épaisseur). Nous avons étalé et collé les coupes sur des lames avec un gel de gélatine 2% puis nous les avons séchées pendant une nuit dans une étuve à une température entre 35-42°C. Enfin, nous avons procédé au déparaffinage des coupes avec deux bains successifs de 15 min chacun dans du xylène, deux autres bains de même durée d'éthanol absolu. Les coupes ont été réhydratées en les plongeant dans des bains successifs d'éthanol 95°, deux bains d'éthanol 70° et un bain d'eau distillée.

En dernier lieu, nous avons coloré les coupes par l'hématoxyline de Groat 1% et l'éosine. Brièvement, nous avons plongé et laissé les lames dans des bains successifs: de 5

min dans de l'hémalum 2%, 3 min dans l'eau, 5 s dans l'éthanol-HCl, 2 min dans l'eau et nous avons ensuite plongé les lames dans un bain d'éosine pendant 2 min suivies d'un bain d'eau distillée de 20 s. Puis, les lames ont été soumises à une solution de bicarbonate de soude 1% pendant 20 s pour bleuir l'hémalum avant une déshydratation dans deux bains d'alcool absolu et deux autres de xylène.

## II.18. Mesure des activités des transaminases

Les activités de ces enzymes ont été réalisées sur du sang prélevé à partir des rats appartenant à chaque groupe d'étude, par ponction au niveau du sinus retro orbital et recueilli dans des tubes héparines. En suite, chaque échantillon sanguin a été centrifugé à 3000 rpm (SIGMA 1-14, Germany) pendant 15 min et le sérum a été récupéré. L'activité de ces transaminases sérique (ALT, AST) est mesurée à partir de ce sérum, en utilisant un automate de Biochimie COBAS INTEGRA® 400 plus (Roche Diagnostics, Suisse).

## II.19. Analyse statistique

Les données des résultats sont représentées par moyenne±écart-type. Les variances des résultats parmi les différents lots d'animaux ont été comparées par le test *ANOVA* et les moyennes des résultats entre deux lots d'animaux ont été comparées par le test de *Student*. Les résultats obtenus sont considérés comme étant significatifs pour  $p \leq 0,05$ , très significatifs pour  $p \leq 0,01$  et hautement significatifs pour  $p \leq 0,001$ .

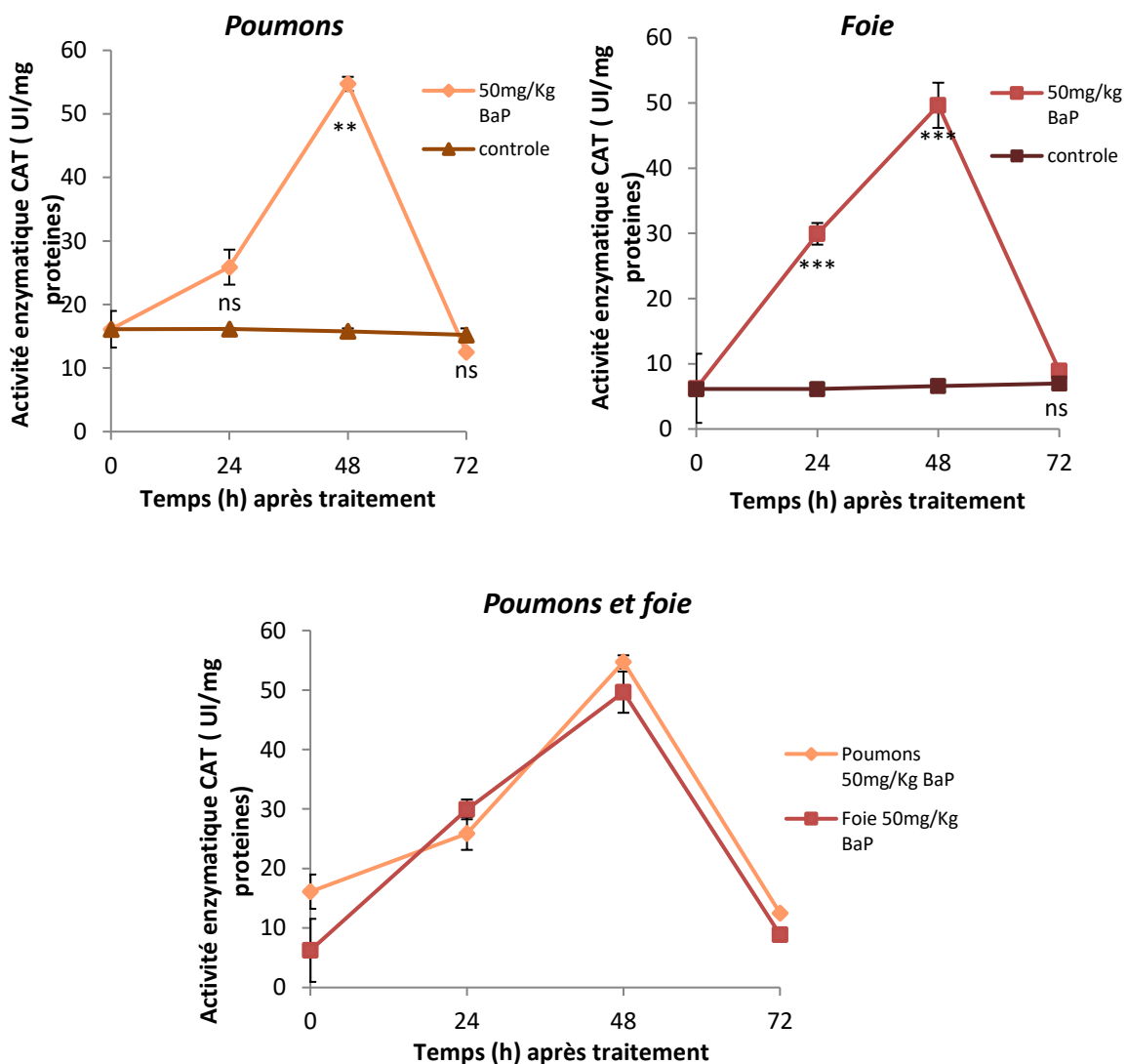
### **III.1. Modulation différentielle par l'acide gallique du stress oxydatif aigüe induit par le benzo(a)pyrène**

Mis à part, les effets de toxicité cutanée observés chez les animaux, notamment après application de BaP (Ou autres HAP) sur le dos rasé de souris Swiss, entraînant, par exemple, la disparition des glandes sébacées (Picot et Mantandon, 2013), la toxicité aigüe du BaP n'a que très rarement été étudiée, chez le rat ou la souris. Seuls les modèles d'éco-toxicologie réalisés, chez des espèces de poissons, ont été réalisés jusqu'ici (Wessel et al., 2010). C'est pourquoi, il était intéressant de réaliser un modèle d'intoxication aigüe sur les souris, proche de l'homme dans sa physiologie, afin de mettre en évidence le processus de toxicité reposant, notamment, sur le stress oxydatif au niveau des poumons et du foie.

#### **III.1.1. Poumons et foie: sièges du stress oxydatif**

De nombreuses études ont décrit la manière dont une substance chimique contenue dans le tabac endommage des gènes des cellules pulmonaires, déclenchant une série de modifications moléculaires, jusqu'à formation du cancer le plus répandu à l'échelle mondiale. On savait de longue date que cette substance chimique, appelée 'benzo(a)pyrène', était l'un des pires agents cancérigènes. Dans l'organisme humain, le BaP est transformé en une autre substance, le benzopyrène-diol-époxyde (BPDE) dont on ignorait jusqu'à présent le rôle chimique exact dans le cancer du poumon, puis, d'autres scientifiques ont établi précisément comment le BPDE altère les cellules du poumon. Après avoir injecté la substance dans des cellules cultivées en laboratoire, ils ont, grâce à la technique de l'amplification génique, démultiplié les brins d'ADN de ces cellules et séquencé le matériel génétique ainsi obtenu. Récemment, le chercheur Prix Nobel de chimie 2015, Aziz Sançar et son équipe ont développé une nouvelle méthode pour cartographier les dommages causés à l'ADN par le BaP (Li et al., 2017). Par ailleurs, puisque le BaP est un hydrocarbure lipophile, l'exposition des cellules hépatiques riches en lipides fait de ces dernières, l'une des premières cibles du BaP. En effet, il déclenche plusieurs mécanismes cellulaires et sa bioactivation par les cytochromes P450 (CYP1) conduit à la formation de métabolites cytotoxiques qui provoquent des dommages à l'ADN ainsi qu'un stress oxydant est généré à la fois par le BaP et les métabolites produits (Moquet et al., 2008).

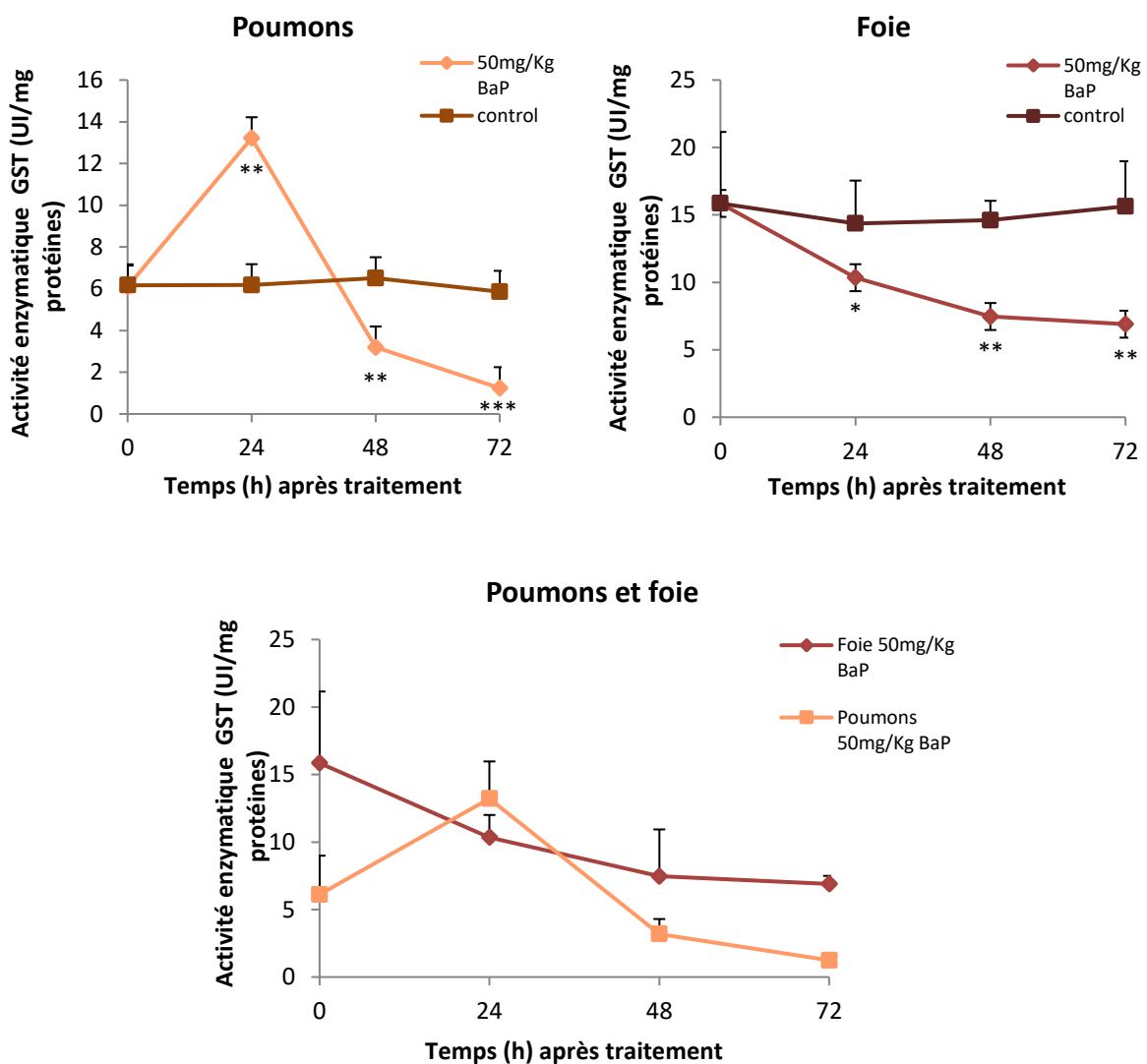
Selon la Figure 15, l'activité enzymatique de la CAT augmente de manière continue, jusqu'à 48 h après administration du BaP, au niveau des poumons et du foie, puis 72 h après, diminue et retrouve une activité normale similaire à celle des souris témoins. Ceci est en accord avec l'étude de Gao et al. (2011), qui décrit une augmentation de l'activité enzymatique de la CAT, corrélée avec une augmentation de la production du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induite par l'administration de 50 mg/Kg de BaP. Puis, cette activité diminue, au bout de 72 h, pour atteindre une valeur normale, au niveau des deux organes (Foie et poumons). La CAT étant



**Fig. 15. Variation de l'activité de la CAT au cours de l'intoxication aigüe.** Au niveau du foie et des poumons, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (contrôle) et intoxiqué par 50 mg/kg de BaP, 24, 48 et 72 heures après intoxication par le BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne±écart-type (n=6). \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ) ; \*\* différence très significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,01$ ) ; \*\*\* différence hautement significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ) ; ns: non significatif, comparé au groupe témoin.

l'enzyme responsable de la dégradation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ceci, peut être due à la diminution de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par le BaP, 72 h après son administration.

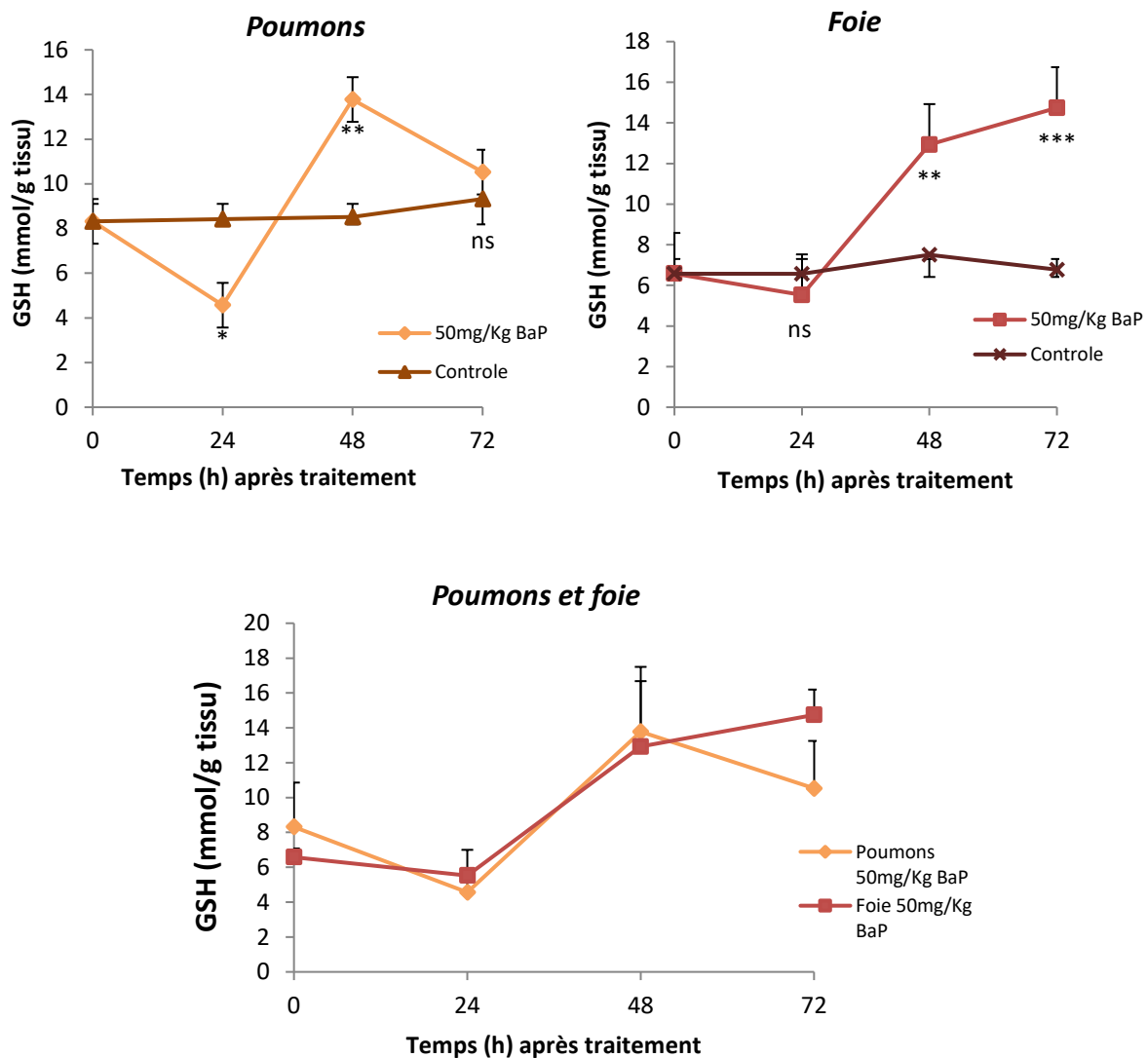
48 et 72 h après exposition au BaP, l'activité enzymatique de la GST démontre une diminution hautement significative, aussi bien, au niveau des poumons ( $p \leq 0,001$ ) que du foie ( $p \leq 0,01$ ) et témoigne d'une diminution des capacités antioxydantes enzymatiques et du prolongement de l'effet du BaP au delà de 24 h, après administration (Fig. 16), ceci est dû à son utilisation excessive dans la neutralisation des RL générés. La GST joue un rôle crucial



**Fig. 16. Variation de l'activité de la GST au cours de l'intoxication aiguë.** Au niveau du foie et des poumons, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (contrôle) et intoxiqué par 50 mg/kg de BaP, 24, 48 et 72 h après intoxication par le BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ). \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ) ; \*\* différence très significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,01$ ) ; \*\*\* différence hautement significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ) ; ns: non significatif comparé au groupe témoin.

dans la détoxification des xénobiotiques, par conséquent, la diminution de son activité enzymatique, au dessous du seuil normal, provoque la promotion de la production de ROS et entraîne une série d'effets sur l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes cellulaires et des organites (Gao et al., 2011).

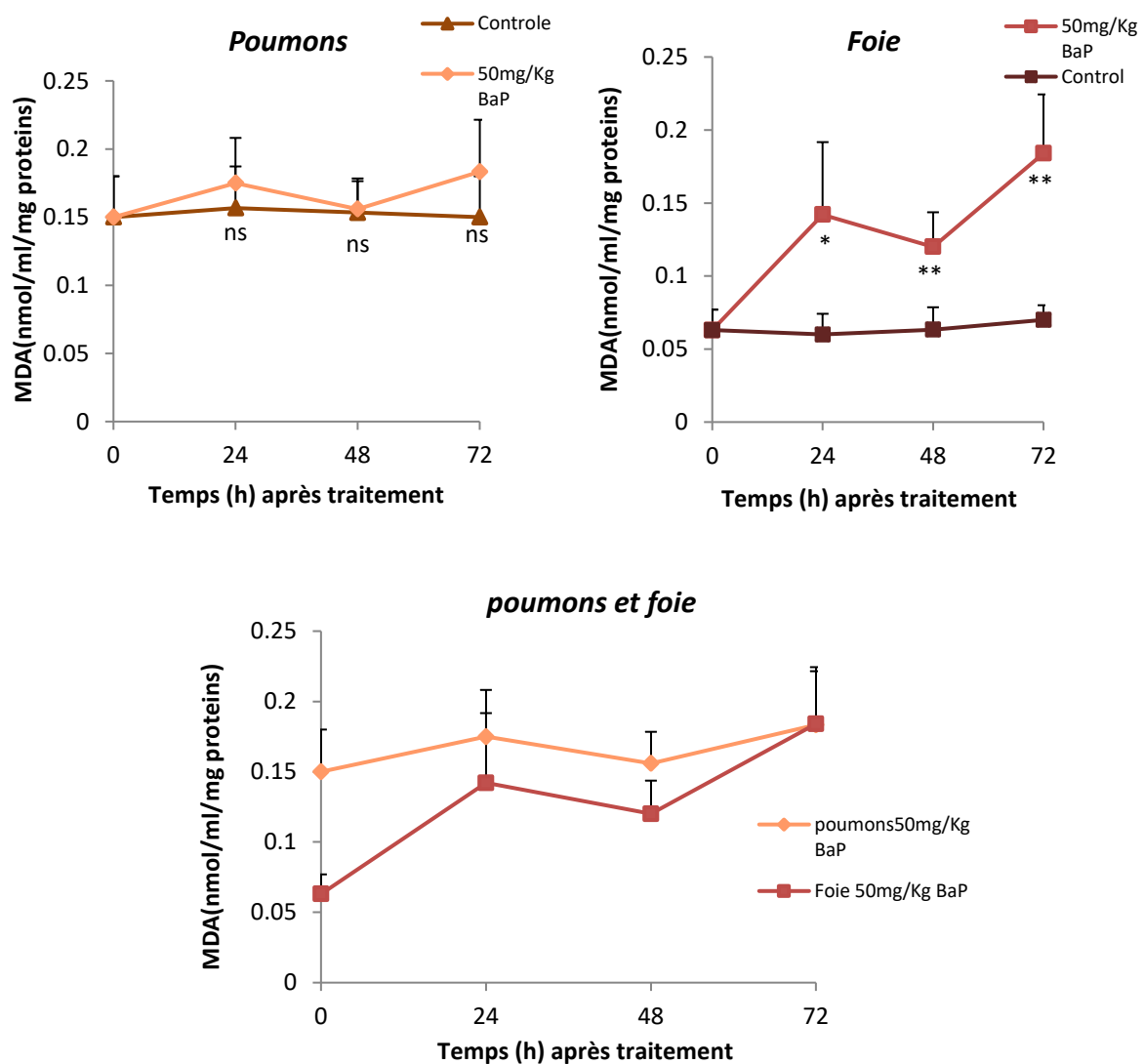
Le taux de GSH augmente de manière très significative, au niveau du foie et des poumons, 48 h après administration du BaP ( $p \leq 0,01$ ) (Fig. 17). Ceci peut être due au fait que, le maximum d'élimination du BaP et de ses métabolites par le système hépatobiliaire a lieu,



**Fig. 17. Variation du taux de GSH au cours de l'intoxication aigüe.** Au niveau du foie et des poumons, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (contrôle) et au groupe intoxiqué par 50mg/Kg de BaP au niveau du foie et des poumons, 24, 48 et 72 h après intoxication par le BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ). \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ) ; \*\* différence très significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,01$ ) ; \*\*\* différence hautement significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ) ; ns: non significatif comparé au groupe témoin.

de 24 à 48 h après exposition, quelle que soit la voie d'exposition (Bonnard et al., 2007). Ce taux continue d'augmenter, légèrement, au niveau hépatique, 72 h après administration, tandis qu'il revient à une valeur normale (Celle du groupe témoin), au niveau des poumons.

En accord avec l'étude de Gao et al. (2011), le taux de MDA reste élevé, 48 et 72 h après l'administration de 50 mg/Kg de BaP, comparé au groupe de souris témoins (Fig. 18). Cette augmentation est significativement plus importante, au niveau hépatique qu'au niveau



**Fig. 18. Variation du taux de MDA au cours de l'intoxication aigüe.** Au niveau du foie et des poumons, chez les souris appartenant aux groupes: témoins (contrôle) et au groupe intoxiquées par 50 mg/kg de BaP, 24, 48 et 72 h après intoxication par le BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ). \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ) ; \*\* différence très significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,01$ ) ; \*\*\* différence hautement significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ) ; ns: non significatif comparé au groupe témoin.



pulmonaire. Cependant, le taux de MDA continue d'augmenter, au niveau du foie, jusqu'à 72 h après l'administration du BaP.

L'augmentation persistante du MDA témoigne de l'augmentation de la peroxydation lipidique, après exposition au BaP. Ceci est en accord avec la littérature, car il est bien connu que ce sont les ROS participant à l'époxydation du BaP, qui causent l'augmentation de l'excrétion du MDA, durant les premiers jours suivant l'injection du BaP. Nous pouvons donc suggérer que le foie est le lieu d'une peroxydation lipidique plus importante qu'au niveau des poumons. En outre, la diminution des capacités antioxydantes enzymatique peut entraîner une accumulation de l'anion superoxyde et une augmentation de la peroxydation lipidique générant un stress oxydatif chez les organismes exposés à des concentrations plus ou moins élevées de HAP (Cillard, 2011).

### **III.1.2. Effet prooxydant de l'acide gallique dans les poumons**

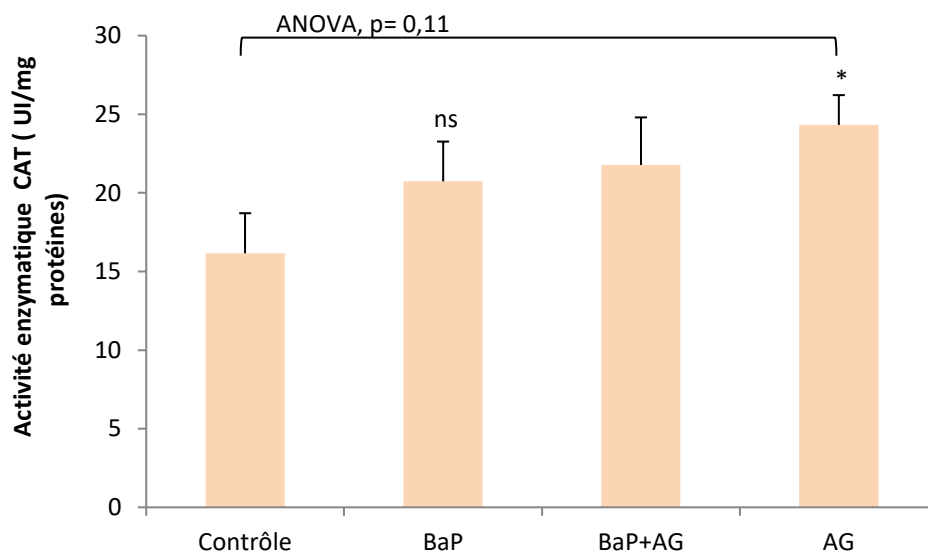
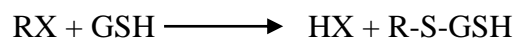
Il existe plusieurs systèmes enzymatiques qui catalysent des réactions pour neutraliser les RL et les ROS. Celles-ci forment les mécanismes de défense endogènes pour aider les cellules à se protéger contre les dégâts induits par les RL. Les enzymes antioxydantes GSH peroxidase, CAT et SOD métabolisent les radicaux intermédiaires toxiques oxydants. Ces enzymes exigent également des cofacteurs tels que le sélénium, le fer, le cuivre, le zinc, et le manganèse pour une activité catalytique optimale. Il a été suggéré qu'une consommation diététique inadéquate de ces minéraux de trace puisse compromettre l'efficacité de ces mécanismes de défense antioxydants.

Les CATs sont des enzymes qui catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, en utilisant un fer ou le cofacteur de manganèse. Elles sont retrouvées au niveau des peroxisomes, dans la plupart des cellules eucaryotes. La CAT en convertissant les molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> joue un rôle important dans l'élimination de ce radical (Deng et al., 2018).

Au niveau pulmonaire (Fig. 19), on note qu'il n'y a pas de différences significatives parmi les quatre groupes d'animaux : Cependant, on remarque une augmentation de l'activité de la CAT chez les souris intoxiquées par le BaP, comparé aux souris témoins mais qui demeure non significative et une faible augmentation de l'activité chez les souris prétraitées par l'AG comparé aux souris intoxiquées par le BaP. L'activité enzymatique de la CAT au niveau pulmonaire est moins importante qu'au niveau hépatique car la production de peroxyde d'hydrogène induite par l'intoxication aigüe au BaP est moindre.

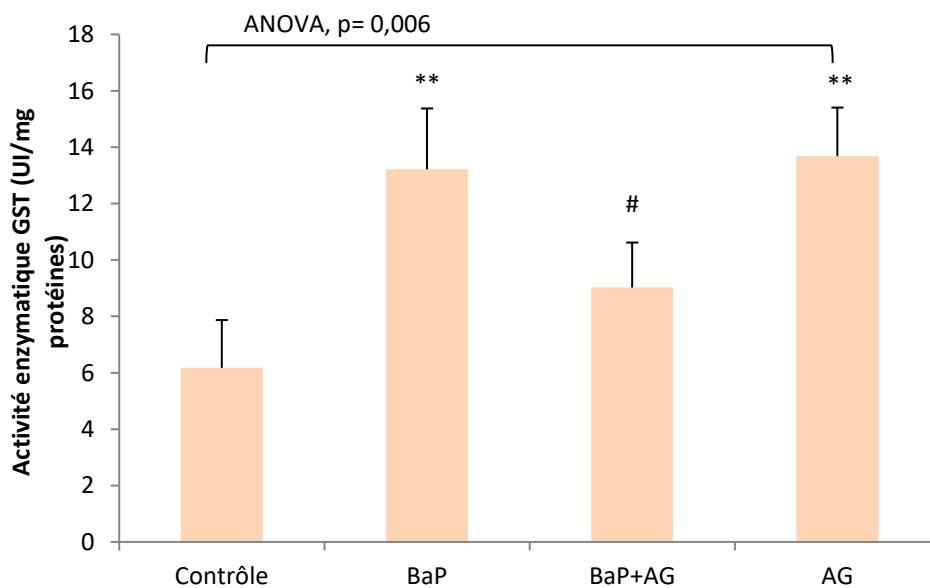
L'AG joue un double rôle étant, à la fois, antioxydant (Effet scavenger sur les ROS) et prooxydant, notamment, avec les enzymes peroxydases tels que la CAT, suivant, la présence ou l'absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, causant des dommages cellulaires, à travers des effets prooxydants en absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et expliquant l'activité enzymatique élevée de la CAT (Qui implique la diminution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) lors du prétraitement par l'AG ainsi que lors du traitement par l'AG seul (Badhani et al., 2015).

La GST est une transférase qui catalyse des réactions du type :



**Fig. 19. Effet de l'AG sur l'activité de la CAT pulmonaire au cours de l'intoxication aigüe.** Au niveau pulmonaire et hépatique, 24 h après intoxication et traitement par l'AG, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (Contrôle), intoxiqué par 50 mg/kg de BaP (BaP), intoxiqué et prétraité par l'AG (BaP+AG) et traité par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne±écart-type (n=6).  $p \geq 0,05$  : Différence non significative entre les quatre groupes ; \* : différence significative, comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ) ; ns: Différence non significative, comparé au groupe témoin.

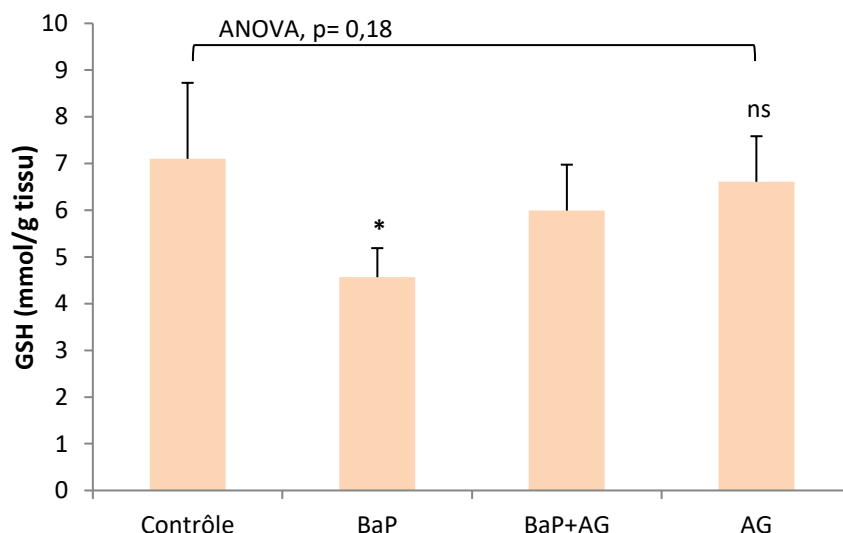
Les enzymes de cette famille sont diversifiées, qu'il s'agisse de protéines cytosoliques, mitochondriales ou microsomales, elles catalysent de nombreuses réactions dont la plus connue est la conjugaison du GSH à des substrats endogènes et xénobiotiques (Udomsinprasert et al., 2005). En effet, pour neutraliser les effets toxiques des composés exogènes carcinogènes tels que la dioxine, les nitrosoamines et les HAP auxquels est constamment exposé l'organisme. Ce dernier, possède un système multi-enzymatique complexe, permettant l'élimination de ces substances hydrophobes par les urines ou la bile. Le foie, mais aussi, d'autres organes ou tissus comme l'intestin, le rein, les poumons et la peau contribuent également, de façon importante au métabolisme et à l'élimination de ces composés. Le métabolisme des xénobiotiques est orchestré en trois phases : I (Réactions d'oxydation), II (Réactions de conjugaison) et III (Systèmes de transport impliquant les protéines ABC). Toute variation dans l'activité de ces enzymes pourra potentiellement avoir des répercussions significatives sur le devenir des composés carcinogènes et/ou médicamenteux et sur les quantités des métabolites produits.



**Fig. 20. Effet de l'AG sur l'activité de la GST pulmonaire au cours de l'intoxication aigüe.** 24 h après intoxication et traitement par l'AG, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (Contrôle), intoxiqué par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiqué et traité par l'AG (BaP+AG) et traité par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ).  $p \leq 0,01$  : Différence très significative entre les quatre groupes ; \*\* différence très significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,01$ ) ; # différence significative comparé au groupe intoxiqué ( $p \leq 0,05$ ).

On remarque, au niveau des poumons, une augmentation très significative de l'activité de la GST ( $p \leq 0,01$ ), au sein du groupe de souris intoxiquées (BaP) comparé au taux normal, observé chez le groupe témoin (Contrôle). Ceci peut s'expliquer par l'expression spécifique, dans le tissu pulmonaire, d'une isoforme de la GST, la GST-M2 (Tang et al., 2010). Par ailleurs, l'AG de par son activité prooxydante, est un scavenger de radicaux libres et peut promouvoir la production de ROS (Par chélation métal, en présence de  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$ ) via la réaction de Fenton. Cette réaction conduit à la production du radical hydroxyl, et par conséquent, au déclenchement d'enzymes détoxifiantes telles que la GST (Badhani et al., 2015). Les poumons affichant une activité enzymatique élevée de la GST témoignent, certainement, de la survenue d'un stress oxydatif. Ce dernier induit la transcription de plusieurs gènes codants pour les GST, afin d'augmenter la protection des cellules contre les effets nocifs de ce carcinogène environnemental, au niveau des poumons.

Le GSH, sous forme réduite, est l'antioxydant majeur des cellules, les protégeant, notamment, des RL générés lors du stress oxydatif. Il existe, sous forme oxydée (GSSG) et réduite (GSH), et intervient dans le maintien du potentiel redox de la cellule et dans un certain nombre de réactions de détoxification et d'élimination des ROS. Le GSH est un pseudo-tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine :  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine, la fonction thiol lui conférant ses principales propriétés biochimiques (Fig. 21) (Bray et Taylor, 1994).

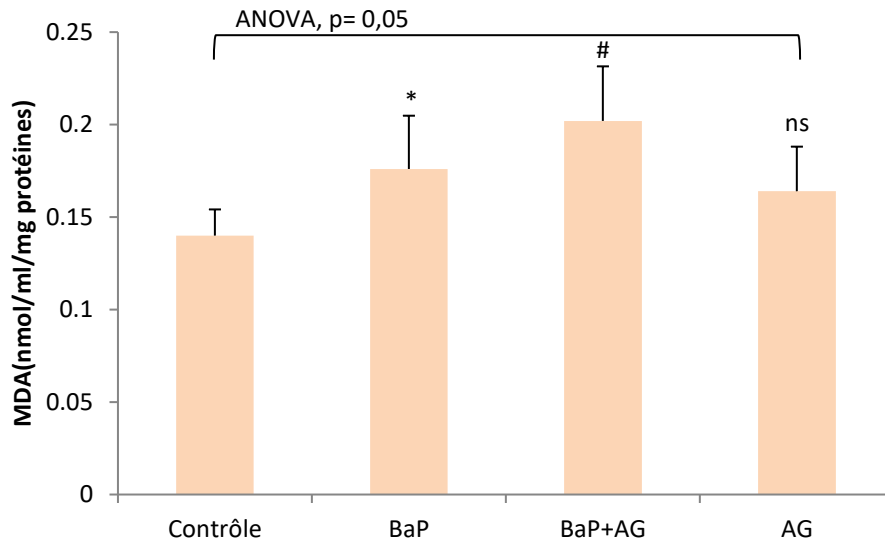


**Fig. 21. Effet de l'AG sur le taux de GSH pulmonaire après intoxication aiguë.** 24 h après intoxication et traitement par l'AG, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (Contrôle), intoxiqué par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiqué et prétraité par l'AG (BaP+AG) et traité par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ).  $p \geq 0,05$  : Différence non

significative entre les quatre groupes ; \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ); ns: non significatif, comparé au groupe témoin.

Le taux de GSH a démontré des variations au sein des 4 groupes de souris, au niveau des poumons. On remarque, chez le groupe intoxiqué par injection IP de 50 mg/kg de BaP (BaP) montre une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) du taux de GSH comparé au groupe témoin, ne recevant que les véhicules (Contrôle). Le groupe intoxiqué par le BaP et pré-traité par 100 mg/kg d'AG (BaP+AG) montre une légère augmentation du taux de GSH mais demeure non significative comparé au groupe intoxiqué. Le dernier groupe, recevant, seulement, 100 mg/kg d'AG (AG), ne démontre pas de différence significative par rapport au groupe témoin (Contrôle). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hegazy et al. (2012) et de Budduluru et al. (2015) ayant rapportés une diminution du taux de GSH, chez les souris traitées par le BaP, sans doute, due à l'utilisation excessive de cet antioxydant dans la neutralisation de fortes concentrations de ROS générés dans ces conditions de toxicité.

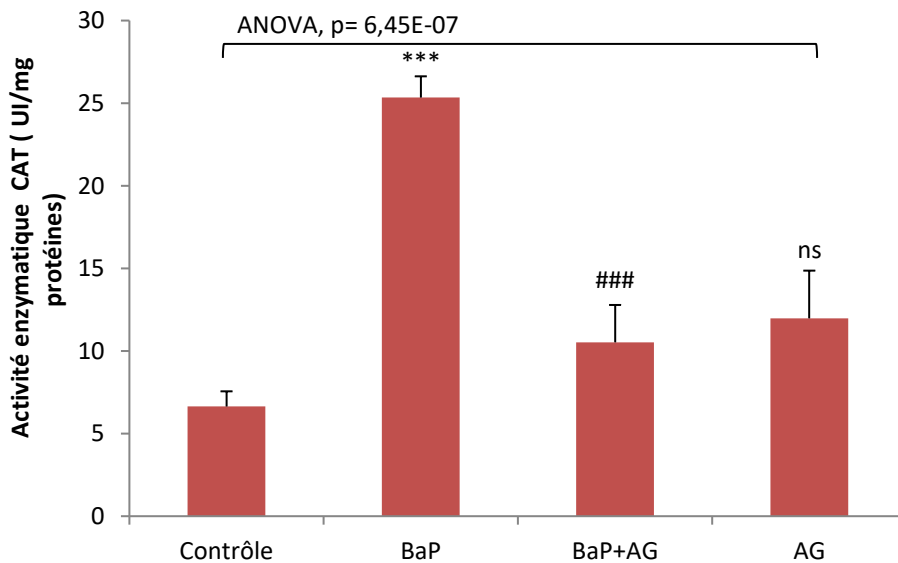
Au niveau des poumons, le BaP induit une augmentation significative de la peroxydation lipidique ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 22), due à sa capacité à générer de grandes concentrations de radicaux libres, et causée par la réactivité de ces derniers, vis-à-vis, de lipides (Selvendiran et al., 2004). En effet, la peroxydation lipidique est un phénomène très important : Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50%) et ce sont les radicaux libres qui, *in vivo*, initient ce processus par l'isolation d'un atome d'hydrogène (H) situé sur l'atome de carbone placé entre deux doubles liaisons (La liaison hydrogène-carbone étant plus faible) conduisant à la formation d'un radical alkyle. Les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^-$ ) et hydroperoxyde ( $\text{HOO}^-$ ) sont les principaux radicaux impliqués et proviennent, notamment, du métabolisme des xénobiotiques et de l'activation des phagocytes au cours de la réaction inflammatoire, puis, provoquent la réduction monoélectronique de l'oxygène pour générer des RL (Cillard, 2011). Par ailleurs, l'AG aurait une action prooxydante, au niveau des poumons, en stimulant la réaction de Fenton, résultant à la production du radical hydroxyle, en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de fer, selon la réaction suivante :  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}$  (Badhani et al., 2015).



**Fig. 22. Effet de l'AG sur le taux de MDA pulmonaire au cours de l'intoxication aigüe.** 24 h après intoxication et traitement par l'AG, chez les souris appartenant aux groupes: témoins (Contrôle), intoxiqué par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiqué et traité par l'AG (BaP+AG) et traité par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ).  $p \leq 0,05$  : Différence significative entre les quatre groupes ; \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ); # différence très significative comparé au groupe intoxiqué ( $p \leq 0,05$ ); ns: différence non significative, comparé au groupe témoin.

### III.1.2. Effet antioxydant de l'acide gallique dans le foie

Au niveau du foie, les différences au sein des groupes des souris sont très marquées ( $p \leq 0,001$ ) (Fig. 23): Le groupe intoxiqué par le BaP (BaP) affiche une augmentation hautement



**Fig. 23. Effet de l'AG sur l'activité de la CAT hépatique au cours de l'intoxication aigüe.** 24 h après intoxication et traitement par l'AG, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (Contrôle); intoxiqué par 50 mg/kg de BaP (BaP); intoxiqué et prétraité par l'AG (BaP+AG) et

*traité par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne±écart-type (n=6).  $p \leq 0,001$  : Différence hautement significative entre les quatre groupes ; \*\*\* différence hautement significative comparé au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ) ; ### différence hautement significative comparé au groupe intoxiqué ( $p \leq 0,001$ ); ns: différence non significative, comparé au groupe témoin.*

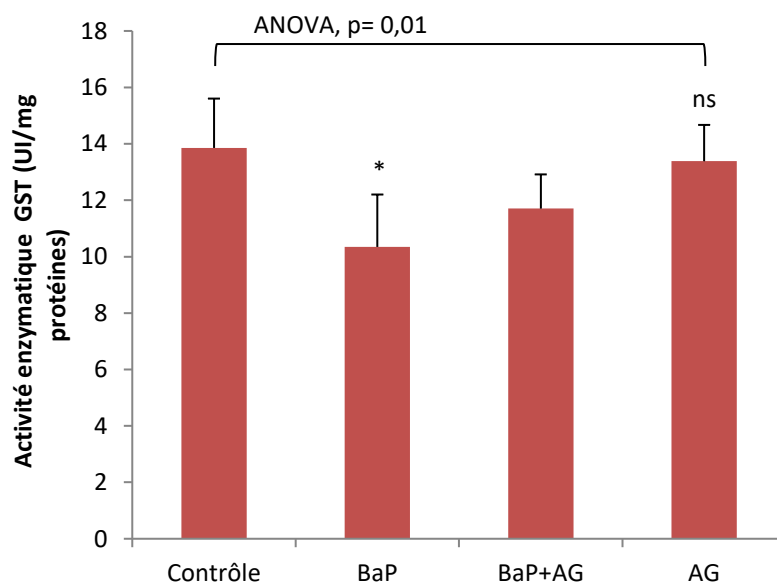
significative de l'activité enzymatique de la CAT, comparé au lot témoin (Contrôle) ( $p \leq 0,001$ ), de même que le groupe prétraité par l'AG (BaP+AG) affiche une nette diminution comparé au lot de souris intoxiquées par le BaP ( $p \leq 0,001$ ). Le dernier groupe, recevant seulement 100 mg/kg d'AG (AG), ne démontre pas de différence significative par rapport au groupe témoin.

Au cours de son métabolisme, le BaP est responsable de la production de ROS tels que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène (Kumar et al., 2013), par le biais des enzymes du cytochrome P450. Ces dernières, étant présentes en majeure partie dans le foie, implique une production de RL plus importante, au niveau hépatique que celle observée au niveau des poumons. Ceci pourrait expliquer que l'augmentation de l'activité enzymatique de la CAT soit en corrélation avec les fortes concentrations de ROS engendrés, notamment, celle du  $H_2O_2$ .

Le prétraitement par l'AG provoque un retour à la normale de l'activité enzymatique de la CAT hépatique, du fait que l'AG soit un puissant antioxydant, à fort pouvoir anti-radicalaire. En effet, ce composé tri-phénolique fournit une protection efficace contre les RL tels que, le radical hydroxyle et l'anion superoxyde, et non radicalaire tel que, le peroxyde d'hydrogène. A une concentration de 4,17 mM, l'AG montre un effet scavenger de 60% sur le  $H_2O_2$  (contre 43% sur le DPPH), le plus fort pouvoir scavenger parmi les différents acides phénoliques.

Les GSTs sont des enzymes polymorphes impliquées dans la conjugaison du GSH à des composés électrophiles nocifs, elles occupent une place très importante dans le système de défense cellulaire. Comme les GSTs détoxiquent les composés carcinogènes, plusieurs études épidémiologiques ont examiné l'incidence de leurs polymorphismes génétiques sur le risque de survenue et/ou l'aggravation de nombreuses pathologies, telles que, les cancers et les maladies cardiovasculaires. Et plus récemment, plusieurs études suggèrent que les GST jouent, aussi, un rôle antioxydant important en protégeant les cellules des dommages occasionnés par les RL et leurs adduits : les hydroxyliperoxydes, les quinones et les carbonyles  $\alpha$  et  $\beta$ -insaturés (Habdous et al., 2004).

Notre étude a montré une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) de l'activité de la GST, au niveau du foie, après l'administration du BaP, chez le groupe intoxiqué (BaP) (Fig. 24). Selon une étude précédente, l'inhibition de l'activité enzymatique de la GST (En dessous de son niveau de base) pourrait promouvoir la production des ROS, leurs effets sur l'intégrité fonctionnelle et structurale des membranes cellulaires et des organelles, et conduire à la diminution de la capacité de détoxification du BaP et l'augmentation de la vulnérabilité au stress oxydatif (Gao et al., 2011). Au cours de cette détoxification, la GST entre en compétition avec l'enzyme EH microsomale (mEH), toutes deux assurent la détoxification du BPDE : toute augmentation de la mEH et/ou toute réduction de l'activité de la GST, entraînent une augmentation de la synthèse de ce toxique.



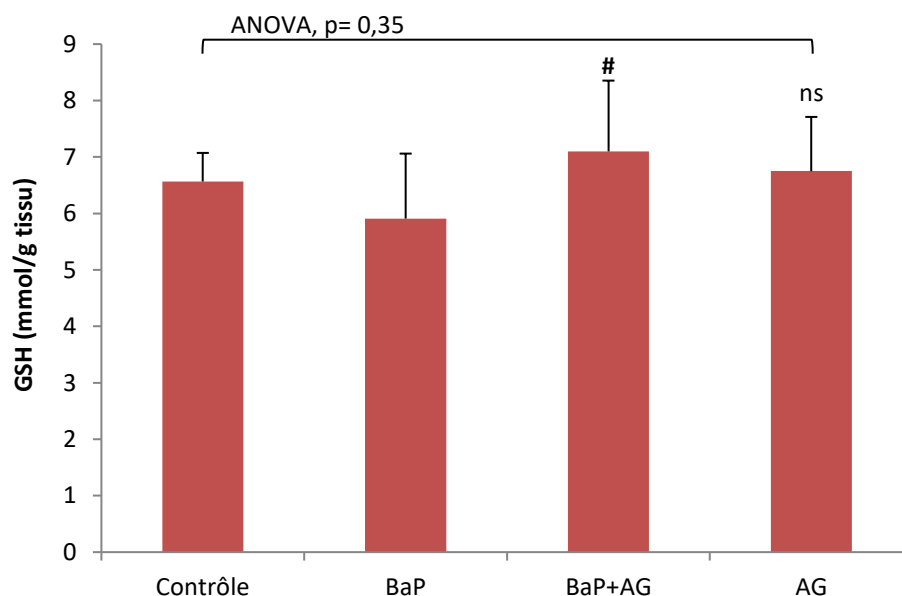
**Fig. 24. Effet de l'AG sur l'activité de la GST hépatique au cours de l'intoxication aigüe.** 24 h après intoxication et traitement par l'AG, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (Contrôle), intoxiqué par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiqué et traité par l'AG (BaP+AG) et traité par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ).  $p \leq 0,01$  : Différence très significative entre les quatre groupes ; \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ); ns: différence non significative, comparé au groupe témoin.

L'activité de la GST a augmenté vers une valeur proche de la normal, chez le groupe de souris, recevant l'AG en prétraitement (BaP+AG). D'après des études sur les intoxications aigües induites chez la souris, le prétraitement par l'AG, à une dose de 100 mg/Kg, induit une augmentation de l'expression de la GST, en particulier, au niveau hépatique, où l'expression



de l'isoenzyme GST $\alpha$ 3 est la plus élevée (Elle constitue 80% des GST totales dans le foie d'un humain adulte). Celle-ci contribue, en majeure partie, à l'activité des GSH peroxydases sélénium-indépendantes, en présence de GSH, et protège le foie des dommages oxydatifs causés par le BaP (Ma et al, 2014 ; Tang et al., 2010 ; Olayinka et al., 2015). L'administration de l'AG seul, chez les souris (AG), provoque une diminution significative de l'activité de la GST vers une valeur proche du témoin (Contrôle). Grâce à son action à la fois inhibitrice et scavenger des ROS, l'AG parvient à diminuer l'activité de cette enzyme par une action indirecte. En effet, la GST contient un résidu cystéine (Par sous unité) dont le groupement thiol est modifié par oxydation par les ROS, permettant ainsi son activation (Shinno et al., 2005).

Le GSH protégerait les cellules de plusieurs polluants, incluant certains issus de la combustion de carburants et de la fumée de cigarette. Les médecins utilisent les médicaments précurseurs de GSH dans plusieurs affections pulmonaires, incluant, l'asthme, la bronchite chronique et l'emphysème. De nouvelles propriétés thérapeutiques sont mises en évidence pour les dommages causés par la fumée de cigarette, la fibrose pulmonaire et d'autres maladies (Morris et Bernard, 1994). Le foie, organe majeur d'entreposage du GSH est déficient lors d'hépatite alcoolique et virale (Hépatites A, B et C). L'augmentation des niveaux de GSH restaure les fonctions du foie (Barbaro et al., 1996) (Fig. 25).



**Fig. 25. Effet de l'AG sur le taux de GSH hépatique après intoxication aiguë.** 24 h après intoxication et traitement par l'AG, chez les souris appartenant aux groupes: témoin (Contrôle), intoxiqué par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiqué et prétraité par l'AG (BaP+AG) et traité par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).  $p \geq 0,05$  : Différence non

*significative entre les quatre groupes ; # Significativement différent comparé au groupe intoxiqué ( $p \leq 0,05$ ); ns: non significatif, comparé au groupe témoin.*

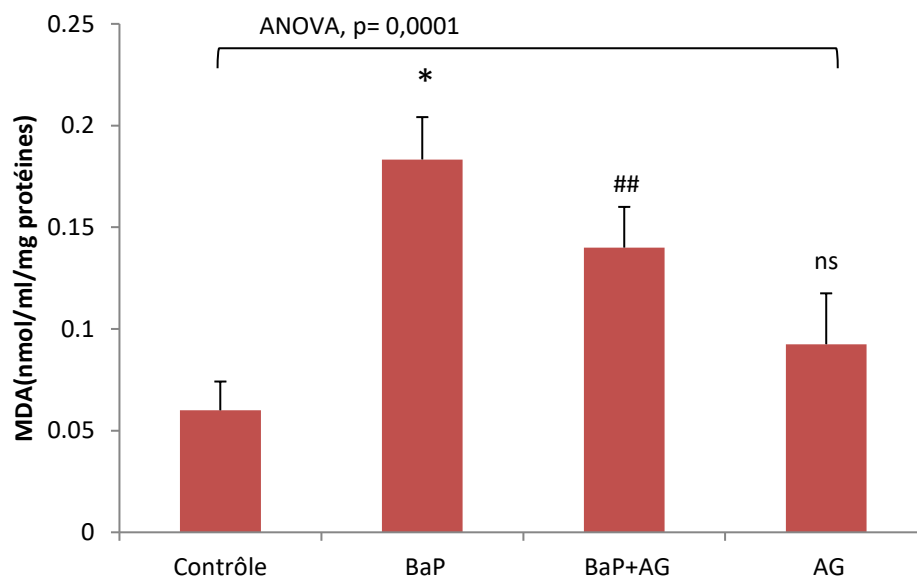
Le taux de GSH, au niveau du foie, démontre des résultats semblables à ceux, précédemment, observés au niveau des poumons, en effet le groupe pré-traité par 100 mg/kg d'AG et intoxiqué par le BaP (BaP+AG) montre une augmentation significative du taux de GSH ( $p \leq 0,05$ ), comparé au groupe intoxiqué (BaP), cependant, ce dernier affiche une diminution du taux de GSH mais qui demeure non significative, comparé au groupe témoin (Contrôle). Le groupe recevant seulement 100 mg/kg d'AG (AG) ne démontre pas de différence significative par rapport au groupe témoin (Contrôle). Nous pouvons suggérer que la faible diminution du taux de GSH, chez les souris intoxiquées, est due à la présence d'un taux élevé de GSH, au niveau hépatique, le foie étant le principal organe responsable des processus de détoxification des xénobiotiques. Selon plusieurs études, l'augmentation du taux de GSH dans le cas du prétraitement avec l'AG, s'explique par la capacité de ce dernier à réduire le GSSG en GSH, augmentant ainsi son taux cellulaire (Hsu et yen, 2007).

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne d'oxydation nocive pour les cellules et provoquée par les dérivés de l'oxygène, en particulier, les radicaux hydroxyles ou peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ). Ses conséquences sont multiples : diminution de la fluidité des membranes plasmique, augmentation de la charge négative de surface et perturbation des membranes des organites cellulaires. On observe ainsi une inactivation des enzymes membranaires, une oxydation des groupements thiols, une augmentation de la perméabilité membranaire, un gonflement des mitochondries avec inhibition de la chaîne respiratoire et la perte du cytochrome C.

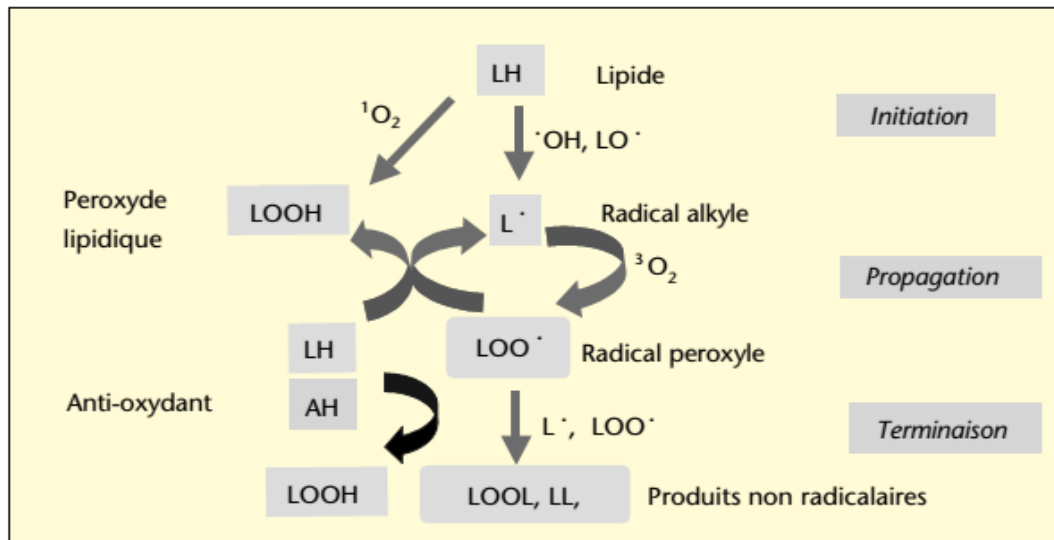
Le MDA cytosolique est un marqueur de l'oxydation des lipides. Il est considéré comme un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras poly-insaturés. Les taux élevés de MDA témoignent de l'oxydation des lipides, et donc, d'un stress oxydatif. En plus du fait de la présence des lipides en grande quantité et de leur rôle essentiel dans l'organisme, les membranes cellulaires sont riches en lipides, les rendant particulièrement sensibles au stress oxydatif. En effet, les acides gras poly-insaturés et l'oxydation des lipides plus que d'autres, sont un signe essentiel de stress oxydatif. En outre, si l'oxydation des lipides est un des facteurs scientifiquement prouvé du risque cardiovasculaire, elle signe aussi un stress

oxydatif général de l'organisme (Notre cerveau par exemple est particulièrement riche en lipides).

Les différences de taux de MDA cytosolique entre les quatre groupes de souris et entre les deux organes étudiés sont évidentes ( $p \leq 0,001$ ), de sorte que, le foie semble démontrer un niveau de peroxydation lipidique plus élevée que les poumons. En effet, le taux de MDA cytosolique chez le groupe de souris intoxiquées par le BaP (BaP) est significativement plus élevé que celui des souris saines appartenant au groupe témoin (Contrôle) ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 26). Ceci, s'apparente à de multiples études menées chez les souris, où le BaP entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique des tissus, au niveau du foie, ainsi que, des reins, chez les souris swiss albinos, suggérant une susceptibilité de ces organes au stress oxydatif induit par le BaP (Asha et Girija, 2011). De même, l'administration intrapéritonéale d'une dose de 50 mg/Kg de BaP, à des souris, entraîne une augmentation du taux de MDA ainsi que l'augmentation des métabolites quinones, au niveau du col de l'utérus. En outre, les ROS générées participent à l'époxidation de BaP et provoque l'excrétion de MDA, dès le premier jour après injection du BaP (Gao et al., 2011).



**Fig. 26. Effet de l'AG sur le taux de MDA au cours de l'intoxication aiguë.** 24 h après intoxication et traitement par l'AG, chez les souris appartenant aux groupes: témoins (Contrôle), intoxiqué par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiqué et traité par l'AG (BaP+AG) et traité par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ).  $p \leq 0,001$  : Différence hautement significative entre les quatre groupes ; \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ) ; ## différence très significative comparé au groupe intoxiqué ( $p \leq 0,01$ ) ; ns: différence non significative, comparé au groupe témoin.



**Fig. 27. Mécanisme de l'autooxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet (Cillard, 2011).**

Le prétraitement par l'AG diminue de manière hautement significative la peroxydation lipidique au niveau du foie des souris appartenant au groupe (BaP) ( $p \leq 0,01$ ), en accord avec les résultats de Padma et al. (2011) Cette diminution est dû à l'action scavenger de l'AG contre les ROS, particulièrement, reconnu pour sa grande capacité à piéger le radical hydroxyle et les peroxyde d'hydrogène, au niveau du foie (Badhani et al., 2015).

### III.1.4. Conclusion

Les effets aigus des dommages oxydatifs induits par le BaP sur divers organes ne sont toujours pas clairs. Dans cette première partie de l'étude, nous avons, donc, évalué le stress oxydatif dans le foie et les poumons des souris afin d'étudier la toxicité aigüe du BaP. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature, notamment ceux de Deng et al. (2018) où l'administration du BaP a entraîné une perturbation des réponses antioxydantes dans les deux organes. En effet, des variations significatives des activités des enzymes SOD, CAT, GST, une diminution significative du taux du GSH et une augmentation significative du taux de MDA (Et donc, de la peroxydation lipidique) ont été observées de 24 h jusqu'à 72 h après injection du BaP.

Le prétraitement par la substance bioactive (AG) est venu moduler les effets du stress oxydatif engendrés par le BaP, suivant l'organe ciblé. Etant donné que tout antioxydant peut devenir pro-oxydant, l'AG jouerait un double rôle : Une action antioxydante, au niveau du foie, en tant qu'antioxydant préventif, en interceptant ou en empêchant la formation des ROS, responsable, notamment, de l'initiation de la peroxydation des lipides, par chélation des métaux de transition comme le fer (Cillard, 2011), et une action prooxydante au niveau des poumons, par la production des ROS qui se traduit, notamment, par l'augmentation de la peroxydation lipidique à ce niveau (Chen et al., 2013). Par ailleurs, l'AG peut soit stimuler ou inhiber la production du radical hydroxyle, selon les constantes de stabilité avec les ions ferriques, mais aussi, selon la concentration de l'AG. A faible concentration, l'activité prooxydante domine, à cause de la réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  et conduit à la formation du radical hydroxyl tandis qu'à forte concentration, l'activité antioxydante prédomine par effet scavenger du radical (Badhani et al., 2015).

Ces résultats représentent un premier pas vers la compréhension et l'évaluation de la toxicité aigüe du BaP, à travers l'évaluation du stress oxydatif mais d'autres approches sont à prévoir pour en découvrir, d'autres mécanismes de toxicité, sur le plan moléculaire. En outre, le rôle des antioxydants dans la prévention des maladies n'est presque plus à prouver, de même que, dans l'élimination de plusieurs cancérogènes, cependant, d'autres études seront nécessaires pour expliquer la duplicité du rôle de l'AG, à travers d'autres paramètres et d'autres conditions expérimentales, notamment, la recherche d'un effet dose-dépendant.

### III.2. Modulation de l'expression des galectines 3 et 8 par l'acide gallique dans la toxicité subaigue du benzo(a)pyrène

L'étude de Labib et al. (2012) a mis en évidence le potentiel d'une exposition subaigüe au BaP sur le changement d'expression génétique. L'objet de celle-ci était d'identifier les éventuels tissus spécifiques pouvant mener à une transformation cancéreuse, chez la souris adulte, pendant 28 jours consécutifs de gavage oral par le BaP. D'autres études ont analysé le transcriptome pulmonaire, la fréquence de mutations et d'adduits d'ADN formés, tout en comparant ces résultats avec les réponses biologiques différentielles, entre les deux organes: poumons et foie, dans le cas de l'exposition aigüe et subaigüe au BaP. A la lumière de ces résultats, il semblerait que la cancérogenèse pulmonaire soit prévalente chez la souris, et ceci est expliqué par une rétention importante de BaP, au niveau des poumons qui est due à une plus grande induction des enzymes CYP1a1 et CYP1b1, au niveau des tissus pulmonaires. Les niveaux d'adduits, dans un tissu et à un moment donné, est en fonction de la conversion métabolique du BaP en métabolites réactifs par les enzymes de phase I du métabolisme des xénobiotiques, de détoxification de phase II, du taux de réparation des adduits et du taux de turnover cellulaire. Ce sont, donc, tous ces éléments réunis qui engendrent une spécificité des deux organes (Zuo et al., 2014).

L'étude concernant l'expression globale des gènes, chez des souris males adultes après exposition au BaP par gavage oral, et la réponse transcriptomique pulmonaire a révélé des changements de la voie de signalisation du récepteur des cellules B (BCR), l'inflammation et la réponse aux dommages causés à l'ADN. En effet, il a été noté que la réponse était différente au niveau du tissu pulmonaire, et dans un certain point, plus intense comparée à celle du foie des mêmes souris. Le stress oxydatif, le métabolisme des xénobiotique, la signalisation de l'AhR et le métabolisme du glutathion sont les voies communément affectées dans les deux tissus pulmonaire et hépatique. Cependant, la voie de signalisation du BCR était négativement régulée, de manière unique, au niveau des poumons, témoignant d'une immunodéficiences primaire potentielle (Labib et al., 2012).

L'ADN ne sert pas physiquement de support direct à la synthèse des protéines, il existe un intermédiaire entre la séquence d'ADN -unité d'information- et la protéine spécifiée, ce qui constitue un flux d'information génétique dans la cellule. Les Gals forment une famille de lectines animales solubles caractérisées par leur domaine de liaison aux sucres, conservé au cours de l'évolution, et leur affinité pour des glycoconjugués contenant des  $\beta$ -galactosides.

Chaque Gal présente un profil d'expression spatio-temporelle, des ligands et des partenaires spécifiques. Par exemple, les souris ayant une mutation nulle pour les Gals 1, 3 ou 7 sont viables, mais présentent des défauts multiples en condition de stress (Advedissian et al., 2015). Pendant les années 2000, la méthode de clonage par l'ADNc a permis l'augmentation rapide des études structurales sur les Gals qui sont présumées jouer des rôles importants dans les différents systèmes biologiques tels que l'organisation tissulaire, l'immunité et le développement. Les ADNc de 12 membres de la famille des Gals ont été isolés, caractérisés et classés en trois sous groupes : prototype, type chimère et type tandem (Kasai et Hirabayashi, 1996).

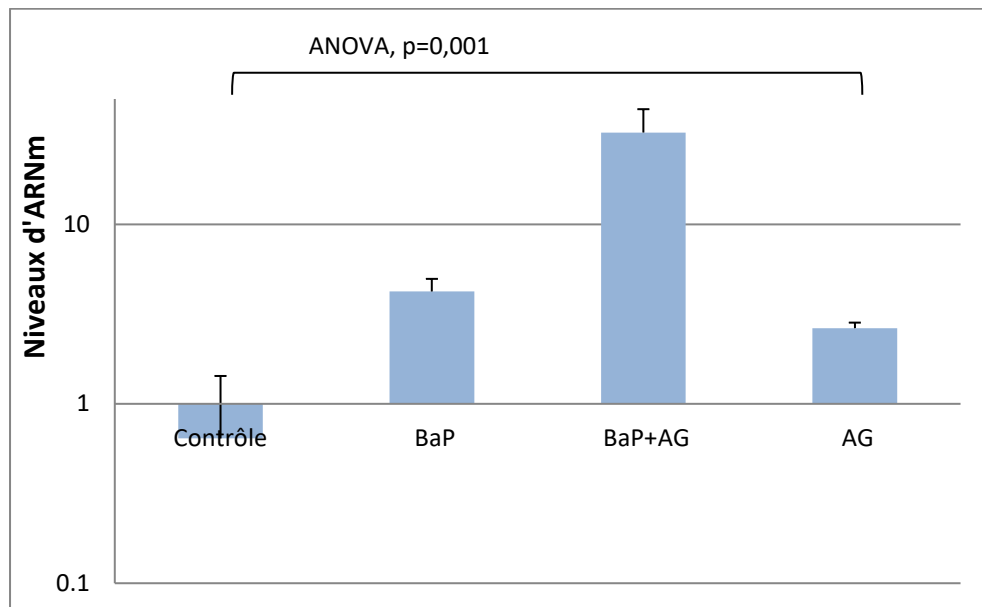
### **III.2.1. Expression de l'ARNm de la galectine 8**

La Gal 8 appartient à un groupe de Gals appelé 'type tandem' dans laquelle Gal 4 est la plus connue et la mieux étudiées (Recherche et al., 1997 ; Cao et Guo, 2016). Cette Gal, ainsi que, les Gal 1, 3 et 9 sont distribuées dans différents types cellulaires, alors que, d'autres telles que les Gals 2, 4 et 7 présentaient une distribution nettement plus restreinte (Cederfur et al., 2008). La Gal 8 est une protéine qui, après sa sécrétion, agit comme une protéine de la matrice cellulaire dans la promotion de l'adhésion cellulaire par liaison à des intégrines de la surface cellulaire, formant un complexe «Gal 8-intégrine» (impliquant une interaction sucre-protéine) qui déclenche une cascade de signalisation, notamment, celle de la voie de la mitogen activated protein kinase (MAPK) qui aboutit à l'activation de facteurs de transcription impliquée dans la réponse au stress et dans l'inflammation (Levy et al., 2006).

#### **III.2.1.1. Induction par le benzo(a)pyrène de la surexpression hépatopulmonaire de la galectine 8**

Nous avons observé une augmentation hautement significative de l'expression de l'ARNm Gal 8 par un facteur de 7 fois, au niveau des poumons, chez les souris intoxiquées par 50 mg/kg de BaP comparé aux souris témoins (Fig. 28). Selon l'étude de Carlson et al. (2007), Gal 8 induit la production de l'anion superoxyde dans les neutrophiles humains apprêtés à des taux comparables à ceux d'un facteur chimiotactique formylmethionyl-leucyl-phenylalanine qui sert de control positif de l'impulsion oxydative. C'est donc dans ce contexte que l'on pourrait expliquer l'expression augmentée de Gal 8 au cours de l'intoxication par le BaP. Cependant, nous ignorons beaucoup à propos des mécanismes de

régulation de cette Gal dans le contexte de stress oxydant, aussi bien sur le plan de la transcription que de la traduction. De plus, en dépit de son expression répandue (Poumons, reins, foie, cœur et cerveau) son rôle dans le stress oxydatif reste encore à élucider (Rabinovich et al., 2002).



**Fig. 28. Expression pulmonaire de l'ARNm de la Gal 8.** L'expression de l'ARNm Gal 8 a été analysée par PCR quantitative. Les groupes de souris employées sont : témoins (Contrôle), intoxiqués par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiqués et prétraités par l'AG (BaP+AG) et traités par l'AG seul (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne±écart-type (n=6).  $p \leq 0,001$  : Différence hautement significative entre les quatre groupes.

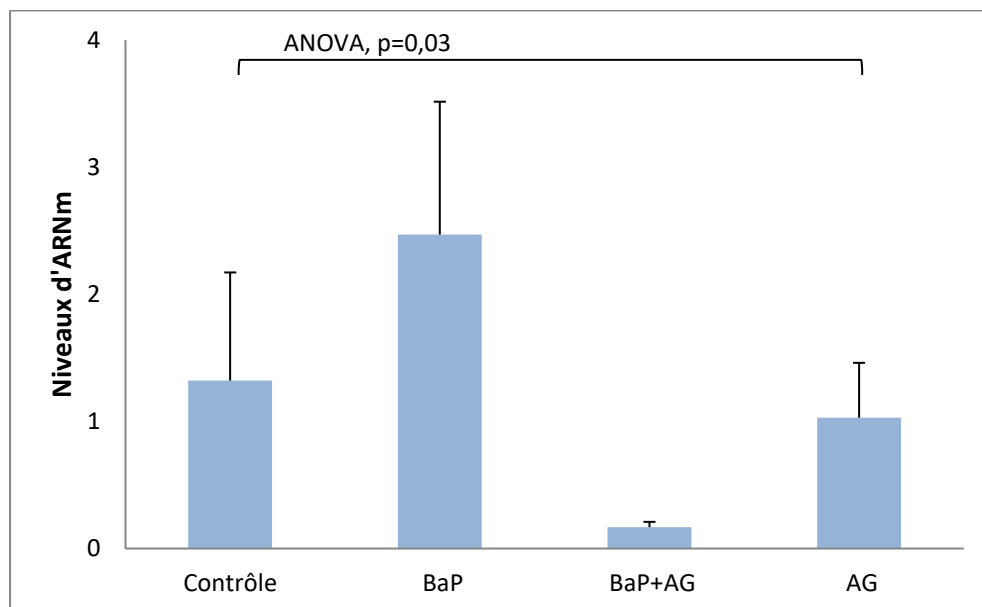
La Gal 8 est largement exprimée dans les tissus normaux, ainsi que dans les tissus tumoraux, notamment au cours de la progression métastatique dans l'adénocarcinome pulmonaire (Anderson et Jenkinson, 2000). C'est cette différence du niveau d'expression de la Gal 8 entre les tissus normaux et les tissus du cancer pulmonaire qui pourrait ouvrir la voie à l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour la prévention et le traitement du cancer du poumon (Chang et al., 2017). Par ailleurs, contrairement à Gal 3 (Impliquée d'avantage dans les stades précoces des cancers), Gal 8 semble intervenir aux stades plus avancés de la progression tumorale.

Il a été démontré que, malgré, des dérégulations de l'expression génétique induites par l'exposition aigüe au BaP, notamment, au niveau du foie, aucun changement dans l'expression de l'ARNm Gal 8 n'a été rapporté (Yauk et al., 2011). Cependant, ce n'est qu'après 28 jours d'exposition de souris au BaP, à des doses de 25 mg/kg, 50 mg/kg et 75



mg/kg qu'une réponse génétique a été enregistrée. Cette dernière se traduisait par l'augmentation des adduits d'ADN et de mutations trans-gènes au niveau hépatique. En effet, le BaP atteignant le foie et métaboliquement actif induise des adduits stables et parvient à produire la réponse toxique attendue qui consiste à l'activation de l'expression des gènes impliqués dans les voies d'arrêt du cycle cellulaire, la réponse aux dommages causés à l'ADN, l'apoptose, la réponse immunitaire et l'inflammation (Malik et al., 2012).

Selon la Figure 29, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'ARNm Gal 8, au niveau du foie, chez les souris du groupe intoxiqué par le BaP, comparé au groupe de souris témoins. La Gal 8 est naturellement exprimée, au niveau du foie ce qui explique son niveau d'expression génétique normal, chez les souris appartenant au groupe témoin. L'expression de la Gal 8 est, aussi, positivement corrélée avec l'apparition des néoplasmes et la surexpression témoigne de l'évolution de ces derniers à travers la croissance et développement métastatique (Levy et al., 2006). De plus, il a été démontré que son expression était régulée selon le stade de développement : de très faibles taux d'expression, au niveau des embryons et des taux plus élevés au niveau des tissus adultes, d'où son rôle dans la croissance cellulaire.



**Fig. 29. Expression hépatique de l'ARNm de la Gal 8.** L'expression de l'ARNm Gal 8 a été analysée par PCR quantitative. Les groupes de souris employées sont : témoins (Contrôle), intoxiqués par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiqués et prétraités par l'AG (BaP+AG) et traités par l'AG seul (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=6).  $p \leq 0,05$  : Différence significative entre les quatre groupes.

Par ailleurs, différentes études ont démontré que la Gal 8 est impliquée dans l'inflammation et est capable de moduler les réponses physiopathologiques dans divers types cellulaires comme les plaquettes humaines (Cattaneo et al., 2014). Ces dernières expriment deux isoformes de Gal 8 exposées à leur surface, après stimulation par la thrombine. De la même manière, son expression au niveau des cellules vasculaires est induite dès leur activation. Aussi, l'expression de cette Gal est augmentée au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins entourés d'infiltrats inflammatoires péri-vasculaire (Stancic et al., 2011).

La Gal 8 agit donc comme une molécule pro-inflammatoire dans différents types de cellules immunitaires et autres. L'un des mécanismes impliqués dans ce processus est la phosphorylation de la sous unité p65 de NFκB coordonnant l'expression de gènes pro-inflammatoires, ainsi que la promotion de la libération de différentes cytokines inflammatoires (Tribulatti et al., 2012). Etant donné que la toxicité induite par le BaP implique l'activation de NFκB, après liaison au AhR, au niveau du foie chez la souris (Cui et al., 2017), nous pouvons suggérer que l'augmentation modérée de l'expression de Gal 8 chez les souris intoxiquées par le BaP pourrait être due à l'intervention de cette lectine dans cette voie.

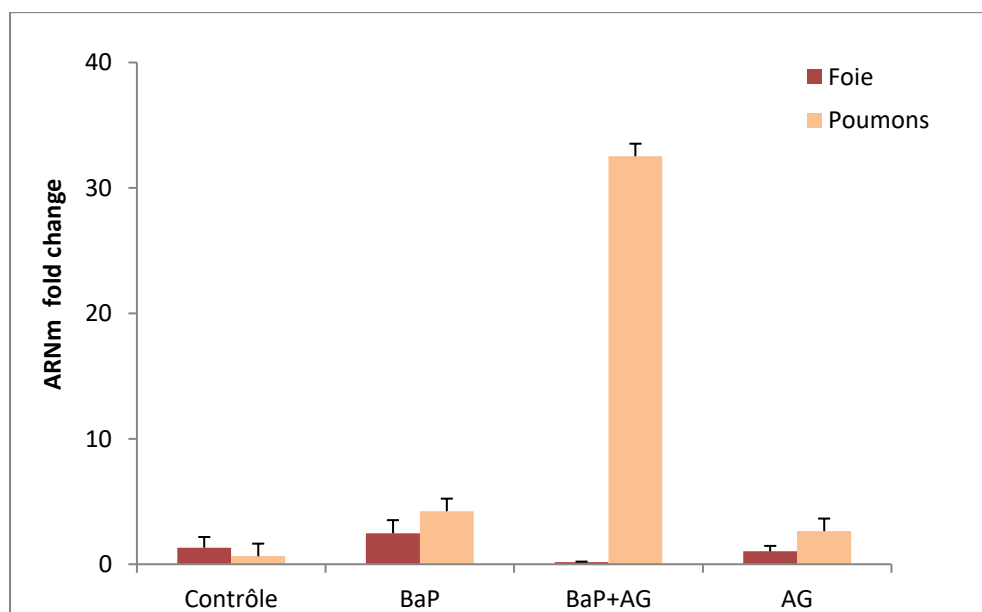
### **III.2.1.2. Modulation contrastée par l'acide gallique de l'expression hépato-pulmonaire de l'ARNm galectine 8**

Au niveau des poumons, nous avons constaté une surexpression de Gal 8 chez les souris intoxiquées par le BaP et prétraitées par l'AG, comparativement avec les souris intoxiquées par le BaP (Fig. 28). De plus, nous avons noté une faible augmentation de Gal 8 chez le groupe de souris traitées par l'AG seule par rapport au groupe intoxiqué par le BaP. La Gal 8 (Tout comme la Gal 4) aurait une activité pro-apoptotique, démontrée *in vitro*, non pas en induisant les programmes apoptotiques complets, mais par la promotion de l'exposition réversible de la phosphatidylserine et préparant par la suite les leucocytes vivant à la phagocytose (Sundblad et al., 2013).

La Gal 8 induit l'apoptose dans les cellules T jurkat à travers l'activation de la voie phospholipase-D/acide phosphatidique, résultant à l'activation de ERK1/2 qui conduit à l'expression du ligand du facteur de la mort cellulaire Fas (Norambuena et al., 2009). Aussi, elle induit l'apoptose des cellules thymocytes CD 4 et CD8 à travers l'activation des caspases et même chez les cellules mononucléaires humaines activée par les anti-CD 3 et anti-CD 28

(Tribulatti et al., 2007). Dans ce contexte, nous pouvons imaginer que l'augmentation de l'expression de la Gal 8 chez les souris intoxiquées par le BaP et prétraitées par l'AG pourrait être associée à l'activité pro-apoptotique de l'AG, au niveau des poumons. Cette dernière interfère dans les voies impliquées dans le processus apoptotique, bien que cela reste à élucider (Liu, 2005).

Au niveau du foie, nous avons observé une diminution importante de l'expression de la Gal 8 par facteur de plus de 12 fois dans le groupe de souris prétraitées par l'AG et intoxiquées par le BaP, comparée au groupe de souris intoxiquées par le BaP (Fig. 29). Le groupe de souris traitées par l'AG seul a présenté un taux d'expression similaire à celui observé, chez les souris appartenant au groupe témoin (Fig. 28 et 30).



**Fig. 30. Comparaison de l'expression tissulaire de l'ARNm Gal 8.** L'expression pulmonaire et hépatique de l'ARNm Gal 8 a été analysée par PCR quantitative et comparée entre les deux organes. Les groupes de souris employées sont : témoins (Contrôle), intoxiquées par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiquées et prétraitées par l'AG (BaP+AG) et traitées par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ).

Etant donné que la toxicité induite par le BaP implique l'activation du NF $\kappa$ B (Après liaison au AhR) au niveau du foie (Cui et al., 2017) et que Gal 8 agissait comme molécule pro-inflammatoire qui est présente en grande concentration dans les cellules synoviales de patientes atteints d'arthrite rhumatoïde, ainsi que chez le model animal réalisé chez les souris (Tribulatti et al. 2012), nous avons suggéré que la diminution de l'expression hépatique de Gal 8 chez les souris prétraitées par l'AG pourrait s'expliquer par le fait que l'AG exerce une

activité anti-inflammatoire à travers l'inhibition de cette même voie. En effet, l'AG parvient à travers des effets épigéniques à supprimer l'activité du NF- $\kappa$ B et à libérer des cytokines au niveau des monocytes humains et le tissu du colique chez les souris atteintes de colite ulcéreuse (Lee et al., 2015). Selon l'étude menée par Aglan et al. (2017), l'AG exerce une activité anti-inflammatoire, en entravant la voie NF- $\kappa$ B et l'expression des cytokines et chimiokines au cours du développement du carcinome hépatocellulaire. Le facteur NF- $\kappa$ B est connu pour être impliqué dans la carcinogenèse hépatique, c'est un facteur de transcription, régulant l'expression de différents gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la résistance à la mort cellulaire, l'inflammation et la carcinogenèse. Le taux d'expression de la Gal 8, chez les souris traitées par l'AG seul étant égale à celui enregistré, chez les souris témoins révèle que l'AG ne joue pas de rôle pro-oxydant, au niveau du foie et parvient à garder une certaine homéostasie cellulaire.

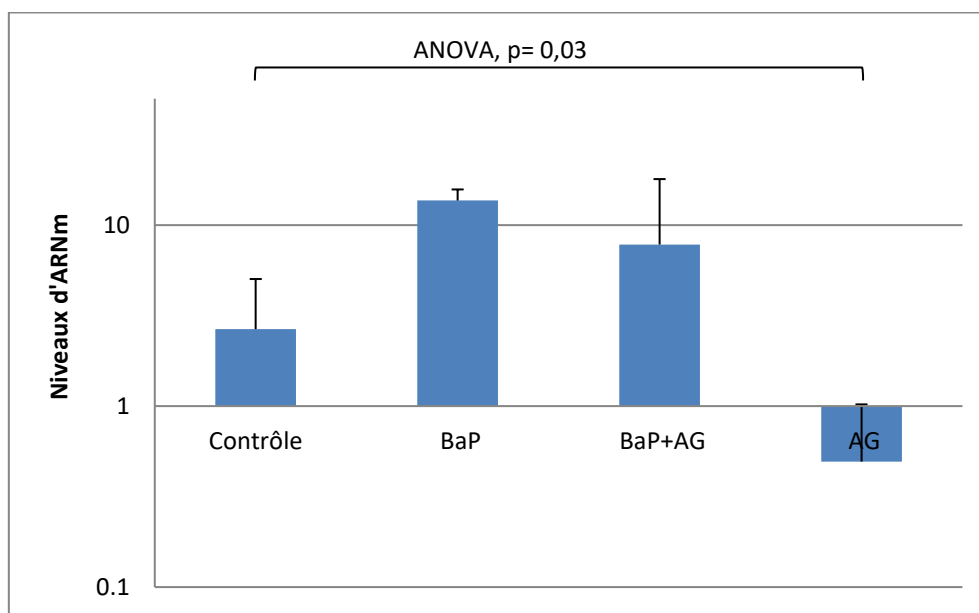
### III.2.2. Expression de l'ARNm de la galectine 3

Les Gals 1 et 3 sont associées à l'épissage de l'ARNm au niveau des lysats cellulaires *in vitro*. Selon la documentation, la Gal 3 est localisée à la fois au niveau du noyau et du cytoplasme de différents types cellulaires. L'immunoblot quantitatif de fractions subcellulaires dérivées de culture quiescentes et prolifératives de fibroblastes révélait que la localisation de la Gal 3 différait, selon, l'état de prolifération de ces cellules. Cette localisation varie, aussi, au long de l'axe crypt-à-surface de l'épithélium du côlon humain où la protéine est concentrée dans le nuclei des cellules épithéliales différenciées du côlon et la transformation de l'état de muqueuse normale à l'état d'adénome et de carcinome, et absente dans l'adénome et le carcinome (Liu et al., 2002). La Gal 3 pourrait, aussi bien, induire qu'inhiber l'adhésion cellulaire, participer à l'activation des neutrophiles et des macrophages, et ainsi, protéger les cellules T de l'apoptose. La localisation intracellulaire permet l'interaction avec différents ligands tels que les Bcl-2 et intervient, ainsi, dans le processus d'apoptose où il est important de souligner qu'il s'agit d'interactions de type protéine-protéine que d'interactions de type lectine-glycoconjugués (Hsu et Liu, 2004).

Par ailleurs, il est admis que Gal 3 est surexprimée au cours du stress oxydatif induit, au niveau des macrophages pulmonaires et des cellules du cancer du sein, et que ses fonctions dépendent du statut redox et la sensibilité à la signalisation du stress cellulaire associée aux voies des MAPK (Sunil et al., 2015).

### III.2.2.1. Modulation contrastée par le benzo(a)pyrène de l'expression hépatopulmonaire de l'ARNm galectine 3

Nous avons remarqué une augmentation pulmonaire considérable de l'ARNm Gal 3 par un facteur de plus de 5 fois, chez les souris intoxiquées par le BaP (50 mg/kg), comparativement avec les souris témoins (Non traitées) (Fig. 31). Même si les mécanismes moléculaires de régulation des Gals restent encore mal connus, cette surexpression de la Gal 3 serait néanmoins essentielle dans la protection des différentes cellules contre les effets néfastes d'une production élevée de ROS induite ici par le BaP (Vinnai et al., 2017). Par conséquent, nous pouvons suggérer que, si la Gal 3 est surexprimée dès que la balance redox est rompue et qu'un stress oxydatif est induit, cela pourrait signifier que la diminution de son expression serait proportionnellement corrélée avec la diminution du stress oxydatif.

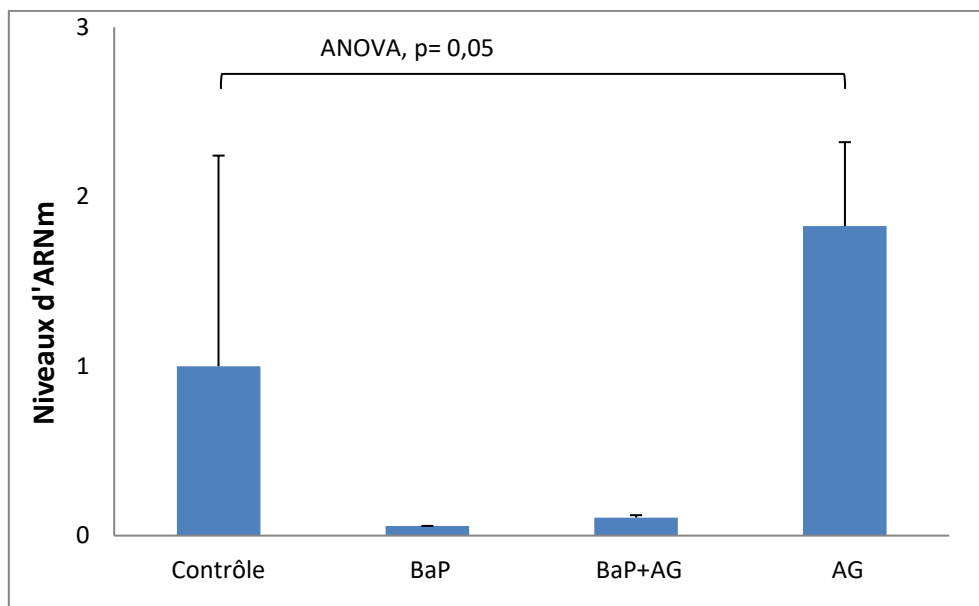


**Fig. 31. Expression Pulmonaire de l'ARNm de la Gal 3.** Les groupes de souris employées sont : témoins (T), intoxiquées par 50 mg/Kg de BaP (B), intoxiquées et prétraitées par l'AG (BAG) et traitées par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne±écart-type (n=6).  $p \leq 0,05$  : Différence significative entre les quatre groupes.

Les cellules de l'épithélium sont parmi les premières à être en contact avec les agents toxiques exogènes comme, par exemple, les émissions automobiles et la fumée de cigarettes qui contiennent du BaP. Denissenko et al. (1996) ont mis en évidence, pour la première fois, le lien entre les mutations causées par le BaP et le cancer pulmonaire. Plus tard, il a été établi que 60% des cancers du poumon étaient dus aux mutations causées par le BaP et d'autres

HAP. Une analyse de l'expression des protéines dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire humain (A549) a été réalisée, afin de décrire la réponse précoce de ces cellules au stress oxydatif induit par le BaP ; les résultats obtenus révèlent que l'expression altérée de 39 protéines dont 23 étaient régulées à la baisse (Verma et al., 2012). Ainsi, nous supposons que c'est dans ce même contexte que Gal 3 est surexprimée au niveau pulmonaire, après administration du BaP, étant donné que cette Gal est spécifiquement distribuée dans l'épithélium du tractus respiratoire. De plus, Garçon et al. (2001) a suggéré que le passage d'un effet oxydant à carcinogène d'un agent implique une plus grande libération de médiateur pro-inflammatoires qui contribuent au processus de cancérogenèse, potentiellement induit ici par le BaP.

S'agissant, de l'expression hépatique de l'ARNm Gal 3, nous avons observé une diminution très remarquable par un facteur de 16 fois, chez les souris intoxiquées par de BaP, par rapport au groupe de souris témoins (Fig. 32). Des analyses par immunoblot et immunohistochimie menés par Hsu et al. (2013) ont démontré que Gal 3 est surexprimée de façon prédominante dans les tissus et les lignées cellulaires du carcinome hépatocellulaire, par rapport aux hépatocytes normaux. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de puces d'ADNc pour analyser les profils d'expression des gènes, au niveau du carcinome hépatocellulaire humain (Chung et al., 2012 ; de Luo et al., 2006). De la même façon, la Gal 3

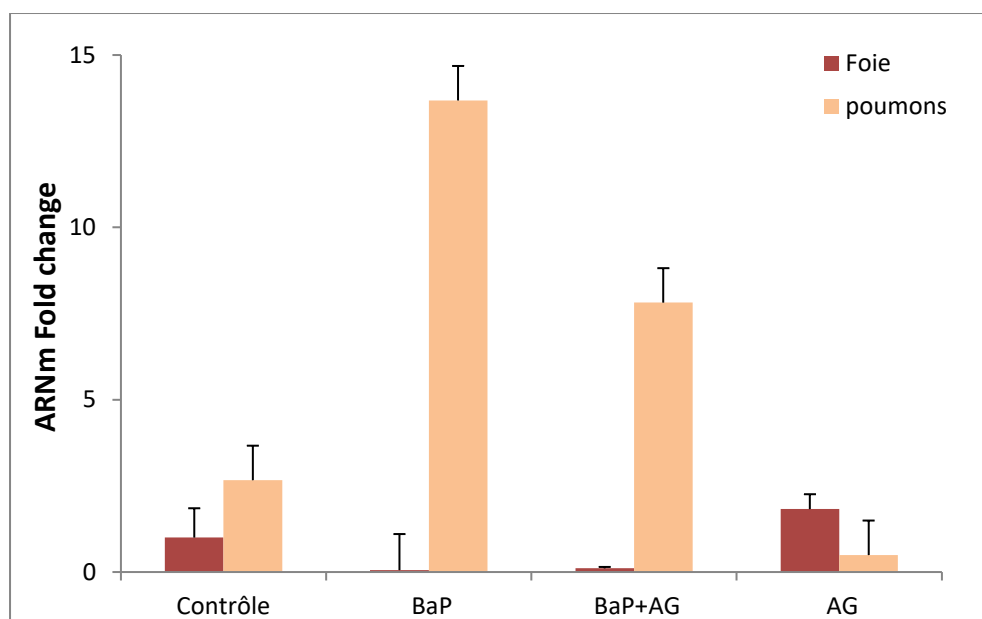


**Fig. 32. Expression hépatique de l'ARNm de la Gal 3.** Les groupes de souris employées sont : témoins (Contrôle), intoxiquées par 50mg/Kg de BaP (BaP), intoxiquées et prétraitées par l'AG (BaP+AG) et traitées par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne±écart-type (n=6).  $p \leq 0,05$  : Différence significative entre les quatre groupes.

est surexprimée dans le cholangiocarcinome intra-hépatique, indiquant qu'elle est associée aux stades pré-néoplasiques et néoplasiques (Bacigalupo et al., 2013).

### III.2.2.2. Induction par l'acide gallique de la sous-expression pulmonaire de l'ARNm galectine 3

Au niveau pulmonaire, nous avons observée une diminution très modérée de l'ARNm Gal 3 chez le groupe de souris intoxiquées par le BaP et prétraitées par 100 mg/kg d'AG comparativement avec le groupe de souris témoins (Fig. 33). De plus, nous avons remarqué que le prétraitement des souris par l'AG seul conduisait à une chute très importante, comparativement à leur soumission à une action double de l'AG et BaP. Ce résultat pourrait être expliqué par l'effet inducteur du BaP qui atténue l'action répressive de l'AG, conduisant, ainsi, à une diminution modérée de l'expression de l'ARNm Gal 3.



**Fig. 33. Comparaison de l'expression tissulaire de l'ARNm Gal 3.** L'expression pulmonaire et hépatique de l'ARNm Gal 3 a été analysée par PCR quantitative et comparée entre les deux organes. Les groupes de souris employées sont : témoins (Contrôle), intoxiquées par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiquées et prétraitées par l'AG (BaP+AG) et traitées par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ).

L'AG, de par son statut de puissant antioxydant, peut faire diminuer le stress oxydatif induit par le BaP et provoque, alors, la diminution de l'expression de la Gal 3 chez les souris

appartenant au groupe prétraité par l'AG et intoxiqué par le BaP, ainsi que chez le groupe de souris ne recevant que l'AG seul. Dans ce contexte, il pourrait être question d'une régulation négative de Gal 3 induite par l'action pro-apoptotique de l'AG au niveau des poumons, tout en sachant que les Gals représentent un réseau complexe de protéines de régulation génique douées de propriétés, à la fois, pro- et anti-apoptotiques qui dépendent du type de Gals et de leur localisation cellulaire (Vinnai et al., 2017 ; Suzuki et al., 2008).

### **III.2.2.3. Expression de la protéine galectine 3 dans le foie intoxiqué par le benzo(a)pyrène**

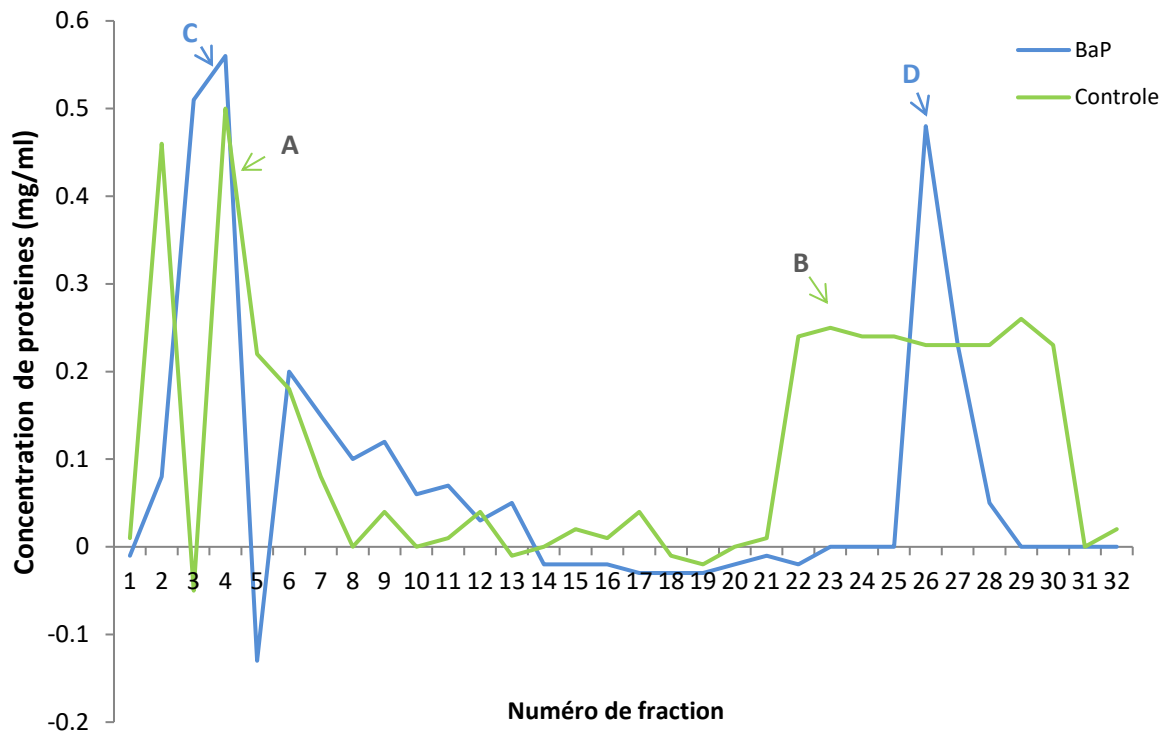
Le potentiel de codage remarquable de la partie sucrée des glycoconjugués cellulaires qui surpasse la capacité de stockage des systèmes de code de l'oligonucléotide ou de l'oligopeptide est devenue un label d'identité cellulaire. A travers la reconnaissance des différents oligosaccharides par des récepteurs endogènes, les lectines jouaient, de plus en plus, des rôles saillants en physiologie animale. Par conséquent, ils ont été étudiés et appliqués dans divers domaines des biosciences fondamentales et appliquées, y compris l'immunologie, la biologie cellulaire et la biochimie. S'agissant des fonctions hépatiques intrinsèques bien connues, les lectines du foie effectuent nombre de fonctions critiques, ce qui est le cas des lectines de type C, telles que les récepteurs des asialoglycoprotéines, qui participent à la clairance des glycoprotéines sériques, par une Gal hépatique spécifique (Van Damme, 2011).

Les Gals jouent un important rôle immuno-modulateur : la Gal 3, par exemple, est associée à la croissance cellulaire, la transformation tumorale et métastatique, et son expression est induite dans la cirrhose hépatique et le carcinome hépatocellulaire (Fenton et al., 2004). Par conséquent, plusieurs lectines avec des spécificités de sucre intéressantes ont été identifiées et certaines d'entre-elles ont été développées en puissants outils pour la purification, la séparation et l'analyse structurale des glycoprotéines, des composés glucidiques et des protéines, au niveau tissulaire et cellulaire. Initialement, la spécificité glucidique de la plupart des lectines était caractérisée par des tests d'inhibition des haptènes, dans lesquels des monosaccharides, des dérivés de monosaccharides ou de petits oligosaccharides sont utilisés pour bloquer la lectine se liant à une cible enrobée de glycane telle que, par exemple, les globules rouges. Pour la plupart des familles de lectines, la relation structure-fonction -en termes de reconnaissance spécifique de monosaccharides- est raisonnablement bien comprise (Van Damme, 2011).



L'étude d'une protéine donnée implique différentes étapes : extraction de la protéine de sa source naturelle, sa purification et sa caractérisation (Structure, fonction biologique, caractéristiques physico-chimiques). Nous avons utilisé les foies provenant de souris saines ou intoxiquées par le BaP, dont l'ARNm Gal 3 a été détecté par PCR quantitative afin d'isoler la protéine Gal 3 et déterminer sa présence par Western blot. Pour ce faire, nous avons broyé les tissus hépatiques, en utilisant l'appareil de Potter, puis, éclaté les cellules et lysé leurs membranes. Afin d'éviter la dénaturation des protéines, nous avons travaillé dans un milieu tamponné approprié et à basse température. Ainsi, nous avons obtenu un homogénat cellulaire que nous avons ensuite soumis à une centrifugation pour éliminer les débris cellulaires. Nous avons solubilisé les Gals dans des solutions salines contenant du lactose, obtenant ainsi un extrait brut. Nous avons débarrassé ce dernier du lactose, par dialyse et filtration, puis, utilisé le produit obtenu comme source pour purifier les Gals, par chromatographie d'affinité sur colonne d'asialofetuin-Sepharose.

Les résultats de la purification des Gals par chromatographie d'affinité à partir de foies de souris saines ou intoxiquées par BaP sont présentés sous forme de chromatogrammes (Fig. 34). Nous avons obtenu deux profils chromatographiques différents : le premier chromatogramme correspondait aux résultats de purification des Gals, à partir de foies de souris saines (Contrôle, couleur verte), tandis que, le second représentait ceux de la purification des Gal, à partir de foies de souris intoxiquées par le BaP (BaP, couleur bleue).



**Fig. 34. Profils de purification de Gal 3 hépatique par chromatographie d'affinité.** Les Gals ont été isolées par chromatographie d'affinité sur colonne d'asialofetuin-Sepharose. 4 mg de protéines totales extraites à partir de foies de souris témoins (contrôle) et intoxiquées (BaP) ont été chromatographiés. A et C: Extrait brut de foie obtenu après passage dans une colonne d'asialofetuin-Sepharose équilibrée par le tampon A. B et D: Protéines retenue par l'asialofetuin-Sepharose et éluées en utilisant le tampon B contenant 30mM de lactose, ces fractions sont collectées et filtrées pour une future analyse par WesternBlot.

La première partie du chromatogramme représentant le groupe témoin (Contrôle), présente deux pics (Fig. 34A) correspondant aux fractions contenant les concentrations protéiques les plus élevées : fractions 2 (0,46 mg/ml) et 4 (0,50 mg/ml). Ils représentent les protéines non liées spécifiquement au ligand et qui ont été obtenues par lavage de la colonne par le tampon B (Débit de 15 ml/h ; volume de fraction : 2 ml), après y avoir déposé l'extrait brut débarrassé de lactose. En plus, des fractions 2 et 4, nous avons pu, par la suite, collecter d'autres fractions (5, 6 et 7) qui correspondent à des concentrations plus faibles en protéines, de 0,22 mg/ml, 0,18 mg/ml et 0,08 mg/ml, respectivement. Ce lavage a été poursuivi jusqu'à ce que la concentration protéique devienne nulle. Ce moment a marqué un virage en vue de la mise en œuvre de l'élution des Gals. Pour ce faire, nous avons utilisé le tampon B contenant 30 mM de lactose pour décrocher spécifiquement les Gals. Ainsi, nous avons observé une concentration en protéines de 0,24 mg/ml à partir de la fraction 22. Il s'en suit des concentrations protéiques considérables et stables (Allant de 0,23 à 0,26 mg/ml) dans les

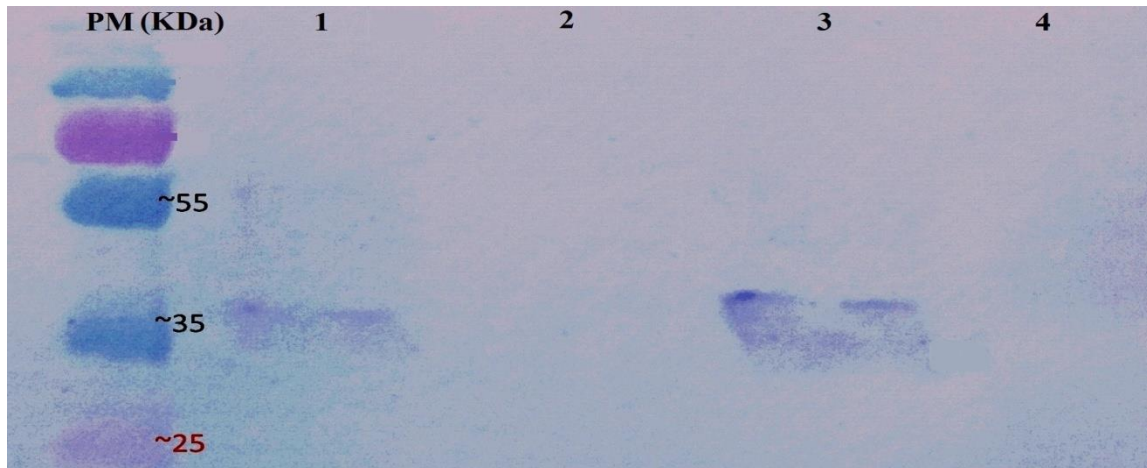
fractions 23 à 30 (Fig. 34B). Elles correspondent aux protéines Gals exprimées dans le tissu hépatique des souris appartenant au groupe témoin, car elles ont été liées spécifiquement à leur ligand, puis, éluées par phénomène de désorption par le lactose contenu dans le tampon B. Ces fractions ont été regroupées et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ , en attendant leur analyse par Western Blot.

La première partie du chromatogramme représentant le groupe intoxiqué par le BaP (BaP) a révélé deux pics importants (Dont l'un est prédominant) correspondant aux fractions 3 et 4 dont les concentrations en protéines étaient les plus élevées : 0,51 mg/ml et 0,56 mg/ml, respectivement (Fig. 34C). Ils représentent les protéines non liées spécifiquement au ligand et qui ont été obtenues par lavage de la colonne par le tampon B, selon le même protocole employé avec le groupe témoin (Contrôle). En plus, des fractions 3 et 4, nous avons pu, par la suite, collecter d'autres fractions (7, 8 et 9) qui correspondent à des concentrations plus faibles en protéines : de 0,15 mg/ml, 0,10 mg/ml et 0,12 mg/ml, respectivement.

Pour éluer les Gals, nous avons utilisé le tampon B contenant 30 mM de lactose pour les décrocher spécifiquement. Ainsi, nous avons observé un seul pic bien défini (Fractions 27 à 29) représentant le groupe intoxiqué par le BaP, contrairement à ce que nous avons obtenu pour le groupe témoin (Un large plateau). Les fractions 27 et 28 étaient les plus riches en protéines : leurs concentrations correspondaient à 0,48 mg/ml et 0,23 mg/ml, respectivement (Fig. 34D). Elles refermaient les Gals présentes dans le tissu hépatique du groupe intoxiqué par le BaP. En effet, elles ont été liées spécifiquement à leur ligand, puis, éluées sélectivement par désorption, par le lactose contenu dans le tampon B. Ces deux fractions ont été regroupées et stockées à  $-20^{\circ}\text{C}$ , avant d'être analysées par SDS-PAGE.

Afin de vérifier la présence potentielle de Gal 3 dans l'éluat contenant les Gals et purifiées par chromatographie d'affinité, à partir de foies de souris des deux groupes (Contrôle et intoxiqué par le BaP), les protéines isolées ont été soumises à une séparation par SDS-PAGE, transférées sur des membranes de nitrocellulose et incubées avec un anticorps anti-Gal 3. Ainsi, nous avons révélé la présence de deux bandes protéiques correspondant à un poids moléculaire d'environ 35 KDa ( $\sim 36$  KDa), au niveau des fractions éluées, à partir des deux groupes : témoin et intoxiqué (Fig.31, pistes 1 et 3). En revanche, aucune bande n'a pu être détectée, au niveau des fractions du matériel non retenu (Fig. 35, pistes 2 et 4). Ce résultat était en conformité avec les données de nombreuses études par Western Blot qui indiquent la présence de deux bandes de Gal 3, au lieu d'une seule (Thijssen et al., 2008). Les auteurs

expliquaient la multiplication du nombre de bandes par l'altération de la phosphorylation de la protéine et/ou des modifications protéolytiques. De plus, d'autres travaux ont déjà rapporté la présence de multiples bandes de Gal 3 (Cowles et al., 1990 ; Shekhar et al., 2004).



**Fig. 35. Analyse par Western blot de Gal 3 hépatique purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne d'asialofetuin-Sepharose.** Les protéines des différentes fractions obtenues par chromatographie ont été analysées par western blot. Ces protéines proviennent de foie de souris saines (Contrôle) et intoxiquées par 50 mg/kg de BaP (BaP). PM : marqueur de poids moléculaire ; 1 : matériel élué du groupe témoin ; 2 : matériel non retenu du groupe témoin ; 3 : matériel élué du groupe intoxiqué ; 4 matériel non retenu du groupe intoxiqué.

Ces bandes semblaient être de faible intensité dans le groupe témoin par rapport au groupe intoxiqué, ceci signifie que la Gal 3 est très faiblement exprimée dans le tissu hépatique dans les conditions normales. En effet, Gal 3 est absente des hépatocytes normaux chez la souris et l'homme, mais, elle détectable au niveau des canalicules biliaires et des cellules de Kupffer (Kim et al., 2007). Par ailleurs, Gudowska et al. (2015) ont démontré que le taux de Gal 3 est particulièrement élevé chez les patients atteints par une pathologie hépatique et que des changements de sa concentration étaient observés dans le cas de la fibrose hépatique, par exemple. Une telle constatation est expliquée par le fait que cette Gal participe directement à la fibrogénèse hépatique. De plus, selon cette même étude, la Gal 3 atteint sa concentration maximale dans le cas de cirrhose hépatique alcoolique (Augmentation par un facteur de 2 fois) et son niveau le plus bas enregistré dans l'hépatite toxique est, remarquablement, corrélé avec notre présente étude. Des données de littérature ont rapporté que Gal 3 jouerait un rôle différent qu'il s'agisse d'une inflammation, ou plutôt, d'un mécanisme impliqué dans l'induction de la cirrhose (Henderson et al., 2006). Aussi, il semble

que les différences d'expression de la Gal 3 dépendent de l'intensité ou de la sévérité de la pathologie, ainsi que de sa chronicité (Gudowska et al., 2015).

Dans ce contexte, il est pertinent de prendre en considération l'ensemble de ces facteurs interférant pour obtenir une meilleure interprétation de l'expression de cette protéine dans une pathologie quelconque, en particulier, hépatique. Il est bon de savoir qu'une cirrhose avancée, par exemple, est le résultat d'un long processus multi annuel d'une maladie chronique et d'une fibrose, tandis que l'hépatite toxique suit un processus davantage aiguë, court, à moyen terme et de forte intensité. Cela nous permet, donc, de suggérer que l'exemple de l'intoxication subaiguë par le BaP suit le même schéma ou le même type de processus que celui observé dans le cas d'une hépatite toxique, tant au niveau de la réponse inflammatoire, que des réponses à la toxicité induites au niveau protéomique et génomique. Il est question, notamment, du changement de l'expression des Gals ou de Gal 3, et des protéines en général.

Ces changements ne s'observent pas, seulement, sur le plan de la concentration, ils touchent, aussi, la localisation cellulaire et tissulaire de Gal 3. En effet, de localisation cytoplasmique, Gal 3 est activement sécrétée dans la circulation sanguine et les fluides biologiques par les cellules activées et endommagées, suite à l'apparition d'une pathologie (Gudowska et al., 2015). Des études menées *in vivo* sur l'intoxication hépatique induite par le tetrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) ont montré des effets toxiques tels que l'apoptose et/ou la nécrose, responsables de l'augmentation de l'expression de Gal 3, notamment, dans la périphérie des zones enflammées et endommagées. Il est, aussi, admis que Gal 3 est faiblement exprimée au niveau foie humain, ce qui explique l'apparition d'une bande de très faible intensité, correspondant au poids moléculaire d'environ 35/36 KDa. Ces données confortent nos résultats de western blot qui a révélé que Gal 3 était faiblement exprimée chez les souris contrôles.

Dragomir et al. (2012) ont mis en évidence le rôle joué par la Gal 3 dans l'intoxication induite par l'acetaminophene (APAP) au niveau du foie où l'expression de cette lectine. Elle est capable de provoquer l'augmentation de l'expression du TNF $\alpha$  et d'IL 12 dans les monocytes humains et maintient un microenvironnement pro-inflammatoire et cytotoxique. Les auteurs ont conclu que les souris n'exprimant pas cette Gal (Gal 3<sup>-/-</sup>) présentaient une diminution de leur susceptibilité à une pathologie induite par la streptozotocine, la Con A ou à l'arthrite. Cette diminution est accompagnée par une diminution de l'expression de ces protéines pro-inflammatoires sus citées. L'étude a, finalement, permis de conclure que Gal 3

contribuait à l'hépatotoxicité induite par l'APAP, à travers la promotion de l'activation classique des macrophages. Cette activation est caractérisée par l'accumulation de plusieurs sous populations de macrophages au niveau du foie, suivant l'intoxication.

Etant donnée l'absence d'études expliquant le rôle joué par la Gal 3 et les Gals lors de l'intoxication par le BaP et en se la basant sur des données disponibles concernant l'intoxication par cet agent cancérigène, nous pouvons suggérer que Gal 3 joue un rôle dans l'initiation de l'hépatotoxicité, dans une phase de toxicité subaiguë (A moyen terme et non pas à long terme, car son expression est en corrélation avec la chronicité de la toxicité) travers la promotion du processus inflammatoire et, notamment, celui de l'activation des macrophages hépatiques.

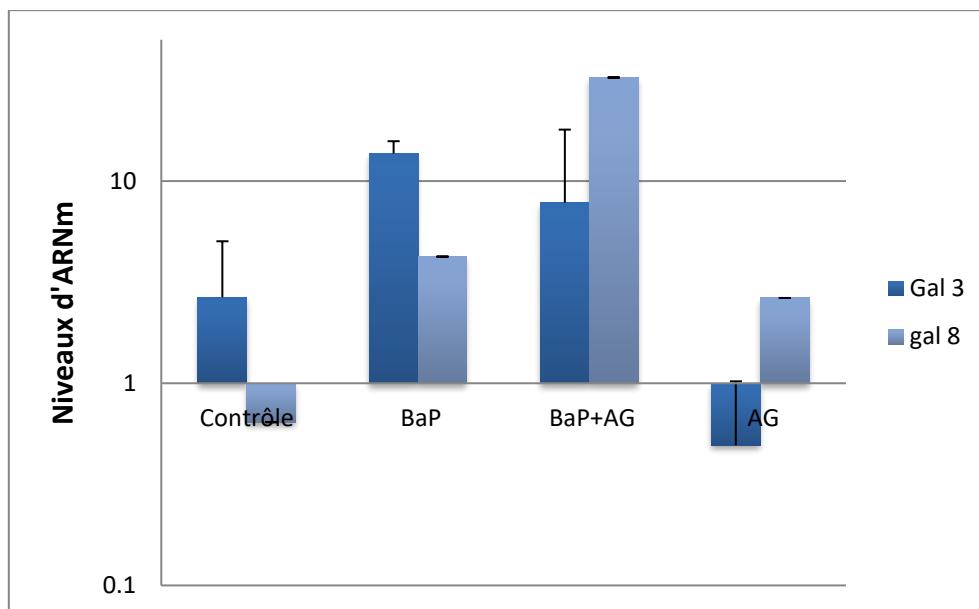
Enfin, nous pouvons dire que les changements observés dans l'expression de Gal 3 au niveau des organes et, en particulier, le foie sont associés à la sévérité de la pathologie et le dommage causé. Ceci confère à cette Gal une vraie place et une valeur dans le diagnostic et le pronostique des maladies du foie, ainsi que la classification de ces pathologies. Notre étude, a permis de conclure que l'intoxication subaiguë (28 jours) induite par le BaP (dose unique de 50 mg/kg) ne provoquait pas de cancérogenèse hépatique (Etant donnée, l'expression modérée à faible de la Gal 3, chez les souris intoxiquées). Cependant, elle a engendrée une toxicité relative qui a déclenché un processus inflammatoire au niveau du foie, organe responsable de métabolisation.

### **III.2.3. Comparaison des profils d'expression des galectines 3 et 8**

Dans le cas du traitement des souris par le BaP et après évaluation de l'expression génétique et de l'ARNm, il a été conclu, selon, l'étude de Zuo et al. (2014) que les poumons, la rate et le pré-estomac sont les organes cibles du BaP et que le foie, le colon et l'estomac glandulaire sont ses organes «non» cibles. Les changements induits par un agent cancérigène (Le BaP) dans l'expression des gènes aident à distinguer les organes cibles et «non» cibles. Les deux tissus démontraient un même niveau d'adduits à l'ADN, mais cela ne suffit pas pour prédire les différences transcriptomiques dans le foie et les poumons. Ces auteurs supposaient plutôt que des mécanismes spécifiques aux tissus sont mis en œuvre pour une régulation différentielle de voies biologiques connues et associées, notamment, avec la cancérisation expliquant la cancérogenèse «ciblée» ou sélective, au niveau des poumons.

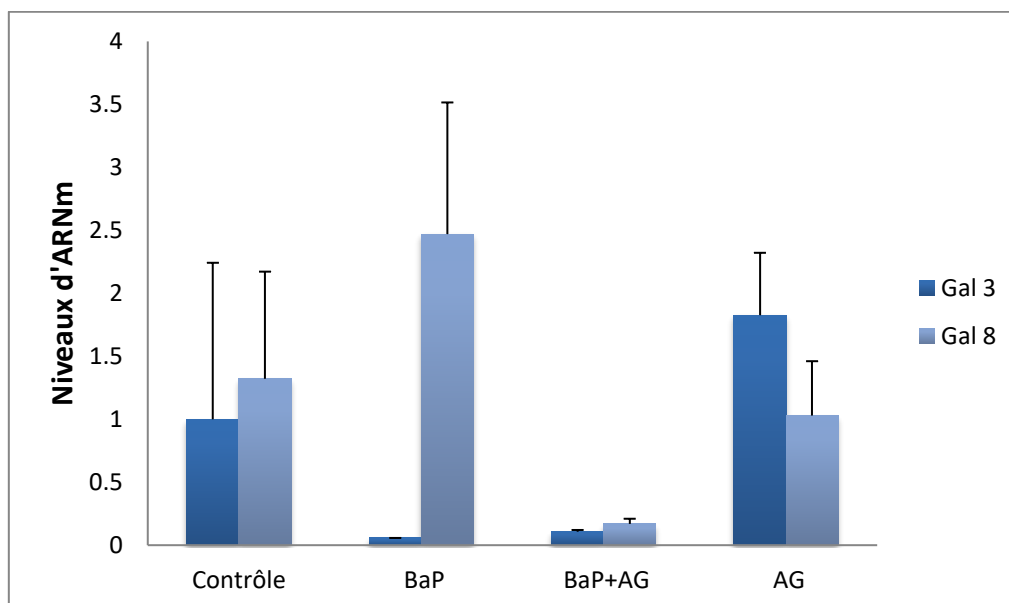
De ce fait, les changements dans l'expression précoce des gènes sont «tissu-spécifiques», de même que les processus biologiques liés à sa modulation. Ainsi, le mécanisme de cancérogénicité du BaP est complexe et la compréhension de son organotropisme est très utile, notamment, au travers de l'expression génique.

Les profils d'expression des ARNm Gals 3 et 8 au cours d'intoxication subaiguë par BaP, ainsi que sa modulation par l'AG, au niveau des deux organes cibles du BaP, sont présentés dans la Figures 36 (Poumons) et la Figure 37 (Foie). L'expression des deux ARNm indiquait des variations importantes, aussi bien, entre les deux organes étudiés qu'au niveau du même organe, ainsi que entre les différents groupes de souris (Saines ; intoxiquées par le BaP ; intoxiquées par le BaP et prétraitées par l'AG ; traitées par l'AG seul). Il est, aussi, nécessaire de souligner que les deux Gals présentaient des profils d'expression, nettement, différents, même si elles font partie de la même famille de protéines de types lectines. La famille des Gals présente une distribution restreinte de l'expression qui est spécifique au tissu, ainsi que du développement, tout au long de l'embryogenèse. Bien que les niveaux d'expression des Gals soient distincts, ils se chevauchent entre eux (Wada et Makino, 2001).



**Fig. 36. Expression pulmonaire des ARNm Gals 3 et 8.** L'expression pulmonaire des ARNm Gals 3 et 8 a été analysée par PCR quantitative et comparée. Les groupes de souris employées sont: témoins (Contrôle), intoxiquées par 50 mg/Kg de BaP (BaP), intoxiquées et prétraitées par l'AG (BaP+AG) et traitées par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne±écart-type (n=6).

Au niveau hépatique, les Gals 3 et 8 présentait des profils d'expression génétique remarquablement différents de ceux précédemment observés au niveau des poumons (Fig. 37). D'après les données disponibles de littérature, nous pouvons déduire que l'administration du BaP en conditions subaigües n'induisait pas de carcinogenèse chez la souris, l'expression génétique étant relativement faible, similaire à celle observée dans les tissus normaux (Sains). Par ailleurs, deux sous populations de macrophages activés et exprimant Gal 3 ont été observés au cours de l'hépatotoxicité induite par l'acetaminophen : macrophages pro-inflammatoires ; macrophages anti-inflammatoires et réparatrices (Bacigalupo et al., 2013). Les auteurs de cette étude ont noté une surexpression de Gal 3 au niveau des macrophages infiltrants (48h et 72h, après l'intoxication) ; alors que la déficience en Gal 3 entraînait une baisse de l'hépatotoxicité et de l'expression des médiateurs anti-inflammatoires. La même observation a été rapportée par Volarevic et al. (2012) et qui révélait que la déficience en Gal 3 entraînait une réduction de l'hépatite induite par la Con-A et le prétraitement des souris par un inhibiteur sélectif de la Gal 3 réduisait le nombre de cellules T CD 4 et CD 8. Cette Gal est, donc, responsable des réponses pro-inflammatoires et de l'activation classique des macrophages impliqués dans le développement des pathologies hépatiques.



**Fig. 37. Expression hépatique des ARNm Gals 3 et 8.** L'expression hépatique des ARNm Gals 3 et 8 a été analysée par PCR quantitative et comparée. Les groupes de souris employées sont : témoins (Contrôle), intoxiquées par 50 mg/kg de BaP (BaP), intoxiquées et prétraitées par l'AG (BaP+AG) et traitées par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6).



### III.2.4. Conclusion

Lors de la réalisation d'une recherche en biochimie, il est important de procéder à la purification de telle ou telle substance pour qu'elle soit exempte de contaminants et afin de l'étudier correctement. Cette étape est toutefois délicate à réaliser car les cellules contiennent des milliers de substances différentes, mais, aux propriétés physico-chimiques, relativement, semblables, en plus du fait que la substance recherchée peut être instable ou encore en quantité réduite, voir infime. Les techniques d'isolement, de purification et de caractérisation des protéines et des acides nucléiques constituent les outils de bases de la biochimie et leur mise en œuvre implique des efforts considérables du biochimiste. Mise à part le domaine de la recherche, certaines de ces techniques sont, aussi, utilisées dans des applications du domaine clinique (Voet et Voet, 2016).

Enfin, il est important de souligner que Gal 8 peut être transcrite différemment, selon, les types de tissus et générer différentes iso-formes. En effet, sept ARNm différents codant pour Gal 8 humaine ont été identifiés, certains appartiennent au groupe prototype et d'autres au groupe en tandem. Ainsi, l'étude de l'expression de cette protéine est rendue compliquée, car il est possible que le niveau de l'ARNm soit diminué, alors que la concentration de la protéine soit élevée (Chang et al., 2017). De plus, contrairement à la Gal 3 (Impliquée d'avantage dans les stades précoces des cancers), la Gal 8 semble intervenir aux stades plus avancés de la progression tumorale.

Les changements démontrés dans l'expression de la Gal 3 au niveau des organes étudiés et en particulier, au niveau du foie, est finalement reliée à la sévérité de la pathologie et du dommage causé, ce qui confère à cette Gal une vraie valeur dans le diagnostic et le pronostic des maladies du foie et un excellent indicateur afin de différencier le type de pathologie induites. Dans notre étude cela nous permet de déduire que l'intoxication subaigüe (D'une durée de 28 jours) par le BaP à une dose unique de 50 mg/kg ne provoque pas de cancérogenèse hépatique (Vue l'expression modérée à faible de la Gal 3 chez les souris intoxiquées) mais induit cependant une toxicité relative, et le déclenchement d'un processus inflammatoire au niveau de l'organe responsable du métabolisme de ce xénobiotique.

### III.3. Effet protecteur de l'acide gallique contre l'hépatotoxicité chronique induite par le benzo(a)pyrène

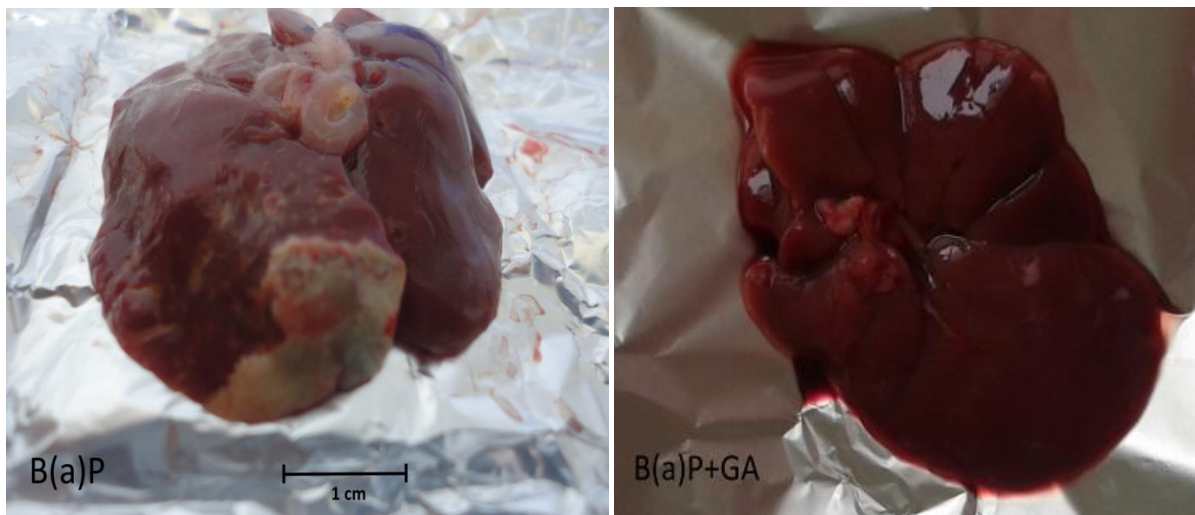
Le foie est le principal organe attaqué par les ROS, ces cellules parenchymateuses sont des cellules primaires induisant des lésions hépatiques, lorsqu'elles sont soumises au stress oxydatif (Sanchez-Valle et al., 2012). La mitochondrie, les microsomes et les peroxysomes de ces cellules peuvent, donc, produire des ROS qui régulent des facteurs liés à l'expression des gènes d'oxydation des acides gras. De plus, les cellules de Kupffer, les cellules stellaires et les cellules endothéliales sont potentiellement plus exposées et/ou plus sensibles aux ROS. En effet, un type de cytokines, le TNF  $\alpha$ , peut être produit dans des cellules de Kupffer induites par le stress oxydatif, ce qui pourrait augmenter l'inflammation et l'apoptose. En ce qui concerne les cellules étoilées hépatiques, la prolifération et la synthèse du collagène des cellules stellaires hépatiques est déclenchée par la peroxydation lipidique provoquée par le stress oxydatif (Sakaguchi et al., 2011). Lorsque les ROS sont produits en excès, l'homéostasie est perturbée, ce qui entraîne un stress oxydatif qui joue un rôle essentiel dans les maladies du foie, les troubles dégénératifs et d'autres maladies chroniques (Li et al., 2014).

Le stress oxydatif déclenche non seulement des lésions hépatiques en induisant des altérations irrémédiables des lipides, des protéines et des contenus d'ADN et module les voies de contrôle des fonctions physiologiques. Puisque ces voies régulent la transcription des gènes, l'expression des protéines, l'apoptose cellulaire et l'activation des cellules stellaires hépatiques; le stress oxydatif est considéré comme l'un des mécanismes pathologiques qui entraîne l'initiation et la progression de diverses maladies du foie, tel que l'hépatite virale chronique, les maladies hépatiques alcooliques et la stéato-hépatite non alcoolique. Il a également été suggéré qu'il existe des interférences complexes entre les facteurs pathologiques, l'inflammation, les radicaux libres et la réponse immunitaire (Singal et al., 2011). En outre, le stress oxydatif systémique qui survient au cours d'une maladie du foie peut également causer des dommages aux organes extra-hépatiques, tels qu'une déficience du cerveau et une insuffisance rénale et l'œdème cérébral (Palma et al., 2014 ; Bosoi et al., 2012).

Dans cette partie de la thèse, le foie étant le lieu de métabolisme de cet HAP, notre premier objectif était de mettre en évidence l'éventuelle toxicité hépatique induite par le BaP, à long terme (Chronique). Dans un deuxième lieu, notre but était d'évaluer l'effet antioxydant de l'AG, dans la protection contre l'hépatotoxicité du BaP, chez le rat.

### III.3.1. Effets du benzo(a)pyrène et de l'acide gallique sur la fonction hépatique

Les analyses macroscopiques des foies des rats intoxiqués par le BaP (B(a)P) et des rats intoxiqués par le BaP puis traité par l'AG (B(a)P+GA) ont présenté des différences importantes. Chez le groupe de rats intoxiqués par le BaP, la lésion hépatique était explicite, avec une coloration blanc jaunâtre et un durcissement d'un diamètre compris entre 1,0 et 1,2 cm. Il y avait, également, des signes de lésions hépatiques adjacentes avec une zone légèrement plus étendue (1,2 à 1,5 cm). Ces lésions étaient de coloration rougeâtre, d'aspect kystique et avec des bordures imprécises (Bien que limitées). Les rats intoxiqués et post-traités par l'AG n'ont pas montré de lésions apparentes mais la présence de taches blanches et d'une coloration brun rougeâtre (Fig. 38).

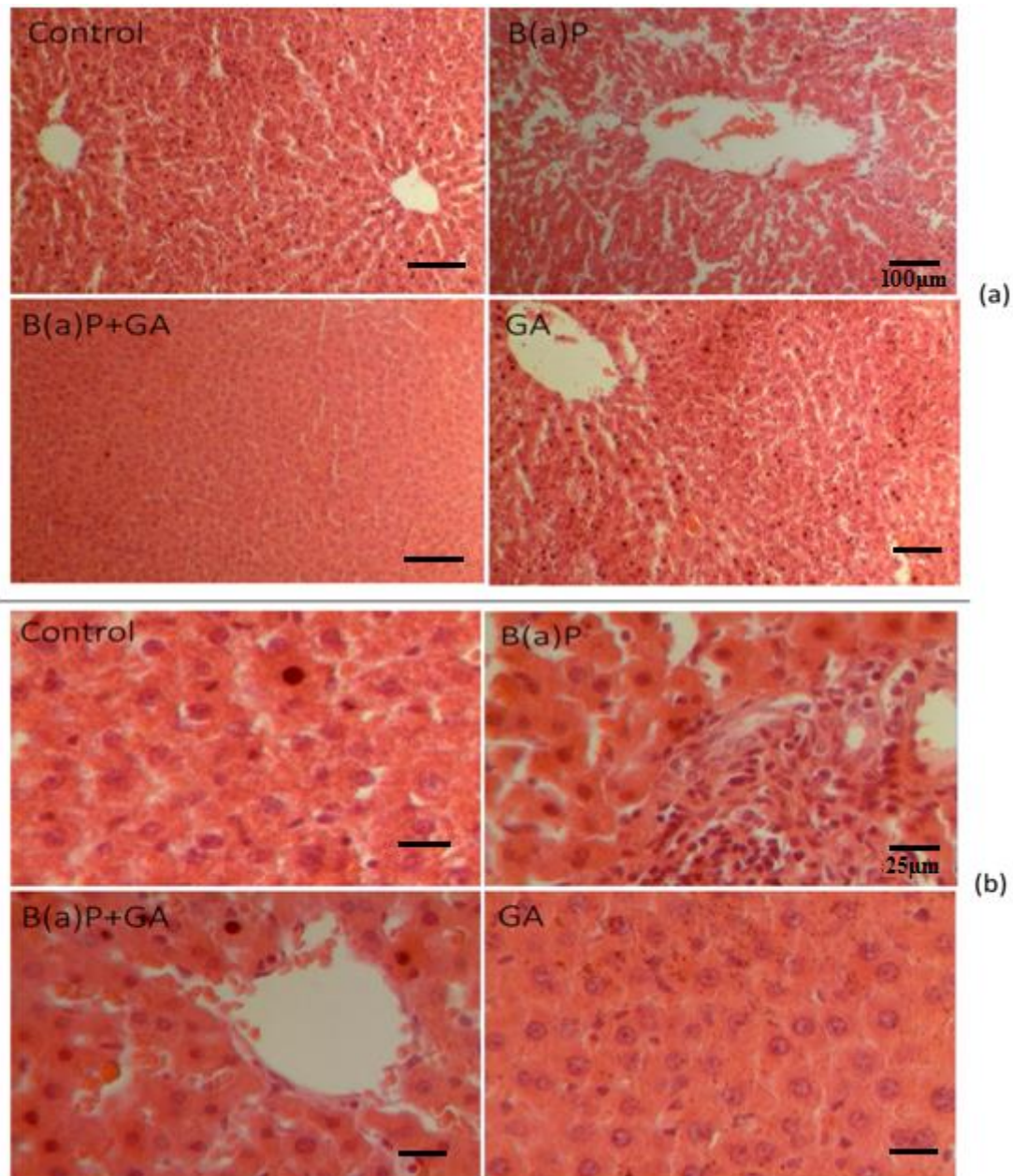


**Fig. 38. Aspect macroscopique des foies des rats.** *Intoxiqués, recevant 100 mg/kg de BaP révélant une zone de forme irrégulière blanc jaunâtre en plus des lésions hépatiques adjacentes (B(a)P) et les rats intoxiqués traités par 100 mg/kg d'AG pendant cinq jours consécutifs après l'intoxication chronique, révélant des taches blanches, une couleur brun rougeâtre et aucune lésion apparente (B(a)P+GA).*

Les variations de l'aspect macroscopique du foie entre le groupe de rats intoxiqués par 100 mg/kg de BaP par voie IP et le groupe de rats intoxiqués par le BaP et post-traités par l'AG (100 mg/kg par voie orale) sont clairement remarquables et ont révélé des anomalies et des altérations, à priori, prédictives d'une hépato-cancérogenèse chez les rats intoxiqués par le BaP alors que le post-traitement par l'AG a montré, en corrélation avec des études précédentes (Canbek et al., 2011 ; Padma et al., 2011), que cet antioxydant avait la capacité d'améliorer l'état de l'organe hépatique vers une structure proche de l'état physiologique avec des caractéristiques normales, à savoir, l'intégrité tissulaire restaurée, l'absence totale de

lésions observées, chez les rats intoxiqués par le BaP, et de façon globale, un aspect extérieur de l'organe plutôt normal, pour un organe hépatique bien préservée.

La coloration H&E et l'examen microscopique (10×, 40×) des coupes histologiques de sections des foies de rats, appartenant aux quatre groupes étudiés (Fig. 39) montrent que les coupes hépatiques du groupe de rats témoins (Control) et du groupe de rats traités par l'AG seul à 100 mg/kg par voie orale pendant cinq jours consécutifs (GA) ont affiché des caractéristiques histologiques plus ou moins similaires qui correspondent aux caractéristiques 'normales', montrant des hépatocytes sans inflammation ni nécrose, hormis, quelques infiltrats ainsi que de discrètes lésions de portites dans les espaces portes. Ils montrent de façon générale, une architecture bien conservée. L'analyse histologique de l'intoxication chronique par le BaP a été réalisée, à partir des sections hépatiques présentant des anomalies, à l'analyse macroscopique du groupe de rats intoxiqués par le BaP (B(a)P). Elles ont montré un aspect hétérogène, lié à de vastes plages de nécroses hépatocytaires, jouxtant les lobules hépatiques, plus ou moins, conservés et réalisant un aspect de carte géographique. Autour des foyers nécrosés, existe un infiltrat inflammatoire évident des cellules inflammatoires, de types polynucléaires éosinophiles dans les espaces portes, ainsi qu'une hémorragie, une dégénérescence hydroponique, une pycnose, une dilatation des sinusoides et une dégénérescence des hépatocytes, il s'agit de lésions d'hépatite nécrosante. Dans les zones plus conservées, les hépatocytes présentent des lésions de souffrances à type de rétraction des noyaux, ballooning à type de bollooonisation hépatocytaire, des canaux biliaires plus ou moins conservés et pas d'hyperplasie.



**Fig. 39. Photomicrographies de l'évaluation histopathologique, traduisant l'effet de l'AG sur l'hépatotoxicité induite par le BaP.** Chaque photomicrographe est représentative des quatre groupes d'animaux: le groupe témoin, recevant l'huile de tournesol et 0,9% de NaCl (control); le groupe intoxiqué recevant 100 mg / kg de BaP (B(a)P); l'intoxiqué et traité par 100 mg / kg de AG (B(a)P+GA) et le groupe GA, recevant 100 mg / kg de AG seul (GA), aux différents grossissements 10× (a) et 40× (b).

En revanche, les coupes appartenant au groupe de rats intoxiqués par le BaP et post-traité par l'AG (B(a)P+GA) ont montré un parenchyme hépatique à l'architecture conservée, une travée hépatique d'aspect normal, l'absence de septa fibreux, en revanche, une hyperhémie était visible à la microscopie et cela dans les veines centrolobulaires et dans les

espaces portes. Malgré cela, le foie montre dans l'ensemble, un organe quasiment normal avec des caractéristiques histologiques, nettement, améliorées comparées au foie du groupe intoxiqué par le BaP (B(a)P), ne présentant pas d'infiltration des cellules inflammatoires ni de lésions nécrotiques. Par ailleurs, il faut noter qu'au niveau des coupes histologiques de foie appartenant aux rats du groupe intoxiqué par le BaP et post-traité par l'AG (B(a)P+GA), les hépatocytes présentent des lésions minimales, une vacuolisation des noyaux est remarquée (Noyau bien visible) et également une hyperplasie des cellules de Kupffer contenant du fer.

Des variations dans l'analyse histologique hépatique sont donc évidentes entre les différents groupes de rats: le groupe témoins (Control), le groupe intoxiqué par le BaP (B(a)P), le groupe intoxiqué par le BaP et post-traités par l'AG (B(a)P+GA) et le groupe traité par l'AG seul (GA) et révèlent des anomalies et de sérieuses altérations histologiques particulièrement observées chez les rats intoxiqués par le BaP. Tandis que, le traitement des rats préalablement intoxiqués par 100 mg/kg d'AG par voie orale pendant cinq jours consécutifs a démontré, en corrélation avec des études précédentes (Canbek et al., 2011 ; Padma et al., 2011), que cet antioxydant avait la capacité d'améliorer le structure du tissu hépatique vers une structure physiologique qui présente des caractéristiques normales : intégrité cellulaire des hépatocytes restaurée, infiltration cellulaire atténuée, dilatation sinusoïdale et nécrose réduite pour une architecture histologique bien conservée.

Comme le montre le tableau 4, le traitement des rats avec une dose unique 100 mg/kg de BaP injecté par voie IP induit une augmentation très significative des niveaux plasmatiques des deux transaminases (ALT, AST). En effet, le groupe de rats recevant 100 mg/kg de BaP par voie intra péritonéale (BaP) a montré une augmentation très significative du taux plasmatique de l'ALT ( $p \leq 0,01$ ) alors qu'une valeur significativement diminuée de l'enzyme ALT a été enregistrée respectivement dans le groupe intoxiqué et post traité par l'AG (BaP+AG) et le groupe de rats traité par l'AG seul (AG) ( $p \leq 0,05$ ). Les mêmes observations ont été enregistrées pour les valeurs plasmatiques de l'AST avec une augmentation très significative de son taux plasmatique chez les rats appartenant au groupe intoxiqué par le BaP (BaP) ( $p \leq 0,01$ ). Par ailleurs, une diminution significative du taux de l'AST plasmatique a été enregistrée, chez le groupe de rats intoxiqués et post-traités par l'AG (BaP+AG), comparé au groupe de rats intoxiqués (Contrôle) ( $p \leq 0,05$ ). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre le groupe de rats, recevant 100 mg/kg d'AG seul par voie orale (AG) et le groupe de rats témoins (Contrôle).

**Tableau 4. Effet de l'AG sur le taux des transaminases sériques, au cours de l'intoxication par le BaP.** Le test de student a été utilisé pour mesurer les différences du niveau sérique des AST et ALT (UI/L) parmi les quatre groupes d'animaux. Les données sont exprimées en moyenne±écart-type (n=6); \*\* significativement différent du groupe control ( $P \leq 0,01$ ) ; # significativement différent groupe intoxiqué, ( $P \leq 0,05$ ) ; ns: différence non significative comparé au groupe contrôle.

	Contrôle	BaP	BaP+AG	AG
<b>ALT</b>	57.3±15.3	107.5±14.9 **	68±10.8 #	73.2±10.7 ns
<b>AST</b>	111.8±17.2	178.2±14.8 **	106.3±18.5 #	112.5±13.5 ns

La libération dans le sang d'enzymes intracellulaires tels que les transaminases est un signe de lésion des cellules hépatiques (Olayinka et al., 2015). L'augmentation des activités sériques des enzymes ALT et AST, après l'administration du BaP traduit la fuite des hépatocytes fonctionnels et l'intégrité membranaire, tandis que, la diminution des valeurs des transaminases sériques, chez les rats intoxiqués et post-traités par l'AG reflètent la restauration de l'intégrité physiologique des hépatocytes (Bodduluru et al., 2015).

### III.3.2. Effet de l'acide gallique sur le stress oxydatif chronique induit par le benzo(a)pyrène

La cancérogénicité du BaP dans les organes tels que les poumons et la peau n'est plus à prouver étant donnée que l'étiologie principale du cancer du poumon, à côté des facteurs intrinsèques (Comme l'hérédité), est le tabagisme, la pollution atmosphérique et les facteurs d'occupation. Par conséquent, le BaP en tant qu'agent carcinogène retrouvé dans la cigarette est utilisé pour induire le cancer du poumon, dans différents modèles animaux, *in vivo*. C'est l'exemple de l'étude Sikdar et al. (2014), où, des rats ont été exposés au BaP et ont développé un cancer du poumon, au bout de quatre mois. Dans une autre étude, la production d'un modèle expérimental de carcinogenèse pulmonaire chez des rats Wistar, a été réalisée en administrant une seule instillation intra-pulmonaire de BaP, à des doses de 10 et 20 mg / kg et les animaux ont été sacrifiés après 8, 10, 12 et 14 semaines. La diminution du mécanisme de défense antioxydant était l'une des raisons majeures de la cancérogénicité induite par le BaP et était liée à une diminution des activités des enzymes antioxydantes incluant la SOD et la CAT ainsi que du GSH, donnant lieu à l'action synergique des ROS (Da Silva et al., 2007).

Ainsi, il existe plusieurs systèmes d'enzymes qui catalysent des réactions pour neutraliser les RL et les ROS dont, la SOD, la GSH peroxydase/réductase, la CAT et d'autres qui forment les mécanismes de défense endogènes du fuselage pour aider à se protéger contre les dégâts induits par les RL dans les cellules. Ces enzymes exigent également des cofacteurs tels que le sélénium, le fer, le cuivre, le zinc et le manganèse pour une activité catalytique optimale, c'est pour cette raison qu'une consommation diététique inadéquate de ces minéraux peut compromettre l'efficacité de ces mécanismes de défenses antioxydantes (Deng et al., 2018). Dans la présente étude, nous avons examiné les changements dans les indicateurs de stress oxydatif à travers, en mesurant les activités des enzymes antioxydantes CAT, SOD et GST et les niveaux de GSH et de MDA. Les résultats obtenus après intoxication par le BaP, indiquent généralement une réduction des capacités du système de défense antioxydant.

### III.3.2.1. Amélioration des capacités antioxydantes par l'acide gallique

Le groupe de rats intoxiqués par une injection IP unique de 100 mg/kg de BaP (BaP) a montré une augmentation importante de l'activité de la CAT par rapport au groupe témoin (Contrôle) ( $p \leq 0,01$ ) tandis qu'on remarque que l'activité de la CAT est redevenue normale chez le groupe de rats post-traité par l'AG (BaP+AG) ( $p \leq 0,05$ ). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre le groupe de rats témoins et le groupe de rats recevant 100 mg/kg d'AG seul (AG) (Fig. 36). Étonnamment, le CAT qui est responsable de la détoxification de  $H_2O_2$  en eau a montré une activité considérablement accrue dans le groupe intoxiqué. En suite, il revient à une valeur normale dans le groupe intoxiqué et post-traité par l'AG (BaP+AG). Ceci peut s'expliquer par des concentrations élevées de  $H_2O_2$  produites non seulement par le BaP, la SOD, mais aussi, par les voies d'activation des enzymes peroxysomales et microsomaux (Henkler et al., 2010). L'enzyme GPx est responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène, à de faibles niveaux intracellulaires - cas de stress oxydatif de faible intensité- atteint rapidement la saturation, tandis que, la CAT prend le relais et est plus efficace, car elle ne peut pas être saturée, même, à de très fortes concentrations de  $H_2O_2$ .

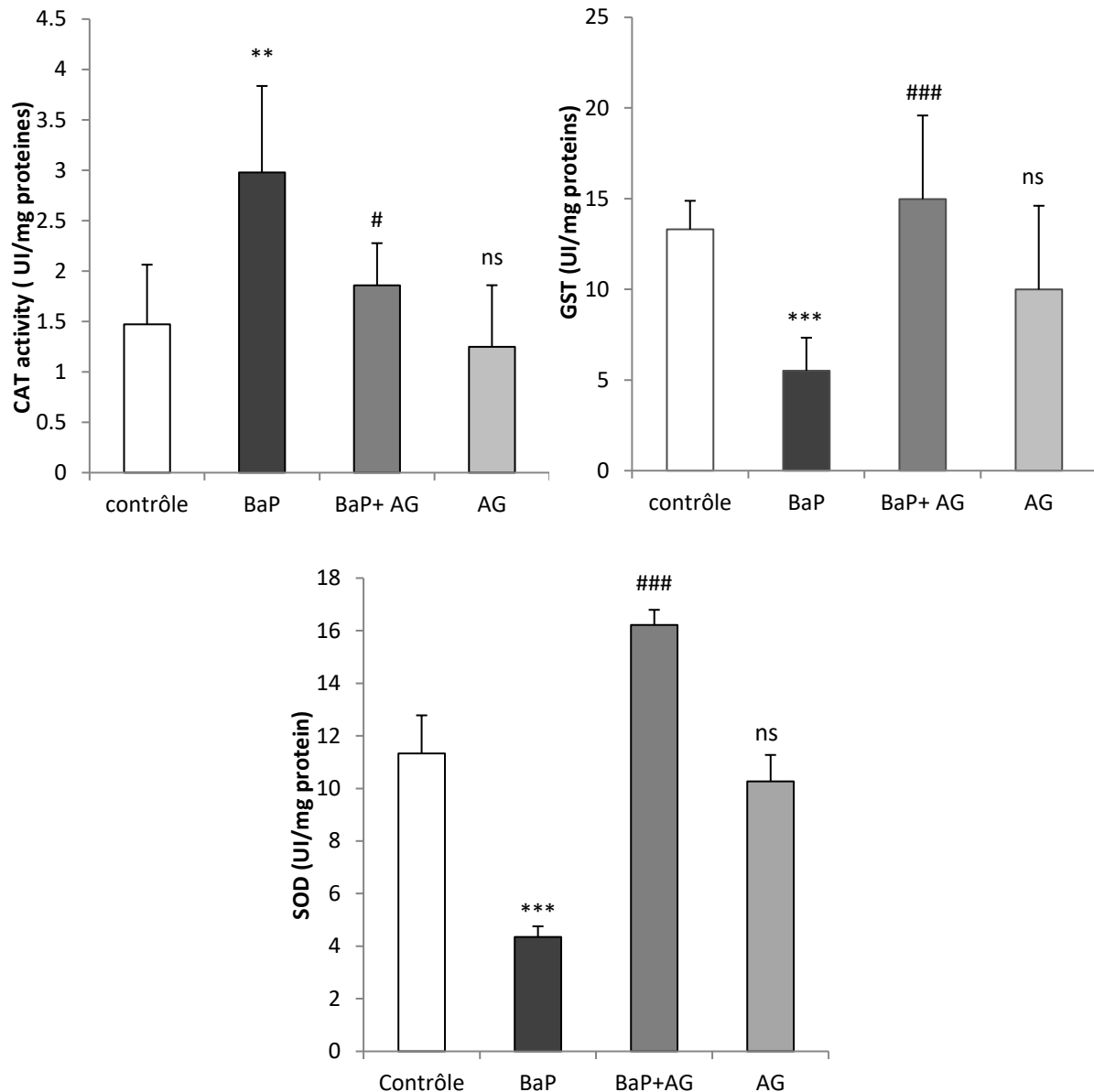
Suivant les études de Ma et al. (2014) et Reckziegel et al. (2016), le traitement avec l'AG semble inverser les résultats sus cités, en augmentant l'activité enzymatique des GST et SOD et ramener la CAT à la valeur normale, grâce à sa puissante capacité antioxydante et capacité à piéger les RL. Cela peut s'expliquer par une relation structure-activité : l'AG est un acide phénolique qui possède trois groupes hydroxyles, en position para par rapport au groupe



carboxylique, une position très efficace pour former des radicaux phénoxy stables, en donnant un proton à leur O-H.

L'activité de la GST a dramatiquement diminué de 58% dans le groupe de rats intoxiqués par injection IP de 100 mg/kg de BaP (BaP) par rapport au groupe de rats témoins (Contrôle) ( $p \leq 0,001$ ) alors que le groupe intoxiqués et post-traité par 100 mg/kg d'AG (BaP+AG) présentait une activité significativement élevée de 63,19% par rapport au groupe intoxiqué par 100 mg/kg de BaP ( $p \leq 0,01$ ) (Fig. 40). La GST qui catalyse la conjugaison du GSH avec des xénobiotiques permettant leur excrétion, a démontré une activité faible, hautement significative, au cours de l'intoxication chronique par le BaP, en concomitance avec une faible teneur en GSH. Ceci peut résulter de son utilisation excessive dans la neutralisation de quantités importantes de radicaux libres générés dans cette situation et de l'inhibition des enzymes impliquées dans la synthèse et la régénération du GSH, comme la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. Ces conditions peuvent induire un stress oxydatif et causer de graves dommages aux cellules du foie (Gao et al., 2011 ; Gum et al., 2007).

Les résultats de l'activité de la SOD ont montré les variations les plus évidentes. L'activité enzymatique des rats intoxiqués par 100 mg/kg de BaP a clairement diminué, de manière hautement significative, partant d'une valeur normale de 11,33 UI / mg de protéine enregistrée chez les rats témoins à 4,35 UI / mg de protéine ( $p \leq 0,001$ ) alors que les rats intoxiqués et traités par l'AG (BaP+AG) ont démontré une augmentation plus importante de l'activité de la SOD comparée à l'activité de l'enzyme chez les rats témoins (Contrôle) ( $p \leq 0,001$ ). Le groupe recevant l'AG seul (AG) n'a montré aucune différence significative par rapport au groupe témoin (Contrôle) (Fig. 40). La SOD est une enzyme antioxydante responsable de la dismutation de l'anion superoxyde en  $H_2O_2$  et de l'oxygène moléculaire pour assurer la défense contre les RL (Reddy et al., 2015). La diminution de son activité, dans la présente étude, reflète, non seulement, l'incapacité d'éliminer l'anion superoxyde, mais indique aussi une susceptibilité aux maladies oxydatives et aux altérations fonctionnelles, notamment, celles dues au stress oxydatif induit par des polluants nocifs comme les HAP et à leur tête le BaP.



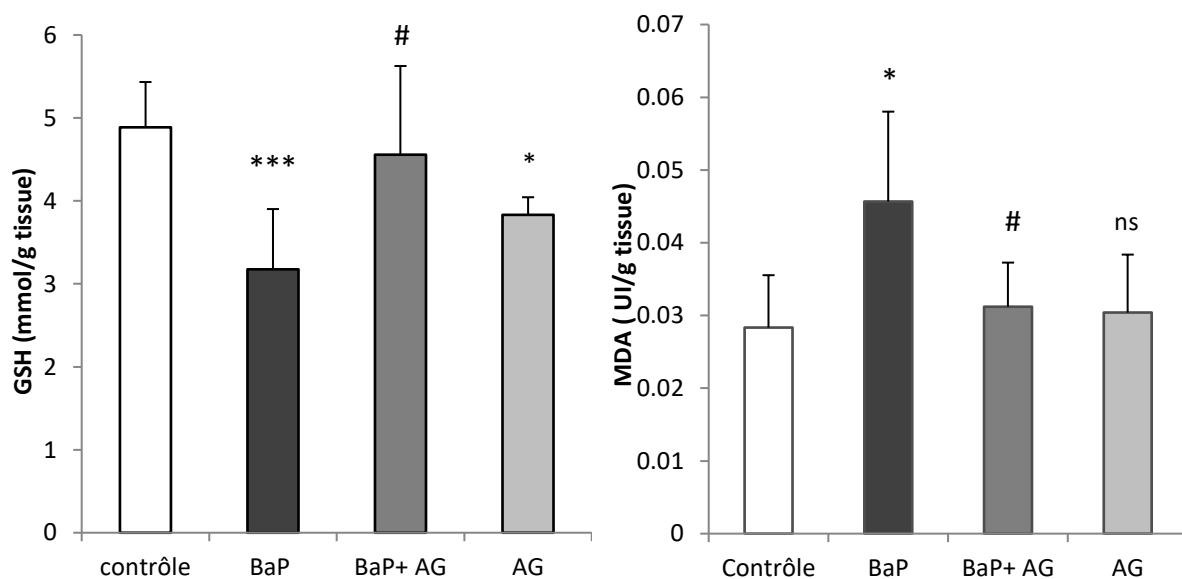
**Fig. 40. Effet de l'AG sur l'activité des enzymes hépatique CAT, GST et SOD après intoxication par le BaP.** Chez les quatre groupe de rats : le groupe témoin recevant l'huile de tournesol et 0,9% NaCl (Contrôle), le groupe intoxiqué recevant 100 mg / kg de BaP en IP (BaP), le groupe intoxiqué et traité par 100 mg/kg d'AG groupe (BaP+AG) et traité par l'AG seul (AG). Les données sont exprimées en moyenne±écart-type. \*\*\* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ) ; ### significativement différent du groupe intoxiqué par le BaP ( $p \leq 0,001$ ) ; ns: non significatif, comparé au groupe témoin.

### III.3.2.2. Recouvrement du glutathion et diminution de la peroxydation lipidique

Les variations dans le taux du GSH hépatique de chaque groupe sont représentées sur la Figure 41. En comparaison avec la valeur basale du groupe témoin, le stress oxydatif causé par le BaP entraîne la déplétion du GSH intracellulaire ( $p \leq 0,001$ ) tandis que le traitement par

l'AG altère significativement la réduction du GSH ( $p \leq 0,05$ ). En effet, la diminution du GSH dans le groupe intoxiqué a été estimée à 65%, par rapport à une récupération quasi totale du taux en GSH dans le groupe post-traité par l'AG.

Le GSH est un antioxydant clé déterminant dans la régulation de l'état cellulaire redox, dans la protection contre les ROS, la régénération des vitamines C et E et donc dans la prévention du stress oxydatif et de la détoxification (Reckziegel et al., 2016). Les modifications de la concentration hépatique réduite en GSH ont démontré que le stress oxydatif causé par le BaP appauvrissait considérablement le GSH intracellulaire, alors que le post-traitement avec l'AG modifiait significativement la diminution du taux de GSH. En effet, la différence était évidente entre : la diminution du taux de GSH chez le groupe de rats intoxiqués par le BaP et le recouvrement presque totale du taux de GSH chez le groupe post-traité par l'AG. Le niveau du GSH a également augmenté significativement dans le groupe intoxiqué et post traité par l'AG, en accord avec les expériences de Navabi et al. (2012) qui ont mis en évidence l'amélioration du rapport GSH/GSSG et la suppression de la génération de RL par l'AG.



**Fig. 41. Effet de l'AG sur le taux du GSH et du MDA hépatiques après intoxication chronique.** 24 semaines après l'injection IP de 100 mg/kg de BaP et traitement par l'AG à 100 mg/kg per os pendant cinq jours consécutifs, chez les rats appartenant aux groupes: témoins (Contrôle), intoxiquées par 100 mg/kg de BaP (BaP), intoxiquées et post-traitées par 100 mg/kg d'AG (BaP+AG) et traitées par l'AG seule (AG). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=6$ ). \* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ) ; \*\*\* significativement différent du groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ) ; # significativement différent du groupe intoxiqué par le BaP ( $p \leq 0,05$ ) ; ns: différence non significative, comparé au groupe témoin.

La Figure 41 montre que l'intoxication chronique par une dose unique IP de 100 mg/kg de BaP provoque l'augmentation significative du taux de MDA hépatique chez le groupe de rats intoxiqués (BaP) ( $p \leq 0,05$ ). Cependant, il est très remarquable que le taux de MDA est significativement plus bas chez les rats traités par l'AG à 100 mg/kg (BaP+AG), où ce taux revient à une valeur proche de la normale, observée chez les rats témoins (Contrôle) ( $p \leq 0,05$ ). Le groupe de rats recevant l'AG seul à une dose de 100 mg/kg (AG) n'a présenté aucune différence significative par rapport au groupe de rats témoins (Contrôle).

Les dommages oxydatifs peuvent également être mesurés par la peroxydation des lipides et son produit final : le MDA (Gao et al., 2011). Même si la peroxydation lipidique est un processus physiologique normal à médiation par des réactions en chaîne non enzymatiques et radicalaires, son niveau est augmenté par un stress oxydatif excessif (Hegazy et al., 2012). L'intoxication chronique par BaP induit une peroxydation lipidique importante et significative indiquant une lésion de la membrane cellulaire et une perturbation de la membrane intercellulaire, en raison d'espèces réactives d'oxygène et d'azote à haut débit ainsi que d'antioxydants diminués (Repetto et al., 2012). Le traitement des rats intoxiqués par l'AG réduit significativement le taux de MDA, en raison de l'activité de piégeage des RL de l'AG et par conséquent, la protection de la structure et des fonctions de la membrane.

### III.3.3. Conclusion

Les deux systèmes antioxydants enzymatique et non enzymatique sont essentiels pour la réponse cellulaire afin de traiter le stress oxydatif, dans les conditions physiologiques. Par conséquent, une enzyme antioxydante comme la CAT, SOD et GSH-Px et les récepteurs d'électrons non-enzymatiques tels que GSH sont affectés et utilisés comme indices pour évaluer le niveau de stress oxydatif (Dey et al., 2013). Notamment, le facteur 2 lié à l'érythroïde (Nrf2) est un régulateur majeur de l'équilibre redox cellulaire. En condition physiologique, le Nrf2 se lie à protéine kelch-like ECH associée-1 (Keap1) dans le cytoplasme, et sont inactivés et facilement dégradés. Sous un stress oxydatif, cependant, Nrf2 dissocie la forme Keap1 par modification de Keap1 ou phosphorylation de Nrf2 et sont ainsi activés. Le Nrf2 activé se déplace dans le noyau et interagit avec l'élément de réponse antioxydant (ARE) favorisant l'expression de gènes cibles cyto-protecteurs incluant des enzymes antioxydantes et les enzymes détoxifiantes de phase II. L'activation accrue de Nrf2 par des molécules pharmacologiques ou le génie génétique a été montré pour protéger le foie

dans différents modèles de stress oxydatif. Par exemple, en termes d'activation de Nrf2, l'utilisation de petites molécules, telles que l'acide oléanolique et l'acide ursolique ont montré une hépatoprotection contre les lésions hépatiques induites par l'APAP, médicament célèbre possédant une hépatotoxicité.

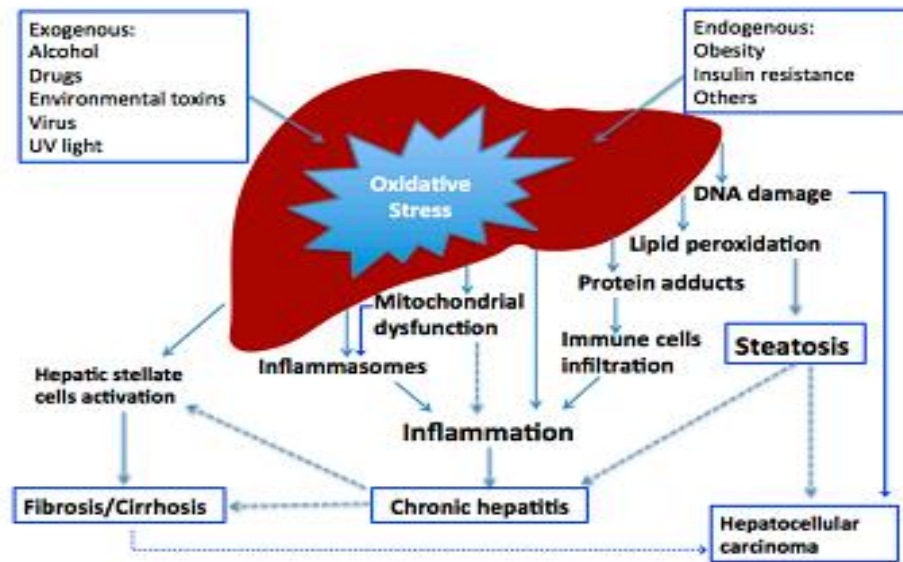


Fig. 42. Mécanismes généraux des maladies hépatiques induites par le stress oxydatif (Li et al., 2015).

Bien que les données des études cliniques doivent encore prouver l'efficacité des antioxydants, l'application de ces derniers est une stratégie curative rationnelle pour la prévention et le traitement des maladies du foie, impliquant un stress oxydatif (Zhang et al., 2013). Des antioxydants naturels ont été trouvés dans de nombreux produits comestibles (Tels que les fruits, les légumes, les céréales et le thé) et les plantes médicinales, qui possèdent souvent de fortes capacités anti-oxydantes et anti-radicalaires ainsi qu'une action anti-inflammatoire. De nombreuses études ont démontrées que les polluants environnementaux tels que les métaux lourds par exemple seraient en cause des dommages oxydatifs dans le foie, chez les modèles animaux. Le foie est un organe essentiel pour la détoxification et le métabolisme, c'est aussi, le lieu de stockage des xénobiotiques le rendant plus exposé aux dommages. Pour cette raison, de nombreux polluants et toxines ont été utilisés pour modéliser les lésions hépatiques chez les animaux et pour étudier les effets des antioxydants/plantes sur les dommages causés sur le foie et induits par les polluants (Li et al., 2015).

La collecte des données de littérature disponibles au sujet des HAP et, particulièrement, du BaP et de ses effets sur la santé humaine, nous a vite orientés vers l'analyse des effets sur les deux organes cibles majeurs de ce polluant, à savoir les poumons et le foie. Notre démarche a été construite à travers la réalisation de modèles expérimentaux animaux comme support biologique pour l'étude biochimique et moléculaire des intoxications induites par le BaP. Afin d'estimer l'étendue des effets de ce toxique, ainsi que l'activité protectrice de l'AG, nous avons fait le choix de mener des expériences sur trois périodes de temps différentes : de 24h à 72h, 28 jours et 6 mois, qui correspondent, respectivement, aux trois types de toxicités aiguë, subaiguë et chronique. Les résultats que nous avons pu obtenir tout au long de notre étude, nous ont permis de déduire plusieurs conclusions et constatations tout à fait remarquables.

Dans un premier temps, le BaP a induit une toxicité aiguë, au niveau des poumons et du foie, caractérisée par l'apparition d'un stress oxydatif dû à un déséquilibre de la balance pro-oxydants/antioxydants et se traduisant, globalement, par une diminution des capacités antioxydantes cellulaires et une augmentation de la peroxydation lipidique durant les trois jours qui suivent l'exposition au BaP. Cette même expérience, nous a permis de noter que l'AG jouerait un double rôle «pro et anti oxydant» de manière spécifique, selon l'organe. L'AG a montré une activité, d'avantage, prooxydante au niveau des poumons, tandis qu'il a bien montré une activité antioxydante au niveau hépatique. Cependant, des tests plus avancés, notamment sur un plan moléculaire et visant d'autres voies de signalisation cellulaire sont nécessaires, afin de comprendre et d'élucider ce double rôle, en plus de l'établissement de l'effet dose-dépendant de l'AG. Par ailleurs, le rôle complexe du stress oxydatif dans les processus physiologiques et pathologiques reste non élucidé. Ainsi, d'études des mécanismes sous-jacents à l'action du BaP, chez les humains, sont des défis à venir.

Par la suite, c'est au cours de l'induction d'une toxicité subaiguë par le BaP que nous avons pu mettre en évidence le rôle potentiel joué par une type de lectines animales, les Gals. En effet, nos résultats ont démontré une modulation de l'expression génétique de deux Gals, largement et spécifiquement, étudiées dans le foie et les poumons, il s'agissait des Gals 3 et 8. Cette modulation implique un rôle actif de ces glycoprotéines dans ce type d'intoxications, notamment, à travers des voies impliquées dans la réponse inflammatoire. La Gal 3 est une Gal clé, de part, sa présence ubiquitaire et les rôles importants qu'elle joue dans de multiples processus physiologiques et pathologiques. Le profil d'expression de cette Gal au cours de

l'intoxication subaiguë par le BaP suggère son rôle potentiel dans la réponse cellulaire aux xénobiotiques et qui pourrait être vérifié par une analyse de son expression, dans des cellules hépatiques en culture, en présence du BaP.

La toxicité chronique représente une partie importante de l'étude des intoxications induites par le BaP, étant donné son impact sur la santé humaine, à long terme. En effet, cette molécule est un polluant mutagène, génotoxique et cancérigène, largement, distribué dans l'environnement et auquel l'organisme humain est exposé de manière quotidienne. Il est, aussi, admis que la pollution est en cause de pathologies sévères, et même, de mortalité. Le BaP, lui-même, est reconnu pour causer le cancer du poumon, c'est pour cette raison que la toxicité chronique pulmonaire ne figure pas dans le cadre de notre étude où c'est plutôt le foie, organe majeur responsable du métabolisme du BaP qui a fait l'objet d'une évaluation, comme siège de la toxicité chronique de ce xénobiotique. Nous avons montré le développement d'un stress oxydatif important, au niveau hépatique, essentiellement, du à la diminution des capacités antioxydantes enzymatiques (CAT, GST et SOD) et non enzymatiques (GSH) causées, principalement, par les ROS générés par le BaP. Par ailleurs, une augmentation significative de la peroxydation lipidique à l'origine de nombreux dysfonctionnements membranaires, a été confirmée par l'augmentation des taux sériques des transaminases hépatiques (ALT et AST), chez les rats intoxiqués. De plus, cette toxicité chronique s'est traduite par la survenue de dommages tissulaires importants tels que l'apparition de foyers de nécroses et par l'absence, toutefois, de lésions précancéreuses.

Le traitement par l'AG a clairement renversé les effets toxiques induits, au niveau du foie, en diminuant le stress oxydatif et en améliorant de façon remarquable l'état du tissu hépatique. Cependant, bien que le concept de thérapie antioxydante ait été soulevé, depuis des décennies, il reste du chemin à parcourir avant l'application en clinique des antioxydants. Ils sont, principalement, utilisés comme compléments alimentaires pour prévenir la progression de la maladie ou améliorer l'efficacité des traitements. Les HAP sont responsables de mortalité dans le monde, et notamment, en Algérie, leur toxicité n'est presque plus à prouver et ce sont les effets à long terme qui nécessitent une attention particulière afin de réduire l'exposition à ce type de polluants toxiques et d'établir de nouveaux moyens de diagnostic précoce, c'est-à-dire, avant l'avènement de maladies, notamment, broncho-pulmonaires et potentiellement hépatiques. Dans ce contexte, les Gals représentent des outils de grand intérêt. De plus, la mise au point de stratégies basées sur l'utilisation de substances naturelles

bioactives telles que l'AG permettant la protection, la prévention ou l'élaboration de nouvelles thérapeutiques afin de lutter contre les effets néfastes induits.



## Liste des références

- Abdel-Shafay H, Mansour MSM (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 25: 107-123.
- Advedissian T, Deshayes F, Poirier F, Grandjean C, Viguier M (2015). Les galectines: Des lectines pas comme les autres. *Médecine/Sciences* 31: 499-505.
- Aglan HA, Ahmed HH, El-Toumy SA, Mahmoud NS (2017). Gallic acid against hepatocellular carcinoma: An integrated scheme of the potential mechanisms of action from in vivo study. *Tumor Biology* 39(6): 1-10.
- Akahani S, Nangia Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A (1997). Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Research* 57: 5272-5276.
- Albert RE, Miller ML, Cody T, Andringa A, Shukla R, Baxter CS (1991). Benzo[a]pyrene-induced skin damage and tumor promotion in the mouse. *Carcinogenesis* 12(7): 1273-1280.
- Almkvist J, Karlsson A (2004). Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconjugate Journal* 19 : 575-581.
- Anderson G, Jenkinson EJ (2000). Thymus organ cultures and T-cell receptor repertoire development. *Immunology* 100: 405-410.
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Arts IC, Van De Putte B, Hollman PC (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 48:1752-7.
- Asha S, Girika D (2011). Benzo[a]pyrene induced liver and kidney cancer in swiss albino mice. *Research in Pharmacy* 1(4): 22-27.
- Ba Q, Li J, Huang C, Qiu H, Li J, Chu R, et al (2015). Effects of Benzo[a]pyrene Exposure on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Angiogenesis, Metastasis, and NF- $\kappa$ B Signaling. *Environmental Health Perspectives* 123: 246-254.
- Bacigalupo ML, Manzi M, Rabinovich GA, Troncoso MF (2013). Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 19(47): 8831-8849.
- Badhani B, Sharma N, Kakkar R (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Advances* 5: 27540.
- Baptiste TA, James A, Saria M, Ochieng J (2007). Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: Implications in the extracellular functions of the lectin. *Experimental Cell Research* 313: 652-664.
- Barbaro G, Di Lorenzo G, Soldini M, Parrotto S, Bellomo G, Belloni G, Grisorio B, Barbarini G (1996). Hepatic glutathione deficiency in chronic hepatitis C: quantitative evaluation in patients who are HIV positive and HIV negative and correlations with plasmatic and lymphocytic concentrations and with the activity of the liver disease. *The American Journal of Gastroenterology* 91(12): 2569-2573.
- Baulig A, Garlatti M, Bonvallot V, Marchand A, Barouki R, Marano F, et al (2003). Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human

airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 285(3): 671-679.

Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.

Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L (1998). Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Experimental and Clinical Research* 24: 133-8.

Betti-Cusso M (2013). Ces aliments qui nous protègent. *Le figaro.fr santé*. Disponible sur: <https://sante.lefigaro.fr/actualite/2013/09/17/21265-ces-aliments-qui-nous-protigent>

Bodduluru LN, Kasala ER, Barua CC, Karnam KC, Dahiya V, Ellutla M (2015). Antiproliferative and antioxidant potential of hesperetin against benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Chemico-Biological Interactions* 242: 345-352.

Bonnard N, Brondeau MT, Clavel T, Falcy M, Jargot D, Lafontaine M, Reynier M, Schneider O (2007). Benzo(a)pyrène. *INRS* 144: 1-3.

Bosoi CR, Yang X, Huynh J, Parent-Robitaille C, Jiang W, Tremblay M, Rose CF (2012). Systemic oxidative stress is implicated in the pathogenesis of brain edema in rats with chronic liver failure. *Free Radicals Biology and Medicine* 52: 1228-1235.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Bray TM, Taylor CG (1994). Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition. *Biochemical Pharmacology* 47: 2113-2123.

Brewer CF (2002). Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica Biophysica Acta* 1572: 255-262.

Bucher D L (1945). Antioxidants for fish oils. *Fishery Market News* 7: 7-18.

Camby I, Le MM, Lefranc F, Kiss R (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16: 137-57.

Canbek M, Ustüner MC, Kabay S (2011). The effect of gallic acid on kidney and liver after experimental renal ischemia/reperfusion injury in the rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5: 1027-1033.

Cao Z, Guo X. (2016). The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein Cell* 7: 314-324.

Carlsson MC, Balog CI, Kilsgård O, Hellmark T, Bakoush O, Segelmark M (2012). Different fractions of human serum glycoproteins bind galectin-1 or galectin-8, and their ratio may provide a refined biomarker for pathophysiological conditions in cancer and inflammatory disease. *Biochimica Biophysica Acta* 1820(9): 1366-72.

Carlsson MC, Cederfur C, Schaar V, Balog CI, Lepur A, Touret F (2011). Galectin-1- binding glycoforms of haptoglobin with altered intracellular trafficking, and increase in metastatic breast cancer patients. *PLoS One* 6: 26560.

Cattaneo V, Tribulatti MV, Carabelli J, Carestia A, Schattner M, Campetella O (2014). Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology* 24(10): 966-973.

Cavaliere EL, Rogan EG (1992). The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis: The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacology and Therapeutics* 55(2): 183-199.

- Cederfur C, Salomonsson E, Nilsson J, Halim A, Oberg CT, Larson G, Nilsson UJ, Leffler H (2008). Different affinity of galectins for human serum glycoproteins: Galectin-3 binds many protease inhibitors and acute phase proteins. *Glycobiology* 18(5): 384-394.
- Chang WA, Tsai MJ, Kuo PL, Hung AY (2017). Role of galectins in lung cancer (Review). *Oncology Letters* 14: 5077-5084.
- Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM (2004). Proteomics in Diagnostic Pathology: Profiling and Imaging Proteins Directly in Tissue Sections. *The American Journal of Pathology* 165(4): 1057-1068.
- Chen CY, Chen KC, Yang TY, Liu HC, Hsu SL (2013). Gallic Acid Induces a Reactive Oxygen Species-Provoked c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase-Dependent Apoptosis in Lung Fibroblasts. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine* 2013: 613950.
- Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Carmelo BB (2004). Galectin genes: Regulation of expression. *Glycoconjugate Journal* 19: 441-449.
- Choubey S, Varughese LR, Kumar V, Beniwal V (2015). Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharmaceutical Patent Analyst* 4: 305-315.
- Chung LY, Tang SJ, Sun GH, Chou TY, Yeh TS, Yu SL, Sun KH (2012). Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. *Clinical Cancer Research* 18: 4037-4047.
- Cillard J (2011, juin). Radicaux libres et vieillissement: des aspects fondamentaux aux applications cliniques. In, 4<sup>ème</sup> Symposium International Nutrition, Biologie de l'Oxygène et Médecine. *Société Française de Recherches sur Les Radicaux Libres*, Paris.
- Cioci G (2006). Etude Structure-Fonction De Glycoconjugués Et De Lectines Bactériennes Et Fongiques [En ligne]. Thèse de Doctorat. Université Grenoble I – Joseph Fourier, Grenoble. Disponible sur : tel.archives-ouvertes.fr (00081084).
- CIRC (Centre International de Recherche Contre le Cancer) (2010). Air Pollution, Part 1, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures.
- Claiborne A (1985). Catalase activity. In: Greenwald RA, editors. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton, USA: *CRC Press*, pp 283-284.
- Cooper, DNW (2002). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica Biophysica Acta* 1473: 209-231.
- Cowles EA, Agrwal N, Anderson RL, Wang JL (1990). Carbohydrate-binding protein 35: isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated derivative. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 17706 –17712.
- Crane M, Constans A (2004). Protein Purification Gets Easier, *The Scientist* 18(9): 45.
- Crocker PR (2002). Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell. *Current Opinion Structural Biology* 12(5): 609-15.
- Cui H, Gu X, Chen J, Xie Y, Ke S, Wu J, Golovko A, Morpurgo B, Yan C, Phillips TD, Xie W, Luo J, Zhou Z, Tian Y (2017). Pregnane X receptor regulates the AhR/Cyp1A1 pathway and protects liver cells from benzo-[a]-pyrene-induced DNA damage. *Toxicology Letters* 275: 67-76.
- Da Silva BAK, Silva IS, Pereira DM, et al (2007). Experimental model of pulmonary carcinogenesis in Wistar rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 22: 16-20.

- Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Talas ZS, Nabavi SM (2014). Polyphenols: Well Beyond The Antioxidant Capacity: Gallic Acid and Related Compounds as Neuroprotective Agents: You are What You Eat!. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 15: 362-372.
- Dangles O, Dufour C, Bret S (1999). Flavonol–serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *Journal of Chemical Society* 2: 737-44.
- Day AJ, Bao YP, Morgan MRA, Williamson G (2000). Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radicals Biology and Medicine* 29: 1234-43.
- Delacour DV, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, Moreau HO, Maes E, Pons A, Andre S, LeBivic A, Gabius HJ, Manninen A, Simons K, Huet G (2005). Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *Journal of Cellular Biology* 169: 491-501.
- DeMarini DM, Landi S, Tian D, Hanley NM, Li X, Hu F (2001). Lung tumor KRAS and TP53 mutations in nonsmokers reflect exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Cancer Research* 61(18): 6679-6681.
- Deng C, Dang F, Gao J, Zhao H, Qi S, Gao M (2018). Acute benzo[a]pyrene treatment causes different antioxidant response and DNA damage in liver, lung, brain, stomach and kidney. *Helyon* 4(11): e00898.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274(5286): 430-432.
- Dey A, Lakshmanan J (2013). The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food and Function* 4: 1148-1184.
- Dragomir AC, Sun R, Choi H, Laskin JD, Laskin DL (2012). Role of galectin-3 in classical and alternative macrophage activation in the liver following acetaminophen intoxication. *Journal of Immunology* 189(12): 5934-41.
- Drickamer K (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Journal of Molecular Biology* 263: 9557-9560.
- Drickamer K (1999). C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology* 9: 585-590.
- Dumic J, Dabelic S, Flogel M (2006). Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica Biophysica Acta* 1760: 616-635.
- Ellman GL (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.
- Elola MT, Chiesa ME, Alberti AF, Mordoh J, Fink NE (2005). Galectin-1 receptors in different cell types. *Journal of Biomedical Science* 12: 13-29.
- EPA (1977). Toxic and Priority Pollutants Under the Clean Water Act: Priority pollutants list. In: United States Environmental Protection Agency web site, December 2014 available from: <https://www.epa.gov/eg/toxic-and-priority-pollutants-under-clean-water-act>.
- Fenton NB, Arreguín LB, Méndez CF, Arreguín ER (2004). Purification and Characterization of Liver Lectins from a Lizard, *Sceloporus spinosus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 34(2): 153-168.
- Fernandes FHA, Salgado HRN (2016). Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46: 257-265.
- Florov AF, Mishenkova EL (1970). Inhibitory effects of some preparations from higher plants on reproduction of influenza virus in vitro and in vivo. *Mikrobiologichnyi Zhurnal* 32: 628-33.

Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters* 266(1): 6-11.

Franco-Fraguas L, Batista-Viera F, Carlsson J (2003). Isolation of a beta-galactoside-binding lectin from cat liver. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 447-457.

Freitas M, Alves V, Sarmento-Ribeiro A, Mota-Pinto A (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons May Contribute for Prostate Cancer Progression. *Journal of Cancer Therapy* 4: 37-46.

Gao M, Li Y, Long J (2011). Induction of oxidative stress and DNA damage in cervix in acute treatment with benzo[a]pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 719: 52-59.

Garçon G, Gosset P, Garry S, Marez T, Hannotiaux MH, Shirali P (2001). Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo(a)pyrene-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. *Toxicology Letters* 121: 107-117.

GBD Risk Factors Collaborators (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 10053: 1659-1724.

Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB (2011). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta histochemica* 113(3): 236-247.

Gruson D, Ko G (2012). Galectins testing: New promises for the diagnosis and risk stratification of chronic diseases?. *Clinical Biochemistry* 45: 719-726.

Gudowska M, Gruszewska E, Cylwik B, Panasiuk A, Rogalska M, Flisiak R, Szmitkowski M, Chrostek L (2015). Galectin-3 Concentration in Liver Diseases. *Annals of Clinical and Laboratory Sciences* 45(6): 669-73.

Gum SI, S.J. Jo, S.H. Ahn, (2007), The potent protective effect of wild ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) against benzo[a]pyrene-induced toxicity through metabolic regulation of CYP1A1 and GSTs. *Journal of Ethnopharmacology* 112: 568-576.

Habdous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M, Visvikis S (2004). Polymorphismes des glutathion S-transférases et pathologies humaines: bilan des études épidémiologiques. *Annales de Biologie Clinique* 62: 15-24.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.

Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U, Ullah MF, Semin (2007). Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Cancer Biology* 17: 370-376.

Hegazy AM, Bakry HH, El-Shawarby RM (2012). Effects of benzo(a)pyrene on blood components, tumor markers, and oxidative status in mice. *Toxicological and Environmental Chemistry* 94: 136-145.

Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K (2001). In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3178-86.

Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T (2006). Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 5060-5065.

- Henkler FJ, Brinkmann A, Luch L (2010). The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers* 2: 376-396.
- Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG (2006). Galectin-1 Binds Different CD43 Glycoforms to Cluster CD43 and Regulate T Cell Death. *Journal of Immunology* 177: 5328-5336.
- Hirashima M, Kashio Y, Nishi N, Yamauchi A, Imaizumi TA, Kageshita T, Saita N, Nakamura T (2004). Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconjugate Journal* 19: 593-600.
- Hittelet A, Legendre H, Nagy N, Bronckart Y, Pector JC, Salmon I (2003). Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *International Journal of Cancer* 9: 103-370.
- Hollman PCH, Arts ICW (2000). Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Food Science Agriculture* 80: 1081-93.
- Hsu CL, Yen CG (2007). Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition* 98, 727-735.
- Hsu DK, Liu FT (2004). Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconjugate Journal* 19: 507-515.
- Hsu YL, Wu CY, Hung JY, Lin YS, Huang MS, Kuo PL (2013). Galectin-1 promotes lung cancer tumor metastasis by potentiating integrin  $\alpha\beta 4$  and Notch1/Jagged2 signaling pathway. *Carcinogenesis* 34: 1370-1381.
- Huflejt ME, Leffler H (2004). Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconjugate Journal* 20: 247-255.
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG (2001). Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Research* 61(17): 6350-6355.
- Hussein SA, Karousa MM, Amin A, Awadalla MA (2016). Gastroprotective and Antioxidant Activities of Rutin against Ethanol-induced Gastric Mucosal Erosion in Rats via suppression of Inflammation, Oxidative Stress and Apoptosis in Stomach tissues. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 6(5): 1658-1668.
- Hyp J, Dauben Jr, James D, Laity WJL (1968). Diamagnetic Susceptibility Exaltation in Hydrocarbons. *Journal of the American Chemistry Society* 91: 1991-1998.
- IARC (2010). Monographs on the Évaluation of Carcinogénic Risk of Chemicals to Humans.V 92.
- IARC (2018). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. In: International Agency for Research on Cancer web site, 12 septembre 2018 available from: <https://www.iarc.fr/fr/featured-news/>
- Ideo H, Seko A, Yamashita K (2005). Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 280: 4730-4737.
- Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y (2003). Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology and Toxicology* 92: 33-38.
- Joshi G, Johnson JA (2012). The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 7(3): 218–229.

- Kasai K, Hirabayashi J (1996). Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *Journal of Biochemistry* 119(1): 1-8.
- Kasala ER, Bodduluru LN, Barua CC, Sriram CS, Gogoi R (2015). Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports* 67: 996-1009.
- Kawada M, Ohno Y, Ri Y, Ikoma T, Yuuetu H, Asai T, Watanabe M, Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown RJC (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International* 60: 71-80.
- Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo H, Shin T (2007). Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biology International* 31: 655-662.
- Kim HR, Ch, Lin HM, Biliran H, Raz A (1999). Cell Cycle Arrest and Inhibition of Anoikis by Galectin-3 in Human Breast Epithelial Cells. *Cancer Research* 59: 4148-4154.
- Klaunig JE, Kamendulis LM (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44: 239-267.
- Kocourek J, Horejsi V (1981). Defining a lectin. *Nature* 290: 188.
- Kumar M, Sharma VL, Sehgal A, Jain M (2012). Protective Effects of Green and White Tea Against Benzo(a)pyrene Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Murine Model. *Nutrition and Cancer* 64(2): 300-306.
- Kuwabara I, Kuwabara Ya, Yang RY, Schuler M, Green DR, Bruce L, Zuraw BL, Hsu DK, Liu FT (2002). Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry* 277: 3487-3497.
- Lariche N, Lahouel M, Benguedouar L, et al (2017). Ferulenol, a Sesquiterpene Coumarin, Induce Apoptosis via Mitochondrial Dysregulation in Lung Cancer Induced by Benzo[a]pyrene: Involvement of Bcl2 Protein. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 17: 1-6.
- Labib S, Yauk C, Williams A, Arlt VM, Phillips DH, White PA, Halappanavar S (2012). Subchronic Oral Exposure to Benzo(a)pyrene Leads to Distinct Transcriptomic Changes in the Lungs That Are Related to Carcinogenesis. *Toxicological Sciences* 129(1): 213-224.
- Ladji R, Yassaa N, Balducci C, Cecinato A (2013). Particle size distribution of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban and industrial aerosol of Algiers, Algeria. *Environmental sciences and pollution research* 21: 1819-1832.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lahm H, Andre S, Hoeflich A, Kaltner H, Siebert HC, Sordat B, von der Lieth CW, Wolf E, Gabius HJ (2004). Tumor galectinology: Insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconjugate Journal* 20: 227-238.
- Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH (2000). Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 2848-52
- Lee W, Lee SY, Son YJ, Yun JM (2015). Gallic Acid Decreases Inflammatory Cytokine Secretion Through Histone Acetyltransferase/Histone Deacetylase Regulation in High Glucose-Induced Human Monocytes. *Journal of Medicina Food* 18(7): 793-801.

- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F (2004). Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal* 19: 433-440.
- Levy Y, Auslender S, Eisenstein M, Vidavski RR, Ronen D, Bershadsky AD, Zick Y (2006). It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology* 16 (6): 463-476.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* 6: 6020-6047.
- Li S, Tan H, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 16(11): 26087-26124.
- Li W, Hu J, Adebali O, Adar S, Yang Y, Chiou YY, Sancar A (2017). Human genome-wide repair map of DNA damage caused by the cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (26): 6752-6757.
- Liu FT (2005). Regulatory roles of galectins in the immune response. *International Archives of Allergy and Immunology* 136: 385-400.
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochimica Biophysica Acta* 1572: 263-273.
- Liu FT, Rabinovich GA (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 5: 29-41.
- Liu RH (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of food sciences* 78(1): 18-25.
- Locatelli C, Carvalho DR, Mascarello A, de Cordova CA, Yunes RA, Nunes RJ, Pilati C, Creczynski-Pasa TB (2012). Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. *Investigational New Drugs* 30(3): 870-9.
- Locatelli C, Filippin-Monteiro FB, Centa A, Creczynski-Pasa. 2013a TB. Antioxidant, antitumoral and anti-inflammatory activities of gallic acid. In book: Handbook on Gallic Acid: Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications, Edition: 4 th, Chapter: Antioxidant, Antitumoral and Anti-Inflammatory Activities of Gallic Acid, Publisher: NovaPublishers, Editors: Michelle A. Thompson, Parker B. Collins, pp.1-23.
- Locatelli C, Filippin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB. 2013b. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 60: 233-239.
- Lu Z, Nie G, Belton PS, Tang H, Zhao B (2006). Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International* 48: 263-74.
- Luo JH, Ren B, Keryanov S, Tseng GC, Rao UN, Monga SP, Strom S, Demetris AJ, Nalesnik M, Yu YP, Ranganathan S, Michalopoulos GK (2006). Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology* 44: 1012-1024.
- Ma S, Lv L, Lu Q (2014). Gallic acid attenuates dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in mice through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1 and glutathione-s-transferase alpha 3. *Medicinal Chemistry* 4: 663-669.
- Malik AI, Williams A, Lemieux CL, White PA, Yauk CL (2012). Hepatic mRNA, microRNA, and miR-34a-Target responses in mice after 28 days exposure to doses of benzo(a)pyrene that elicit DNA damage and mutation. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 53: 10-21.



- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jime'nez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-47.
- Marie C, Maitre A, Douki T, Gateau M, Tarantini A, Guiraud P, et al (2008). Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *Journal of Applied Toxicology* 28(5): 579-590.
- Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis and carcinogenesis. *Archives of toxicology* 82(5): 273-299.
- McGeady P, Kuroda Sh, Shimizu K, Takai J, Gelb MH (1995). The farnesyl group of H-Ras facilitates the activation of a soluble upstream activator of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 270: 26347-26351.
- Melo AG, Souza PNC, Maia NC, Thomas AB, Silva LBR, Batista LR, Ferreira RL, Cardoso PG (2013). Screening and Identification of Tannase-Producing Fungi Isolated from Brazilian Caves. *African Journal of Microbiological Research* 7: 483-487.
- Miller KP, Ramos KS (2001). Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug metabolism reviews* 33(1): 1-35.
- Moiseeva EP, Williams B, Samani NJ (2003). Galectin 1 inhibits incorporation of vitronectin and chondroitin sulfate B into the extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells. *Biochimica Biophysica Acta* 1619: 125-132.
- Moon J, Tsushida T, Nakahara K, Terao J (2001). Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radicals Biology and Medicine* 30: 1274-85.
- Moquet V, Egly JM, Geacintov N (2008). Une cigarette, un aromatique... et un cancer. *Médecine/Sciences* 24(3): 233-234.
- Morris RE, Bernard GR (1994). Significance of Glutathione in Lung Disease and Implications for Therapy. *The American Journal of the Medical Sciences* 307: 119-127.
- Muñoz B, Albores A (2011). DNA Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Mechanisms and Markers, in: Prof. Clark Chen (Ed.). Selected Topics in DNA Repair, *IntechOpen.*, London, pp. 125-144.
- Nabavi SF, Habtemariam S, Jafari M (2012). Protective role of gallic acid on sodium fluoride induced oxidative stress in rat brain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89: 73-77.
- Nagae M, Nishi N, Murata T, Usui T, Nakamura T, Wakatsuki S, Kato R (2006). Crystal structure of the galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain from *Mus musculus* reveals the basic mechanism of carbohydrate recognition. *Journal of Biological Chemistry* 281: 35884-35893.
- Nickel W (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *European Journal of Biochemistry* 270: 2109-2119.
- Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J, Sato S (2007). Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry* 282: 1374-1383.
- Norambuena A, Metz C, Vicuña L, Silva A, Pardo E, Oyanadel C, Massardo L, González A, Soza A (2009). Galectin-8 Induces Apoptosis in Jurkat T Cells by Phosphatidic Acid-Mediated ERK1/2 Activation Supported by Protein Kinase A Down-Regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 284(19): 12670-9.

- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.
- Olayinka ET, Ore A, Ola OS, Adeyemo OA (2015). Ameliorative effect of gallic acid on cyclophosphamide-induced oxidative injury and hepatic dysfunction in rats. *Medicinal Sciences* 3: 78-92.
- Padma VV, Sowmya P, Felix TA, et al (2011). Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *Food and Chemical Toxicology* 49: 991-998.
- Palma HE, Wolkmer P, Gallio M, Correa MM, Schmatz R, Thome GR, Pereira LB, Castro VS, Pereira AB, Bueno A (2014). Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 386: 199-210.
- Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS (1999). Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chemical Research in Toxicology* 12(1): 1-18.
- Perone MJ, Bertera S, Shufesky WJ, Divito SJ, Montecalvo A, Mathers AR, Larregina AT, Pang M, Seth N, Wucherpennig KW, Trucco M, Baum LG, Morelli AE (2009). Suppression of Autoimmune Diabetes by Soluble Galectin-1. *The Journal of Immunology* 182(5): 2641-2653.
- Picot A, Mantandon F (2013). Les arènes. In: Picot A, Mantandon F (eds): *Ecotoxicochimie appliqué au hydrocarbures*. Cachan, *Lavoisier*, pp 355.
- Poirier F (2002). Roles of galectins in vivo. *Biochemical Society Symposium* 69: 95-103.
- Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, Dunkel M, Gewiess A, Preissner S (2013). Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PLoS ONE* 8: e82562.
- Qu SX, Stacey NH (1996). Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 17(1): 53-59.
- Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A (2007). An emerging role for galectins in tuning the immune response: Lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology* 66: 143-158.
- Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S (2002). Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends in Immunology* 23(6): 313-20.
- Rapoport EM, Kurmyshkina OV, Bovin NV (2008). Mammalian Galectins: Structure, Carbohydrate Specificity and Functions. *Biochemistry* 73(4): 393-405.
- Rechreche H, Mallo GV, Montalto G, Dagorn JC, Iovana JL (1997). Cloning and expression of the mRNA of human galectin-4, an S-type lectin down-regulated in colorectal cancer. *European Journal of Biochemistry* 248(1): 225-30.
- Reckziegel P, Dias VT, Benvegnú DM et al (2016). Antioxidant protection of gallic acid against toxicity induced by Pb in blood, liver and kidney of rats. *Toxicological Reports* 3: 351-356.
- Reddy KP, Madhu P, Reddy PS (2015). Induction of oxidative stress by benzo(a)pyrene in the epididymis of Wistar rats. *Toxicological and Environmental Chemistry* 97: 1226-1235.
- Repetto M, Semprine J, Boveris A (2012). Lipid peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination, in: A. Catala (eds.), *Lipid peroxidation, InTech.*, Rijeka, pp. 3-33.

- Revkin JH, Shear CL, Pouleur HG, Ryder SW, Orloff DG (2007). Biomarkers in the prevention and treatment of atherosclerosis: need, validation, and future. *Pharmacological Review* 59: 40-53.
- Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K (2011). Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: Common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 26, 30-46.
- Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: A review. *Current Medicine and Chemistry* 19: 4850-4860.
- Saussez S, Decaestecker C, Mahillon V, Cludts S, Capouillez A, Chevalier D, et al (2008). Galectin-3 upregulation during tumor progression in head and neck cancer. *Laryngoscope* 118: 1583-90.
- Seelenmeyer C, Wegehngel S, Tews I, Kunzler M, Aebi M, Nickel W (2005). Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *Journal of Cellular Biology* 171: 373-381.
- Seetharaman J, Kanigsber A, Slaaby R, Leffler H, Barondes S H, and Rini J M (1998). X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 273: 13047-13052.
- Selvendiran K, Banu SM, Sakthisekaran D (2004). Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Clinica Chimica Acta* 350: 73-78.
- Serrano J, Cipak A, Baoda J, Gonzalo H, Cacabelos D, Cassanye A, Pamplona R, Zarkovic N (2010). Double-edged sword behaviour of gallic acid and its interaction with peroxidases in human microvascular endothelial cell culture (HMEC-1). Antioxidant and pro-oxidant effects. *Acta Biochim Polonica* 57: 193–198.
- Shahidi F, Naczki M (1995). Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: *Technomic Publishing Co Inc.*
- Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog J (2005). Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Research* 65: 7292-7300.
- Sharon N, Halina L (2003). Lectins. *Kluwer Academic Publishers.*
- Shekhar MP, Nangia-Makker P, Tait L, Miller F, Raz A (2004). Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial-endothelial interactions. *The American Journal of Pathology* 165: 1931–1941
- Sheu HL, Lee WJ, Lin SJ, Fang GC, Chang HC, You WC (1997). Particle-bound PAH content in ambient air. *Environmental Pollution* 96(3): 369-82.
- Shimada T (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and pharmacokinetics* 21(4): 257-76.
- Shinno E, Shimoji M, Imaizumi N, Kinoshita S (2005). Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by gallic acid. *Life Sciences* 78: 99-106.
- Sikdar S, Mukherjee A, Khuda-Bukhsh AR (2014). Ethanolic Extract of *Marsdenia condurango* Ameliorates Benzo[a]pyrene-induced Lung Cancer of Rats. *Journal of Pharmacopuncture* 17: 007-017.
- Simonetti P, Pietta P, Testolin G (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 1152-5.

Singal AK, Jampana SC, Weinman SA (2011). Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver International* 31: 1432-1448.

Smithgall TE, Harvey RG, Penning TM (1988). Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 263(4): 14-20.

Solhaug A, Øvrebø S, Møllerup S, Låg M, Schwarze PE, Nesnow S, Holme JA (2005). Role of cell signaling in B[a]P-induced apoptosis: characterization of unspecific effects of cell signaling inhibitors and apoptotic effects of B[a]P metabolites. *Chemico-Biological Interactions* 151(2): 101-119.

Stancic M, van Horssen J, Thijssen VL, Gabius HJ, van der Valk P, Hoekstra D, Baron W (2011). Increased expression of distinct galectins in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 37: 654-671.

Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, Baum LG (2006). Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *Journal of Immunology* 176: 778-789.

Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF, Cummings RD (2008). Galectins-1, -2 and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *Journal of Biological Chemistry* 283(15): 10109-23.

Strlic M, Radovic T, Kolar J, Pihlar J (2002). Anti- and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems. *Food Chemistry* 50: 6313-6317.

Su Y, Zhao B, Guo F, Bin Z, Yang Y, Liu S, et al (2014). Interaction of benzo[a]pyrene with other risk factors in hepatocellular carcinoma: a casecontrol study in Xiamen, China. *Annals of Epidemiology* 24: 98-103.

Sundblad V, Mathieu V, Kiss R, Rabinovich GA (2013). Galectins: Key Players in the Tumor Microenvironment. In: Sundblad V, Cancer immunotherapy, *Academic Press*, Cambridge, pp 537-563.

Sunil VR, Francis M, Vayas KN, Cervelli JA, Choi H, Laskin JD, Laskin DL (2015). Regulation of ozone-induced lung inflammation and injury by the  $\beta$ -galactoside-binding lectin galectin-3. *Toxicology and Applied Pharmacology* 284: 236-245.

Suzuki Y, Inoue T, Yoshimaru T, Ra C (2008). Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. *Biochimica Biophysica Acta* 1783: 924-934.

Tang SC, Sheu GT, Wong RH, Huang CY, Weng MW, Lee LW, Hsu CP, Ko JL (2010). Expression of glutathione S-transferase M2 in stage I/II non-small cell lung cancer and alleviation of DNA damage exposure to benzo[a]pyrene. *Toxicology Letters* 192: 316-323.

Tangney C, Rasmussen HE (2013). Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Current Atherosclerosis Reports* 15(5): 324.

Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW (2008). The Galectin Profile of the Endothelium Altered Expression and Localization in Activated and Tumor Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology* 172(2): 545-553.

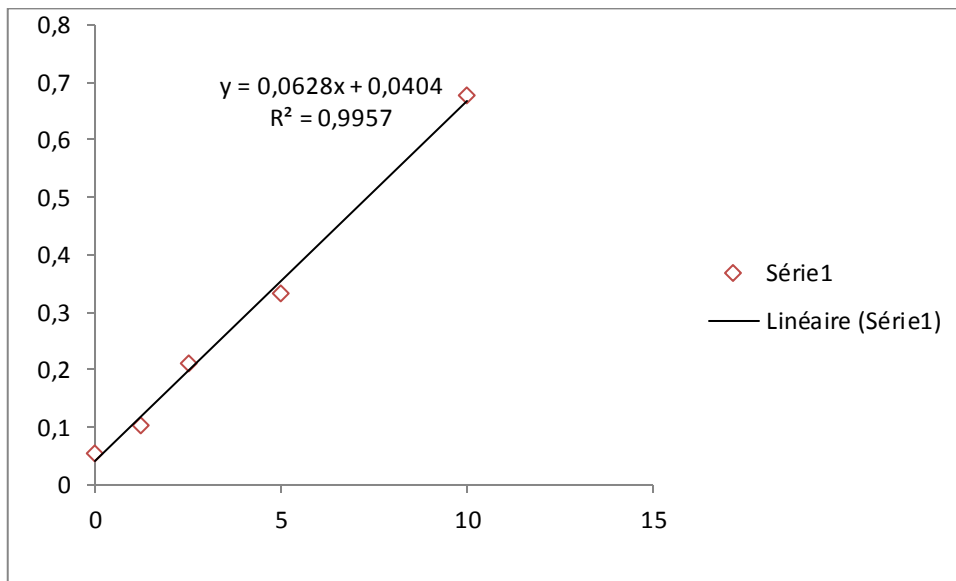
Thompson PE, Moore AM, Reinertson JW (1953). Antimalarial activity of bresorcylic acid and analogs and reversal by p-hydroxybenzoic acid. *Antibiotics and Chemotherapy* 3: 399-408.

Tomas-Barberan FA, Clifford MN (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *Journal of Science Food and Agriculture* 80: 1024-32

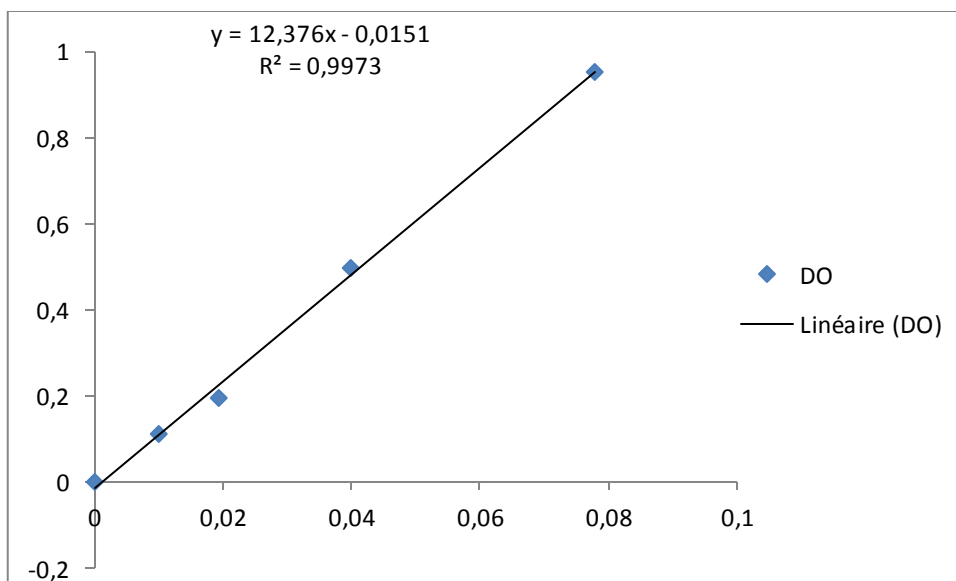
- Topfer-Petersen E, Romero E, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ (1998). Spermadhesins: a new protein family Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30: 217-224.
- Tribulatti MV, Figini MG, Carabelli J, Cattaneo V, Campetella O (2012). Redundant and antagonistic functions of galectin-1, -3, and -8 in the elicitation of T cell responses. *Journal of Immunology* 188: 2991-2999.
- Tribulatti MV, Mucci J, Cattaneo V, Agüero F, Gilmartin T, Head SR, Campetella O (2007). Galectin-8 induces apoptosis in the CD4 CD8 thymocyte subpopulation. *Glycobiology* 17(12): 1404-1412.
- Udomsinprasert R, Pongjaroenkit S, Wongsantichon J, Oakley AJ, Prapanthadara L, Wilce CJM et Ketterman AJ (2005). «Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme». *Biochemical Journal* 388: 763-771.
- Van Damme JM (2011). Lectins as Tools to Select for Glycosylated Proteins. In: K. Gevaert, J. Vandekerckhove (eds.): *Methods in Molecular Biology*, New York, Springer, pp 289-297.
- Verma N, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S (2012). Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics* 12: 1731-1755.
- Vinnai JR., Cumming RC., Thompson GJ., Timoshenko AV (2017). The association between oxidative stress-induced galectins and differentiation of human promyelocytic HL-60 cells. *Experimental Cell Research* 355(2): 113-123.
- Vitrac X, Moni JP, Vercauteren J, Deffieux G, Mérillon JM (2002). Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanones in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 458: 103-110.
- Voet D, Voet JG (2016). Techniques de purification des protéines et des acides nucléiques. In Voet D, Voet JG (eds): *Biochimie*. Paris, De Boeck Supérieur, pp 129-130.
- Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML (2012). Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 55: 1954-1964.
- Wada, J, Makino H (2001). Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *Acta Medica Okayama* 55: 6078-6086.
- Walker BJ, Mouton CP (2008). Environmental influences on cardiovascular health. *Journal of the National Medical Association* 100: 98-102.
- Wang J, Park JL, Patterson RL (2006). Immunoprecipitation of spliceosomal RNAs by antisera to galectin-1 and galectin-3. *Nucleic Acids Research* 27: 5166-5174.
- Wessel N, Ménard D, Pichavant-Rafini K, Ollivier H, Le Goff J, Burgeot T, Akcha1 F (2010). The Toxicity of Benzo[a]pyrene on Sole (Solea Solea) Hepatocytes: Assessment of Genotoxic and Enzymatic Effects. *Polycyclic Aromatic Compounds* 30: 346-354.
- Wolfe AR, Smith TJ, Meehan T (2004). Benzo[a]pyrene diol epoxide forms covalent adducts with deoxycytidylic acid by alkylation at both exocyclic amino N(4) and ring imino N-3 positions. *Chemical Research in Toxicology* 17(4): 476-491.
- Xue W, Warshawsky D (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206(1): 73-93.

- Yang F, Oz HS, Barve S, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW (2001). The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Molecular Pharmacology* 60: 528-33.
- Yang RY, Hsu DK, Yu L, Ni J, Liu FT (2001). Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 276: 20252-20260.
- Yasuda N, Akao S, Takemura G, Minatoguchi S, Gotoh K, Fujiwara H, Fukuda K (2001). Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* 12: 847-52.
- Yauk CL, Jackson K, Malowany M, Williams A (2011). Lack of change in microRNA expression in adult mouse liver following treatment with benzo(a)pyrene despite robust mRNA transcriptional response. *Mutation Research* 722: 131-139.
- Yoon CH, Chung SJ, Lee SW, Park YB, Lee SK, Park MC (2013). L'acide gallique, acide polyphénolique naturel, induit l'apoptose et inhibe l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les synoviocytes fibroblastiques de polyarthrite rhumatoïde. *Revue du rhumatisme* 80(3): 271-278.
- You BR, Park WH (2010). Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicology In Vitro* 24: 1356-62.
- Zhang, Y.K.; Wu, K.C.; Klaassen, C.D (2013). Genetic activation of Nrf2 protects against fasting-induced oxidative stress in livers of mice. *Plos one* 8: 59122.
- Zhong Y, Shahidi F (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In: Shahidi F (eds): Handbook of antioxidants for food preservation. Cambridge, Woodhead publishing, pp 287-333.
- Zuo J, Brewer DS, Arlt VM, Cooper CS, Phillips DH (2014). Benzo[a]pyrene-induced DNA adducts and gene expression profiles in target and non-target organs for carcinogenesis in mice. *BMC Genomics* 15: 880.

## Annexes

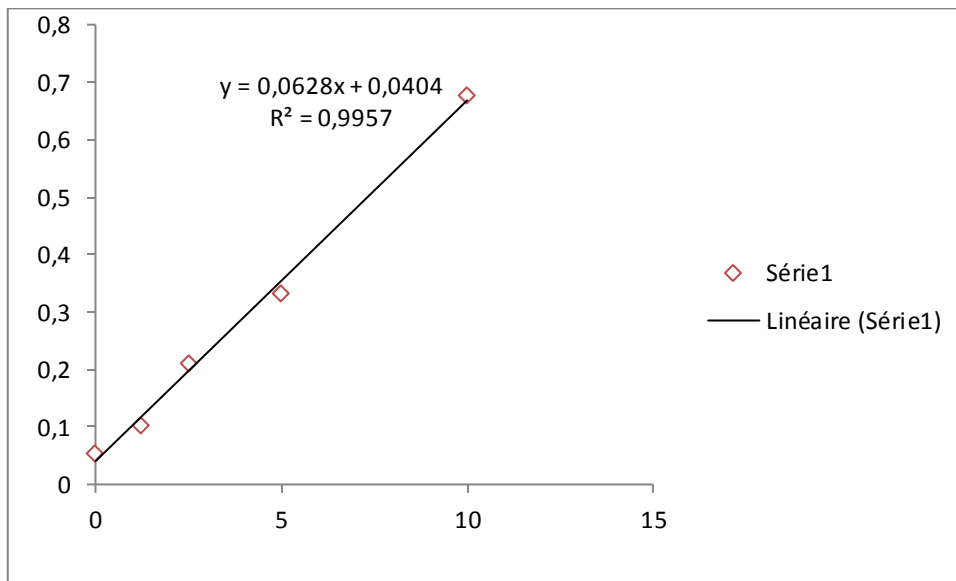


**Annexe 01. Gamme étalon pour le dosage tissulaire du GSH cytosolique.**

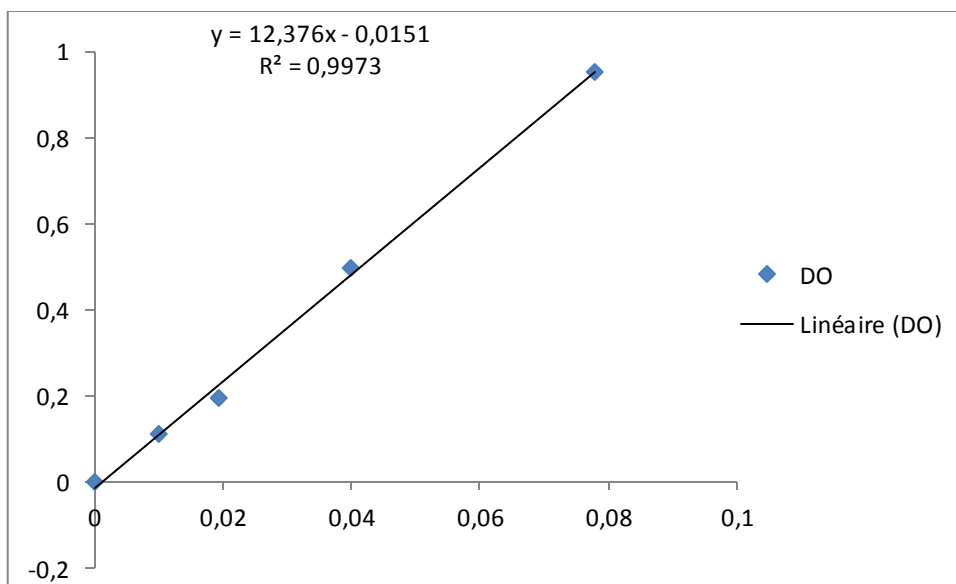


**Annexe 02. Gamme étalon pour le dosage tissulaire du MDA cytosolique.**

## Annexes



**Annexe 01. Gamme étalon pour le dosage tissulaire du GSH cytosolique.**



**Annexe 02. Gamme étalon pour le dosage tissulaire du MDA cytosolique.**



## Communications et publications

- ✚ Communication affichée au 2<sup>ème</sup> Congrès International de la Société Algérienne de Nutrition (Alger, 13-15 Octobre 2015) intitulée : Effet protecteur de l'acide gallique contre les effets chroniques d'un polluant organique persistant cancérigène avéré : le benzopyrène.  
Co-auteurs : Rechreche H., Lahouel M.
- ✚ Communication Orale au Séminaire International des Biotechnologies (SIBC) de l'Université des Frères Mentouri (Constantine, 19-20-21 Octobre 2015) intitulée : Etude de l'effet protecteur de l'extrait de propolis contre la toxicité hépatique induite par le cyclophosphamide.  
Co-auteurs : Lahouel M., Rechreche H., Boulemaache M.
- ✚ Communication affichée au Séminaire International Environnement et Toxicologie (SINENTOX'2019) de l'Université Frères Mentouri Constantine 1 (Constantine, 18-19 Fevrier 2019) intitulée : Evaluation du stress oxydant et de la toxicité hépatique et pulmonaire induits in vivo par le benzopyrène.  
Co-auteurs : Lahouel M., Rechreche H.
- ✚ Communication affichée au 6<sup>ème</sup> Congrès de la Biologie Médicale et Médecine de Laboratoire de la Société Algérienne de Biologie Clinique (Alger, 19-20 2016) intitulée : Etude expérimentale des effets aigus et chroniques d'un polluant cancérigène : Le benzopyrène.  
Co-auteurs : Lahouel M., Rechreche H.
- ✚ Communication affichée au Séminaire National de Biotechnologie, Environnement et Santé (BeEnSa'2018) de l'Université MSB de Jijel (Jijel, 28-29 Novembre 2018) intitulée : Evaluation de la toxicité aigüe d'un polluant cancerigène : le benzopyrène.  
Co-auteurs : Lahouel M., Khennouf T., Rechreche H.
- ✚ Communication affichée à la 1<sup>ère</sup> Journée scientifique annuelle du laboratoire de Toxicologie Moléculaire de l'Université MSB de Jijel (Jijel, 29 novembre 2016) intitulée : Etude expérimentale des effets aigus et chroniques d'un polluant cancérigène : le benzopyrène.  
Co-auteurs : Lahouel M., Khennouf T., Rechreche H.

- ✚ Publication dans le Journal of New Technology and Materials (JNTM) intitulée : Beneficial effect of gallic acid on oxidative stress and chronic hepatotoxicity induced by carcinogenic benzopyrene in rats. Volume 09, N°02 (2019), pages : 10-16.  
Auteurs : Ilham Benchouieb, Hocine Recherche et Mesbah Lahouel.
  
- ✚ Publication en cours intitulée : Assessment of carcinogenic benzo[a]pyrene acute toxicity involving oxidative stress in mice lung and liver.  
Auteurs : Ilham Benchouieb, Hocine Recherche, Khennouf Tareq et Mesbah Lahouel.
  
- ✚ Publication en preparation : Gallic acid modulates the expression of galectin 3 and 8, during subacute toxicity induced by benzo[a]pyrene.

Présentée par : M<sup>lle</sup> Ilham Benchouieb

Rapporteur : P<sup>r</sup> Hocine Rechreche

### Thème

## Etude *in vivo* des toxicités hépato-pulmonaires induites par le benzo(a)pyrène : modulation par l'acide gallique et association avec l'expression des galectines 3 et 8

### Résumé

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des polluants dont le plus dangereux est le benzo(a)pyrène, classé cancérigène avéré pour l'homme. Parmi les substances bioactives, l'acide gallique possède des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Le but de notre étude est d'évaluer la toxicité aiguë, sub aiguë et chronique induite par le benzo(a)pyrène au niveau pulmonaire et hépatique chez la souris et le rat ainsi que l'effet protecteur de l'acide gallique. Le benzo(a)pyrène est administré aux animaux à des doses de 50 mg/kg et 100 mg/kg par voie IP; à partir de chaque modèle de toxicité sont évalués les paramètres biochimiques relatifs au stress oxydatif, au dosage des transaminases sériques, à l'analyse histopathologique d'une part et d'autre part à l'étude de l'expression des galectines 3 et 8 au niveau du foie et des poumons. Les résultats révèlent la modification du potentiel antioxydant cellulaire en faveur du stress oxydatif, l'augmentation de la peroxydation lipidique, l'apparition de nécroses et de lésions hépatocellulaires ainsi que la modulation de l'expression génétique des galectines. L'acide gallique parvient à renverser les effets sus cités offrant un effet protecteur contre les effets toxiques induits par le benzo(a)pyrene, de même que la galectine 3 peut constituer un moyen de diagnostic si appuyé par d'autres essais notamment cliniques.

**Mot clés:** Acide gallique, Benzo(a)pyrène, Galectines, Stress oxydatif, Toxicité.

### Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons are pollutants, the most dangerous of which is benzo(a)pyrene, a known carcinogen to humans. Among the bioactive substances, gallic acid has anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties. The aim of our study is to evaluate acute, sub-acute and chronic toxicity induced by benzo(a)pyrene in lungs and liver of mice and rats, as well as the protective effect of gallic acid. Benzo(a)pyrene is administered to animals at doses of 50 mg / kg and 100 mg / kg IP; From each toxicity model, the biochemical parameters relating to oxidative stress, serum transaminase assay, histopathological analysis are evaluated on the one hand and the study of the expression of galectin 3 and 8 in the liver and lungs on the other hand. The results reveal the modification of the cellular antioxidant potential in favor of oxidative stress, the increase of lipid peroxidation, the appearance of necroses and hepatocellular lesions as well as the modulation of the genetic expression of galectins. Gallic acid manages to reverse the aforementioned effects offering a protective effect against the toxic effects induced by benzo(a)pyrene, as well as galectin 3 can constitute a means of diagnosis if supported by other tests including clinical ones.

**Keywords:** Benzo(a)pyrene, Galectins, Gallic acid, Oxidative stress, Toxicity.

### المخلص

الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات هي ملوثات، وأخطرها البنزو(أ)بايرين، وهو مادة معروفة مسرطنة للإنسان. من بين المواد النشطة بيولوجيًا، يحتوي حمض الغاليك على خصائص مضادة للأكسدة. مضادة للالتهاب ومضادة للسرطان. الهدف من دراستنا هو تقييم السمية الحادة غير المتزامنة والمزمنة الناجمة عن البنزو(أ)بايرين على مستوى الرئتين والكبد عند الفئران والجرذان وكذلك التأثير الوقائي لحمض الغاليك. يُعطى البنزو(أ)بايرين للحيوانات بجرعات 50 مغ / كغ و 100 مغ / كغ. من كل نموذج سمية ويتم تقييم المعلمات البيوكيميائية المتعلقة بالإجهاد التأكسدي، اختبار المصل الترانسميناسات، التحليل النسيجي من ناحية ودراسة التعبير لل galectin 3 و galectin 8 في الكبد والرئتين. ومن ناحية أخرى تكشف النتائج عن تعديل إمكانات مضادات الأكسدة الخلوية لصالح الإجهاد التأكسدي، زيادة بيروكسيد الدهون وظهور النخر وأفات الكبد، فضلا عن تعديل التعبير الجيني لل galectins. يدير حمض الغاليك لعكس التأثيرات المذكورة سابقًا و يقدم تأثيرًا وقائيًا ضد التأثيرات السامة الناجمة عن البنزو(أ)بايرين، وكذلك galectin 3 يمكن أن يشكل وسيلة للتشخيص إذا كانت مدعومة باختبارات أخرى بما في ذلك السريرية.

**الكلمات المفتاحية:** الإجهاد التأكسدي، البنزو(أ)بايرين، حمض الغاليك، السمية، Galectins.

