

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

*Université de Jijel*  
*Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie*



*Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Magistère en Biologie*  
*Option : Toxicologie Moléculaire*

**THEME**

**Contribution à l'étude de l'implication du stress oxydatif  
et de l'apoptose dans l'adénome prostatique et de sa  
relation avec les xénoestrogènes**

Présenté en 30 Octobre 2011 par

**ZABAIYOU Nada**

Devant le Jury composé de :

**Président :** Dr. LEGHOUCHI Essaid (Pr., Université de Jijel)

**Rapporteur :** Dr. LAHOUEL Mesbah (Pr., Université de Jijel)

**Examineur :** Dr. NAÏMI Dalila (Pr., Université de Constantine)

**Examineur :** Dr. RECHRECHE Hocine (MCA, Université de Jijel)

**Membre invité :** Dr. MABED Djafer (Hôpital de Jijel)

## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le Docteur Lahouel Mesbahi, Professeur à l'Université de Jijel, qui a encadré cette thèse en me laissant une grande liberté et beaucoup d'autonomie. Je le remercie également pour sa disponibilité et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée. Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la recherche sont pour moi une source de motivation pour la suite de ma carrière.*

*Les travaux de cette thèse ont été réalisés au niveau du laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie. Je remercie le Docteur Leghouchi Essaid, Professeur et Doyen de la Faculté des sciences, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, mais aussi pour avoir accepté de présider le jury de cette soutenance.*

*Je tiens également à remercier Madame le Docteur Naïmi Dalila, Professeur à l'Université de Constantine et Monsieur le Docteur Recherche Hocine, Maître de conférences à l'Université de Jijel qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse et de me faire ainsi bénéficier de leurs compétences et de leurs connaissances.*

*J'adresse mes remerciements particuliers à Mr le Docteur Mabed Djafer, chef de service d'Urologie à l'Hôpital de Jijel pour l'intérêt qu'il a bien me porté en participant à mener à bien ce travail en me fournissant les échantillons d'adénomes prostatiques sur lesquels j'ai travaillé. A Mr Medjemem Kheireddine pour sa disponibilité, ses explications et pour me fournir toutes les informations dont j'avais besoin sans aucune parcimonie et Monsieur le Docteur Hamel Ali Bey, Docteur en Anatomie et Histologie Pathologique pour son aide dans l'étude histologique.*

*Je remercie également tous ceux qui ont apporté leur contribution scientifique à mon travail. Je tiens à remercier en particulier Mlle Abdelaziz Samia pour ses conseils, ses explications, sa disponibilité et surtout son amitié, le Dr Alyanne Mohamed, Mr Harouche Kamel et Mr Desdous Rachid pour leur aide précieuse.*

*Un immense merci aux ingénieurs de laboratoires, à Mme Bouraoui Hadia, pour son humeur, sa grande gentillesse et sa disponibilité, à Mr Aibeche Riad, pour sa disponibilité, à Mr Bousdjira Yahya, à Mlle Bouzid Amira, à Brihoum Hadjer bien sur (qui est amie avant d'être ingénieure de labo), à Mme Roula Massika, sans oublier l'ensemble des techniciens et ingénieurs des laboratoires de pédagogie des départements de Biologie et de Chimie.*

*Une pensée émue à mes amies pour toujours Houda et Karima, à mes amies aussi Meriem Acila, Habiba, Aicha, Nabila et Ouidad. A Ammar, Hamid et Khaled ainsi qu'à tous les étudiants avec qui j'ai passé une ambiance de travail très sympathique dans le laboratoire. Merci à toi aussi Youcef pour ton aide en tout ce qui est informatique.*

*En fin, je remercie tous ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui ont participé d'une manière ou d'une autre à accomplir ce travail*

*Je dédie ce travail*

*À mes parents, qui m'ont encouragé sans relâche dans mes études, qui m'ont soutenu et m'ont donné l'opportunité de parvenir au bout de ce long chemin. Qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour et affection.*

*À mes sœurs Soumia, Houda et Lyna et à mon frère Allaoua.*

*À mes grands-mères et à toute la famille.*

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>I. Analyse bibliographique</b> .....	4
<i>I.1. Le stress oxydatif</i> .....	5
<b>I.1.1.</b> Les espèces réactives de l'oxygène .....	5
<b>I.1.2.</b> Mécanismes antioxydants.....	7
<b>I.1.2.1.</b> Les systèmes enzymatiques.....	7
<b>I.1.2.2.</b> Les systèmes non enzymatiques.....	9
<b>I.1.3.</b> Conséquences du stress oxydatif.....	10
<b>I.1.3.1.</b> La peroxydation lipidique.....	10
<b>I.1.3.2.</b> L'oxydation des protéines .....	11
<b>I.1.3.3.</b> Effets des ROS sur l'ADN .....	12
<b>I.1.3.4.</b> Effets des ROS sur les polysaccharides.....	12
<i>I.2. L'apoptose</i> .....	13
<b>I.2.1.</b> La mort cellulaire.....	13
<b>I.2.2.</b> Le processus d'apoptose.....	13
<b>I.2.3.</b> Les voies de l'apoptose.....	14
<b>I.2.3.1.</b> Les caspases.....	14
<b>I.2.3.2.</b> Voie intrinsèque ou voie mitochondriale .....	16
<b>I.2.3.3.</b> Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort .....	18
<b>I.2.4.</b> Régulation et contrôle de l'apoptose.....	19
<b>I.2.4.1.</b> Les protéines Bcl-2.....	19
<b>I.2.4.2.</b> Les molécules régulatrices des caspases.....	20
<b>I.2.5.</b> L'apoptose dans l'adénome prostatique.....	21
<i>I.3. La prostate</i> .....	22
<b>I.3.1.</b> Histologie.....	22
<b>I.3.2.</b> Le contrôle endocrinien de la prostate.....	23
<b>I.3.2.1.</b> Rôle des androgènes.....	23

<b>I.3.2.2.</b> Le récepteur aux androgènes.....	24
<b>I.3.2.3.</b> Le récepteur aux estrogènes.....	24
<b>I.3.2.4.</b> Les estrogènes.....	25
<b>I.3.3.</b> Les maladies prostatiques.....	26
<i>I.3.3.1. L'adénome prostatique.....</i>	26
<b>I.3.3.2.</b> Le cancer de la prostate.....	27
<b>I.3.4.</b> Les xénoestrogènes dans la prostate .....	29
<b>I.3.4.1.</b> Mode d'action.....	29
<b>I.3.4.2.</b> Structure et métabolisme des xénoestrogènes.....	31
<b>I.3.4.2.1.</b> Les pesticides.....	31
<b>I.3.4.2.2.</b> Les dérivés phénoliques.....	33
<b>I.3.4.2.3.</b> Les parabènes.....	34
<b>II. Matériel et Méthodes</b> .....	35
<b>II.1.</b> Prélèvement des échantillons.....	36
<b>II.2.</b> Méthodes.....	37
<b>II.2.1.</b> Dosage sérique (dosage du PSA).....	37
<b>II.2.2.</b> Dosages tissulaires.....	37
<b>II.2.2.1.</b> Evaluation de l'état du stress oxydatif.....	37
<b>II.2.2.1.1.</b> Dosage du MDA cytosolique.....	37
<b>II.2.2.1.2.</b> Dosage du glutathion (GSH) cytosolique.....	38
<b>II.2.2.1.3.</b> Extraction de la fraction cytosolique.....	39
<b>II.2.2.1.4.</b> Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique.....	39
<b>II.2.2.1.5.</b> Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique.....	40
<b>II.2.2.1.6.</b> Evaluation de l'activité de la glutathion-S transférase cytosolique.....	40
<b>II.2.2.1.7.</b> Evaluation de l'activité de la glutathion peroxydase cytosolique.....	41
<b>II.2.2.2.</b> Mesure de l'apoptose par l'évaluation de l'activité enzymatique des caspases - 3.....	42
<b>II.2.2.3.</b> Dosage des protéines totales.....	43
<b>II.2.3.</b> Etude histologique.....	44
<b>II.2.4.</b> Recherche des xénoestrogènes dans le tissu prostatique.....	44
<b>II.2.4.1.</b> Recherche des xénoestrogènes dans le tissu humain.....	45
<b>II.2.4.2.</b> L'extraction des xénoestrogènes.....	45
<b>II.2.4.3.</b> Analyse des échantillons par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	46
<b>II.2.4.3.1.</b> Principe de la chromatographie en phase gazeuse.....	46
<b>II.2.4.3.2.</b> Le détecteur.....	47

<b>II.2.4.3.3.</b> Appareillage et conditions opératoires.....	47
<b>II.3.</b> Analyse statistique des résultats.....	48
<b>III. Résultats et Discussion</b> .....	49
<b>III.1.</b> Analyse des taux du PSA .....	50
<b>III.2.</b> Variation de l'état oxydatif dans l'adénome prostatique .....	55
<b>III.2.1.</b> Variation des taux du MDA dans les tumeurs prostatiques.....	55
<b>III.2.2.</b> Etude de l'activité antioxydante dans les tumeurs prostatiques.....	58
<b>III.2.2.1.</b> Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique .....	58
<b>III.2.2.2.</b> Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique.....	60
<b>III.2.2.3.</b> Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase cytosolique.....	62
<b>III.2.2.4.</b> Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) cytosolique.....	64
<b>III.2.2.5.</b> Variation des taux du glutathion (GSH) dans les tumeurs prostatiques .....	67
<b>III.3.</b> Etude de l'implication de l'apoptose dans l'adénome prostatique et dans la HPIN par l'évaluation de l'activité enzymatique des caspases -3.....	69
<b>III.4.</b> caractérisation histologique des adénomes prostatiques et de la HPIN par microscopie optique.....	73
<b>III.5.</b> Détection des xénoestrogènes dans les tissus prostatiques adénomateux par GC/MS.....	75
<b>Conclusion et Perspectives</b> .....	84
<b>Références bibliographiques</b> .....	87
<b>Annexes</b> .....	105

## Liste des abréviations

<b>2,4 D</b>	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
<b>2,4,5 T</b>	Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique
<b>AhR</b>	Aryl hydrocarbon receptor
<b>AIF</b>	Apoptosis Inducing Factor
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate
<b>ANT</b>	Adenine Nucleotide Transporter
<b>AP</b>	Adénome Prostatique
<b>AP-1</b>	Activator protein 1
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>CARD</b>	Caspase activation and recruitment domain
<b>CDNB</b>	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
<b>DDT</b>	Dichlorodiphényltrichloroéthane
<b>DHT</b>	Dihydrotestostérone
<b>DISC</b>	Death-inducing signaling complex
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factors
<b>GC/MS</b>	Gas chromatography/masse spectrometry
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSH-Px</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>GST</b>	Glutathion S-transférase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HAP</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>HCH</b>	Hexachlorocyclohexane
<b>HIF</b>	Hypoxia Inducible Factors
<b>HPIN</b>	High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia
<b>Hsp</b>	Heat choc proteins
<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis protein
<b>IGF</b>	Insulin-like growth factor

<b>KCl</b>	Chlorure de potassium
<b>KGF</b>	Keratinocyte growth factor
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NFAT</b>	Nuclear factor of activated T-cells
<b>NF-Kappa B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>O<sup>2-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>PCB</b>	Poly Chlorinated Biphenyls
<b>PIK</b>	Polo-Like Kinase
<b>PKc</b>	Protein Kinase c
<b>pNA</b>	pNitroaniline
<b>pRb</b>	Retinoblastoma protein
<b>PSA</b>	Prostate specific antigen
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog
<b>PVC</b>	Polychlorure de vinyle
<b>RA</b>	Récepteur aux androgènes
<b>RE</b>	Récepteur aux estrogènes
<b>RG</b>	Récepteur aux glucocorticoïdes
<b>RM</b>	Récepteur minéralocorticoïde
<b>ROS</b>	Reactive oxygene species
<b>RP</b>	Récepteur à la progestérone
<b>S-DHA</b>	Sulfate de DHA
<b>SNC</b>	System Nerveux Central
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SP-1</b>	Specificity Protein 1
<b>T</b>	Testosterone
<b>TBA</b>	Thiobarbituric acid
<b>TGFβ</b>	Transforming growth factor beta
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>VDAC</b>	Voltage-dependent anion channel
<b>Vit</b>	Vitamine



# *Introduction*

## **Introduction**

L'adénome de la prostate constitue l'une des maladies les plus communes chez l'homme âgé. Elle est caractérisée par une augmentation de la taille de la glande prostatique due à une surcroissance des cellules prostatiques. A Jijel, l'incidence de l'adénome prostatique ne cesse de croître. L'hôpital Mohamed Seddik Benyahia reçoit chaque année des dizaines de malades atteints de cette maladie dont la majorité d'entre eux nécessite une intervention chirurgicale.

L'étiologie de l'adénome de la prostate est jusqu'à présent inconnue. La cause la plus probable est celle liée aux changements hormonaux qui se produisent au cours du temps. Les testicules produisent de la testostérone, qui est convertie en dihydrotestostérone (DHT) et en œstradiol. Ces derniers ont tendance à s'accumuler, atteignant avec le temps des niveaux élevés entraînant ainsi l'apparition de perturbations de l'homéostasie hormonale prostatique. Mais, comment et pourquoi les niveaux de ces hormones augmentent reste une question sans réponse (Kwiatek et al., 2007). Toutefois, on soupçonne fortement l'implication des contaminants environnementaux qui pourraient agir comme xénoestrogènes. En effet, ces contaminants interfèrent avec les processus biologiques régulés par les hormones stéroïdiennes conduisant à des perturbations au niveau de leurs organes cibles. Ces xénoestrogènes ont principalement une activité mimique sur les voies d'action des estrogènes endogènes. Les recherches encore nouvelles sur ce sujet, ont clairement montré que les xénoestrogènes ont vraiment des effets délétères sur la prostate en impactant le système hormonal.

Par ailleurs, le stress oxydatif et l'augmentation de la génération des ROS dans divers processus cellulaires seraient également à l'origine de divers dommages et perturbations moléculaires et cellulaires dans plusieurs maladies humaines. Ces perturbations peuvent causer des dommages au niveau de l'ADN et des chromosomes et induire des altérations épigénétiques ou interagir avec les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeurs et sont actuellement associées avec les déséquilibres de croissance et de prolifération ainsi qu'avec les transformations néoplasiques.

La prolifération et la croissance cellulaire sont contrôlées par un processus très compliqué appelé apoptose. Dans la prostate, ce processus est régulé par les androgènes et les niveaux

cellulaires en ROS. Ainsi, toute modification de ces deux paramètres peut conduire à une inhibition ou activation de l'apoptose.

Donc, mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'apparition et l'évolution de l'adénome prostatique notamment ceux liés au stress oxydatif, à l'apoptose et à la perturbation endocrinienne, permet une meilleure caractérisation de la maladie, une meilleure prévention, ouvre de nouvelles portes pour des thérapies qui soient étiologiques au lieu d'être symptomatologiques et permet même d'éviter le recours aux chirurgies qui restent toujours le dernier refuge pour les malades, surtout pour les hommes âgés.

Dans ce contexte, nous allons effectuer cette recherche dont les objectifs principaux sont :

- L'évaluation du stress oxydatif impliqué dans l'adénome prostatique ;
- L'étude de l'implication de l'apoptose dans la survenue de l'adénome prostatique ;
- La recherche d'une éventuelle présence et accumulation des xénoestrogènes dans les tissus prostatiques adénomateux.

*Analyse  
bibliographique*

## **I.1. Le stress oxydatif**

L'O<sub>2</sub> est une molécule biradicalaire formée de deux atomes d'oxygène présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. C'est un gaz indispensable à la vie. Il est normalement transformé en molécules d'eau dans un processus orchestré par la chaîne respiratoire mitochondriale : c'est une réaction de réduction qui implique quatre électrons et qui est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et qui conduit à la synthèse de l'ATP. Cependant, ce processus n'est toutefois pas parfait puisque 2 à 5 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Pincemail et al., 2001).

Dans les conditions physiologiques quotidiennes, ces ERO sont normalement produites en faible quantité, et cela sous le contrôle de systèmes de défenses adaptatifs par rapport au niveau des radicaux présents (Favier, 2003). Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydants/antioxydants est en équilibre. Tout déséquilibre de cette balance en faveur des pro-oxydants et de leurs effets potentiellement négatifs est appelé « stress oxydatif ».

### **I.1.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS)**

Les espèces réactives de l'oxygène ERO ou ROS (Reactive Oxygen Species) peuvent être simplement définies comme étant agents oxydants contenant de l'oxygène. Il a été rapporté que jusqu'à 1 à 3 % de l'apport pulmonaire de l'oxygène chez l'homme est converti en ROS (Sohal, 1996).

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène tels que les radicaux superoxydes (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les ROS, qu'ils soient radicalaires ou non, partagent la spécificité de la présence d'un atome d'oxygène, chose qui les différencie des espèces réactives du nitrogène (RNS : Reactive Nitrogen Species). Les radicaux libres contiennent un ou plusieurs électrons non appariés et de ce fait sont des espèces chimiques hautement réactives, avec une demi-vie allant généralement de quelques secondes à quelques minutes, alors que, les ROS non radicalaires peuvent subsister pendant une durée plus longue, mais elles peuvent aussi être converties en espèces radicalaires (Valko et al., 2004).

Les ROS sont un produit du métabolisme cellulaire normal. Il a été rapporté qu'approximativement 10000-20000 radicaux libres attaquent chaque cellule de l'organisme par jour et ceci chez un adulte d'âge moyen (Valko et al., 2004).

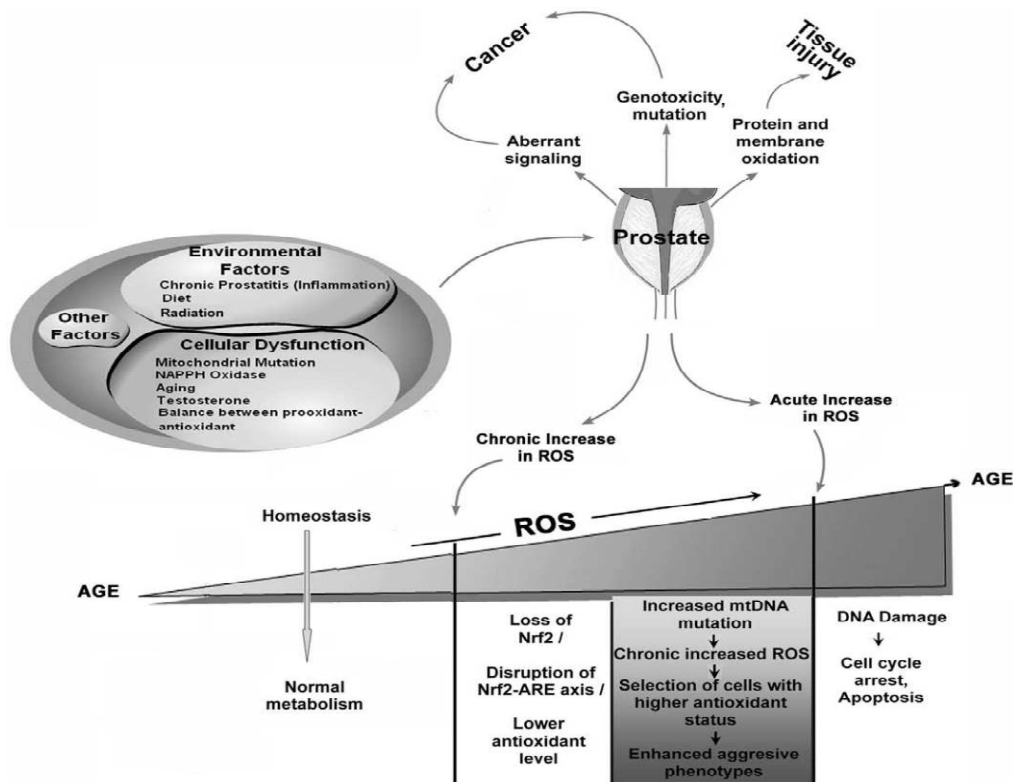
Bien que des concentrations élevées en ROS soient connues être nuisibles aux cellules, de faibles concentrations sont au contraire à la base de fonctions cellulaires très importantes parmi lesquelles figurent la modulation de la transduction des signaux cellulaires (Monteiro et Stern, 1996), la modulation des activités des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, NFAT et HIF (Li et al., 1998), la régulation de l'apoptose (Fang et Iyer, 2007 ; Orrenius, 2007) et la régulation de l'activité des enzymes mitochondriales (Nulton-Persson, 2001 ; Oberley, 2002).

Dans la prostate, une forte production des ROS a été liée avec le développement de l'adénome et des cancers prostatiques où des niveaux très élevés en ROS, en particulier le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le radical superoxyde, ont été retrouvés (Khandrika et al., 2009). Cette production excessive des ROS est suggérée être liée à l'exposition aux androgènes, qui sont directement associés avec le développement de l'adénome et des cancers prostatiques (Ripple et al., 1997). Une suppression de ces androgènes par castration est capable de réduire cette production des ROS (Miyak et al., 2004). Ces ROS peuvent jouer un rôle primordial dans l'occurrence, la récurrence et la progression du cancer de la prostate (Mahraein-Ghomi et al., 2008).

Des travaux expérimentaux montrent que l'administration prolongée de la DHT et de l'œstradiol à des rats induit l'expression des cytokines proinflammatoires au niveau de la prostate (Khandrika et al., 2009). Les infiltrations inflammatoires ont été identifiées comme étant la majeure source de la production des ROS. L'induction du stress au niveau de l'épithélium prostatique a été liée à la formation de l'Atrophie Inflammatoire Proliférative (PIA : Proliferative Inflammatory Atrophy) (Khandrika et al., 2009). Cette lésion constitue en général la base de l'augmentation et de la régénération de la prolifération des cellules épithéliales et conduit au développement de la Néoplasie Intraépithéliale Prostatique (PIN) et progressivement au cancer de la prostate.

La génération des ROS dans les cellules prostatiques est également liée avec une activation des systèmes NAD(P)H oxydases (NOX) (Kumar et al., 2008).

Les mécanismes de la production et de la réponse cellulaire aux ROS dans les cellules prostatiques sont résumés dans la figure 1.



**Figure 1.** Mécanismes de la production et de la réponse cellulaire aux ROS dans les cellules prostatiques (D'après Khandrika et al., 2009).

## I.1.2. Mécanismes antioxydants

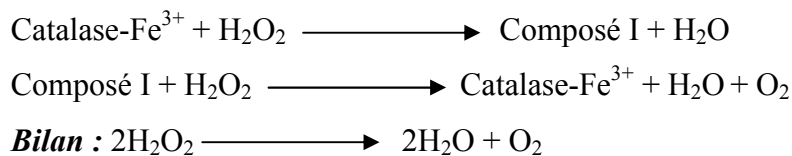
Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Pour se protéger, notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente en développant des systèmes de défense antioxydants qui sont enzymatiques ou non-enzymatiques (Droge, 2002).

### I.1.2.1. Les systèmes enzymatiques

Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), puissante enzyme antioxydante naturelle qui constitue le premier et l'un des principaux maillons du processus de défense contre les radicaux libres (Joanny MenVielle-Bourg, 2005). Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène.

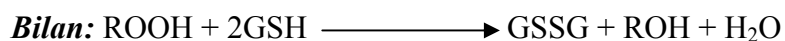
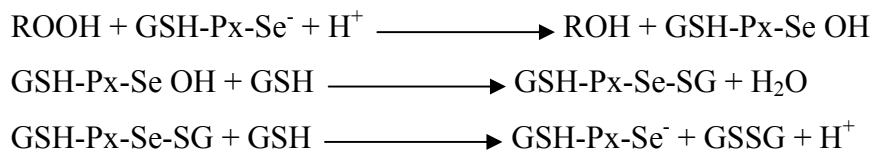
Il existe plusieurs isoenzymes de la SOD qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko et al., 2002). On distingue principalement les SODs à cuivre zinc (Cu-Zn SOD) et la SOD à manganèse (Mn SOD) (Fridovich, 1998 ; Zelko et al, 2002).

La deuxième enzyme antioxydante c'est la catalase. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène moléculaire. C'est une réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène qui se fait en deux étapes (Putnam et al., 2000):



Les glutathions peroxydases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène et d'une grande variété d'hydroperoxydes organiques (ROOH) en eau et en alcools correspondants (ROH) respectivement, tout en couplant la réaction de réduction avec l'oxydation d'un substrat réducteur spécifique qui est le glutathion (Zachara et al., 2006).

Le mécanisme de fonctionnement des GSH-Px est le suivant :



Le fonctionnement de l'enzyme nécessite un flux de glutathion recyclé par la coopération de la glutathion réductase (GR) qui réduit le glutathion oxydé en consommant du NADPH, lui-même généré grâce à la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) alimentée par la voie des pentoses phosphates (Valko et al., 2006).

Une autre famille d'enzymes qui jouent un rôle essentiel dans la défense antioxydante est la famille des glutathion-S-transférases. Elles permettent essentiellement la protection de l'ADN en détoxifiant les substrats électrophiles réactifs, les produits du stress oxydatif (comme les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique) ainsi que certains carcinogènes, et ceci par leur



conjugaison avec le glutathion réduit facilitant ainsi leur élimination de l'organisme (Hayes et al., 2005 ; Mc Cunney, 2005).

Dans le tissu prostatique humain, plusieurs sous classes de GST ont été détectées. Il s'agit de  $\alpha$ ,  $\mu$ , et  $\theta$ . La sous classe  $\pi$  étant la plus abondante (Di Ilio et al., 1990 ; Di Paolo et al., 2005). Chez l'homme, les gènes codant pour  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$  sont localisés dans les chromosomes 6, 1 et 11 respectivement (Board et Webb, 1987).

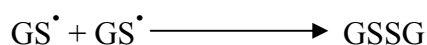
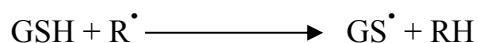
L'étude quantitative de la méthylation des gènes a permis de mettre en évidence que la perte de l'expression de la GST  $\pi$  constitue l'altération génétique la plus commune dans le cancer de la prostate (> 90 %) ainsi que dans la HPIN (70 %) (Jeronimo et al., 2001 ; Lin et al., 2001 ; Harden et al., 2003).

### **I.1.2.2. Les systèmes non enzymatiques**

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Il s'agit principalement du glutathion, des vitamines et de certains éléments minéraux.

Le glutathion, thiol libre de bas poids moléculaire le plus abondant dans les cellules eucaryotes, est un tripeptide (L-gamma-glutamyl-L-cysteinyl glycine) synthétisé par toutes les cellules de l'organisme. Il existe sous deux formes chimiques, la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH), qui représente 98 à 99 % du glutathion total (Pastore et al., 2003).

Le glutathion exerce un effet protecteur vis-à-vis des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène grâce à son pouvoir réducteur important ou par l'intermédiaire d'enzymes antioxydantes dont il sert de cofacteur. Il tamponne l'environnement redox intracellulaire (Biswas et al., 2006), ce qui permet entre autres de maintenir les groupements sulfhydryles des protéines sous forme réduite (Townsend et al., 2003). Le GSH exerce son pouvoir réducteur selon la réaction suivante :



Parmi les vitamines impliquées dans la protection contre le stress oxydatif, on distingue la vit E (Pincemail et al., 1998) et la vit C (Pincemail et al., 2001). Elles protègent les cellules

contre les espèces réactives de l'oxygène comme le  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{O}_2\cdot^-$  et inhibent la peroxydation lipidique notamment au niveau des membranes cellulaires. Il y a également les caroténoïdes qui sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres ainsi que les lipoperoxydes (Pincemail et al., 2001).

Certains oligoéléments ont aussi des propriétés antioxydantes. En effet, le statut en sélénium est corrélé à la capacité antioxydante tissulaire (Brigelius-Flohe et al., 2003). Cet élément est capable de moduler à la fois la teneur des enzymes antioxydantes telles que la GSH-Px ainsi que leur activité respective et par ce biais il est impliqué dans les défenses cellulaires endogènes contre les divers hydroperoxydes (Papp et al., 2007). Un autre oligoélément est le zinc, un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il joue un rôle dans la protection des groupements thiols des protéines (Chakraborty et al., 2007).

A toutes ces molécules antioxydantes citées, sont ajoutés également de nombreux autres antioxydants non-enzymatiques comme l'urate, le glucose, la bilirubine, l'albumine, ...

### **I.1.3. Conséquences du stress oxydatif**

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003).

#### **I.1.3.1. La peroxydation lipidique**

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation (Hulbert, 2005) et elles représentent une cible privilégiée, principalement pour le radical hydroxyle, qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Il s'agit d'une réaction en chaîne appelée peroxydation lipidique qui se poursuit par la transformation du radical peroxyde, au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer et al., 1992). Le radical peroxyde, après évolution

en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde et l'hydroxynonanal (Hong et al., 2004).

Les aldéhydes issus de la dégradation des formes lipoperoxydes instables sont très toxiques. Les plus importants quantitativement sont les 4-hydroxyalkénals. Ce sont des agents alkylants très puissants qui peuvent former des composés d'addition avec les résidus cystéine des protéines et du glutathion et des bases de Schiff avec les groupements aminés des protéines (Catalá, 2009). Des aldéhydes comme le 4-hydroxy-2,3-nonanal (4-HNE) ou le malondialdéhyde (MDA) peuvent former des adduits avec les protéines au niveau des résidus lysine, histidine ou cystéine, entraînant la formation de bases de Schiff et des pontages intra et inter moléculaires (Valko et al., 2006).

### **I.1.3.2. L'oxydation des protéines**

Les réactions d'oxydation des protéines sont principalement classées en deux catégories : d'une part, la modification de la chaîne peptidique par cassure des liaisons peptidiques et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. Ces modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002).

Les protéines peuvent aussi subir soit des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine soit des modifications de certains acides aminés (Favier, 2003).

Ces modifications touchent notamment la méthionine, la lysine, la cystéine et les acides aminés aromatiques qui peuvent être oxydés de façon irréversible. L'oxydation de la cystéine est réversible mais peut perturber les fonctions biologiques du glutathion ou de certaines protéines (Davies et al., 1999).

Les protéines oxydées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées (Davies et al., 1999). Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules (Favier, 2003).

### **I.1.3.3. Effets des ROS sur l'ADN**

L'ADN est très sensible à l'attaque par les radicaux oxygénés notamment le radical  $\cdot\text{OH}$  où cinq classes principales de dommages oxydatifs peuvent être enregistrées : les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits intra-caténaux, les cassures de brins et les pontages ADN-protéines (Cadet et al., 2002). L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8-hydroxyadénine, 8-hydroxyguanine, formimido uracile, 5 hydroxycytosine, 5 hydroxyméthyl uracile, thimine diol et oxazolone.

Dans les tissus prostatiques âgés, bénins et malins, une augmentation significative des proportions de la 8-hydroxyadénine et 8-hydroxyguanine a été enregistrée (Trzeciak et al., 2004).

Les radicaux attaquent la liaison entre la base et le désoxyribose créant un site abasique, ou attaquent le sucre lui-même créant une coupure de la chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés (Favier, 2003).

### **I.1.3.4. Effets des ROS sur les polysaccharides**

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent attaquer les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Le glucose peut également s'oxyder dans les conditions physiologiques et cela en présence de traces métalliques, tout en libérant des cétoaldéhydes,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\cdot\text{OH}$  qui entraînent la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde (Favier, 2003).

## **I.2. L'apoptose**

### **I.2.1. La mort cellulaire**

Depuis le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, il est connu que la disparition d'une cellule peut résulter, non seulement d'une impossibilité à résister aux agressions externes, mais aussi d'une capacité à s'autodétruire. Mais, Ce n'est que depuis moins de trente ans que la mort cellulaire est considérée comme une fonction à part entière. Les quatre types de mort cellulaire les plus classiquement décrits sont l'autophagie, la nécrose, la sénescence et l'apoptose.

L'autophagie est un processus qui permet le renouvellement des composants cellulaires lorsque les conditions nutritives de la cellule sont limitées (Kroemer et Jäätelä, 2005). La mort cellulaire par sénescence, au sens morphologique, désigne toutes les modifications non pathologiques que nous trouvons au cours du vieillissement (Lou et Chen, 2006). La nécrose, quant à elle, est une mort « désordonnée » et accidentelle de la cellule. Elle peut être due à une agression par des agents cytotoxiques physiques, chimiques ou à des variations extrêmes des conditions physiologiques (Mannheim, 1998). Enfin, nous arrivons à l'apoptose qui se différencie de la nécrose d'un point de vue mécanistique. En effet, la nécrose est la conséquence passive d'une agression de la cellule alors que l'apoptose est parfaitement intégrée dans les processus physiologiques normaux de la cellule.

### **I.2.2. Le processus d'apoptose**

En 1972, Kerr et al., introduisirent le terme « apoptose » en référence au terme grec signifiant « chute des pétales ou des feuilles » en décrivant un processus actif du suicide cellulaire au cours du renouvellement des hépatocytes (Kerr et al., 1972). L'apoptose est une réponse conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Elle est nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement de tout organisme vivant aussi bien lors du développement de l'organisme durant les changements morphologiques qu'il subit à l'embryogénèse que pendant l'activation du système nerveux et du système immunitaire (Schulze-Osthoff, 2008).

C'est un processus essentiel pour le maintien du nombre des cellules dans les tissus et de manière générale, pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme (Rathmell et Thompson, 2002 ; Bradly et al., 2007 ).

### **I.2.3. Les voies de l'apoptose**

Le déroulement de l'apoptose est contrôlé par deux voies de signalisation principales : la voie extrinsèque également appelée voie des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale. Mais avant de décrire ces deux voies d'apoptose, nous allons d'abord faire un passage sur les principaux effecteurs de l'apoptose ; les caspases, qui ont un rôle primordiale dans la propagation et l'exécution du signal.

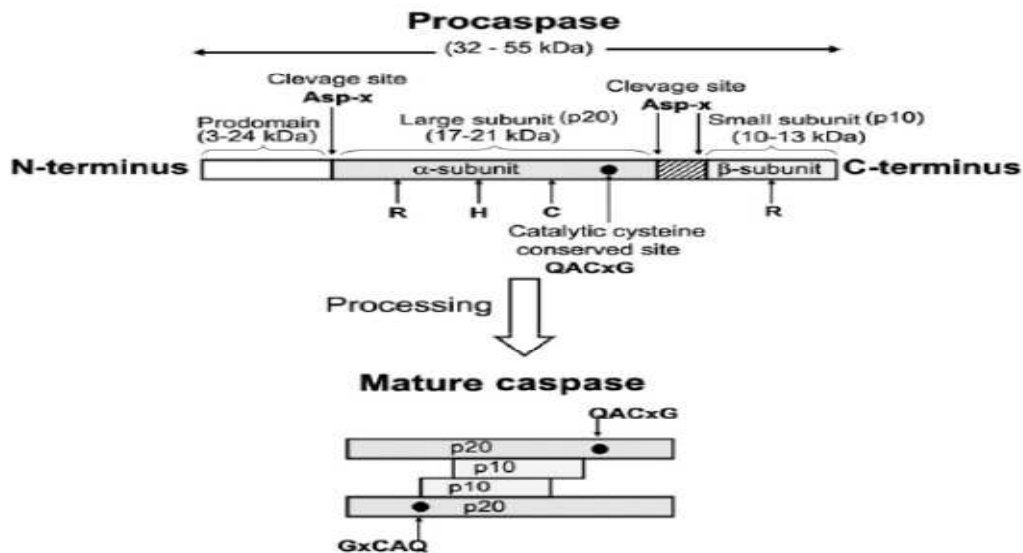
#### **I.2.3.1. Les caspases**

Le terme caspase a été proposé par Alnemri et collaborateurs (1996). Ce sont une famille de protéases à cystéine qui clivent spécifiquement leurs substrats après un aspartate (Cysteiny-Aspartate-Specific proteASIS). Les caspases sont des enzymes conservées au cours de l'évolution, retrouvées initialement chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, elles sont présentes aussi bien chez les insectes que chez les mammifères (Budihardjo et al., 1999).

Les caspases sont exprimées constitutivement sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes ou procaspases avec une faible activité intrinsèque. Elles sont synthétisées sous forme de monomères pour les caspases initiatrices et de dimères pour les caspases effectrices (Boatright et al., 2003). Leur structure à l'état inactif est constituée d'une unité protéique large située au milieu de la molécule et portant un motif conservé QACxG, d'une sous unité protéique localisée dans la partie C-terminale et d'un prodomaine situé dans la partie N-terminale. La large sous-unité contient le site analytique qui porte le résidu cystéine (C) localisé au centre du motif QACxG (où x=R, Q ou G).

L'activation des zymogènes se fait par clivage protéolytique au niveau de deux sites consensus, conduisant à la séparation des deux sous-unités suite à la coupure du prodomaine. Le clivage se fait toujours après la liaison Asp-X (où X est un acide aminé variable selon les caspases).

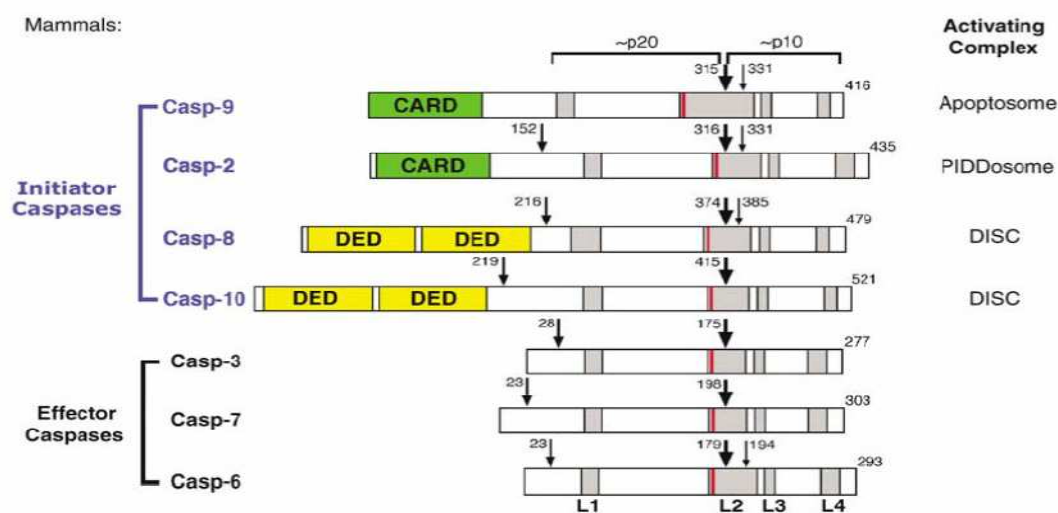
L'activation des caspases se fait en deux étapes successives où, il y a d'abord clivage et libération de la petite S/U suivie de la grande, puis association des deux après clivage formant un hétérodimère (figure 2). Des études cristallographiques ont montré que les caspases activées forment des tétramères suite à l'association de deux hétérodimères qui contiennent chacun deux sites catalytiques indépendants.



**Figure 2.** Mode d'activation des caspases (D'après Chowdury et al., 2008).

Le mode d'activation préférentiel des caspases initiatrices implique leur recrutement au niveau de plateforme de signalisation. Ce recrutement est possible grâce à des domaines particuliers présents au niveau des caspases initiatrices tels que le domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) pour les caspases-9 et -2 ou le domaine DED (Death Effector Domain) pour les caspases-8 et -10 (Bao and Shi, 2007).

A ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez l'homme mais il est probable que ce nombre ne soit pas exhaustif (Kumar, 2007). Cependant, il y a 7 caspases responsables de l'apoptose divisées en deux groupes représentés dans la figure 3.



**Figure 3.** Les différents domaines structurant les caspases (D'après Bao et Shi, 2007).

Comme leur nom l'indique, les caspases sont des enzymes qui clivent après un résidu aspartate. Des sites de reconnaissance et des séquences d'acides aminés homologues permettent la liaison des caspases à leurs substrats et ceci grâce à des facteurs de spécificité localisés dans la petite sous-unité des caspases (Nicholson, 1999). Le nombre des substrats des caspases ne cesse d'augmenter. En effet, environ 280 substrats cellulaires des caspases de mammifères ont été identifiés en 2003 (Fischer et al., 2003). Ce nombre est passé à 400 en 2007 (Luthi et Martin, 2007). Parmi ces substrats, il y a les protéines cytoplasmiques kératine 18 (Schutte et al., 2004) et  $\beta$ -caténine (Brancolini et al., 1998), les protéines nucléaires (lamine A et B, récepteur de lamine B, Mdm2, les protéines liées à l'ARN et associées aux ribonucléoprotéines et les protéines de structure des chromosomes), les protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (ARN polymérase I, ADN topoisomérase, ...), les protéines kinases (Akt, Raf-1, PKC, ...), les protéines du cycle cellulaire et de prolifération (P21, P27, pRb, ...), les protéines des voies de transduction du signal (pro-interleukines, phospholipases) ainsi que les protéines de l'apoptose (caspases, protéines de Bcl-2) (Salido et Rosado, 2009).

#### **I.2.3.2. Voie intrinsèque ou voie mitochondriale**

Il est actuellement clairement établi que l'apoptose implique les mitochondries comme effecteur central (Green et Kroemer, 2004). Ces organites collectent les informations relatives au métabolisme cellulaire et aux cascades de transduction de signaux. Ils intègrent ces informations, décident alors du sort de la cellule et participent le cas échéant à l'exécution de la mort (Haouzi et al., 2001). L'intervention des mitochondries dans l'apoptose ne s'explique pas par une simple perte de fonction ayant pour conséquence un déficit énergétique, mais est reconnue plutôt comme un mécanisme actif s'accompagnant de profondes altérations.

La perméabilisation de la membrane mitochondriale est en effet observée de manière précoce dans le processus d'apoptose, liée à une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Cette perméabilisation va participer au processus d'apoptose par au moins trois mécanismes : la perte des fonctions mitochondriales comme la production d'énergie, le relargage des protéines stockées dans l'espace intermembranaire et impliquées dans l'activation des caspases tel que le cytochrome c, mais aussi le relargage de protéines capables d'induire l'apoptose indépendamment des caspases tel que l'AIF. La perméabilisation de la membrane mitochondriale représente un point de non retour dans l'induction de l'apoptose.



D'une manière générale, la perméabilité de la membrane mitochondriale implique le contrôle de la perméabilisation de la membrane externe et le contrôle de la perméabilisation de la membrane interne (Armstrong, 2006).

Le concept de mégapore mitochondrial nommé PTP (Pore de Transition de Perméabilité) responsable du relargage des facteurs apoptotiques a été récemment décrit. En effet, L'ouverture de ce pore interfère avec le transport des électrons de la chaîne respiratoire ainsi que la production d'ATP. Ce pore est formé de la participation d'une multitude de facteurs qui sont le VDAC et le récepteur benzodiazépine, situés dans la membrane externe, l'héxokinase II associée au VDAC dans la partie cytosolique, la créatine kinase qui est localisée dans l'espace intermembranaire, l'ANT situé dans la membrane interne, la cyclophiline D située dans la matrice et les protéines de la famille Bcl-2.

Le VDAC est perméable à des molécules de taille de l'ordre de 5 KDa alors que la membrane interne est normalement imperméable (Zamzami et Kroemer, 2001). L'ouverture de ce pore est régulée par le pH de la matrice et le potentiel membranaire mitochondrial (Petronilli et al., 1994). Cependant, lors de l'apoptose, l'ouverture du pore et la dissipation du potentiel membranaire sont perturbés, conduisant au relargage des molécules proapoptotiques (Ly et al., 2003).

Dans la voie caspases dépendante, il y a recrutement du cytochrome c qui est relargué de la mitochondrie dans le cytoplasme et devient ainsi capable d'activer l'apoptose (Liu et al., 1996) en interagissant, en présence d'ATP, avec l'Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor -1), une protéine comportant un domaine CARD, modifiant sa conformation d'une structure monomérique inactive en un heptamère capable de lier et d'activer 7 dimères de caspase -9, puis le domaine CARD de chaque molécule d'Apaf-1 réagit avec le domaine CARD de la caspase -9 formant ainsi un complexe appelé 'apoptosome' où la caspase -9 est activée (Widlak et Garrard, 2005). La caspase -9 comme les caspases -8 et -10 est une caspase initiatrice. Son activation conduit à un clivage protéolytique ce qui permet l'activation des caspases effectrices comme la caspase -3 (Riedl et Shi, 2004).

Dans la voie mitochondriale caspases indépendante, d'autres protéines comme l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) ou l'endonucléase G sont elles-aussi relarguées de la mitochondrie suite à un signal apoptotique (Mate et al., 2002).

Lorsque la membrane mitochondriale est rendue perméable suite à un stimulus pro-apoptotique, l'AIF sera transloqué de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau où il termine sa maturation. Dans le noyau, l'AIF se fixe à l'ADN, déplace les protéines qui lui sont associées et active ou recrute les endonucléases initiant ainsi la fragmentation de l'ADN en particules de haut poids moléculaire (Kpb) (Ye et al., 2002).

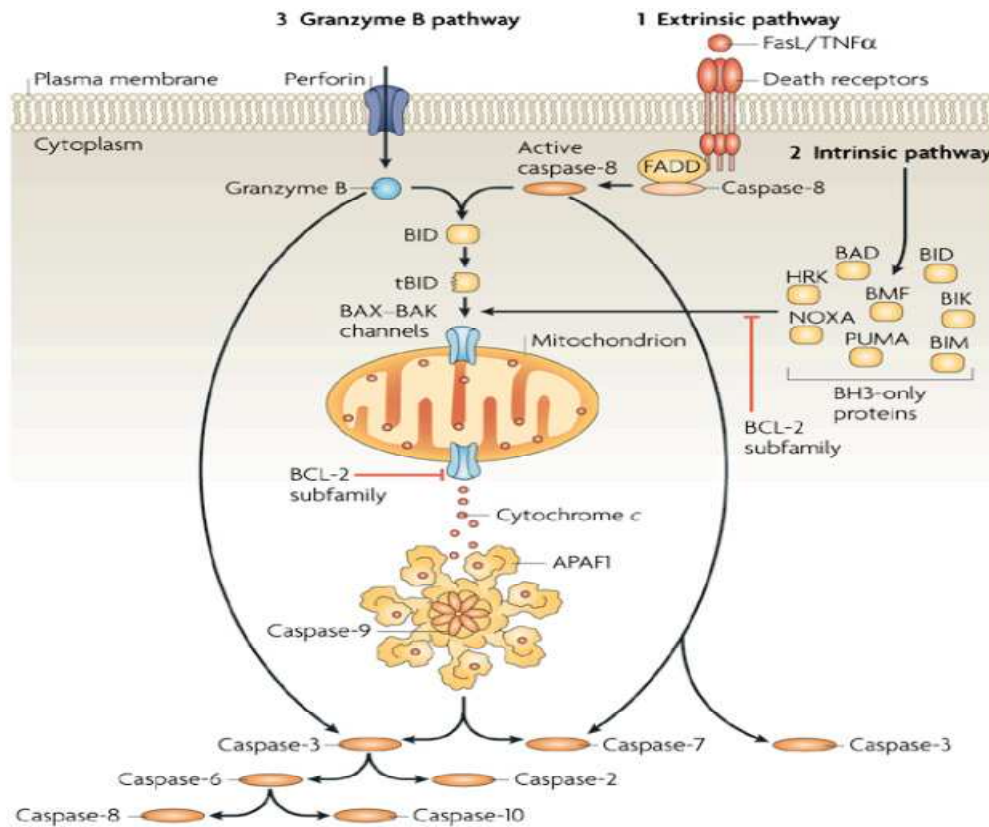
Quant à l'endonucléase G, elle est aussi transloquée vers le noyau où elle induit la fragmentation de l'ADN (Cregan et al., 2004). L'endonucléase G agit en coopération avec des exonucléases et la DNase I générant des fragments d'ADN internucléosomiaux (Saelens et al., 2004).

### **I.2.3.3. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort**

La deuxième voie apoptotique est celle des récepteurs membranaires appelés récepteurs de mort DR (Death Receptors) appartenant à la famille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor) qui présentent un domaine extracellulaire riche en cystéines (CRDs, « cystein rich domains ») qui favorisent la liaison entre le ligand et le domaine trans-membranaire du récepteur. Ils contiennent également dans leur région cytoplasmique un domaine conservé DD (Death Domain) qui permet le recrutement d'autres protéines possédant aussi un domaine DD et qui assurent la propagation du signal de mort (Ashkenazi et Dixit, 1998).

Les récepteurs de mort sont activés par la fixation de leur ligand et vont recruter des protéines intracellulaires dites adaptatrices. Ces dernières vont à leur tour recruter les caspases initiateuses -8 et -10 et induire leur activation par autoclivage. Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont Fas (ou CD95) activé par son ligand Fas L, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF- $\alpha$ , TRAIL-R1 et TRAIL-R2 qui sont les récepteurs de TRAIL et DR3 dont le ligand est Apo3L (Micheau et Tschopp, 2003 ; Rubio-Moscardo et al., 2005). Leur activation conduit à l'induction de l'apoptose.

Ces deux voies principales de l'apoptose (intrinsèque et extrinsèque) semblent fonctionner de façon indépendante. Pourtant, dans certains cas, il existe une liaison entre elles, à travers les protéines de la famille Bcl-2 (Scaffidi et al., 1998 ; Eskes et al., 2000 ; Zhang et al., 2000 ; Kuwana et al., 2002). La figure 4 représente les voies de l'apoptose et la relation entre elles.



**Figure 4.** Les voies de l'apoptose (D'après Taylor et al., 2008).

## I.2.4. Régulation et contrôle de l'apoptose

### I.2.4.1. Les protéines Bcl-2

L'apoptose est contrôlée par un groupe de protéines hautement conservées au cours de l'évolution qui sont les protéines de la famille Bcl-2 (Salido et Rosado, 2009).

La majorité des membres de cette famille sont localisés en grande partie dans les membranes subcellulaires y compris la membrane mitochondriale externe, le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire. Ils ont une faible homologie entre leurs séquences totales en acides aminés. Cependant, ils ont de fortes homologies entre des régions précises, nommées domaines BH (Bcl-2 Homology) qui sont des segments en hélice  $\alpha$  numérotés BH1 à 4 et sont essentielles pour les interactions entre protéines (Yin et al., 1994). Ils peuvent être classés en 3 groupes en fonction de leur structure et de leur fonction : le premier groupe antiapoptotique est constitué des protéines de survie (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 et A<sub>1</sub>/Bfl<sub>1</sub>) qui, toutes contiennent trois à quatre domaines BH. Le second groupe est composé des protéines proapoptotiques Bax, Bak et Bok qui contiennent deux à trois domaines BH. Le troisième groupe

comprend au moins huit protéines ne contenant qu'un seul domaine d'homologie, le domaine BH3 (Bim, Bid, Bik et Nix) d'où leur nom de protéines à Bh3 isolé ou « Bh3-only protein, Bop » (Kaufmann et Hengartner, 2001).

Bcl-XL et Bcl-2 sont des molécules antiapoptotiques de la famille Bcl-2 dont la principale fonction est de permettre l'adaptation et le maintien de l'intégrité de la mitochondrie au cours de perturbations du métabolisme cellulaire. Leur mécanisme d'action comme celui des autres membres de cette famille repose sur l'inhibition de l'activité de Bid et Bax qui participent dans la formation de pores dans la membrane mitochondriale permettant le relargage du cytochrome c (Kuwana et al., 2002). Le mécanisme de l'activité antiapoptotique Bcl-2/Bcl-xL serait également de moduler l'activation Bax/Bak en séquestrant les molécules de la sous famille BH3 (Salido et Rosado, 2009).

Les molécules Bcl-2 proapoptotiques (Bax et Bak) sont nécessaires à la voie apoptotique mitochondriale (Wei et al., 2001). En effet, dans une situation d'apoptose, Bax s'intègre dans la membrane mitochondriale et, en présence de Bak, contribue à la perméabilisation de la membrane externe, à la chute du potentiel mitochondrial et à la libération de protéines proapoptotiques tel que le cytochrome c (Zong et al., 2003).

#### **I.2.4.2. Les molécules régulatrices des caspases**

Les protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAPs, ont été découvertes dans le baculovirus. A ce jour, 8 IAPs sont connues chez l'humain dont XIAP, C-IAP1, C-IAP2 et la survivin (Salido et Rosado, 2009). Les IAPs agissent par deux mécanismes : soit par liaison directe aux caspases supprimant leur activité catalytique soit par une activité E<sub>3</sub> ligase qui conduit à l'ubiquitination et la dégradation de la caspase cible (Jin et El-Deiry, 2005).

Dans le cas de l'apoptose induite par la voie Fas/caspase -8, les IAPs n'inhibent pas la caspase -8 mais plutôt son substrat, la caspase -3 bloquant ainsi la cascade protéolytique (Roy et al., 1997). Alors que dans la voie mitochondriale, les IAPs (XIAP, c-IAP1 et c-IAP2) se fixent directement à la caspase initiateur, la procaspase -9 et empêchent son activation induite par le cytochrome c (Deveraux et al., 1998). L'activité des IAPs est régulée pendant l'apoptose en particulier par l'action de deux protéines Smac/Diablo et Omi/Htra2.

Les protéines Smac/Diablo sont des protéines mitochondriales qui seront relarguées de la mitochondrie au cytoplasme après perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ces protéines agissent sous forme de dimères en contribuant à l'activation des caspases en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose IAPs (Verhagen et al., 2000).

La protéine Omi/HtrA2, une serine protéase homologue de l'endoprotéase bactérienne HtrA2, est présente dans l'espace intermembranaire mitochondrial. En situation d'apoptose, Omi/HtrA2 sera libérée dans le cytosol où exerce son rôle soit en inhibant les IAPs déclenchant donc la cascade des caspases soit en dégradant, grâce à son activité de sérine protéase, des protéines intracellulaires nécessaires à la vie de la cellule (Verhagen et al., 2002 ; Van Gurp et al., 2003).

Une autre protéine, la protéine FLIP, possède deux domaines DEDs en N-terminal, facilitant son interaction avec les prodomaines des caspases -8 ou -10 empêchant ainsi leur recrutement par les récepteurs TNF-R1 et Fas/CD95 (Okano et al., 2003).

### **I.2.5. L'apoptose dans l'adénome prostatique**

Plusieurs études réalisées *in vitro* ont suggéré l'existence d'une réduction de l'apoptose dans l'adénome prostatique. Kyprianou et al. (1996) ont rapporté que les cellules épithéliales basales et lumbales de l'adénome surexpriment les Bcl-2, comparativement à ceux des tissus prostatiques sains. D'après les auteurs, l'augmentation de l'expression des Bcl-2 peut être impliquée dans la dérégulation des mécanismes de mort cellulaire apoptotique normale dans les cellules prostatiques humaines, entraînant un déséquilibre de la croissance en faveur de la prolifération cellulaire, qui pourrait contribuer à la promotion de l'hypertrophie prostatique.

Des données similaires ont été proposées par Colombel et al. (1998) qui ont trouvé que la Bcl-2 est fortement exprimée dans les cellules basales des nodules glandulaires matures et dans la plupart des cellules à petits nodules immatures. Claus et al. (1997) et à l'aide de l'anticorps Ki-67 et du test TUNEL permettant de marquer les cellules prolifératives et les cellules apoptotiques, ont montré que la croissance prostatique était compartimentée dans le stroma, alors que la mort cellulaire était absente.

### **I.3. La prostate**

#### **I.3.1. Histologie**

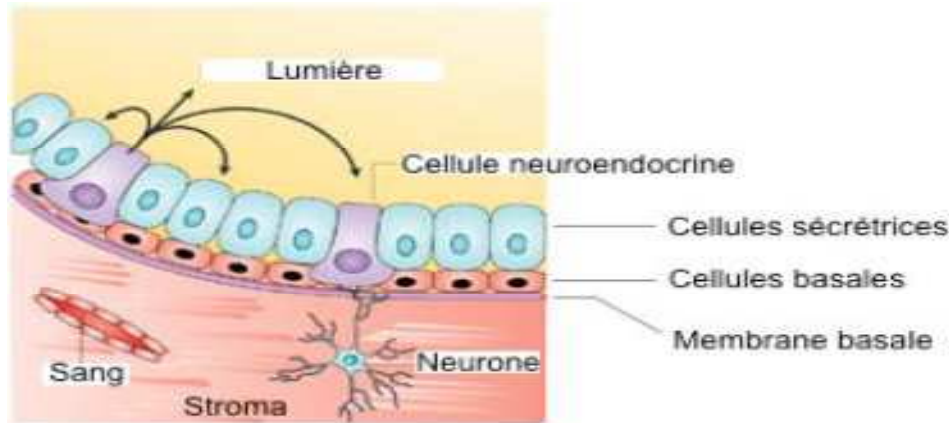
La prostate est constituée de deux couches histologiques principales, les glandes tubulo-alvéolaires ou acini et le stroma fibromusculaire lisse (Marker et al., 2003). Le tissu glandulaire est composé de trois types de cellules :

\* Les cellules basales qui sont considérées comme le compartiment de réserve de l'épithélium prostatique et sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium sécrétoire et forment une couche continue entre les cellules sécrétrices et la membrane basale. Les cellules basales sont androgéno-indépendantes et peuvent se différencier en cellules sécrétrices androgène-dépendantes.

\* Les cellules luminales ou sécrétrices (cellules épithéliales apicales) organisées en monocouche continue et sont responsables de l'activité exocrine de la prostate. Elles produisent les produits constitutifs du plasma séminal contenant l'antigène glycoprotéique spécifique PSA, des phosphatases spécifiques de la prostate ainsi que des polyamines. Ces cellules expriment le récepteur aux androgènes et sont dépendantes de son activation pour leur viabilité et leur capacité sécrétoire (van Leenders et al., 2003 ; Novara et al., 2006).

\* Les cellules neuroendocrines sont présentes dans tous les compartiments glandulaires de la prostate. Elles produisent des substances semblables aux neurohormones comme la calcitonine, la sérotonine, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) et contiennent également des granules sécrétoires (Novara et al., 2006). La figure 5 représente un schéma représentatif de l'épithélium glandulaire prostatique.

Cet ensemble cellulaire est entouré d'une lame basale qui marque la délimitation avec le stroma conjonctif constitué de fibroblastes, de fibres de collagène et élastiques, des cellules musculaires lisses, de nerfs et de vaisseaux sanguins et lymphatiques (Novara et al., 2006) .



**Figure 5.** L'épithélium glandulaire prostatique (D'après Bok et Small, 2002).

### I.3.2. Le contrôle endocrinien de la prostate

Le développement, la maintenance et la fonction de la prostate requièrent l'activité du RA et des androgènes (Marker et al., 2003).

#### I.3.2.1. Rôle des androgènes

L'hormone qui joue le rôle principal est la testostérone, ou plus précisément son métabolite actif, la 5-alpha dihydrotestostérone (DHT) obtenu par conversion de la testostérone ou des androgènes surrénaliens circulants (delta-4 androstènedione, S-DHA) par l'enzyme 5-alpha réductase qui prédomine dans la prostate (Hermabessière et Taillandier, 1993). Les androgènes sont transformés par la 5-alpha réductase en DHT dans le cytoplasme des cellules épithéliales.

L'importance de la DHT dans le développement de la prostate a été mise en évidence par un modèle humain naturel ayant une déficience en 5-alpha réductase. Les adultes ont une prostate rudimentaire et un taux de PSA plasmatique bas ou non détectable. L'analyse histologique montre la présence de tissu conjonctif et de muscle lisse mais pas de tissu épithélial. L'administration de DHT à ces patients résulte en un élargissement de la prostate et une élévation du PSA. La différenciation et la croissance de la prostate sont largement médiées par la DHT plutôt que la testostérone (Zhu et al., 2005). Les effets des androgènes sont liés à leur liaison sur un récepteur spécifique appelé récepteur aux androgènes (RA).

### **I.3.2.2. Le récepteur aux androgènes**

Le récepteur aux androgènes (RA) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires parmi lesquels : les récepteurs aux estrogènes (RE), à progestérone (RP), et aux gluco-(RG) et minéralo-corticoïdes (RM) (Tostain et al., 2004). Comme tous ces récepteurs, RA est une protéine soluble qui fonctionne comme un facteur de transcription intracellulaire. RA est particulièrement exprimé dans les tissus cibles des androgènes tels que la prostate, les muscles, le foie et le SNC mais avec un niveau d'expression très élevé observé dans la prostate (Martin et al., 2008). Le RA interagit avec différentes voies de signalisation intracellulaires complexes et interconnectées.

Dans la voie génomique, le RA se trouve sous forme inactive dans le cytoplasme des cellules, associé aux protéines chaperonnes Hsp 90 et 70. Une fois lié à son ligand, RA subit un changement conformationnel, une dissociation des Hsp, une dimérisation puis le transport vers le noyau où il se fixe aux éléments de réponse de l'ADN nucléaire (Feldman et Feldman, 2001). Le RA régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires (Nantermet et al., 2004). Parmi lesquels, les gènes impliqués dans la synthèse, la maturation, le transport et la dégradation des protéines sécrétées dans le liquide séminal.

Dans la voie non génomique, il n'y a pas d'interaction avec l'ADN. Elle met en jeu des modifications de type phosphorylation/déphosphorylation d'où sa rapidité d'action (son activation est mesurable en quelques minutes, alors que l'initiation de la transcription des gènes par voie génomique prend 30 à 60 min) (Cato et al., 2002). Le RA lié à son ligand active la voie de signalisation des MAPK, qui est impliquée dans de nombreux processus cellulaires (Heinlein et Chang, 2002 ; Kim et al., 2007) et qui conduit à la régulation de différentes cibles intracellulaires. Les MAPK peuvent également moduler la phosphorylation des cofacteurs du RA régulant ainsi son activité transcriptionnelle (Heinlein et Chang, 2002).

### **I.3.2.3. Le récepteur aux estrogènes**

Il existe également des récepteurs spécifiques aux estrogènes (RE) au niveau de la prostate et qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (Zhu et al., 2005). Il existe deux types de RE codées par deux gènes distincts, RE $\alpha$  et RE $\beta$ .



Ce sont des protéines cytosoliques associées à des protéines de choc thermique Hsp 70 et 60 (Prins et Korach, 2008) qui bloquent le site de liaison à l'ADN du récepteur, mais la liaison des récepteurs à leur ligand conduit à leur activation et leur translocation dans le noyau où ils se lient à l'ADN au niveau de sites spécifiques responsables de la différenciation de la prostate. Elles peuvent se lier aux sites AP-1 et SP-1 et influencer les voies impliquées dans la prolifération (Prins et Korach, 2008). Dans la prostate, RE $\beta$  est localisé dans l'épithélium tandis que le RE $\alpha$  est localisé dans le stroma (Weihua et al., 2002).

Plusieurs études réalisées sur le sein, l'ovaire, le colon et la prostate ont montré la sous expression du RE $\beta$  (ARNm et protéines) dans le tissu tumoral comparé au tissu sain (Campbell-Thompson et al., 2001 ; Roger et al., 2001 ; Fixemer et al., 2003). Il semble que le rapport RE $\alpha$ /RE $\beta$  augmente au cours de la tumorigénèse, suggérant ainsi que ces deux protéines aient des rôles différents au cours de ce processus.

#### **I.3.2.4. Les estrogènes**

Les estrogènes sont synthétisés via l'aromatase des androgènes par une enzyme appelée aromatasase, qui régule la balance entre androgènes et estrogènes. Chez l'homme, cette balance est altérée avec l'âge : le niveau des androgènes plasmatiques baisse tandis que le niveau des estrogènes reste relativement constant (Vermeulen et al., 2002). Quand le niveau d'estrogènes varie, des altérations du développement prostatique sont observées, mais ces changements sont systémiques et conduisent en fait à un changement complexe de tout l'environnement endocrinien (Marker et al., 2003).

Si les estrogènes ne semblent pas avoir un rôle direct dans la différenciation et le développement de la prostate, ils ont un rôle plus tardif (Ellem et Risbridger, 2007). En effet, les souris traitées transitoirement au stade néonatal aux estrogènes développent avec l'âge une dysplasie épithéliale de la prostate et une inflammation due à une infiltration cellulaire. Cet effet de prolifération aberrante est médié par RE $\alpha$  car le traitement des souris ArKO par un agoniste spécifique des ER $\beta$  montre que la stimulation des ER $\beta$  exerce des réponses antiprolifératives au niveau de l'épithélium, qui ne sont pas influencées par l'altération des niveaux d'androgènes ou l'activation de ER $\alpha$ . (Mc Pherson et al., 2007).

### **I.3.3. Les maladies prostatiques**

La prostate peut être le siège de trois principales maladies : La prostatite, qui recouvre les diverses pathologies infectieuses ou inflammatoires de la prostate, l'adénome prostatique et le cancer de la prostate.

#### **I.3.3.1. L'adénome prostatique**

L'adénome prostatique est la maladie la plus fréquente de l'homme âgé (90% d'atteintes histologiques chez les sujets de 80 ans). Ses dénominations sont nombreuses « hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) », « adénomyome » et « hyperplasie adénofibromyomateuse » (Fourcade et Tahan, 2000).

Sur le plan physiopathologique, l'adénome prostatique est dû à une prolifération tant du stroma fibreux que des cellules épithéliales glandulaires. Cet adénome résulte d'un déséquilibre entre prolifération cellulaire et apoptose. La présence d'androgènes est le facteur qui joue le rôle majeur dans la pathogénie de l'adénome. La DHT exerce un rôle majeur dans la régulation génétique des facteurs de croissance. Les estrogènes jouent aussi un rôle important (Fourcade et Tahan., 2000). Il existe également des interactions entre les diverses cellules à l'intérieur de la prostate grâce à des signaux de transduction (paracrine). De nombreux facteurs de croissance entrent ainsi en jeu sous des formes encore incomplètement connues. Ils interviennent comme stimulants (KGF, FGF et EGF) ou encore comme inhibiteurs de la croissance (TGF $\beta$ ) (Colombel et al., 1998).

La croissance prostatique dépend également d'un système local d'information intracellulaire qui a pour support des polypeptides synthétisés par les cellules prostatiques elles-mêmes. L'action de ces polypeptides s'exerce au sein de chacune des structures glandulaires ou stromales de la prostate ou entre ces deux composantes (Desgrandchamps et al., 1992). La prostate contient également des récepteurs adrénergiques appartenant essentiellement au sous type alpha et qui sont impliqués dans la contraction des cellules musculaires lisses prostatiques. Elles se situent de façon prédominante dans le stroma et principalement dans la région centroprostatique.

Le nombre de ces récepteurs semble être augmenté dans le tissu adénomateux chez les patients symptomatiques essentiellement par augmentation du contingent cellulaire stromal (Mottet et al., 1999). La densité cellulaire en récepteurs alpha est plus grande dans les cellules musculaires présentes dans l'adénome et les nodules hyperplasiques que dans le stroma avoisinant. Ces récepteurs participent à la synthèse et la libération de FGF $\beta$ , facteur impliqué dans la croissance prostatique. Les récepteurs beta-adrénergiques sont également présents. Leur stimulation entraîne une relaxation des cellules musculaires prostatiques (Tsujii et al., 1992).

Du point de vue symptomatologie, les premiers changements histologiques sont identifiables à partir de l'âge de 30 ans, se traduisant à des symptômes vers l'âge de 50 ans chez un homme sur deux. A partir de la 8<sup>e</sup> décennie de la vie, c'est l'ensemble des hommes qui est touché (Madersbacher et al., 1998). Les symptômes de la maladie associent généralement pollakiurie, souvent associée à des contractions vésicales désinhibées qui ne disparaissent pas toujours avec le traitement de l'obstruction et les symptômes dysuriques. Ils s'agissent d'un besoin impérieux, d'une diminution de la force du jet et d'une sensation d'une miction incomplète. Une irritation et une obstruction sont également enregistrées (Simpson, 1997).

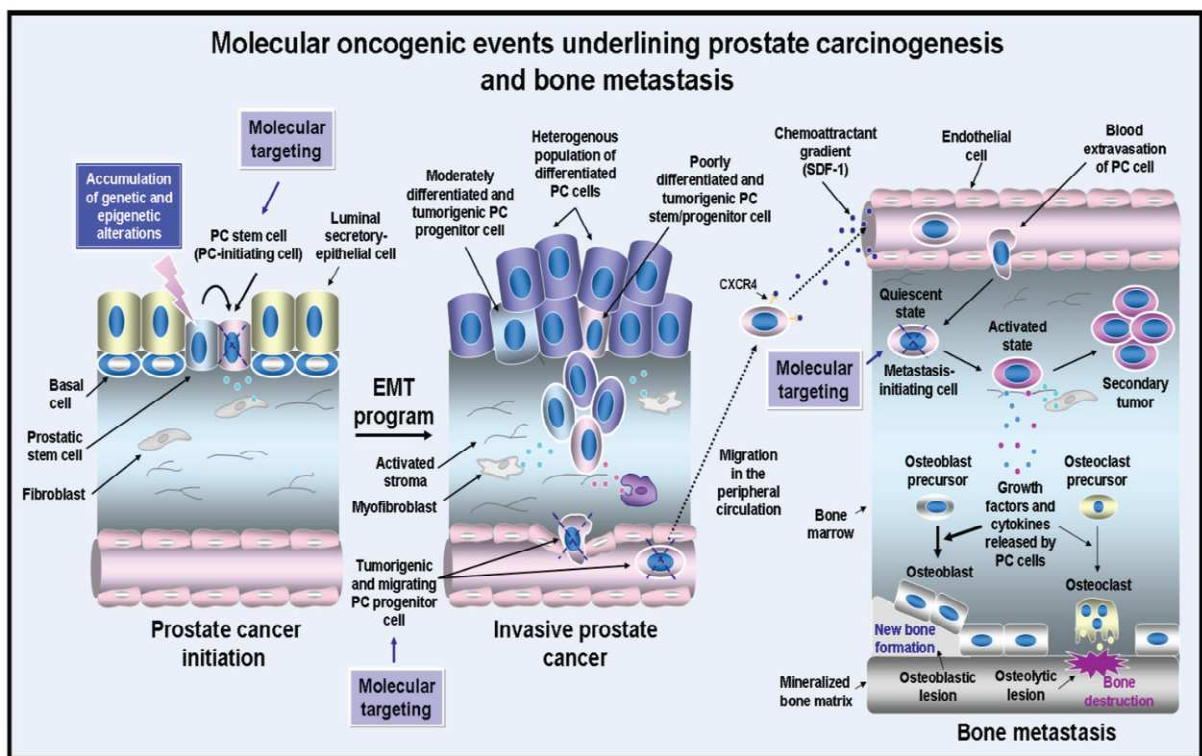
### **I.3.3.2. Le cancer de la prostate**

Le cancer de la prostate constitue un problème de santé publique important par sa fréquence. En effet, des milliers de nouveaux cas de cancer de la prostate sont recensés dans le monde chaque année, ce qui le place au deuxième rang des cancers masculins et présente 10% de ces derniers.

On peut observer une évolution vers une néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN). C'est une prolifération cellulaire au voisinage des canaux et acini prostatiques caractérisée par des altérations phénotypiques et génétiques proches des cellules cancéreuses (Bostwick et al., 1996) sauf que dans la PIN, l'assise cellulaire basale est conservée. Les PINs sont divisées en deux catégories : PIN de bas grade et PIN de haut grade. Les lésions de cette dernière sont considérées comme étant les précurseurs des adénocarcinomes prostatiques.

L'évolution vers l'adénocarcinome prostatique, représente environ 99% des cancers de la prostate et son développement est sous la dépendance des androgènes.

Il se développe au dépend de l'épithélium sécrétoire des canaux et acini prostatiques et est dépourvu de couches de cellules basales. Les cellules sont caractérisées par l'augmentation de la taille des noyaux et par la présence d'un nucléole proéminent. Cet adénocarcinome est multicentrique, polymorphe et forme un large spectre de lésions, allant de carcinomes très bien différenciés où les glandes tumorales diffèrent peu des glandes normales, à des carcinomes très peu différenciés ne présentant ni la morphologie, ni les fonctions sécrétoires habituelles (Hammerich et al., 2009). La figure 6 présente les principaux événements moléculaires qui se produisent dans l'adénocarcinome prostatique.



**Figure 6.** Événements moléculaires oncogéniques au cours de la cancérogenèse prostatique et des métastases osseuses (d'après Mimeault et Batra, 2011).

La majorité des cancers sont d'origine épithéliale. On en distingue autre que l'adénocarcinome, le carcinome à cellules transitionnelles et les tumeurs neuroendocrines. La zone stromale est aussi un site de prolifération tumorale, il y a le rhabdomyosarcome qui se développe le plus souvent chez l'enfant de moins de 10 ans, et le léiomyosarcome (le plus souvent chez l'adulte après 40 ans) (Bartolozzi et al., 1988 ; Tazi et al., 2001 ). Le cancer évolue ensuite vers une forme clinique et symptomatique suite à un retentissement extra-

prostatique caractérisée par une différenciation des cellules cancéreuses. L'extension des cellules cancéreuses prostatiques se fait ensuite vers les vésicules séminales et la vessie, puis par les chaînes lymphatiques iliaques avant de gagner les os, le foie, les poumons et le cerveau (Albin et Mason, 2007).

#### **I.3.4. Les xénoestrogènes dans la prostate**

La prostate peut être la cible de plusieurs facteurs extérieurs ayant une action directe ou indirecte sur son fonctionnement, conduisant à des perturbations au niveau de la glande prostatique. Un point particulier concerne l'interférence des xénoestrogènes, molécules à potentiel estrogénique variable, mais également faible et qui peuvent se retrouver à des concentrations importantes dans l'alimentation ou dans l'environnement (Martin et al., 2008).

Les xénoestrogènes ont été également dénommés « perturbateurs endocriniens » (Colborn et al., 1993). Un perturbateur endocrinien est, selon la définition précisée lors du Workshop Européen de Weybridge en décembre 1996 : « un agent exogène capable d'entraîner des effets délétères sur un organisme vivant ou sa descendance en interférant avec la synthèse, le stockage, le transport, le métabolisme, la fixation, l'action ou l'élimination d'une hormone endogène intervenant dans les mécanismes de régulation de l'homéostasie, du développement ou de la reproduction » (Fénichel et Brucker-Davis, 2008).

##### **I.3.4.1. Mode d'action**

Il existe plusieurs sites et plusieurs processus cellulaires qui peuvent être la cible des xénoestrogènes et altérer les fonctions des organes. Les xénoestrogènes peuvent agir au niveau de la liaison au récepteur hormonal en imitant le ligand naturel (agissant comme un agoniste) ou en inhibant la liaison (agissant en tant qu'antagoniste). Cette inhibition peut être compétitive si l'agoniste endogène et l'antagoniste exogène sont en compétition pour le même site de liaison du récepteur, ou non compétitive si l'inhibiteur se lie au récepteur ou au complexe (récepteur + hormone) ailleurs que sur le site d'activation. Un exemple de ce type de xénoestrogènes est le *p*-tert-octylphénol (Damstra et al., 2002). Les xénoestrogènes peuvent causer des modifications au niveau de la synthèse hormonale. Un inhibiteur de l'aromatase par exemple empêchera ou diminuera la formation de 17 $\beta$ -œstradiol à partir de la

testostérone, conduisant à une augmentation de la concentration de cette dernière et à une concentration plus faible en œstrogène.

De même, l'induction des enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones peut modifier leur niveau circulant. Ainsi, l'induction du cytochrome *P450 1A1* hépatique impliqué dans l'hydroxylation de l'œstradiol serait responsable de l'activité antiestrogénique de certains PCBs, en facilitant l'inactivation et l'élimination de l'œstradiol (Pang et al., 1999). Les xénoestrogènes peuvent également perturber la distribution et l'accumulation des hormones, en agissant sur l'activation de certains seconds messagers ou en bloquant des cascades de synthèse d'hormones conduisant à la modification des niveaux sanguins d'hormones et ainsi leur biodisponibilité (Sikka et Wang, 2008).

Les perturbateurs endocriniens peuvent modifier le transport et l'élimination des hormones. La majeure partie des molécules lipophiles est transportée dans le sang sous forme liée à des protéines de transport comme l'albumine. Une modification de la concentration sanguine des protéines de liaison peut augmenter ou diminuer la biodisponibilité de ces hormones au niveau de leurs récepteurs. Egalement, une substance qui entre en compétition avec une hormone pour les sites de liaison de son transporteur peut provoquer une augmentation de sa fraction libre qui est active et peut se lier à son récepteur. Ils peuvent aussi modifier les réponses cellulaires après liaison de l'hormone au récepteur. Cette liaison qui déclenche une cascade de réactions et produit des systèmes de seconds messagers et qui peuvent être modifiés par les perturbateurs endocriniens (Damstra et al., 2002).

Certains xénoestrogènes peuvent agir en modifiant la concentration en récepteur d'une hormone. C'est le cas de la 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) considérée comme agoniste exogène pour l'Ahr et dont l'activation induit une augmentation de l'expression des enzymes responsables de la dégradation du récepteur aux œstrogènes (Safe and Krishnan, 1995), conduisant à une augmentation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'œstradiol et une inhibition de l'expression des gènes contrôlés par cette même hormone.

Plusieurs substances peuvent conduire à la formation d'un nombre élevé de radicaux libres oxygénés ou à l'inhibition de la formation des antioxydants, ce qui provoque un stress oxydatif qui peut contribuer à des déséquilibres hormonaux (Sikka et Wang, 2008).

### **I.3.4.2. Structure et métabolisme des xénoestrogènes**

Les xénoestrogènes recouvrent un très large spectre de diverses structures moléculaires, incluant certains pesticides et une grande variété de molécules chimiques tels les alkylphénols (nonylphénol, octylphénol), le bisphénol A et les phtalate-esters (dont le benzylbutyl-phtalate [BBP]), les dioxines ainsi que les parabènes (Sonnenschein et Soto, 1998).

#### **I.3.4.2.1. Les pesticides**

*Le Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides* (FAO, 1990) définit ainsi les pesticides: «toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites. Le terme comprend les substances destinées à être utilisées comme régulateurs de croissance des plantes, comme défoliants, comme agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée des fruits, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, soit avant, soit après la récolte pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport» (FAO., 1996).

Selon la cible qu'ils visent, les pesticides sont classés en plusieurs catégories : les insecticides, les fongicides, les herbicides, les nématicides, les acaricides, les rodenticides, les molluscides et les algicides. Ils peuvent également être classés selon leur composition chimique en : organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes de synthèse, urées substituées, ... (Testud et Grillet, 2007). Les pesticides comptent aujourd'hui plus de 900 matières actives (Marc, 2004) parmi lesquelles une grande variété est classée comme xénoestrogènes. Le tableau 1 représente les principaux pesticides considérés en tant que xénoestrogènes.

**Tableau 1.** Tableau représentant les pesticides xénoestrogènes (D'après Levi, 1999).

<b>Pesticide (matière active)</b>	<b>Famille chimique</b>
2,4 D ; 2,4,5 T ; Alachlor, Amitrole, Atrazine	Herbicides
Aldicarbe, HCH, Carbaryl, Chlordane, Cyperméthrine, DDT et métabolites, Dieldrine, Endosulfan, Ethylparathion, Lindane, Heptachlore, Heptachlore epoxyde, Kepone, Malathion, Parathion, Mirex, Perméthrine, Methomyl	Insecticides
Benomyl, Maneb, Mancozèbe, Zinèb, Ziram	Fongicides
Dicofol, Kelthane	Acaricides

Du fait de la diversité de leurs structures chimiques, de leurs groupes fonctionnels et de ce fait de leurs propriétés physicochimiques, les pesticides ont des métabolismes différents. Certains subissent des transformations au niveau hépatique sous l'effet de diverses enzymes (réductase pour la chlordécone ou par des cytochromes *P450* mono-oxydases, des carboxylestérases non spécifiques, des phosphatases et des glutathions S-transférases pour le malathion) soit par le biais d'une S-oxydation par des enzymes microsomiales hépatiques (aldicarbe).

Ils peuvent également subir une hydrolyse par des estérases spécifiques (ziram, maneb et zinèbe) ou par des estérases non spécifiques (perméthrine) au niveau du tube digestif (Testud et Grillet, 2007).

Le DDT, un insecticide largement utilisé en agriculture est un xénoestrogène qui se lie aux récepteurs ER $\alpha$  (Chen et al., 1997). Le lindane et la dieldrine se lient, *in vitro*, aux récepteurs androgéniques du rat, inhibant ainsi la liaison de la 5-alpha dihydrotestostérone (DHT) (Bonvallot et Frédéric., 2004). Le lindane possède également des activités mimétiques envers l'hormone naturelle œstradiol. Il possède une activité estrogénique (Aarif and Huisingh, 2001) ainsi qu'antiestrogénique (Oropeza-Hernandez et al., 2001).



D'autres études ont suggéré que l'atrazine, un autre pesticide fongicide possède un effet inducteur vis-à-vis de l'aromatase, conduisant à l'augmentation des niveaux sanguins en estrogènes (Sanderson et al., 2000). Le fenitrothion, insecticide organophosphoré, est considéré comme xénoestrogène grâce à son pouvoir de blocage des récepteurs aux androgènes (Curtis, 2001; Tamura et al., 2001). C'est le cas également de la vinchlozoline, du p-p-DDE et de la linuron qui altèrent la différenciation des organes androgéno-dépendants comme la prostate en agissant comme antagonistes des récepteurs aux androgènes (Kelce et al., 1997; Lambright et al., 2000; Tamura et al., 2001). D'autres pesticides tels que le toxaphène et l'endosulfan interagissent également *in vitro* avec les récepteurs aux estrogènes humains (Schrader et Cooke, 2000; Andersen et al., 2002).

#### **I.3.4.2.2. Les dérivés phénoliques**

Cette famille renferme une grande variété de molécules chimiques tels que les alkylphénols dont le nonylphénol et l'octylphénol, le bisphénol A et les phtalates (BBP : benzylbutylphtalates).

##### **a. Les alkylphénols**

Les alkylphénols sont des substances chimiques très lipophiles qui entrent dans la fabrication des polymères, des détergents, des agents tensioactifs, mais aussi dans l'industrie textile et papetière, dans la formation de certains pesticides et comme stabilisants pour le caoutchouc et le plastique (Becue et Nguyen, 2005). L'octylphénol est caractérisé par un métabolisme principalement hépatique et à moindre degré dans l'intestin, les reins et les testicules (Nomura et al., 2008). Il s'agit d'une hydroxylation de l'anneau aromatique et de la chaîne alkylée suivie d'une conjugaison à l'acide glucuronique (Van den Berg et al., 2003). Le nonylphénol subit une glucuronidation ou une hydroxylation principalement au niveau hépatique et à moindre degré dans l'intestin (Daidoji et al., 2006).

Le pouvoir estrogénique de l'octylphénol est dû à sa liaison au récepteur estrogénique empêchant ainsi la liaison des estrogènes endogènes au récepteur (Laws et al., 2006) et induit la transcription des gènes liés à ce récepteur.

## **b. Le bisphénol A**

Le bisphénol A possède un usage très varié. Il entre dans la fabrication de nombreux produits dont les principaux sont les casques de sécurité, les bouteilles et les conteneurs en polycarbonate (dont les bouteilles d'eau), les plastiques de voitures et les plastiques en général (Kang et al., 2006). Le bisphénol A est un xénoestrogène à effet estrogénique et antiandrogénique qui inhibe l'activité transcriptionnelle du DHT. Chez le rat, cette activité est liée à la diminution des niveaux de CYP 2C 11/6 et de CYP 3A2/1 responsables de l'activité testostérone 2 $\alpha$ -hydroxylase et 6 $\beta$ -hydroxylase.

Chez les rats Sprague-Dawley, l'administration sous-cutanée d'une dose de 10 $\mu$ g/Kg/j entre les 1<sup>er</sup> et le 5<sup>e</sup> jour après la naissance a provoqué la formation de lésions néoplasiques intraépithéliales de la prostate chez tous les males à l'âge adulte (Ho et al., 2006). D'autre part, L'exposition *in utero* chez la souris à de faibles doses de BPA provoque une augmentation du poids de la prostate ainsi que du nombre de RA (Gupta, 2000).

### **I.3.4.2.3. Les parabènes**

Chose pareille pour les parabènes. En effet, diverses études ont montré que les parabènes ont un effet estrogénique. Ce potentiel estrogénique est en effet lié à leur structure cyclique qui se rapproche à celle de l'œstradiol. Leur mécanisme d'action probable est alors une action sur le cycle des estrogènes.

Des études réalisées *in vitro* (Tavares et al., 2009) ont montré que les parabènes sont capables de se lier aux récepteurs aux estrogènes, d'activer les gènes contrôlés par ces récepteurs, de stimuler la croissance cellulaire et d'augmenter le niveau de protéines réceptrices aux estrogènes.

*Matériel*  
*et*  
*Méthodes*

## **II. Matériel et Méthodes**

Les travaux d'étude de notre mémoire ont été réalisés au niveau du laboratoire de pharmacologie et phytochimie de l'Université de Jijel en collaboration avec le service d'Urologie de l'Hôpital de Jijel. Pour répondre aux problématiques, notre travail a été divisé en trois parties :

La première consiste à évaluer le stress oxydatif dans les tissus prostatiques adénomateux par le dosage du MDA, du glutathion et des différentes enzymes antioxydantes (SOD, catalase, GST, GSH-Px) ;

La deuxième comporte l'évaluation de l'apoptose par le dosage de ses effecteurs principaux, les caspases -3 ;

Et la troisième partie consiste à rechercher les pesticides ainsi que d'autres xénoestrogènes susceptibles d'être présents dans ces tissus en mettant en place une méthode spécifique de leur recherche.

Ces trois parties sont complétées par une étude histologique permettant une meilleure caractérisation et détection des différentes altérations pathologiques malformatives de ces tissus tumoraux ainsi que par le dosage du marqueur tumoral spécifique : l'antigène spécifique de la prostate PSA.

### **II.1. Prélèvement des échantillons**

Il s'agit d'une étude clinique portant sur 11 cas de tumeurs prostatiques, dont 10 sont des adénomes prostatiques obtenus à partir d'hommes d'un âge moyen de 73 ans. Le plus jeune parmi eux a 58 ans et le plus âgé 85 ans. Le 11<sup>e</sup> échantillon est une néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade HPIN (High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia) portée par un homme de 84 ans. Ces malades ont été diagnostiqués entre Avril 2010 et Janvier 2011 au niveau du service d'Urologie de l'Hôpital Mohammed Seddik Benyahia de la Wilaya de Jijel.

Les prélèvements sont constitués de pièces opératoires obtenues après adénomectomie transvésicale. Ils ont été divisés en deux parties : la première a été mise dans du formol et est destinée à l'étude histologique et l'autre a été placée directement dans la glace dans des boîtes stériles afin de bien les conserver d'une éventuelle dégradation.

Ces dernières pièces d'un poids moyen de 4 g sont transportées depuis l'hôpital au laboratoire sur glace où elles ont été conservées à une température de -25 °C jusqu'au moment du dosage.

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Dosage sérique**

#### **II.2.1.1. Dosage de l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA)**

Le PSA est une glycoprotéine produite presque exclusivement par la glande prostatique et en moindre quantité par les cellules épithéliales des glandes périurétrales (Monge, 2006).

Le PSA n'étant pas spécifique de cancer mais spécifique d'organe (Monge, 2006). Il a été utilisé initialement comme marqueur de l'évolution de la maladie chez des patients porteurs d'un cancer de la prostate, le PSA a rapidement été utilisé dans le dépistage de cette maladie (Catalona et al., 1998).

Les résultats de ce dosage ont été obtenus à partir de l'hôpital où le dosage du PSA a été effectué par des tests immuno-enzymatiques sur les échantillons de sérum des malades conservés à + 4 °C.

### **II.2.2. Dosages tissulaires**

Ces dosages ont été effectués sur les fragments de tissus qui ont été conservés par congélation.

#### **II.2.2.1. Evaluation de l'état du stress oxydatif**

##### **II.2.2.1.1. Dosage du MDA cytosolique**

Les aldéhydes sont des produits secondaires issus de la décomposition des hydroperoxydes.

La mesure des aldéhydes peut être réalisée de manière globale par réaction avec l'acide thiobarbiturique connue sous le nom de 'substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique' (TBARS) se terminant par la mesure de la coloration du conjugué obtenu (Favier, 1997).

La détermination du malondialdéhyde (MDA) a été proposée il y'a plus d'une cinquantaine d'années et constitue sans doute le marqueur de peroxydation lipidique le plus utilisé (Favier, 1997).

Il est mesuré en utilisant la méthode spectrophotométrique d'Okhawa et al., 1979.

Son principe est le suivant : chaque molécule du malondialdéhyde (MDA) issu de la lipoperoxydation réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (Thiobarbituric Acid TBA). La réaction s'effectue en milieu acide à la température de 95-100 °C et conduit à la formation d'un complexe de couleur rose (MDA-TBA)

Pour se faire 1 g du tissu prostatique est broyé et homogénéisé à l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES, Glass company an ISO-9001 steered firm. New Jersey USA) en présence de 3 volumes de KCl (1,15 M). Par la suite, 0,5 ml de l'homogénat sont prélevés, additionnés de 1 ml d'acide thiobarbiturique 0,67 % et de 0,5 ml de TCA 20 % puis placés dans le bain Marie pour un chauffage de 15 minutes à 100 °C. Ensuite, le mélange est refroidi, additionné de 2 ml du n-butanol puis centrifugé à 3000 rpm pendant 15 minutes (Centrifugeuse 55702, Bioblock scientific, Italy).

Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est récupéré pour la mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre (UV mini 1240, Shimadzu corporation, Japon) à une longueur d'onde de 530 nm.

Les absorbances mesurées à 530 nm ont été converties en équivalents du MDA en nmol/mg de tissu en utilisant une solution de TEP (son hydrolyse donne le MDA).

#### **II.2.2.1.2. Dosage du glutathion (GSH) cytosolique**

La détermination de la quantité du glutathion a été réalisée selon la méthode colorimétrique décrite par Ellman (1959) en utilisant le réactif DTNB (5-5' dithionitrobenzoic acid) qui, en présence du GSH sera coupé et produit l'acide 2-nitro5-thiobenzoïque (TNB), produit de coloration jaune présentant une absorbance à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage consiste à l'homogénéisation de 1 g du tissu prostatique avec 3 volumes d'acide trichloroacétique TCA (5 %) puis à une centrifugation à 2000 tours/min pendant 15 min. Ensuite, 50 µl du surnageant seront prélevés et dilués dans 10 ml du tampon phosphate (0,1 M ; pH 8). 20 µl du DTNB (0,01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution puis incubés pendant 15 min.

La densité optique des échantillons est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5 %).

Le taux du glutathion est déterminé à partir d'une gamme étalon du glutathion mesuré à 412 nm et les concentrations sont exprimées en millimole du glutathion par gramme de tissu (m mole/g de tissu).

#### **II.2.2.1.3. Extraction de la fraction cytosolique**

L'extraction de la fraction cytosolique a été réalisée selon la méthode d'Iqbal et al. (2003). Pour cela, 1 g du tissu prostatique est homogénéisé et broyé dans 3 volumes du tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4) contenant du KCl à 1,17 %.

L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 minutes à une température de 4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 9600 rpm pendant 30 minutes (centrifugeuse Eppendorf minispin, Germany), toujours à 4 °C. Le surnageant ainsi obtenu est récupéré et conservé à congélation pour le dosage des enzymes cytosoliques.

#### **II.2.2.1.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique**

La mesure a été effectuée suivant la méthode décrite par Beauchamps et Fridovich (1971) qui évalue la quantité de la SOD par sa capacité à inhiber le flux d'anions superoxydes générés par le système xanthine-xanthine oxydase. Les radicaux produits par ce système réduisent le nitrobleu de tetrazolium (NBT) en bleu de formazan dont l'absorbance est quantifiée et ceci suite à la photoréduction de l'O<sub>2</sub> et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électrons qui est la méthionine.

Pour réaliser la mesure, 5 µl de la source enzymatique (fraction cytosolique) ont été additionnés à 2 ml du milieu réactionnel (0,1 ml cyanide de sodium 10<sup>-2</sup> M ; 0,1 ml solution de NBT 1,76.10<sup>-4</sup> M ; 1 ml EDTA 66.10<sup>-3</sup> M et 0,1 ml riboflavine 2.10<sup>-6</sup> M). Par la suite 0,1 ml de méthionine (10<sup>-2</sup> M) ont été ajoutés à ce mélange qui est ensuite irradié avec une lampe de 15 Watts pendant 10 min.

La mesure de l'absorbance a été effectuée à une longueur d'onde de 560 nm et les valeurs de la SOD sont exprimées en UI/g de protéines. Le contrôle de la réaction a été préparé dans les mêmes conditions mais en absence de la source enzymatique.

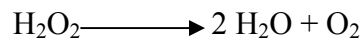
Une unité d'activité de la SOD est définie en tant que la quantité d'enzymes requise pour empêcher la réduction de NBT par 50 %.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'essai}}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100 \%$$

$$\text{SOD UI/g de protéines} = \% \text{ d'inhibition} \times 6,35.$$

#### **II.2.2.1.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique**

L'activité catalase a été mesurée par la méthode de Claiborne (1985) utilisant l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat. La détermination de l'activité a été réalisée spectrophotométriquement en mesurant la disparition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 240 nm selon l'équation suivante :



La réaction s'effectue dans une cuve du spectrophotomètre en quartz à 25 °C en plaçant 1 ml du tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,2), 0,950 ml du peroxyde d'hydrogène (0,019 M) et 0,025 ml de la source enzymatique (fraction cytosolique) puis en lisant la DO à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique est exprimée en UI/g de protéines et est mesurée selon la réaction suivante :

$$\text{UI/g de protéines} = ((2,303/T) \log A_1/A_2) / \text{g protéines.}$$

Sachant que :

A<sub>1</sub> : Absorbance au temps 0 min

A<sub>2</sub> : Absorbance au temps 1 min

T : Intervalle de temps en min

#### **II.2.2.1.6. Evaluation de l'activité de la glutathion-S transférase (GST) cytosolique**

L'activité de la GST a été déterminée spectrophotométriquement selon la méthode décrite par Habig et al. (1974) en utilisant le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) comme substrat électrophile qui se lie au GSH en présence de l'enzyme, conduisant à la formation d'un complexe coloré (GSH, substrat) détecté à 340 nm.

Le mélange réactionnel contient 1700 µl du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) et 100 µl du CDNB (20 mM).



Après incubation du mélange réactionnel à 37 °C pendant 10 min, la réaction est démarrée par l'addition de 100 µl de l'homogénat et de 100 µl du glutathion en tant que substrat.

La variation de la densité optique due à l'apparition du complexe GSH-CDNB est lue chaque minute pendant 5 min à 340 nm.

Le calcul de l'activité de la GST se fait selon la relation suivante :

$$\text{Enzyme (UI/ml)} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min Test} - \Delta A_{340}/\text{min Blanc}) / (Vt) (Fd)}{(9,6) (Ve)}$$

Vt : volume total (en millilitres) de l'essai ;

Fd : facteur de dilution ;

9,6 : coefficient d'extinction millimolaire du glutathion-1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué à 340 nm ;

Ve : volume (en millilitre) de l'enzyme utilisée.

$$\text{UI/mg protéines} = \frac{\text{UI/ml de l'enzyme}}{\text{mg/ml de protéines}}$$

#### **II.2.2.1.7. Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) cytosolique**

Elle est déterminée selon la méthode de Paglia et Valentine (1967) basée sur la réduction des peroxydes organiques en alcools par la GSH-Px. Parallèlement, sur l'oxydation du glutathion GSH en glutathion oxydé (GSSG) qui sera par la suite de nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) en présence du NADPH.

L'activité de la GSH-Px de l'échantillon est déterminée en suivant la décroissance de l'absorption du NADPH à 340 nm.

Dans une cuve contenant 2 ml du tampon phosphate (50 mM ; pH 7), sont ajoutés 50 µl de la solution du GSH, 100 µl de la solution de la glutathion réductase (30 U/ml), 50 µl de NaN<sub>3</sub>, 100 µl de Na<sub>2</sub> EDTA, 100 µl de la solution du NADPH et 50 µl de la fraction cytosolique.

Puis ce volume sera complété jusqu'à obtenir un volume total de 2,9 ml.

La réaction est démarrée par l'addition de 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) puis la décroissance de la DO est suivie chaque minute pendant 3 minutes.

L'activité de la GSH-Px exprimée en µmol/min/g de protéines est égale à :

$$\Delta A / \text{min} \times \frac{1}{6,22} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume utilisé}} \times \frac{1}{F}$$

Où :

Δ A : variation de l'absorbance ;

6,22 : absorption molaire de NADPH (µmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) ;

F : quantité de protéines en mg présente dans la fraction cytosolique.

### **II.2.2.2. Mesure de l'apoptose par l'évaluation de l'activité enzymatique des caspases -3**

La mesure de l'activité de la caspase -3 est basée sur le principe d'hydrolyse du substrat peptidique acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA) par la caspase -3.

La caspase -3 présente dans les lysats cellulaires va cliver son substrat après un motif précis : le DEVD conduisant à la libération de la *p*-nitroaniline (pNA) dont la concentration est déterminée après mesure de la densité optique à 405 nm.

L'essai a été réalisé avec le caspase -3 assay Kit (Sigma Aldrich, Allemagne) selon les étapes suivantes :

D'abord, 10 µl de lysats cellulaires ou de contrôle (+) casp -3 sont placés dans des tubes en verre et auxquels est ajouté 980 µl de tampon d'essai.

Parallèlement, la même réaction est faite mais en ajoutant 10 µl d'un inhibiteur spécifique des caspases.

La réaction est commencée par l'ajout de 10 µl de substrat de ces caspases dans chaque tube.

Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 1 h 30 min à 2 h voire 24 h si l'apparition de la couleur jaune est lente.

La détermination de la DO est ensuite réalisée à l'aide du spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm contre un blanc préparé avec le tampon d'essai et dans les mêmes conditions.

L'activité enzymatique de la caspase -3 exprimée en  $\mu$ mole de pNA libérés par minute et par ml de lysats est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Activité casp -3 en } \mu\text{mole pNA/min/ml} = \frac{\text{DO} \times \text{d}}{\epsilon^{\text{mM}} \times \text{t} \times \text{v}}$$

Où :

$$\epsilon^{\text{mM}} = 10,5$$

v = volume de l'échantillon en ml

d = facteur de dilution

t = temps de réaction en minutes

### **II.2.2.3. Dosage des protéines totales**

Il a été effectué selon la méthode de Lowry et al. (1951). Cette méthode consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible qui se base sur deux réactions colorimétriques :

La première se produit entre les liaisons peptidiques et les ions cuivre  $\text{Cu}^{2+}$ , en présence d'une base et donne une couleur bleu-profond.

Dans la deuxième réaction, un complexe de sels inorganiques (sels de phosphomolybdate et de phosphotungstate) réagit principalement avec les résidus tryptophane, tyrosine, cystéine et histidine des protéines en donnant une intense couleur bleu-vert. La densité optique des échantillons est mesurée à 750 nm.

Pour réaliser ce dosage, nous avons procédé de la façon suivante :

10  $\mu$ l de la fraction cytosolique sont placés dans un tube contenant 990  $\mu$ l de NaCl 0,9 % sur lesquels sont ajoutés 3 ml de la solution de Lowry (La composition de cette solution est reportée dans l'annexe 1).

Après 15 min, nous avons ajouté 150  $\mu$ l de la solution de Folin-Ciocalteu. Les tubes sont laissés à l'obscurité pendant 30 min.

L'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc contenant du tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4) avec du KCl (1,17 %) et préparé dans les mêmes conditions.

### **II.2.3. Etude histologique**

Elle a été effectuée par le docteur Hamel dans son laboratoire d'anatomopathologie sur des biopsies fixées dans du formol. Ce dernier permet d'immobiliser les constituants cellulaires dans un état le plus proche possible de l'état vivant.

Après la fixation, ces prélèvements subissent une déshydratation en les plongeant dans des bains successifs d'alcool à des degrés croissants (Shander Citadel 2000, Thermo scientific, Germany). Ces prélèvements subissent ensuite une imprégnation dans la paraffine par un distributeur automatique de paraffine (Shandon Histocenter 3, Thermo electron corporation, Germany).

Les blocs de paraffine obtenus sont ensuite coupés à l'aide d'un microtome (Leica, RM 2125 RT) en coupes de 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui vont être collées sur des lames en verre et mises à sécher avant d'être déparaffinées au xylène afin d'éliminer la paraffine puis réhydratées dans des bains d'alcool à titre décroissant.

Après réhydratation, les coupes sont colorées dans le but de renforcer le contraste et de rendre plus évident les différents constituants cellulaires et tissulaires.

La coloration utilisée est celle de l'hématoxyline/éosine (HE) (Shandon Varistain 24-4, Thermo electron corporation, Germany) qui associe un colorant nucléaire (hématoxyline) et un colorant cytoplasmique (éosine).

La lecture des lames par microscope optique a été effectuée après montage des lames sous lamelles.

### **II.2.4. Recherche des xénoestrogènes dans le tissu prostatique**

La liste des xénoestrogènes ne cesse de croître. Il n'est pas possible donc de rechercher en même temps toutes les substances considérées comme xénoestrogènes.

Notre étude a été alors limitée à la recherche des pesticides, des dérivés phénoliques et des phtalates qui représentent en quelque sorte les polluants xénoestrogènes les plus répandus dans la wilaya de Jijel. En effet, Jijel est une ville côtière située en zone méditerranéenne. Ses activités économiques sont largement dépendantes de l'agriculture avec 30 % de sa superficie totale occupés par des terres arables. Et du fait des conditions climatiques qui y règnent, le développement de divers ravageurs comme les parasites, les insectes, les champignons et les mauvaises herbes sur les différentes cultures est favorisé, faisant appel à de grandes quantités de pesticides afin de réduire ou prévenir les dégâts causés par ces prédateurs. Parmi ces

pesticides, les herbicides représentent la plus grande quantité des pesticides utilisés. Le reste regroupe les fongicides et les insecticides.

Les dérivés phénoliques et les phtalates sont également des polluants omniprésents, retrouvés dans les eaux, les sédiments, le sol mais aussi dans l'air. Ils sont issus principalement des déchets domestiques et des effluents des usines.

#### **II.2.4.1. Recherche des xénoestrogènes dans le tissu humain**

Les pesticides et divers autres micropolluants xénoestrogènes ont été plus d'une cinquantaine d'années mis en évidence dans tous les compartiments environnementaux. Aussi bien dans les eaux de rivières, les nappes phréatiques, l'air, les eaux de pluie mais aussi dans les fruits, les légumes, les céréales et les produits d'origine animale.

D'un point de vue analytique, passer de l'analyse de matrices environnementales caractérisées par des niveaux relativement élevés à l'analyse de matrices humaines à très faible contenu en composés toxiques n'est pas chose aisée (Focant, 2006). De nombreuses études précédentes ont déjà porté sur le dosage de ces xénoestrogènes dans les différents compartiments du corps humains tels que le sérum (Linos et al., 1998), le liquide amniotique (Luzardo et al., 2009), les urines (Wittke et al., 2001), ...où des concentrations non négligeables ont été enregistrées.

L'intérêt se rapporte aujourd'hui sur leur recherche et dosage dans les tissus humains. En effet, des études en ce sens ont été faites (Saito et al., 2004 ; Medina et al., 2009 ; Zhao et al., 2009) mettant en place différentes techniques d'extraction et de dosage.

#### **II.2.4.2. L'extraction des xénoestrogènes**

Malgré la mise en œuvre de techniques de séparation performantes associées à des modes de détection de plus en plus sensibles et spécifiques, l'efficacité de la procédure analytique est encore limitée par l'étape de préparation de l'échantillon. Il s'agit d'une étape importante puisque l'on estime que 30 % des erreurs commises au cours de l'analyse globale lui sont imputables et que l'analyste lui consacre 60 % de son temps (Pichon, 2006).

Pour nos échantillons, nous avons effectué l'extraction selon la méthode décrite par Pang et al., 2006 en utilisant un mélange de solvants composé du cyclohexane et d'acétate d'éthyle afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction.

10 g de tissu sont mis dans un tube contenant 20 g de sulfate de sodium, sur lesquels 35 ml du mélange cyclohexane + acétate d'éthyle (1+1) sont ajoutés.

Ce mélange est homogénéisé puis centrifugé à 1400 tours/min pendant 3 minutes.

Après centrifugation, le surnageant est récupéré puis filtré à travers un entonnoir contenant de la laine de verre et environ 15 g de sulfate de sodium.

Les échantillons filtrés sont ensuite homogénéisés dans 35 ml du mélange cyclohexane + acétate d'éthyle (1+1) puis centrifugés et filtrés.

Le filtrat obtenu est réduit à environ 1 ml par évaporation dans un évaporateur rotatif (rotavapor) à 40 °C.

Ce protocole d'extraction utilisé à l'origine pour l'extraction des pesticides, a été également adopté pour l'extraction des dérivés phénoliques et des phtalates du fait qu'ils possèdent des propriétés physicochimiques proches de celles des pesticides.

#### **II.2.4.3. Analyse des échantillons par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)**

Les pesticides, les phénols et les phtalates constituent un ensemble complexe de molécules aux propriétés physicochimiques spécifiques. Ainsi, une méthode sensible est nécessaire pour la détection du plus grand nombre de ces composés.

En pratique, de par leur caractère semi-volatil de ces composés, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonnes capillaires est utilisée pour la séparation avant la mesure. En effet, la CPG est la technique la plus utilisée pour l'analyse de ces composés, toutes matrices confondues (van Zoonen, 1996 ; van der Hoff et van Zoonen, 1999).

##### **II.2.4.3.1. Principe de la chromatographie en phase gazeuse**

Son principe de séparation repose sur le partage des composés à analyser entre une phase mobile (gaz) et une phase stationnaire (solide ou liquide greffé). Cette séparation est principalement fonction de leurs volatilités respectives (McNair et Miller, 1998 ; Focant, 2006).

#### **II.2.4.3.2. Le détecteur**

Les méthodes analytiques mises en œuvre pour réaliser les dosages dans les matrices humaines doivent autoriser des seuils de détection de l'ordre du picogramme ( $10^{-12}$  g) par gramme de matrice (Focant, 2006). La CPG peut être couplée à divers types de détecteurs. Les plus importants sont (Wittkowski et Matissek, 1990) :

- Le Détecteur à capture d'électrons (ECD : Electron Capture Detector) ;
- Le Détecteur à Nitrogène-Phosphore (NPD : Nitrogen Phosphorus Detector) ;
- Le Détecteur à Ionisation de Flamme (FID : Flame Ionization Detector) ;
- Le Détecteur à Spectrométrie de Masse (MSD : Mass Spectrometry Detector).

Afin d'assurer une spécificité élevée, la spectrométrie de masse (MS) est utilisée comme moyen de détection des pics chromatographiques (Focant, 2006). Cette technique a une place privilégiée dans le domaine de l'analyse grâce à sa faible consommation d'échantillon (de l'ordre de la femtomole) et donc sa sensibilité, à sa grande résolution et à la relative rapidité des analyses. Elle permet la détermination de la masse moléculaire d'un composé recherché.

#### **II.2.4.3.3. Appareillage et conditions opératoires**

Nous avons utilisé un chromatographe Shimadzu QP 2010 équipé d'un injecteur de type split/splitless.

La colonne utilisée est une colonne capillaire de type SE 30 de 25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et d'une épaisseur du film de 0,25  $\mu\text{m}$ .

Le spectromètre de masse est constitué d'une source à impact électronique et d'un quadripôle analyseur.

Les conditions opératoires utilisées sont (Pang et al., 2006) :

- Gaz vecteur : hélium avec un débit de 1,2 ml/min ;
- Volume injecté : 1  $\mu\text{l}$  ;
- Mode d'injection : splitless pendant 1,5 min ;
- Energie d'ionisation en impact électronique : 70 eV ;
- Température de l'injecteur : 290 °C ;
- Programme de température :
  - Température initiale : 40 °C pendant 1 min ;

- Programme 1 : 30 °C/min jusqu'à 130 °C ;
- Programme 2 : 5 °C/min jusqu'à 250 °C ;
- Programme 3 : 10 °C/min jusqu'à 300 °C ;
- Température finale : 300 °C pendant 5 min.

### **II.3. Analyse statistique des résultats**

Les résultats numériques et graphiques sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes du premier groupe d'adénomes prostatiques comportant les tumeurs à plus faible poids avec les autres groupes d'adénomes prostatiques. Le test statistique utilisé est le test -t de Student :

$P > 0.05$  : différence non significative (ns).

$P < 0.05$  : différence significative (\*).

$P < 0.01$  : différence très significative (\*\*).

$P < 0.001$  : différence hautement significative (\*\*\*) .



*Résultats*  
*et*  
*Discussion*

### **III. Résultats et Discussion**

Comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie Matériel et Méthodes, notre travail a été réalisé sur 10 adénomes prostatiques et une néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade (HPIN), obtenus à partir de malades qui ont été hospitalisés au niveau de l'hôpital Mohamed Seddik Benyahia de la wilaya de Jijel.

Notre étude comporte principalement une évaluation de l'état du stress oxydatif dans ces tumeurs prostatiques ainsi qu'une évaluation générale de l'apoptose et un dosage des xénoestrogènes susceptibles d'y être présents.

L'expression de nos résultats est effectuée en comparant d'abord les paramètres étudiés dans les différents adénomes en fonction de leurs poids. En effet, chez ces malades ayant développé des adénomes prostatiques, le poids de ces tumeurs est différent allant de 35 g à 114 g, ainsi, les groupes de tumeurs prostatiques adénomateuses ont été classés comme suit :

**Groupe 1** : considéré comme témoin, regroupe 2 adénomes pesant 35 g et 37 g.

**Groupe 2** : contient 3 échantillons d'adénomes prostatiques de 45 g, 49 g et 55 g.

**Groupe 3** : regroupe également 3 adénomes de poids de 72 g, 72 g et 75 g.

**Groupe 4** : avec 2 adénomes, un de 104 g et l'autre de 114 g.

La deuxième partie de l'étude concerne la comparaison des résultats des différents dosages effectués obtenus dans les adénomes avec ceux obtenus avec la néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade (HPIN) afin de mettre en évidence l'existence ou non de modifications des paramètres étudiés en fonction de la nature de la tumeur prostatique.

#### **III.1. Analyse des taux du PSA**

La prostate est une glande indispensable au fonctionnement du système reproducteur masculin. Son hypertrophie se produit chez la plupart des hommes de plus de 50 ans, c'est la tumeur bénigne la plus commune dans cet organe communément appelée adénome de la prostate (Kwiatek et al., 2007). L'adénome de la prostate se produit presque exclusivement dans la zone transitionnelle de la prostate et jusqu'à 80 % des hommes âgés de 70 à 80 ans

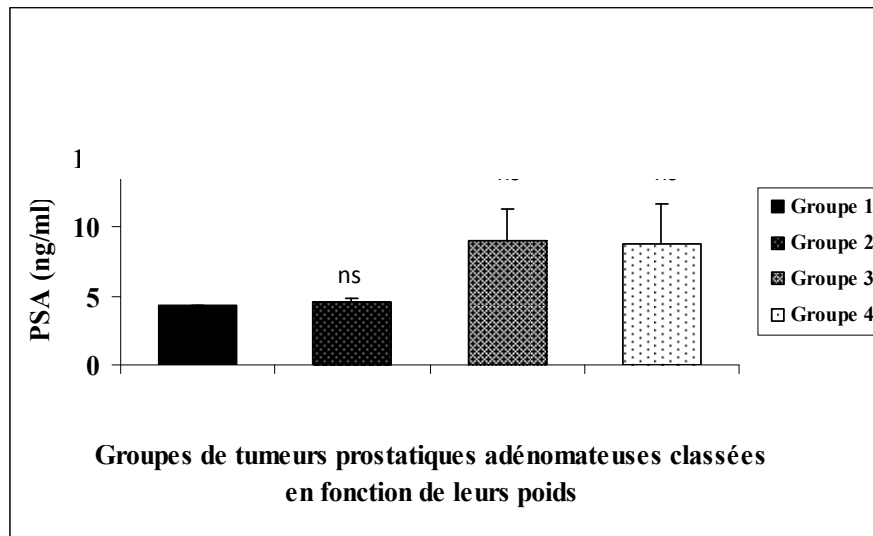
possèdent histologiquement un adénome prostatique (Ziada et al., 1999).

La lésion précurseur, néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade (HPIN) est considérée comme précurseur du cancer de la prostate et cela sur la base de diverses preuves pathologiques (Qian et al., 1997), épidémiologiques (Saker et al., 1994) et cytogéniques (Beheshti et al., 2002). Par exemple, l'analyse de HPIN et de cancer de la prostate coexistants a montré la présence d'anomalies chromosomiques similaires tel que la perte du chromosome 8p et le gain des chromosomes 8q, 7, 10q et Xq (Nupponen et Visakorpi, 2000 ; Hughes et al., 2006). En effet, une étude récente a suggéré que la majorité des altérations de l'expression qui se produisent au cours de la progression en cancer de la prostate, se produisent dans la forme de transition de l'état bénin en HPIN plutôt qu'au cours de la transformation HPIN en cancer de la prostate (Tomlins et al., 2007).

Sur le plan clinique, ces pathologies ont les mêmes symptômes associant généralement des complications urologiques, nécessitant le recours à un diagnostic efficace permettant une bonne précision et détermination de la maladie.

Mise à part le toucher rectal (TR) qui permet la palpation de la face postérieure de la prostate (Høerni et al., 2001), le dépistage comporte aussi les biopsies prostatiques et le dosage de l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Ce dernier est le premier marqueur tumoral adopté par la FDA pour le dépistage précoce du cancer de la prostate. Les concentrations plasmatiques du PSA atteignent également des niveaux supérieurs à la normal dans l'adénome prostatique (Yuan et al., 1992).

Le dosage de ce marqueur tumoral dans les sérums des malades atteints d'adénomes prostatiques que nous avons étudiés a permis l'obtention des résultats présentés dans la figure 7.



**Figure 7.** Variations sériques des taux du PSA exprimés en ng/ml dans les différents groupes d'adénomes prostatiques classés en fonction de leurs poids.

**Groupe 1 :** témoin, 2 adénomes (35 g et 37 g), **groupe 2 :** 3 adénomes (45 g, 49 g et 55 g), **groupe 3 :** 3 adénomes (72 g, 72 g et 75 g), **groupe 4 :** 2 adénomes (104 g et 114 g). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

L'analyse des résultats présentés dans la figure 07 montre la présence d'une différence dans la concentration de ce marqueur tumoral entre les différents groupes d'adénomes prostatiques. Cette différence est non significative ( $p > 0,05$ ) dans le groupe 2 atteignant  $4,55 \pm 0,318$  ng/ml par rapport au premier groupe dans lequel nous avons enregistré la plus faible valeur moyenne du PSA ( $4,32 \pm 0,021$  ng/ml).

Les troisième et quatrième groupes marquent respectivement des valeurs moyennes de  $9,035 \pm 2,283$  ng/ml et  $8,82 \pm 2,828$  ng/ml, toutes les deux supérieures à celle du premier groupe.

Dans tous ces groupes étudiés, nous avons remarqué que le taux du PSA est supérieur à la valeur seuil fixée à 4 ng/ml.

Parmi les 11 échantillons de tumeurs prostatiques soumis à notre étude, nous avons un qui représente une HPIN (Néoplasie Intraépithéliale Prostatique de Haut grade) qui constitue le stade initial de l'adénocarcinome prostatique.

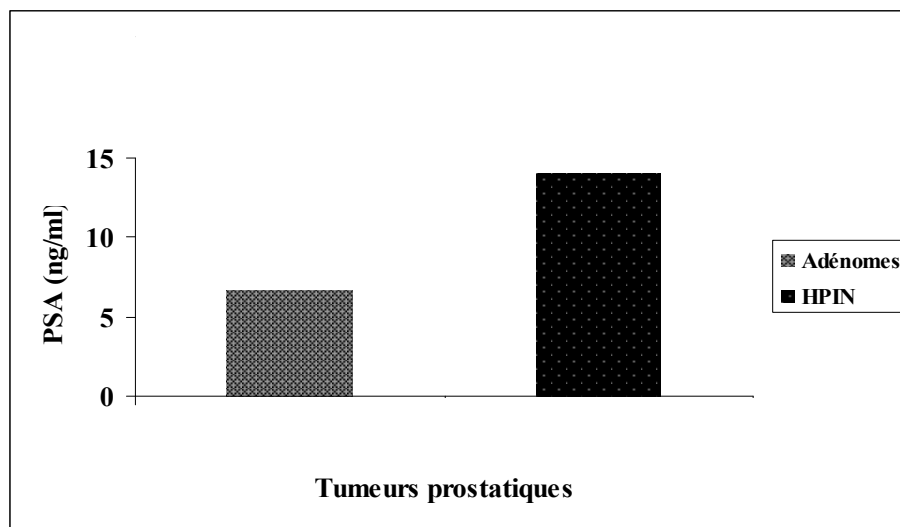
Afin d'étudier une éventuelle influence du type des tumeurs prostatiques (bénignes et malignes) sur les variations sériques du taux de PSA, une deuxième comparaison a été faite et cela en adoptant de nouveaux groupes de malades classés en fonction du type de leurs tumeurs prostatiques.

Le premier groupe comporte les adénomes prostatiques (tumeurs prostatiques bénignes) en nombre de 10.

Le deuxième groupe contient seulement un seul échantillon qui est la HPIN (tumeur prostatique maligne).

Malheureusement, nous n'avons pas l'effectif suffisant pour faire une étude statistique permettant une bonne comparaison des résultats par le calcul des écart-types, étant donné que le deuxième groupe ne contient qu'un seul échantillon qui est une HPIN. L'étude a été donc faite en se basant sur la comparaison de leurs moyennes seulement.

Les résultats du dosage du PSA dans le sérum de malades atteints de HPIN et d'adénomes prostatiques sont représentés dans la figure 8.



**Figure 8.** Variations du taux du PSA sérique en fonction de la nature des tumeurs prostatiques.

Le dosage du PSA chez le malade atteint de HPIN a révélé la présence d'un taux élevé de ce marqueur tumoral avec une valeur de 14,06 ng/ml. Ce taux de PSA est très élevé par rapport au taux moyen du PSA de tous les adénomes (6,74 ng/ml) et représente plus que son double.

Ce taux a dépassé même celui le plus élevé des malades atteints d'adénomes qui a été enregistré dans le groupe 3 avec une valeur moyenne de 9,035 ng/ml. Ces résultats confirment

donc vraiment que le PSA est un marqueur tumoral spécifique dont les taux augmentent au cours du processus de la cancérogénèse.

La détérioration de certains mécanismes cellulaires au niveau de la prostate est suggérée être à l'origine de l'élévation des taux sériques du PSA dans l'adénome et le carcinome prostatiques (Cetinkaya et al., 1998). Le PSA libéré dans le milieu extracellulaire comme conséquence de cette détérioration, passe dans la circulation générale à travers des microcirculations (Cetinkaya et al., 1998). Bien que cette libération du PSA et son passage dans la circulation générale soient des mécanismes assez bien compris, une augmentation de la densité du réseau des vaisseaux sanguins à proximité de la couche basale de la prostate et des acini peut être l'un des facteurs qui jouent un rôle facilitant le passage du PSA dans la circulation générale (Cetinkaya et al., 1998).

Chez un homme sain, la concentration sérique du PSA  $\leq 4$  ng/ml et est un million de fois moins inférieure à sa concentration dans le liquide séminal (0,5 – 5 g/l). Dans notre étude, le dosage du PSA dans les divers groupes d'adénomes prostatiques classés en fonction de leur poids n'a révélé la présence d'aucune différence significative dans les taux du PSA des divers groupes. Par contre, Stephan et al. (2007) indiquent que les taux sériques du PSA sont influencés par le volume de la prostate et y sont proportionnels.

Les différences non significatives enregistrées dans les taux du PSA peuvent être expliquées par la présence de variations intragroupes. En effet, les distributions des taux du PSA des malades dans un même groupe ne sont pas homogènes. Dans le groupe 3 par exemple, la plus faible valeur de PSA sérique était de 7,42 ng/ml, alors que la valeur la plus élevée était de 10,65 ng/ml.

Le taux sérique du PSA est influencé par certaines situations ou certains facteurs qui peuvent faire varier ses valeurs (Janssen et Schulman, 1994), parmi lesquels sont cités les manipulations prostatiques (biopsies, massage de la prostate) (Yuan et al., 1992), la rétention aigue des urines, l'âge du patient et la variabilité individuelle (pouvant atteindre 30% lors de deux dosages successifs) (Soletormos et al., 2007). D'autre coté, notre dosage du taux du PSA dans le sérum du malade atteint de la HPIN a donné une valeur importante de 14,04 ng/ml par rapport aux valeurs obtenues dans les adénomes. Ce résultat peut être expliqué par le fait que dans la HPIN, les niveaux des détériorations cellulaires sont plus élevés qu'à ceux des

adénomes permettant une libération de grandes quantités de PSA et ainsi leur passage dans la circulation générale.

## **III.2. Variation de l'état oxydatif dans l'adénome prostatique**

### **III.2.1. Variation des taux du MDA dans les tumeurs prostatiques**

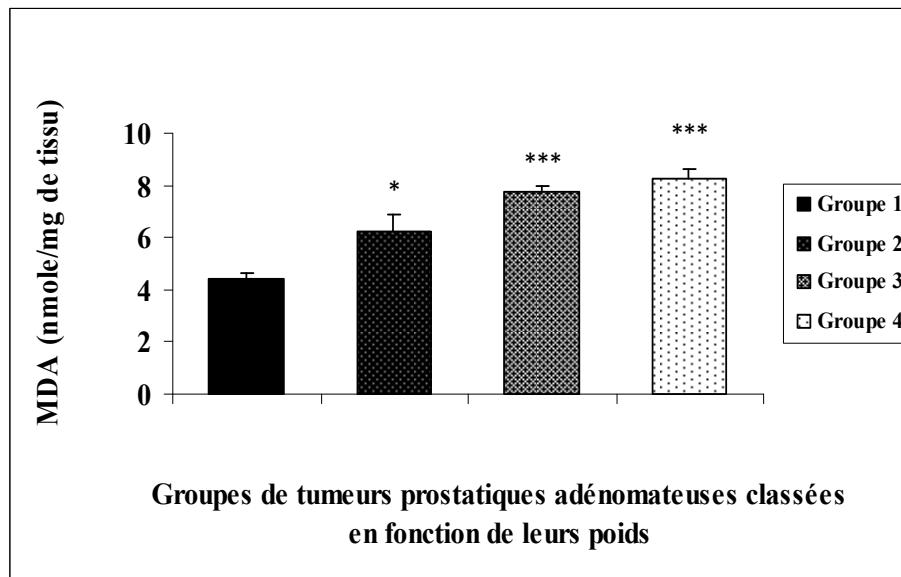
Au sein du métabolisme cellulaire, les réactions d'oxydation sont aussi primordiales que fréquentes. Au cours de la respiration cellulaire, des substrats comme le glucose et les acides aminés sont oxydés et cèdent leurs électrons à la molécule d'oxygène qui sera réduite en eau. La réduction du dioxygène met en jeu une chaîne de transfert des électrons au niveau de la membrane mitochondriale. Cependant, un transfert partiel ou incomplet de ces électrons entraîne la production de radicaux libres oxygénés.

Le stress oxydant, conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène, est normalement contrôlé par des systèmes de défense antioxydante endogènes. Lorsque ceux-ci s'avèrent insuffisants, il en résulte des lésions cellulaires impliquées dans le vieillissement mais également dans certains processus pathologiques.

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003). Cette dernière appelée peroxydation lipidique, fournit ainsi une grande variété de produits parmi lesquels figurent les aldéhydes et plus précisément le MDA (Marnett, 1999).

Pour l'étude de la peroxydation lipidique dans les tumeurs prostatiques adénomateuses, nous avons réalisé un dosage du MDA cytosolique dans ces tissus par la méthode d'Okhawa et al. (1979).

Les taux du MDA cytosolique enregistrés dans les adénomes prostatiques des malades regroupés en fonction de leurs poids sont représentés dans la figure 9.



**Figure 9.** Variation des taux du MDA cytosolique dans les adénomes prostatiques.

**Groupe 1** : témoin, 2 adénomes (35 g et 37 g), **groupe 2** : 3 adénomes (45 g, 49 g et 55 g), **groupe 3** : 3 adénomes (72 g, 72 g et 75 g), **groupe 4** : 2 adénomes (104 g et 114 g). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

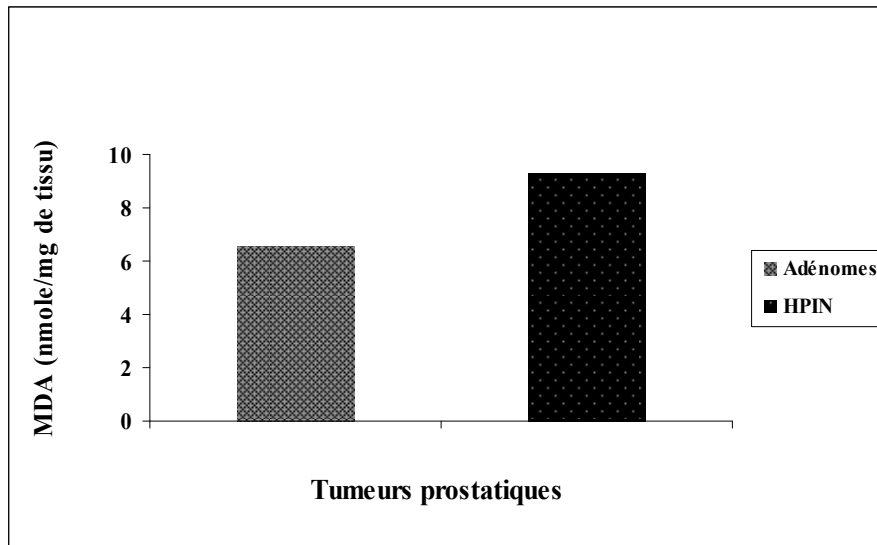
Au niveau des adénomes prostatiques, la quantité du MDA exprimée en nmole/mg de tissu semble varier en fonction du poids de la tumeur et en est proportionnelle. En effet, dans le premier groupe contenant les tumeurs à poids le plus faible, le taux du MDA est également le plus faible avec une valeur de  $4,385 \pm 0,247$  nmole/mg de tissu. Une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la concentration du MDA a été observée dans le deuxième groupe ( $6,21 \pm 0,701$  nmole/mg de tissu).

Dans les groupes 3 et 4, la concentration du MDA cytosolique a augmenté d'une façon hautement significative ( $p < 0,001$ ) avec une valeur de  $7,723 \pm 0,253$  nmole/mg de tissu enregistrée dans le troisième groupe et de  $8,28 \pm 0,375$  nmole/mg de tissu dans le quatrième groupe.

Le développement des adénomes prostatiques est donc associé avec une forte peroxydation lipidique due à une production excessive des radicaux libres et traduite par des taux élevés en MDA dans ces cellules.



Nous avons également effectué un dosage du MDA dans la HPIN. Les taux du MDA obtenus dans la HPIN comparés à ceux des adénomes prostatiques sont représentés dans la figure 10.



**Figure 10.** Variations des taux du MDA cytosolique exprimé en nmole/mg de protéines dans les adénomes prostatiques et la HPIN.

Par comparaison de la moyenne du taux du MDA de tous les adénomes groupés ensemble avec la valeur obtenue dans la HPIN, nous constatons une forte production du MDA dans cette dernière (9,235 nmole/mg de tissu) reflétant ainsi la présence d'une forte peroxydation lipidique dans ces cellules, alors que le taux moyen du MDA produit dans les adénomes ne dépasse pas 6,6 nmole/mg de tissu.

Contrairement aux radicaux libres, les aldéhydes sont relativement stables et par conséquent, capables de diffuser dans les cellules et attaquer les cibles loin de leur site de production (Meagher et al., 2000 ; Dotan et al., 2004). Le MDA lui-même par sa grande cytotoxicité et action inhibitrice sur les enzymes antioxydantes, agit comme un promoteur de cancer et agent cocarcinogène (Samir et El Kholy, 1999).

Biri et al. (1999), en étudiant la peroxydation lipidique dans les tissus prostatiques cancéreux, ont constaté l'existence d'une forte augmentation des taux du MDA dans ces tissus.

En procédant au dosage du MDA dans les sérums de malades atteints d'adénomes prostatiques et dans ceux des malades avec cancer de la prostate, Almushatat et al. (2006) ont

arrivé à conclure quant à l'augmentation des taux du MDA dans ces derniers par rapport aux premiers. Ce résultat est en accord avec celui d'Ozmen et al. (2006) qui ont également trouvé des concentrations très élevées en MDA dosé dans le sérum de patients atteints du cancer prostatique.

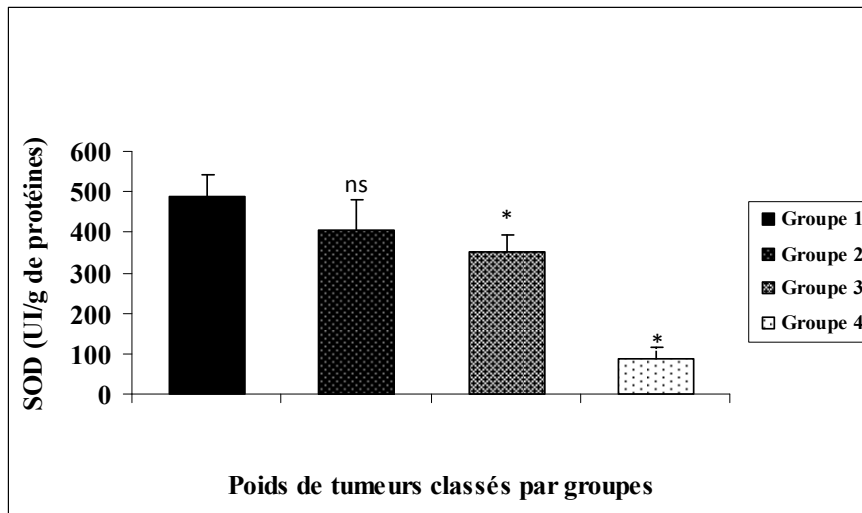
### **III.2.2. Etude de l'activité antioxydante dans les tumeurs prostatiques**

#### **III.2.2.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique**

La SOD et la catalase sont les principales enzymes impliquées dans le mécanisme de défense antioxydante puisqu'elles sont impliquées dans l'élimination directe des ROS. La SOD joue un rôle de dismutation du radical superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  en le convertissant en  $H_2O_2$  et conduit de ce fait à la réduction des effets toxiques dûs à ce radical ou à d'autres radicaux dérivés des réactions secondaires (Pasupathi et al., 2009).

Les résultats de ce dosage effectué par la méthode de Beauchamps et Fridovich (1971) dans les différents groupes d'adénomes prostatiques sont présentés dans la figure 11.

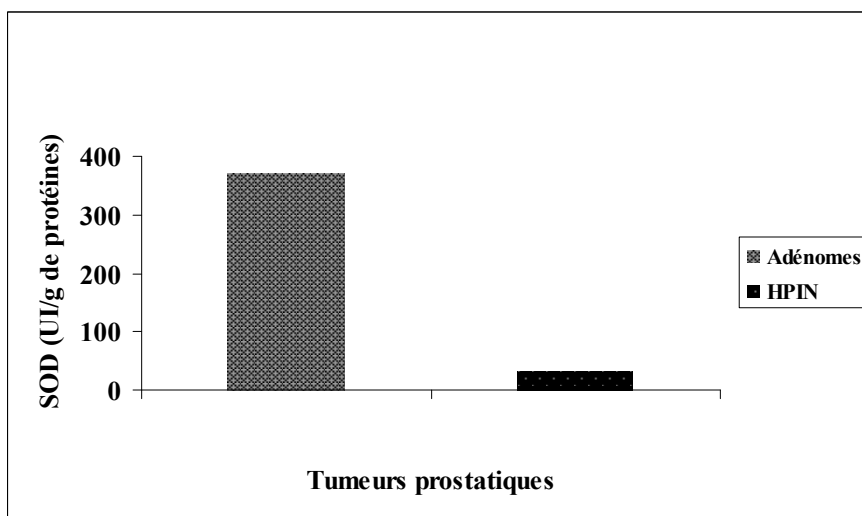
Comparées au premier groupe, les activités enzymatiques de la SOD cytosolique des deuxième, troisième et quatrième groupes montrent un comportement différent qui varie d'un groupe à l'autre. Ainsi, dans le groupe 2, comportant 3 tumeurs adénomateuses prostatiques de 45 g, 49 g et 54 g, nous avons pu marquer une diminution qui n'est pas significative ( $p > 0,05$ ) dans la SOD cytosolique ( $404,64 \pm 37,991$  UI/g de protéines). Par contre, cette diminution de l'activité de la SOD est significative dans le groupe 3 atteignant une valeur de  $350,38 \pm 41,585$  UI/g de protéines. Cette diminution est aussi significative ( $p < 0,05$ ) dans le groupe 4 regroupant les tumeurs prostatiques de plus grandes tailles (114 g, 132 g) avec une valeur de  $86,10 \pm 28,056$  UI/g de protéines.



**Figure 11.** Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique dans les différents groupes d'adénomes prostatiques.

**Groupe 1 :** témoin, 2 adénomes (35 g et 37 g), **groupe 2 :** 3 adénomes (45 g, 49 g et 55 g), **groupe 3 :** 3 adénomes (72 g, 72 g et 75 g), **groupe 4 :** 2 adénomes (104 g et 114 g). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

Les résultats obtenus après dosage de la SOD dans les tissus prostatiques néoplasiques comparés avec ceux adénomateux sont rapportés dans la figure 12.



**Figure 12.** Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique exprimée en UI/g de protéines en fonction de la nature des tumeurs prostatiques.

L'examen des résultats obtenus, nous permet de constater la présence d'une forte diminution de l'activité catalytique de la SOD cytosolique au niveau des cellules néoplasiques qui a atteint une valeur de 32,28 UI/g de protéines. Alors que celle enregistrée dans les cellules adénomateuses des 10 échantillons étudiés a donné une valeur moyenne de 370,06 UI/g de protéines.

Ce résultat est confirmé par celui de Bostwik et al. (2000) qui ont rapporté la présence de faibles concentrations en SOD et en catalase dans les tissus atteints d'un cancer de la prostate. Cette différence dans l'activité de la SOD est due au fait que lorsque les niveaux de l'anion superoxyde présent dans ces cellules sont modérés, l'organisme réagit en surexprimant la SOD (Pincemail et al., 2002) et que lorsque le stress perdure et produit de façon massive des ROS, ce qui est probablement le cas dans ces tissus adénomateux, la SOD sera en partie détruite.

Dans l'adénome prostatique, la diminution de l'activité enzymatique de la SOD et de la catalase est corrélée avec l'augmentation de la quantité des bases d'ADN modifiées (Jung et al., 1997).

Dans la HPIN, l'activité enzymatique de la SOD est encore plus faible, chose qui peut être expliquée par la présence d'une forte inhibition de l'activité de cette enzyme probablement due à la mutation de certains gènes impliqués dans le contrôle de l'expression de cette enzyme.

### **III.2.2.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique**

La catalase, présente pratiquement dans toutes les cellules de mammifères, est responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  qui est l'espèce réactive de l'oxygène la plus abondante dans la cellule.

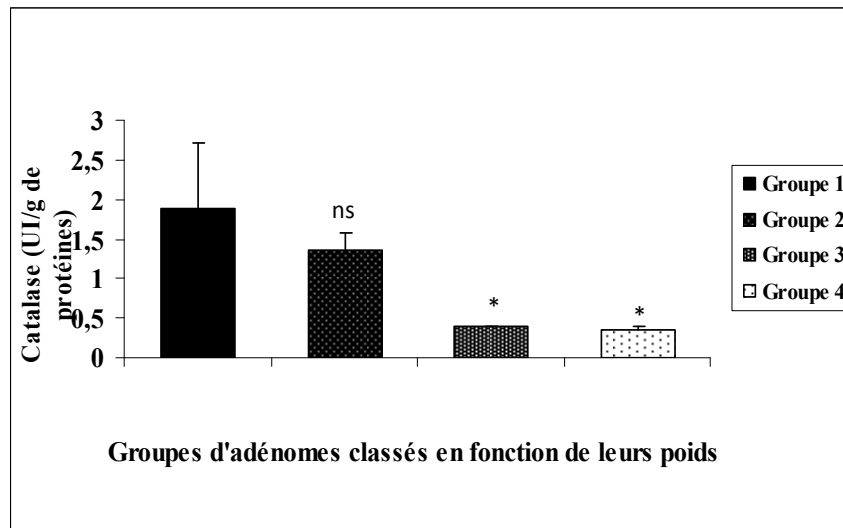
Les variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique dans les différents groupes d'adénomes prostatiques sont illustrées dans la figure 13.

Comme pour la SOD, l'activité enzymatique de la catalase cytosolique diminue de façon inversement proportionnelle par rapport au poids des adénomes prostatiques.

En fait, les tumeurs adénomateuses prostatiques ayant le plus grand poids (groupe 4), possèdent les plus faibles activités de la catalase cytosolique avec une valeur moyenne de  $0,36 \pm 0,029$  UI/g de protéines. Dans le groupe 3, nous avons également enregistré une faible

activité enzymatique en catalase cytosolique ( $0,385 \pm 0,020$  UI/g de protéines) par rapport au premier groupe.

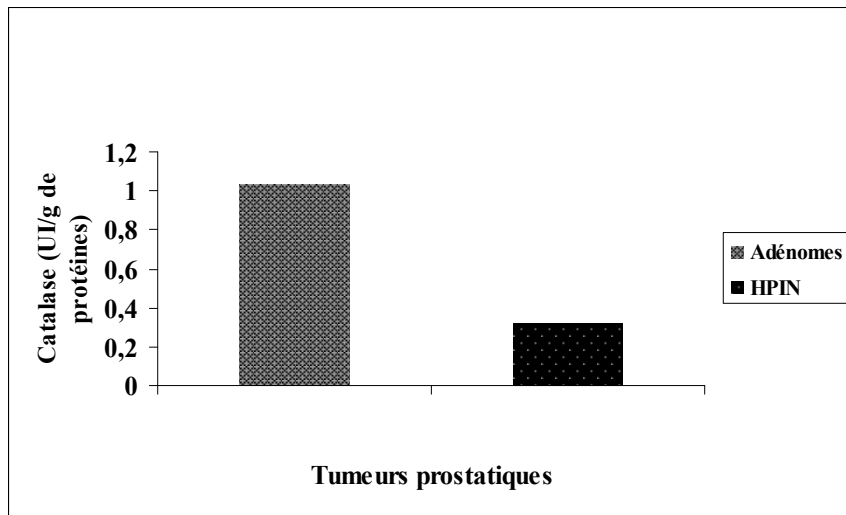
Le groupe 2 a également montré une diminution mais non significative ( $p > 0,05$ ) de l'activité catalase cytosolique ( $1,358 \pm 0,226$  UI/g de protéines) en comparaison avec le premier groupe d'adénomes prostatiques. La valeur la plus importante est celle du premier groupe et est égale à  $1,8865 \pm 0,828$  UI/g de protéines et correspond au groupe aux poids des adénomes prostatiques les plus faibles.



**Figure 13.** Variation des activités enzymatiques de la catalase cytosolique dans les adénomes prostatiques.

**Groupe 1 :** témoin, 2 adénomes (35 g et 37 g), **groupe 2 :** 3 adénomes (45 g, 49 g et 55 g), **groupe 3 :** 3 adénomes (72 g, 72 g et 75 g), **groupe 4 :** 2 adénomes (104 g et 114 g). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0,05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0,05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0,01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0,001$ ).

L'activité enzymatique de la catalase cytosolique diminue aussi dans les cellules néoplasiques où une valeur de  $0,318$  UI/g de protéines a été enregistrée, et c'est ce qui est montré dans la figure 14.



**Figure 14.** Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique dans la HPIN et l'adénome prostatique.

La diminution de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique peut résulter du fait que dans ces tissus étudiés il n'y a pas assez de peroxyde d'hydrogène transformé par la SOD vu l'inhibition de l'activité de cette dernière, ce qui n'a pas nécessité le recours à de grandes concentrations en catalase pour les éliminer. Cependant, le  $H_2O_2$  n'est pas formé seulement à partir de la dismutation de l'anion superoxyde car il peut aussi être produit par différentes oxydases incluant les aminoacides oxydases et l'urate oxydase (Gardès-Albert et al., 2003). Cela conduit à penser à l'existence d'une inhibition de l'activité de la catalase cytosolique. En effet, une étude déjà faite par Łukaszewicz-Hussain (2001) a montré que cette enzyme peut être inhibée en présence de l'anion superoxyde.

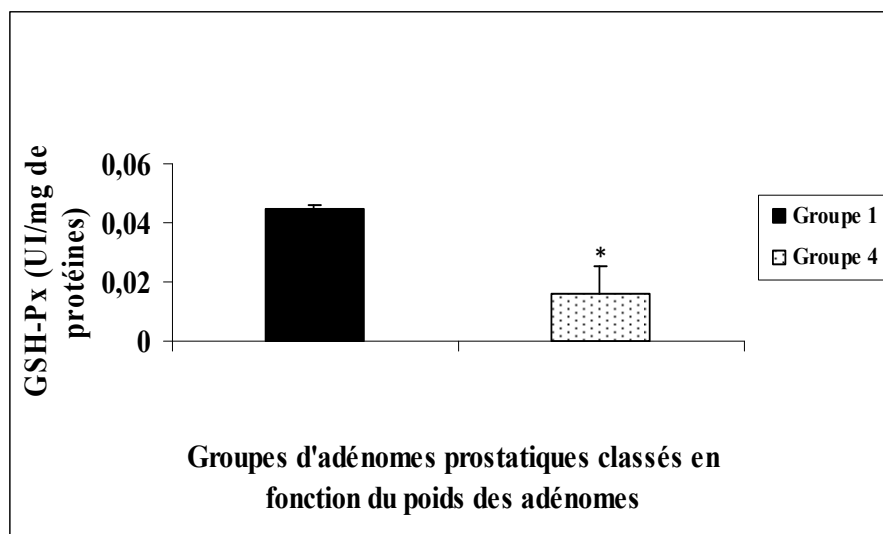
D'une manière générale, la diminution des niveaux de la catalase peut entraîner une accumulation de  $H_2O_2$  ainsi que d'autres espèces toxiques dans les tissus, et qui peut à son tour conduire à une augmentation des dommages de l'ADN. Mais, la diminution de l'activité de la catalase peut surtout endommager la glande prostatique, car les tissus prostatiques sont très riches en polyamines dont l'oxydation par les amines oxydases génère le  $H_2O_2$  parmi d'autres produits libérés (Olinski et al., 1995).

### III.2.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase cytosolique

En plus de la catalase, une autre enzyme peut également détoxifier le  $H_2O_2$ , c'est la glutathion peroxydase (GSH-Px). Cette enzyme est présente dans le cytoplasme de toutes les cellules et

joue un rôle dans la détoxification du  $H_2O_2$  quand il est présent en faible concentration. L'évaluation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) cytosolique a été réalisée par la méthode colorimétrique décrite par Paglia et Valentine (1967) en mesurant la décroissance de l'absorption du NADPH à 340 nm.

Les résultats de l'évaluation de l'activité de cette enzyme exprimés en UI/mg de protéines et classés en fonction du poids des adénomes prostatiques sont illustrés dans la figure 15.



**Figure 15.** Variation de l'activité enzymatique de la GSH-Px cytosolique dans les adénomes prostatiques.

**Groupe 1 :** témoin, 2 adénomes (35 g et 37 g), **groupe 4 :** 2 adénomes (104 g et 114 g). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

En raison de certaines contraintes pratiques (manque de la glutathion réductase), l'évaluation de l'activité de la GSH-Px n'a été effectuée que sur les échantillons du premier et du quatrième groupes ainsi que dans l'échantillon présentant une HPIN et l'analyse des résultats de cette évaluation dans les différents adénomes prostatiques a montré que cette activité diminue avec le développement de la masse adénomateuse prostatique (GSH-Px =  $0,045 \pm 0,0007$  UI/mg de protéines dans le premier groupe contre  $0,0159 \pm 0,0092$  UI/mg de protéines dans le quatrième).

Une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase cytosolique a été également enregistrée dans les tissus néoplasiques. Le tableau 2 regroupe les résultats de l'évaluation de l'activité de la GSH-Px dans la HPIN comparés à ceux dans les adénomes prostatiques. Nous constatons que la HPIN possède une activité enzymatique en GSH-Px cytosolique de 0,016 UI/mg de protéines, inférieure à celle enregistrée dans les adénomes estimée à 0,03045 UI/mg de protéines en moyenne.

**Tableau 2.** Comparaison des concentrations cytosoliques de la GSH-Px des adénomes prostatiques et de la HPIN.

<b>GSH-Px cytosolique (UI/mg de protéines)</b>	<b>Tumeurs prostatiques</b>		
	<b>Adénomes</b>		<b>HPIN</b>
	Groupe 1	Groupe 4	
	0,045	0,0159	0,016

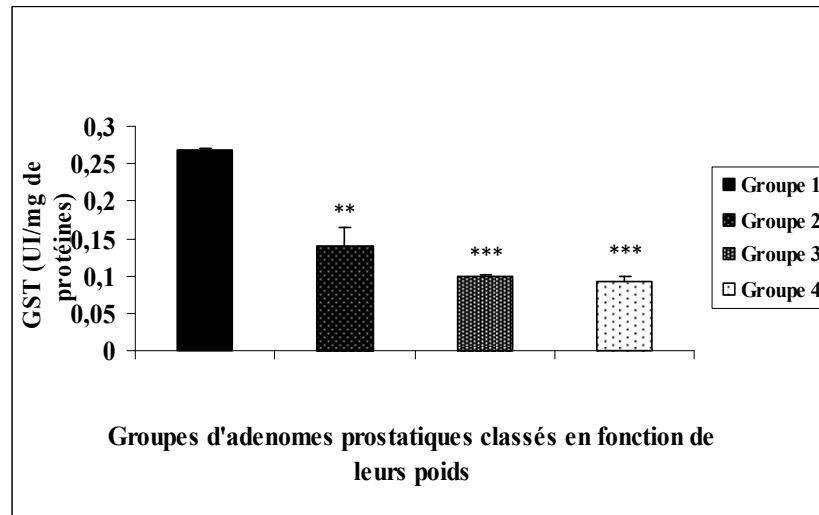
Comme pour la catalase, deux possibilités sont envisageables pour expliquer le comportement de cette activité. La première est que des faibles activités de la GSH-Px sont probablement dues à la présence de faibles concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (qui n'ont pas été transformées par la SOD). La deuxième est la présence d'une inhibition de l'activité de la GSH-Px cytosolique. Cette inhibition est beaucoup plus prononcée et augmente avec la croissance de la masse adénomateuse et/ou le développement vers un état malin. En effet, au cours du stress oxydatif, des carences en certains antioxydants non enzymatiques comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et certains oligoéléments comme le sélénium ont pu être observées (Bonfont-Rousselot, 2007). Cette dernière carence est le plus souvent accompagnée d'une diminution de l'activité GSH-Px (Ducros et al., 2000), pouvant expliquer la déplétion en cette enzyme ayant été enregistrée.

#### **III.2.2.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) cytosolique**

Pour bien étudier l'implication des systèmes antioxydants dans l'adénome prostatique, nous avons procédé à l'évaluation d'une autre activité enzymatique qui est celle de la GST.



Les résultats de la variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase cytosolique dans les différents groupes d'adénomes prostatiques des malades sont représentés dans la figure 16.



**Figure 16.** Variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique dans l'adénome prostatique.

**Groupe 1 :** témoin, 2 adénomes (35 g et 37 g), **groupe 2 :** 3 adénomes (45 g, 49 g et 55 g), **groupe 3 :** 3 adénomes (72 g, 72 g et 75 g), **groupe 4 :** 2 adénomes (104 g et 114 g). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

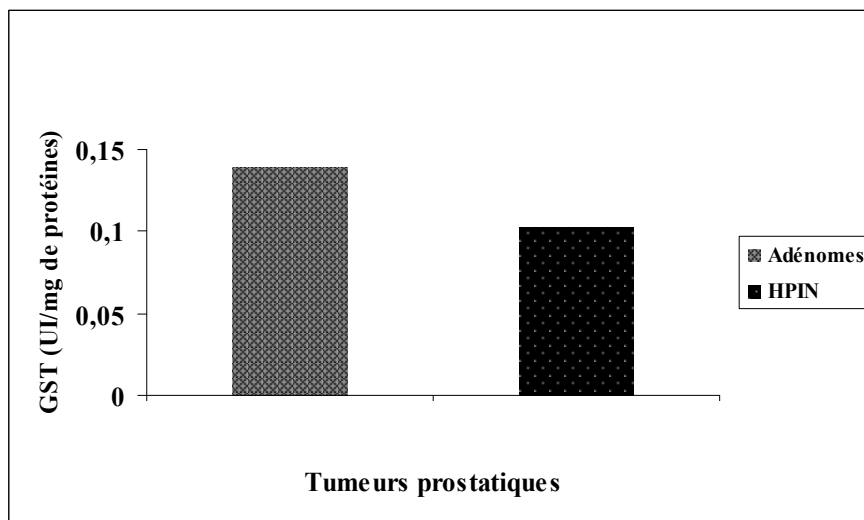
D'après ces résultats, nous constatons que les réserves cellulaires en matière de GST diminuent fortement dans les cellules adénomateuses prostatiques. Cette diminution est poids dépendante et y est inversement proportionnelle.

L'activité enzymatique de la GST paraît fortement diminuée dans les échantillons du groupe 4 et 3 où des différences hautement significatives ont été marquées avec des valeurs de  $0,093 \pm 0,007$  UI/mg de protéines et  $0,0985 \pm 0,0035$  UI/mg de protéines respectivement enregistrées. L'activité enzymatique de la GST cytosolique des échantillons du groupe 2 diminue également ( $0,14 \pm 0,025$  UI/mg de protéines) et de façon très significative ( $p < 0,01$ ) par rapport à celle du premier groupe dont la valeur moyenne de la GST est la plus importante ( $0,2685 \pm 0,0021$  UI/mg de protéines).

L'activité enzymatique de la GST cytosolique dans la HPIN est pareille à celle des autres enzymes antioxydantes (SOD, catalase et GSH-Px), c'est-à-dire inférieure à celle des adénomes. Elle atteint une valeur de 0,103 UI/mg de protéines.

Parallèlement, la valeur moyenne de la GST de tous les adénomes est de 0,139 UI/mg de protéines, légèrement supérieure à celle de la HPIN.

Les activités enzymatiques de la GST cytosolique enregistrées au niveau de la HPIN et des adénomes sont représentées dans la figure 17.



**Figure 17.** Variations des concentrations de la GST cytosolique dans la HPIN et l'adénome prostatique.

La GST ou plus exactement les GSTs constituent un groupe d'enzymes qui catalysent l'attaque nucléophile du glutathion sur les centres électrophiles d'une grande variété de xénobiotiques hydrophobes.

Les travaux réalisés par Kwabi-Addo, 2007 confirment que l'expression de la GST diminue ou est absente dans presque 100 % des cancers prostatiques humains, et que cette absence est étroitement liée à l'hyperméthylation d'un îlot CpG au niveau du promoteur de la GST.

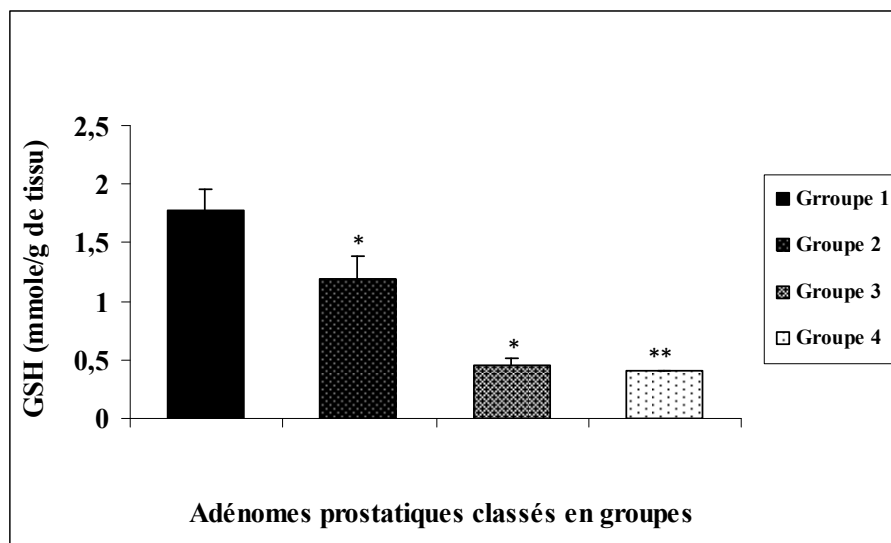
D'un autre côté, des mutations somatiques causant l'inactivation du gène de la glutathion-S-transférase (GST P1) ont été mises en évidence dans presque tous les cancers de la prostate ayant été examinés par Nelson et ses collaborateurs en 2004.

L'activité de la GST est étroitement liée au glutathion, puisque elle catalyse les réactions de neutralisation et d'élimination des xénobiotiques et des radicaux libres toxiques en utilisant comme cofacteur ce GSH. La déplétion en ce dernier peut donc, en partie, expliquer la diminution de l'activité de la GST.

### III.2.2.5. Variation des taux du glutathion (GSH) dans les tumeurs prostatiques

Notre étude de l'état antioxydant a été complétée par le dosage des taux du glutathion cytosolique, thiol non protéique le plus abondant dans la cellule qui joue un rôle majeur dans la défense antioxydante (Armstrong et al., 2002).

Le dosage du glutathion (GSH) effectué par la méthode colorimétrique d'Ellman mettant en jeu le réactif DTNB a permis d'obtenir les résultats représentés dans la figure 18.



**Figure 18.** Variation des concentrations du GSH cytosolique dans les différents groupes d'adénomes prostatiques.

**Groupe 1 :** témoin, 2 adénomes (35 g et 37 g), **groupe 2 :** 3 adénomes (45 g, 49 g et 55 g), **groupe 3 :** 3 adénomes (72 g, 72 g et 75 g), **groupe 4 :** 2 adénomes (104 g et 114 g). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

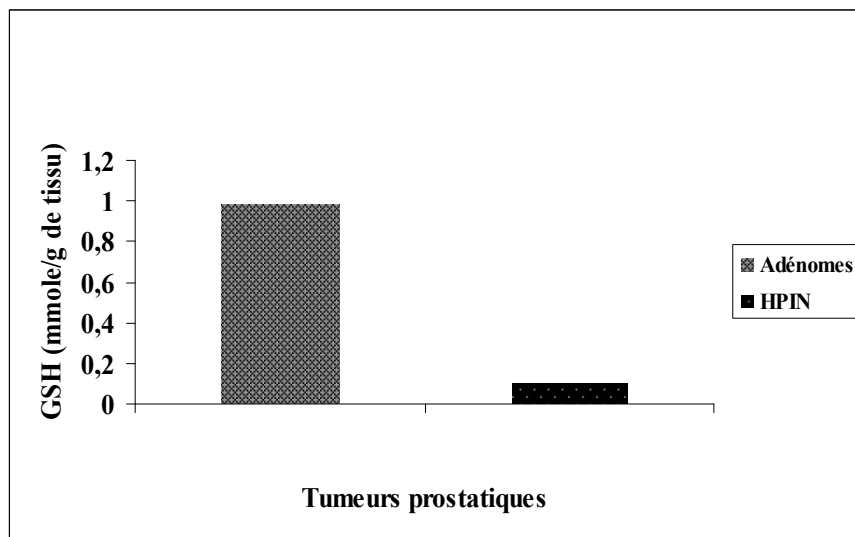
L'analyse des résultats permet de constater que les valeurs du GSH diffèrent d'un groupe à l'autre et que cette variation est fonction du poids des adénomes. Ainsi, chez le premier groupe (comportant des adénomes d'un poids de 35 et 37g c.à.d. les plus petits) le taux moyen du GSH est de  $1,775 \pm 0,176$  mmole/g de tissu et constitue la plus grande valeur.

Chez le deuxième et le troisième groupes, nous avons enregistré de faibles taux de GSH par rapport à ceux enregistrés dans le premier groupe avec des valeurs de  $1,1833 \pm 0,202$  mmole/g de tissu et  $0,4566 \pm 0,060$  mmole/g de tissu respectivement.

Le groupe 4 montre une diminution très significative ( $p < 0,01$ ) des taux du GSH avec une valeur qui atteint  $0,4 \pm 0,012$  mmole/g de tissu.

Chose similaire a été observée dans la HPIN où une déplétion des niveaux cytosoliques en glutathion ( $0,1$  mmole/g de protéines) a été enregistrée comparativement à ceux des adénomes où la concentration moyenne en GSH a été estimée à  $0,985$  mmole/g de protéines.

Les résultats de ce dosage dans la HPIN et dans les adénomes prostatiques sont démontrés dans la figure 19.



**Figure 19.** Variation des concentrations du GSH cytosolique en fonction de la nature des tumeurs prostatiques (bénignes et malignes).

Cette déplétion enregistrée dans les taux cytosoliques du GSH peut être due à la présence d'une inhibition du GSH dans les cellules adénomateuses et à plus grand degré dans la HPIN. En réalité, l'activité antioxydante du GSH est dépendante de deux enzymes : la GSH-Px et la GR (glutathion réductase) (Łukaszewicz-Hussain et Moniuszko-Jakoniuk, 2003). La GR catalyse la réduction du glutathion oxydé GSSG en glutathion réduit GSH. Elle est impliquée dans la maintenance du glutathion sous forme réduite. La diminution en GSH est probablement donc liée à une inhibition de la GR qui ne va pas régénérer le glutathion conduisant à son accumulation sous sa forme oxydée GSSG.

La déplétion peut également être le résultat d'une inhibition du gène codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse du glutathion, principalement la glutathion synthétase, due à des mutations ou à une désactivation de la transcription. Ça peut également être dû à des carences en un ou plusieurs acides aminés impliqués dans sa synthèse. En effet, en conditions du stress oxydatif, les ROS et les RNS attaquent les acides aminés et conduisent à la formation de nouveaux produits. Dans ces conditions, le glutamate se transforme en 4-hydroxy-glutamate et la cystéine devient Cys-S-S-Cys ou Cys-S-S-R disulfide (Valko et al., 2006).

### **III.3. Etude de l'implication de l'apoptose dans l'adénome prostatique et dans la HPIN par l'évaluation de l'activité enzymatique des caspases -3**

L'apoptose est un processus génétiquement contrôlé, activé par des stimuli intra ou extracellulaires mais également par des stimuli pathologiques qui portent atteintes au bon fonctionnement de la cellule tels que, par exemple, une infection virale, un choc thermique, un stress oxydatif ou des dommages induits à l'ADN (Schmitt et Bertrand, 2001). En oncologie, l'intérêt porté à l'apoptose provient des observations indiquant que l'apparition et la croissance des tumeurs ne sont pas uniquement la conséquence d'une prolifération cellulaire excessive mais sont le résultat d'un déséquilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Reed, 1999).

Afin d'étudier l'état de l'apoptose des différents tissus prostatiques soumis à notre étude, nous avons évalué l'activité des caspases -3 en utilisant un kit colorimétrique spécifique.

Les résultats expérimentaux de l'évaluation de l'activité enzymatique des caspases -3 dans les tissus prostatiques adénomateux et néoplasiques sont regroupés dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Variations de l'activité catalytique de la caspase -3 dans Les adénomes prostatiques et la HPIN.

	Groupes d'adénomes (classés en fonction du poids exprimé en gramme)				HPIN
	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	
<b>Activité enzymatique de la caspase -3 (µmole pNA/min/ml)</b>	2,113. 10 <sup>-4</sup> ± 0,000122	0	0	0	0

**Groupe 1** : témoin, 2 adénomes (35 g et 37 g), **groupe 2** : 3 adénomes prostatiques (45 g, 49 g et 55 g), **groupe 3** : 3 adénomes (72 g, 72 g et 75 g), **groupe 4** : 2 adénomes (104 g et 114 g). Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

Le tableau montre une inhibition totale de l'activité catalytique des caspases -3 dans les groupes 2, 3 et 4 et dans la HPIN se traduisant sur le plan expérimental par des absorbances (DO) nulles. Cette activité catalytique caspase -3 n'est toutefois pas absente dans les échantillons du premier groupe d'adénomes prostatiques où nous avons enregistré une valeur de  $2,113. 10^{-4} \pm 0,000122$  µmole pNA/min/ml. Cela nous conduit à mettre en place diverses propositions afin d'expliquer cette inhibition de l'apoptose associée à l'augmentation de la prolifération des cellules prostatiques.

La régulation cellulaire comprend à la fois l'action hormonale, la communication directe cellule à cellule et les facteurs de croissance (Martin et al., 2008).

La croissance et le développement de la prostate sont soumis à un contrôle endocrinien assuré par les androgènes et les estrogènes. La testostérone constitue la principale hormone androgène impliquée dans la prostate, principalement sous forme métabolisée en dihydrotestostérone. Krieg et al. (1993) suggèrent que le développement de l'adénome

prostatique peut être induit par des niveaux de dihydrotestostérone intraprostatique plus élevés en raison d'une activité 5 $\alpha$ -réductase plus importante que dans le tissu normal.

Dans l'épithélium prostatique, l'augmentation de l'expression de RA est aussi induite par les estrogènes. Il s'avère que l'œstradiol et la DHT en synergie augmentent l'expression des enzymes du métabolisme androgénique, 5 $\alpha$ -réductase entre autres, la formation du collagène et la régulation de l'apoptose cellulaire (Martin et al., 2008).

L'homéostasie glandulaire prostatique est maintenue par un équilibre entre sécrétion de facteurs stimulants la croissance et facteurs contrôlant la prolifération cellulaire tel que le TGF- $\beta$  qui induit l'apoptose cellulaire via des récepteurs membranaires spécifiques (Martin et al., 2008).

Par ailleurs, les actions synergiques de la DHT et de l'œstradiol sur la composante stromale, entraînent la production de facteurs de croissance tels que le FGF2 (FGF basique), intervenant dans des boucles de contrôle autocrine et paracrine (Sherwood et al., 1992). Les facteurs de croissance seraient donc directement responsables de la prolifération cellulaire, la DHT jouant un rôle essentiel d'organisation de ces effets. Cette croissance cellulaire dans les tissus prostatiques adénomateux et néoplasiques est accompagnée d'une inhibition de l'apoptose par l'implication de divers mécanismes moléculaires.

Dans les conditions physiologiques de la prostate, Akt, diminue l'activité transcriptionnelle du RA et son expression en inhibant le facteur de transcription FOXO3a et en stimulant la phosphorylation du RA qui conduit à son ubiquitination et sa dégradation. Akt inhibe l'apoptose en phosphorylant Bad et la procaspase -9, alors que PTEN inhibe l'activité de la PI3K/Akt et donc le taux d'Akt. D'un autre côté, NF-Kappa B augmente l'expression des gènes de survie comme les IAP, Bcl-2 et Bcl-XL (Bucur et al., 2006).

Une augmentation de l'expression de FLIP peut être également impliquée dans cette inhibition puisque étant donné que lors de l'induction de la castration de la prostate du rat, une augmentation de l'activation des caspases effectrices -3 et -6 a été enregistrée accompagnée d'une diminution de l'expression de FLIP (Nastiuk et al., 2003). Le promoteur du gène FLIP contient plusieurs éléments de réponse aux androgènes et les androgènes stimulent son expression (Gao et al., 2005).

L'apoptose dans la prostate peut aussi avoir lieu par voie des récepteurs de mort impliquant les récepteurs Fas. Une perte de l'expression de Fas par hyperméthylation a été observée *in vivo* dans des tumeurs cancéreuses prostatiques, tandis que l'inhibition de l'expression de FasL a été observée à un stade beaucoup plus précoce qui est la HPIN (O'Kane et al., 2006).

L'expression de la majorité des protéines impliquées dans l'apoptose est régulée par une protéine très conservée ; la p53. Ainsi, l'expression de l'Apaf-1, protéine impliquée dans l'activation de la caspase initiateur -9, est directement régulée par p53 à travers un élément de réponse à p53 lors de l'apoptose induite par les dommages de l'ADN (Robles et al., 2001).

L'expression de la survivin, un membre de la famille des IAP est négativement régulée par p53 (Mirza et al., 2002). La p53 régule aussi l'expression des différents membres de la famille des Bcl-2 spécialement Bcl-2 (Haldar et al., 1994) et PUMA (Nakano et Vousden, 2001).

La p53 interagit aussi avec les protéines présentes dans la membrane interne mitochondriale comme les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> en bloquant leur activité et par là induisant l'apoptose (Mihara et al., 2003).

Dans le cycle cellulaire, la mitochondrie contrôle la transition au niveau du point de contrôle G1/S par deux mécanismes distincts : l'augmentation de la production des ROS et l'accumulation de l'AMP (Owusu-Ansah et al., 2008). Ainsi, en cas de dommage de l'ADN, la p53 induit le blocage momentané du cycle cellulaire en empêchant le franchissement du point de restriction R (passage de G1 à S) permettant à la cellule la réparation des lésions (Kastan et al., 1991). Si la cellule normale n'est pas capable de réparer son ADN, la p53 déclenche la mort cellulaire en induisant un mécanisme d'apoptose (Bernardini et al., 2001).

La protéine Bcl-2 est aussi un inhibiteur important de la progression du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle G1/S (Mazel et al., 1996 ; O'Reilly et al., 1996) et l'implication des Bcl-2 dans la retardation de la transition G1/S est associée à la diminution des ROS intracellulaires (Deng et al., 2003).

L'inhibition de l'apoptose dans les cellules prostatiques que nous avons étudiées semble donc être beaucoup plus liée à une inhibition de l'expression des protéines du contrôle du cycle cellulaire principalement la p53 et Bcl-2, due probablement à des mutations au niveau de leurs



gènes correspondants ou même à des modifications épigénétiques. L'inhibition de ces protéines conduit à un échappement des cellules au processus apoptotique physiologique au niveau de la phase de transition G1/S conduisant à une tendance des cellules vers la prolifération continue.

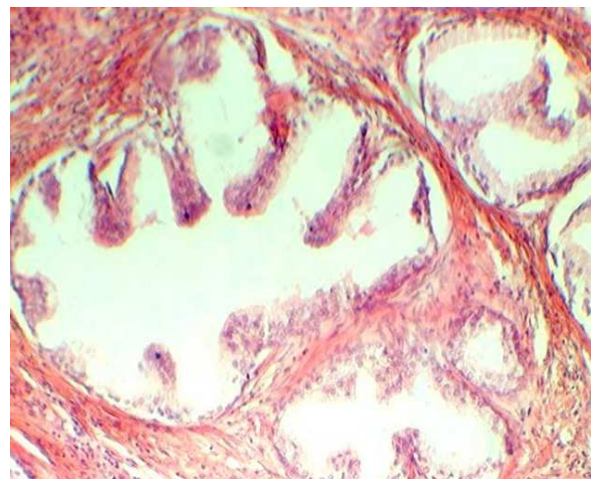
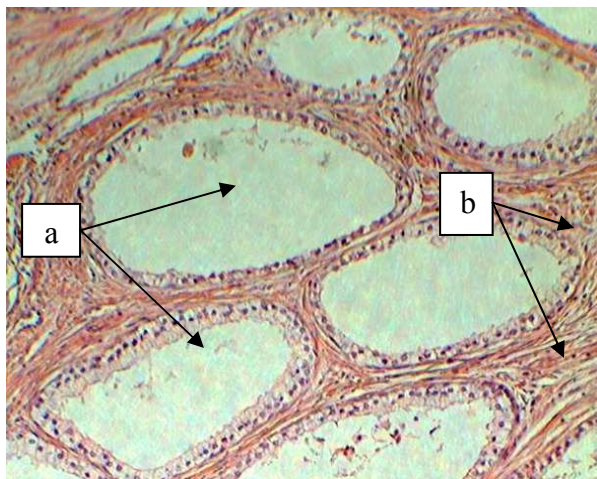
Tous ces processus associés avec la prolifération, l'apoptose et la sénescence peuvent être le résultat d'une activation des voies de signalisation en réponse aux changements intracellulaires des niveaux de ROS (Khandrika et al., 2009). Ainsi, la production excessive des ROS ou une insuffisance des systèmes de défense antioxydants (ou les deux ensembles) peut provoquer un stress oxydatif au niveau de la cellule et l'augmentation des ROS peut jouer un rôle dans les processus cellulaires associés avec l'initiation (HPIN) et la progression du cancer de la prostate.

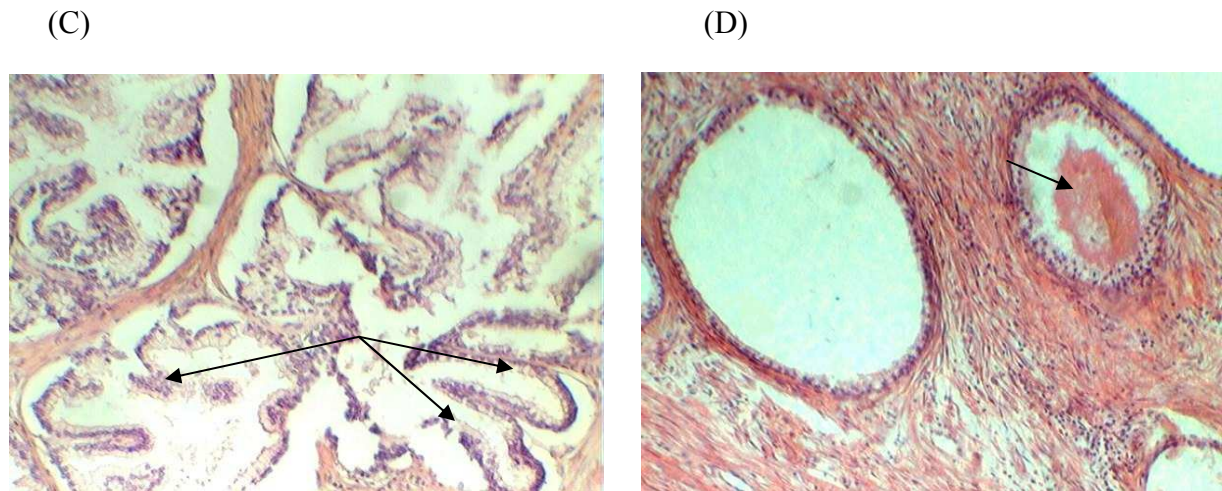
#### III.4. caractérisation histologique des adénomes prostatiques et de la HPIN par microscopie optique

L'étude microscopique des différentes lames des tissus prostatiques adénomateux n'a pas montré de différences entre les différents adénomes. Ils ont histologiquement les mêmes modifications : hyperplasie nodulaire, adénomateuse bénigne du parenchyme prostatique. Elle est faite de glandes dilatées ou kystiques juxtaposées ou dispersées au sein d'un tissu fibromusculaire abondant. Elles sont tapissées par un épithélium cubique ou cylindrique régulier festonné doublé d'une assise myoépithéliale. Les principales modifications histologiques sont représentées dans la figure 20.

(A)

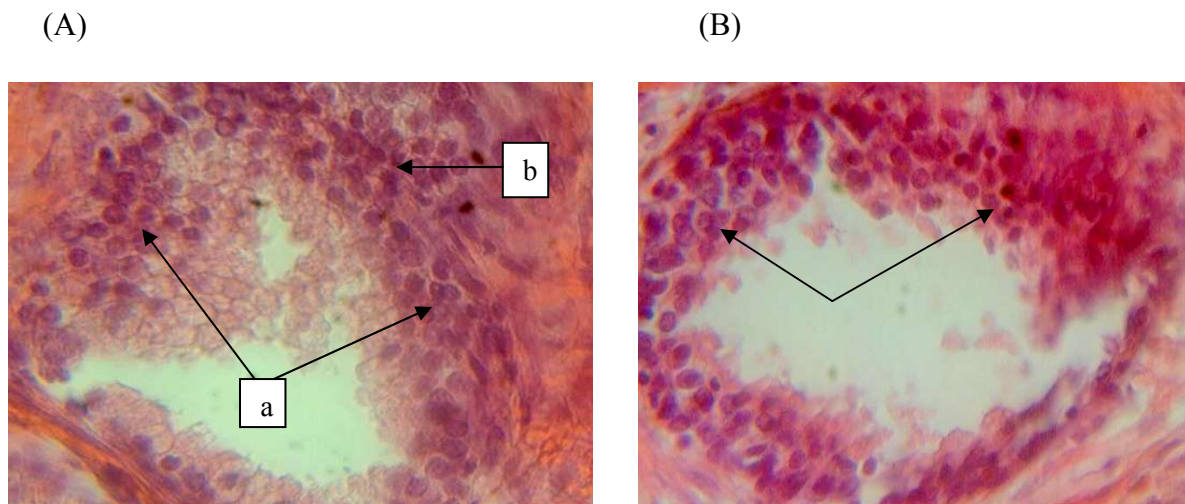
(B)





**Figure 20.** Photomicrographie de l'examen histopathologique des adénomes prostatiques (hématoxyline & éosine). (A) a→ acini glandulaires dilatés, b→ tissu myomateux inflammatoire ( $\times 100$ ), (B) adénome prostatique en feuille de fougère ( $\times 100$ ), (C) aspect rubané de l'épithélium glandulaire (flèches) ( $\times 100$ ), (D) sécrétions glandulaires ou sympéxions (flèche) ( $\times 100$ ).

Concernant la HPIN, la lame est caractérisée par la présence d'une hyperplasie épithéliale irrégulière avec pseudostratification des noyaux, anisocaryose modérée et disparition de la couche myoépithéliale (Figure 21).



**Figure 21.** Photomicrographie de l'examen histopathologique de la néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade (HPIN) (hématoxyline & éosine). (A) a→ épithélium pluristratifié, b→ disparition de la couche myoépithéliale (x 400), (B) noyaux atypiques (flèches) (x 400).

La HPIN possède la même architecture que celle des acini observés dans l'adénome, mais sont bordés par des cellules cytologiquement atypiques. Les changements histologiques observés au niveau de la HPIN sont caractérisés par la présence de nucléoles saillants dans une importante proportion ( $\geq 5\%$ ) de cellules, un élargissement nucléaire, des noyaux atypiques, une augmentation de la densité du cytoplasme et une variation de la taille des noyaux. Le volume de la HPIN possède une corrélation positive avec le stade de la tumeur (Qian et al., 1997) ainsi qu'avec le risque de progression du cancer (Kronz et al., 2001 ; Bishara et al., 2004).

### **III.5. Détection des xénoestrogènes dans les tissus prostatiques adénomateux par GC/MS**

La contribution de l'environnement chimique généré par l'activité humaine est également suspectée avoir un lien avec l'apparition de l'adénome et carcinomes prostatiques. En effet, on a assisté ces dernières années à une inquiétude grandissante face à l'exposition des hommes à des substances d'origine anthropogène ayant des propriétés hormono-mimétiques et beaucoup plus estrogène-mimétiques. Ces substances sont communément appelées xénoestrogènes.

La troisième partie de notre étude a porté sur la recherche des xénoestrogènes dans les fragments d'adénomes prostatiques des malades hospitalisés au niveau de l'hôpital de Jijel.

La recherche a été réalisée par une extraction utilisant un mélange de solvants organiques (acétate d'éthyle + cyclohexane) suivie d'une analyse par GC/MS qui permet de déceler la présence de ces substances.

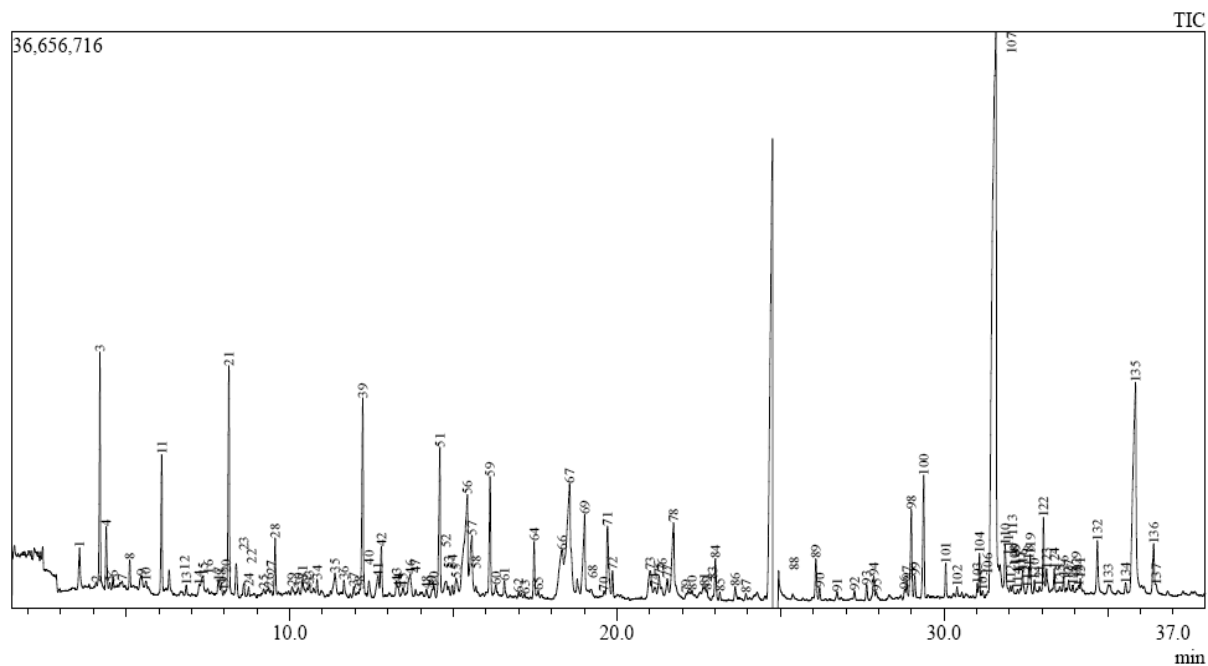
Malheureusement, la recherche des xénoestrogènes n'a été effectuée que sur deux échantillons seulement vu que la plus grande partie de l'adénome est destinée à l'étude anatomopathologique, ce qui ne nous a pas laissé suffisamment de tissu pour la recherche des xénoestrogènes.

Le premier des deux échantillons a été obtenu à partir d'un malade âgé de 66 ans et développant un adénome prostatique de 72 g. Le deuxième malade a 70 ans et son adénome prostatique est d'un poids de 75 g.

Notre analyse par GC/MS est une analyse qualitative dont le but principal est de détecter toute présence des xénoestrogènes recherchés dans le tissu prostatique adénomateux. En effet, la GC/MS permet la détection des différents composés recherchés sous forme de spectres de

masse. C'est une technique très précise qui permet l'identification des composés obtenus par comparaison de leurs spectres de masse avec les spectres figurant dans la banque de données appelée NIST « the National Institute of Standards and Technology » groupant 160 000 molécules (Mendham, 2005).

L'analyse chromatographique de l'échantillon d'adénome prostatique N°= 01 a donné le chromatogramme présenté par la figure 22.



**Figure 22.** Profil chromatographique de la chromatographie en phase gazeuse du premier échantillon d'adénome prostatique.

La première remarque que nous avons pu tirer après analyse de ce chromatogramme est la présence d'une forte teneur en composés qui n'ont pas été ciblés par notre recherche.

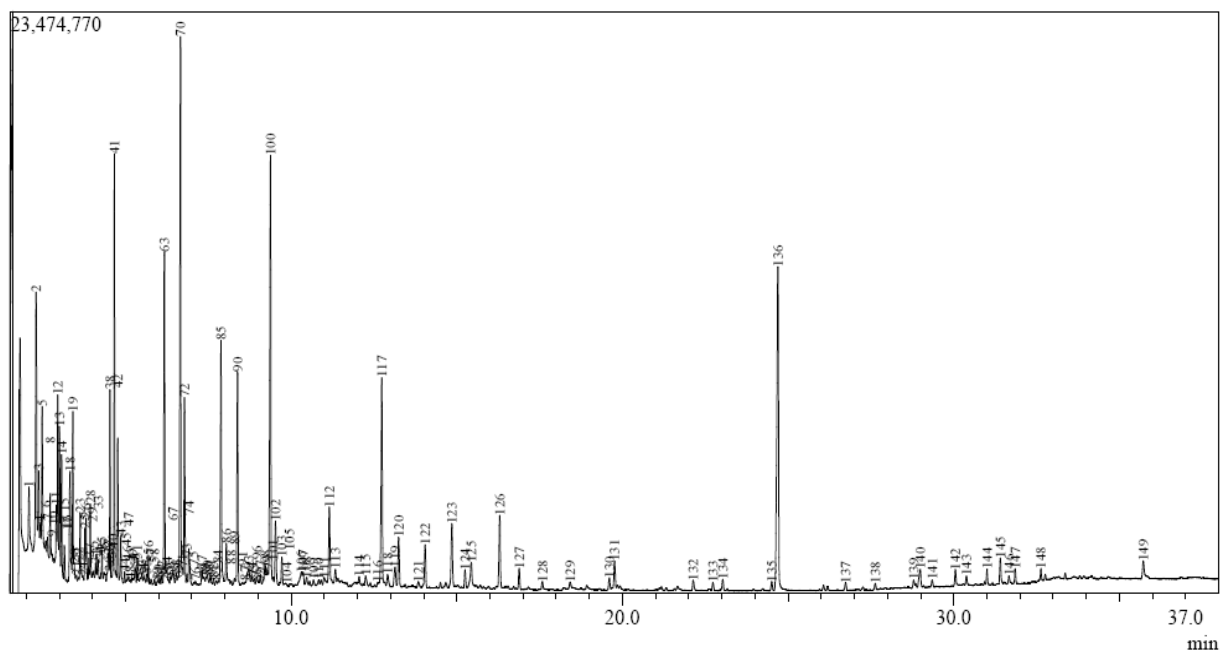
Il s'agit principalement d'acides gras tels que l'acide oléique identifié par le pic N°= 67, l'acide arachidonique représenté par le pic N°= 73 et l'acide ricinoléique (pic N°= 76), d'alcools principalement le cholestérol (beta-cholestérol) qui apparait en grande quantité (pic N°= 107), mais aussi le stigmastérol (pic : 118) et le fucostérol (pic : 123) et de vitamines : vitamine E représentée par le pic N°= 109, en plus de certains aldéhydes et cétones.

Parmi tous ces pics, les xénoestrogènes sont également présents. Il s'agit d'un composé appartenant à la famille des alkylphénols ; le 2,4-bis (1-1-diméthylethyl)-phénol, appelé également le 4-*tert*-butylphénol (pic N°= 11) sortant à environ 6 minutes avec une aire relative de pic de 1,79 %.

Il ya aussi deux composés phtalates, le premier sortant après 7,225 min (pic N°= 14) et représente le diethyl phtalate et le deuxième après environ 14,5 min sous forme d'un pic d'une surface relative de 2,40 % et qui représente le dibutyl phtalate (pic N°= 51).

Cependant, l'analyse chromatographique de cet échantillon n'a permis de mettre en évidence aucune trace de pesticides.

L'analyse chromatographique par GC/MS du deuxième échantillon d'adénome prostatique a permis d'obtenir le chromatogramme illustré dans la figure 23.



**Figure 23.** Profil chromatographique par chromatographie en phase gazeuse de l'échantillon d'adénome prostatique N°= 02.

L'analyse chromatographique du deuxième échantillon nous a permis de constater qu'il est également riche en divers contaminants.

Comme celui du premier échantillon, le chromatogramme du deuxième échantillon (figure 26) a permis de mettre en évidence de l'acide gras : acide oléique (pic N°= 129), du beta-

cholestérol identifié par le pic portant le N°= 145 et de la vitamine C (acide ascorbique) : pic N°= 125.

Les aldéhydes sont aussi présents, représentés par le nonanal (pic N°= 23), decanal (pic : 40) et undecanal (pic : 54).

Les pesticides n'ont pas été retrouvés dans cet échantillon, mais cela n'empêche que les autres xénoestrogènes soient présents.

En effet, l'analyse chromatographique de cet échantillon a permis de détecter la présence d'un phénol qui est le 2-4-bis (1,1-diméthylethyl)-phenol représenté par le pic N°= 85 sortant après 7,8 min.

Le deuxième xénoestrogène appartient à la famille des phtalates et appelé dibutyl phtalate (pic N°= 123) sortant à environ 15 min et possédant une aire relative de pic de 0,99 %.

L'analyse chromatographique des deux échantillons nous a également permis de mettre en évidence la présence de certaines substances qui ne sont pas (jusqu'à présent) considérées en tant que xénoestrogènes mais plutôt en tant que substances cancérigènes. Il s'agit des HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques).

Dans le premier échantillon, ces composés sont le 2,6-diisopropylnaphtalene représenté par le pic N°= 30 et le 1-phenanthrenecarboxylic acide, 1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-méthylethyl)-, [1r-(1 $\alpha$ ,4a $\beta$ ,10a $\alpha$ )]- (pic : 81).

Dans le deuxième échantillon, ces composés comprennent le 1,3-diméthyl-naphtalene (pic : 68), le 1, 4, 6-triméthyl-naphtalene (pic : 83), le 1, 6, 7-triméthyl-naphtalene (pic : 91) et le 2,6-diisopropylnaphtalene (pic : 111).

Les caractéristiques des différents pics de xénoestrogènes et de HAP détectés dans les deux échantillons d'adénomes prostatiques sont présentées dans l'annexe 2.

Largement présents dans notre environnement quotidien, les xénoestrogènes constituent une famille de molécules à structures chimiques très variées. Ce sont des contaminants environnementaux capables principalement d'imiter les effets des estrogènes endogènes et ainsi conduire à des perturbations de la signalisation hormonale estrogénique mais également androgénique (Watson et al., 2007). Ce terme rassemble une multitude de produits et de

substances appartenant à diverses familles : les pesticides, les phénols, les bisphénols polychlorés, les dioxines, les phtalates et les parabènes (Baker, 2001 ; Brody et Rudel, 2003).

L'analyse des deux échantillons d'adénomes prostatiques ayant été l'objet d'une séparation et d'une détection par GC/MS a révélé la présence d'alkylphénols et de phtalates ou plus exactement des esters de l'acide phtalique. Ces deux familles de molécules chimiques sont considérées sur le plan toxicologique, comme étant xénoestrogènes.

Les phtalates ayant été détectés dans les échantillons analysés sont des esters de l'acide phtalique ; le diéthylphtalate et le dibutylphtalate. Les esters de l'acide phtalique (phtalic acid esters PAEs) sont utilisés en tant que solvants dans l'industrie chimique et comme plastifiants dans la formulation des polymères PVC (Saillenfait et Laudet-Hesbert, 2005).

L'exposition environnementale aux phtalates peut provenir du contact direct avec l'air, l'eau ou encore la nourriture. L'ingestion d'aliments ayant été au contact avec des emballages contenant des phtalates demeure la principale source d'exposition pour la population générale. L'inhalation accidentelle de produits volatils comme les cosmétiques est également une autre voie possible d'exposition chez les humains (Saint-Laurent et Rhainds, 2004).

Dans l'organisme, les diesters de phtalates sont tout d'abord hydrolysés au niveau intestinal par des estérases non spécifiques en monoesters correspondants. Une fois absorbés, les monoesters sont distribués dans différents tissus y compris la prostate où ils se lient principalement aux récepteurs des androgènes et bloquent le fonctionnement normal de ces hormones sans pour autant activer ces récepteurs (effet antagoniste) (Cravedi, 2007).

En plus des esters de phtalates, l'analyse de nos échantillons a révélé aussi la présence de composés appartenant à la famille des alkylphénols. Il s'agit du 2,4-bis (1,1-diméthyléthyle), alkylphénol présent dans le premier et le deuxième échantillon. C'est un produit chimique important et très abondant, utilisé pour la production des résines polycarbonates et des plastiques. C'est un polluant largement distribué dans l'environnement qui a été retrouvé dans l'eau de mer et ses sédiments, dans les sédiments des rivières ainsi que dans les effluents des usines (Toyama et al., 2010).

La contamination par cet alkylphénol se fait à travers l'ingestion d'aliments et d'eau contaminés ou même dans certains cas par contact direct (Singleton et Khan, 2003).



Dans l'organisme et plus précisément au niveau de la prostate, ce composé interagit en tant qu'agoniste avec les récepteurs aux estrogènes (Toyama et al., 2010) induisant la transcription des gènes correspondants. Il est considéré que le noyau des alkylphénols imite l'anneau A de l'œstradiol d'où l'effet estrogénique (Michalowicz and Duda, 2006).

Cependant, il est très difficile de confirmer que la présence des diesters de phtalates et de l'alkylphénol, est due à leur accumulation au niveau de cet organe suite à des expositions répétées ou cumulatives. La présence de ces composés dans les échantillons d'adénomes prostatiques peut revenir à une contamination de ces échantillons analysés, au cours de leur conservation et/ou de leur extraction pour l'analyse. Au cours de la préparation pour l'analyse chromatographique, ces fragments d'adénomes peuvent être accidentellement ou par inattention au contact de matériel plastique, d'où la libération et le transfert des esters de phtalates et du composé phénolique vers les tissus prostatiques analysés. C'est ce qui a encore été confirmé par Saillenfait et Laudet-Hesbert (2005) en décrivant une libération des esters de phtalates dans l'environnement en raison de leurs liaisons covalentes faibles qu'ils forment avec les polymères qui y sont associés.

A l'origine, et à l'état normal, les phtalates ne sont pas accumulés dans l'organisme. L'excrétion intervient rapidement, principalement par voie urinaire et par voie fécale. Les métabolites urinaires sont sous formes libres ou glucuroconjuguées (Almeras et al., 2010). Une accumulation n'est possible que lors de l'exposition permanente à de doses répétées et élevées de ces molécules conduisant à une saturation des récepteurs. D'autre côté les alkylphénols sont caractérisées par un pouvoir d'accumulation dans le tissu adipeux d'où ils se libèrent progressivement, se distribuent dans l'organisme et exercent leurs effets au niveau des tissus cibles, principalement la prostate.

Mise à part les alkylphénols et les phtalates trouvés dans les échantillons analysés, l'analyse des chromatogrammes obtenus n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'aucun pic de pesticides, c'est ce qui signifie l'absence de ces composés dans les tissus d'adénomes prostatiques ou leur présence à de très faibles concentrations qui n'ont pas pu être détectées.

Les facteurs pouvant expliquer l'absence des pesticides dans les tissus prostatiques reviennent aux processus de métabolisation et de dégradation que subissent ces molécules dans le corps humain. Les pesticides xénoestrogènes peuvent pénétrer dans l'organisme par trois voies



principales : la voie respiratoire, la voie cutanée et la voie orale. Une fois dans l'organisme, ces molécules seront métabolisées par différentes réactions de phase I en particulier des hydrolyses et des oxydations conduisant à la formation de métabolites plus ou moins toxiques pouvant à leur tour subir des réactions de conjugaison.

Les pesticides xénoestrogènes sont caractérisés par une forte rémanence ainsi que par une forte liposolubilité et ils ont pour la quasi-totalité d'entre eux, tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux (Lauwreys, 1992). L'absence de ces substances dans le tissu prostatique ne signifie pas une absence de leur effet, puisqu'elles sont lentement éliminées et libérées du tissu adipeux, surtout lors de la lipolyse qui entraîne leur mobilisation brusque du tissu adipeux (Lauwreys, 1992). Ces molécules passent dans la circulation générale et delà peuvent atteindre différentes cibles cellulaires et exercer leurs effets sans y être accumulées.

Les xénoestrogènes agissent principalement sur les estrogènes endogènes et leurs récepteurs au niveau de la prostate. En effet, il a été suggéré qu'une augmentation excessive des taux des estrogènes durant le développement prostatique peut contribuer à une élévation de l'incidence de la survenue de l'adénome et du cancer prostatiques (Prins et Korach, 2008). Plus précisément, il s'agit d'une augmentation significative dans le rapport E2/T conduisant à un changement de la balance des androgènes et estrogènes qui régule la croissance prostatique vers une dominance estrogénique. Il a été également suggéré qu'une augmentation de la stimulation estrogénique de la prostate peut conduire à une réactivation de la croissance et par conséquent à une transformation néoplasique (Prins et Korach, 2008).

Pour exercer leur effet, les xénoestrogènes doivent être de 100 à 1000 fois plus concentrés afin d'avoir un effet similaire à celui de l'œstradiol endogène (Singleton et Khan, 2003). Ils sont de ce fait suspectés avoir beaucoup plus un effet de potentialisation de l'activité de l'œstradiol ou avoir des effets supplémentaires s'ils sont présents en mélanges que d'avoir un effet estrogénique direct. En complément des dangers liés au risque associé à chaque molécule individualisée, le problème des mélanges concerne également les éventuels effets d'addition, de synergie ou d'antagonisme entre molécules d'autant plus que certains produits s'accumulent dans l'organisme. Dans ce même contexte, Arnold et al. (1996) ont suggéré que les combinaisons entre de faibles estrogènes environnementaux ont un effet synergique sur l'activation des RE.

La question est donc posée concernant les conséquences des expositions à ces substances sur la santé et, en particulier, sur la genèse des pathologies connues pour leur tendance hormonale comme l'adénome et le cancer prostatiques. Il ne s'agit pas tout d'établir un lien entre une substance considérée par ailleurs comme xénoestrogène et un effet sanitaire donné, mais plutôt, celui de démontrer que les propriétés hormonales d'une substance sont à l'origine ou participent à la survenue de la pathologie (Multigner et al., 2008).

Il faut noter également qu'en plus de leur rôle de perturbation endocrinienne, plusieurs xénoestrogènes possèdent un effet mutagène, parmi lesquels figurent les bisphénols, les alkylphénols, les organochlorés et les phtalates (Hess-Wilson et Knudsen, 2006). Les effets biologiques des xénoestrogènes sont donc multiples (synergie, additivités, antagonismes, bioaccumulation) et parfois simultanés (mutagènes, perturbateurs hormonaux, ...) compliquant ainsi la prédiction de leurs effets biologiques.

Les autres molécules ayant été détectées dans ces tissus prostatiques sont les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques). Ce sont des composés organiques possédant 2 ou plusieurs cycles benzéniques fusionnés. Ils sont générés lors de la combustion incomplète de la matière organique (charbon, pétrole, bois, ...). Chez l'homme, l'alimentation constitue la principale source d'exposition aux HAP, par la consommation de viandes et de poissons fumés, des graisses, des huiles végétales mais aussi des produits contaminés par dépôts atmosphériques (Leoz-Garziandia, 2000).

Dans l'organisme, ces molécules subissent des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse qui aboutissent à la formation de dérivés hydroxylés qui sont les cancérigènes ultimes. Ces dérivés ultimes sont capables de se lier solidement, par des liaisons covalentes, aux macromolécules des cellules et en particulier aux protéines et à l'ADN pour former des adduits, s'ils ne sont pas séparés, provoquent des mutations au sein du patrimoine génétique des tissus et constituent de ce fait un phénomène d'initiation de la cancérogénèse (Leoz-Garziandia, 2000).

Ces HAP peuvent donc aussi participer aux perturbations des cellules prostatiques, conduisant à l'apparition de mutations de différents gènes responsables de l'expression de diverses protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire comme la p53 et la défense

antioxydante contre la formation des radicaux libres et de divers métabolites toxiques tels que les aldéhydes.

L'adénome et les cancers prostatiques constituent donc une composante très complexe qui met en place l'implication de divers facteurs et de diverses perturbations au niveau de son fonctionnement, de son homéostasie et de son contrôle endocrinien conduisant à la formation et l'accumulation de divers produits toxiques qui résultent du métabolisme, principalement les ROS et les aldéhydes qui agissent directement au niveau de l'ADN et par conséquent conduisent à la formation de mutations au niveau des gènes responsables du maintien, de l'intégrité et du contrôle de la prostate.

*Conclusion*  
*et*  
*Perspectives*

## **Conclusion et Perspectives**

L'un des points importants de notre travail concerne l'étude de l'implication du stress oxydatif dans l'adénome prostatique.

La comparaison des différents paramètres du stress oxydatif étudiés dans les différents adénomes ainsi que dans la HPIN a montré l'existence d'une forte implication du stress oxydatif dans ces deux pathologies.

Ainsi, une évaluation des dégâts oxydatifs par le dosage du MDA a permis de mettre en évidence de fortes concentrations de ce marqueur, qui augmentent en fonction du poids des adénomes ainsi qu'au cours du passage d'un état bénin à un état malin.

L'état antioxydant a été également étudié. Dans un environnement adénomateux, l'état du glutathion est déséquilibré, où des diminutions des taux de ce dernier ont été enregistrées.

La comparaison des différentes activités enzymatiques antioxydantes dans les différents adénomes classés en fonction de leurs tailles mais aussi au niveau de la HPIN a révélé une diminution des activités des enzymes cytosoliques SOD et GST au cours de la pathogénèse de l'adénome prostatique.

La catalase et la GPx marquent également une diminution de leurs activités enzymatiques au niveau des adénomes prostatiques et de la HPIN. Cette diminution est fonction du poids des adénomes.

D'autre part, le dosage du taux sérique du PSA a montré que ce dernier n'est pas fonction du poids des adénomes alors qu'il augmente lors de l'augmentation des détériorations cellulaires caractéristiques des cellules néoplasiques. Cependant, ce marqueur tumoral est influencé par une multitude de facteurs en même temps.

L'étude de l'implication de l'apoptose dans l'adénome prostatique par le dosage des caspases -3 a révélé que l'augmentation de la taille des adénomes est en partie due à une inhibition de l'apoptose traduite par l'inhibition de l'activité des caspases -3.

Et enfin, la recherche des xénoestrogènes dans les tissus prostatiques adénomateux nous a permis de mettre en évidence la présence de certaines substances xénoestrogènes qui sont principalement des phénols et des phtalates dont la provenance peut être liée à une contamination au cours de la préparation des échantillons. En revanche, les pesticides ont été complètement absents dans ces tissus.

Cette étude que nous avons réalisée, offre de nombreuses perspectives. En plus de l'étude du stress oxydatif et de l'apoptose dans l'adénome prostatique, nous envisageons dans l'avenir élargir notre travail en étudiant son implication dans les cancers prostatiques qui constituent à nos jours un souci social vu le nombre de malades enregistrés et hospitalisés chaque année surtout dans la wilaya de Jijel.

Nous espérons également approfondir notre recherche en évaluant le stress oxydatif au niveau mitochondrial et en étudiant le comportement des différentes protéines apoptotiques notamment les différentes Bcl-2 (pro- et anti- apoptotiques) et la p53 au niveau des cellules prostatiques adénomateuses et cancéreuses.

Notre troisième but est d'élargir également notre recherche sur les xénoestrogènes sur un grand nombre de malades de la wilaya de Jijel et d'étudier *in vivo* et *in vitro* leur implication dans le processus de perturbation endocrinienne et de cancérogénèse prostatique.

*Références  
bibliographiques*

Références bibliographiques

**Aarif E.M. and Huisingh D., 2001.** Environmental xenoestrogens : short-term exposure of low doses of lindane, dieldrine, dibutyl phthalate, and diethylhexyl phthalate increases uterine weight in young female mice. *Anal. Sci.* ; 17 :261.

**Albin R.J. et Mason M.D., 2007.** Metastasis of Prostate Cancer. *Cancer Metastasis-Biology and Treatment. Springer* ; 10 : pp 407.

**Almeras C., Cancan Y., Gereec V. et Millet M., 2010.** Phtalates. *Projet Persan. EHESP* ; pp : 42.

**Almushatat A.SK., Talwar D., McArdle P.A., Williamson C., Sattar N., O'Reilly D.St.J., Underwood M.A. and McMillan D.C., 2006.** Vitamin antioxidants, lipid peroxidation and the systemic inflammatory response in patients with prostate cancer. *Int. J. Cancer* ; 118 : 1051-1053.

**Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W. and Yuan J., 1996.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* ; 87(2) : 171.

**Andersen H.R., Vinggaard A.M., Rasmussen T.H., Gjermansen I.M. and Bonfeld-Jorgensen E.C., 2002.** Effect of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* ; 179 : 1-12.

**Armstrong J.S., Steinauer K.K., Hornung B., Irish J.M., Lecane P., Birrell G.W., Peehl D.M. and Knox S.J., 2002.** Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell. Death. Differ.* ; 9 (3) : 252-263.

**Armstrong J.S., 2006.** Mitochondrial membrane permeabilization : the sine qua non for cell death. *Bioessays* ; 28 : 253-260.

**Arnold S.F. and McLachlan J.A., 1996.** Synergistic signals in the environment. *Environ. Health. Perspect.* ; 104 : 1020-1023.

**Ashkenazi A. and Dixit N.M., 1998.** Death receptors : signaling and modulation. *Science* ; 281 : 1305-1308.

**Baker V.A., 2001.** Endocrine disrupters-testing strategies to assess human hazard. *Toxicol. In Vitro* ; 15 (4-5) : 413-419.

**Bao Q. and Shi Y., 2007.** Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* ; 14 (1) : 56-65.

**Barondeau D.P., Kassmann C.J., Bruns C.K., Tainer J.A. and Getzoff E.D., 2004.** Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry* ; 43 (25) : 8038-8047.

**Bartolozzi C., Selli C., Olmastroni M., Menchi I. and Di Candio G., 1988.** Rhabdomyosarcoma of the Prostate: MR Findings. *AJR* ; 150 : 1333-1334.

**Beauchamp, C.O. and Fridovich I., 1971.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* ; 44: 276-287.

**Becue A. and Nguyen R., 2005.** Etude de l'analyse des Alkylphénols. Rapport final Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable Direction de l'Eau, Paris. *INERIS*; pp 34.



- Beheshti B., Vukovic B., Marrano P., Squire J.A. and Park P.C., 2002.** Resolution of genotypic heterogeneity in prostate tumors using polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization on microdissected carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia foci. *Cancer Genet. Cytogenet.* ; 137 : 15-22.
- Bernardini S., Chabannes E. et Bittard H., 2001.** Utilité du p53 dans la prise en charge clinique des tumeurs vésicales. *Prog. Urol.* ; 11 : 201-208.
- Biri H., Ozturk H.S., Kacmaz M., Karaca K., Tokucoglu H. and Durak I., 1999.** Activities of DNA turnover and free radical metabolizing enzymes in cancerous human prostate tissue. *Cancer Invest.* ; 17 : 314-319.
- Bishara T., Ramnani D.M. and Epstein J.I., 2004.** High-grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy : risk of cancer on repeat biopsy related to number of involved cores and morphologic pattern. *Am. J. Surg. Pathol.* ; 28 : 629-633.
- Biswas S, Chida AS and Rahman I., 2006.** Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.* ; 71 (5) : 551-564.
- Board P.G. and Webb G.C., 1987.** Isolation of a cDNA clone and localization of human glutathione S-transferase 2 genes to chromosomal band 6p12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* ; 84 (8) : 2377-2381.
- Boatright K. M. and Salvesen G. S., 2003.** Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* ; 15 : 725-731.
- Bok R.A. and Small E.J., 2002.** Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat. Rev. Cancer.* ; 2 (12) : 918-926.
- Bonnefont-Rousselot D., 2007.** Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biologie* ; 157 : 23-26.
- Bonvallet N. et Frédéric D., 2004.** Insecticides organochlorés aux Antilles : Identification des dangers et valeurs toxicologiques de référence (VTR). *Institut de veille sanitaire: pp 52.*
- Bostwick D.G., Pacelli A. and Lopez-Beltran A., 1996.** Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* ; 29 : 117-134.
- Bostwick D.G., Alexander E.E., Singh R., Shan A., Qian J., Santella R.M., Oberley L.W., Yan T., Zhong W., Jiang X. and Oberley T.D., 2000.** Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* ; 89 : 123-134.
- Bradly G., Wouters Ph D., Roland K. and Chiu Ph D., 2007.** Evaluating the Importance of Apoptosis and other Determinants of Cell Death and Survival. In gewirtz D.A., Holt S.E. and Grant S., Apoptosis, Senescence, and Cancer. *Cancer Drug Discovery and Development* ; Humana Press ; *New Jersey* ; 55-72.
- Brancolini C., Sgorbissa A. and Schneider C., 1998.** Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis. *Cell. Death. Differ.* ; 5 : 1042-1050.
- Brigelius-Flohé R., Banning A. and Schnurr K., 2003.** Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. *Antioxid. Redox. Signal* ; 5 (2) : 205-215.
- Brody J.G. and Rudel R.A., 2003.** Environmental pollutants and breast cancer. *Environ. Health. Perspect.* ; 111 (8) : 1007-1019.

- Bucur O., Ray S., Bucur M.C. and Almasan A., 2006.** APO2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer therapy. *Front. Biosci.* ; 1 (11) : 1549-1568.
- Budihardjo I., Olivier H., Lutter M., Luo X. and Wang X., 1999.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* ; 15 : 269-290.
- Cadet J., Douki T., Frelon S., Sauvaigo S., Pouget J.P. and Ravanat J.L., 2002.** Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic. Biol. Med.* ; 33 : 441-449.
- Campbell-Thompson M., Lynch I.J. and Bhardwaj B., 2001.** Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER beta isoforms in colon cancer. *Cancer Res.* ; 61 : 632-640.
- Catalá A., 2009.** Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* ; 157 : 1-11.
- Catalona W.J., Partin A.W., Slawin K.M., Brawer M.K., Flanigan R.C., Patel A., Richie J.P., Dekernion J.B., Walsh P.C., Scardino P.T., Lange PH, Subong EN, Parson RE, Gasior GH, Loveland KG. and Southwick PC., 1998.** Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease : a prospective multicenter clinical trial. *Jama* ; 279 : 1542-1547.
- Cato A.C., Nestl A. and Mink S., 2002.** Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci. STKE.* ; 138 : re9.
- Cetinkaya M., Gunce S., Ulusoy E., Aksoy F., Yildiz O., Adsan O. and Ozden C., 1998.** Relationship between prostate specific antigen density, microvessel density and prostatic volum in benign prostatic hyperplasia and advanced prostatic carcinoma. *Int. Urol. Nephrol.* ; 30 (5) : 581-585.
- Chakraborty I., Kunti S., Bandyopadhyay M., Dasgupta A., Chattopadhyay G.D. and Chakraborty S., 2007.** Evaluation of serum zinc level and plasma SOD activity in senil cataract patients under oxidative stress. *Ind. J. Clin.l Biochem.* ; 22 (2) : 109-113
- Chen C.W., Hurd C., Vorobjkina D.P., Arnold S.F. and Notides A.C., 1997.** Transcriptional activation of the human estrogen receptor by DDT isomers and metabolites in yeast and MCF-7 Cells. *Biochem. Pharmacol.* ; 53 : 1161-1172.
- Chowdhury I., Tharakan B. and Bhat G.K., 2008.** Caspases-An update. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* ; 151 : 10 – 27.
- Claiborne A., 1985.** Catalase activity. In: Greenwald RA, eds. CRC handbook of methods for oxygen radical research. *CRC Press: Boca Raton*; p : 283-284.
- Claus S., Berges R., Senge T. and Schulze H., 1997.** Cell kinetic in epithelium and stroma of benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* ; 158 :217-221.
- Colborn T., Vom Saal F.S. and Soto A.M., 1993.** Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* ; 101 (5) : 378-384.
- Colombel M., Vacherot F., Diez S.G., Fontaine E., Buttyan R. and Chopin D., 1998.** Zonal variation of apoptosis and proliferation in the normal prostate and in benign prostatic hyperplasia. *Br. J. Urol.* ; 82 : 380-385.

- Cravedi J.P., Zalko D., Savouret J.F., Menuet A. et Jégou B., 2007.** Le concept de perturbation endocrinienne et la santé humaine. *Med. Sci.* ; 23 (2) : 198-204.
- Cregan S.P., Dawson V.L. and Slack R.S., 2004.** Role of AIF in caspase-independent cell death. *Oncogene* ; 23 : 2785-2796.
- Curtis L.R., 2001.** Toxicological highlight : Organophosphate antagonism of the androgen receptor. *Toxicol. Sci.* ; 60 : 1-2.
- Daidoji T., Ozawa M., Sakamoto H., Sako T., Inoue H., Kurihana R., Hashimoto S. and Yokota H., 2006.** Slow elimination of nonylphenol from rat intestine. *Drug Metab. Dispos.* ; 34 : 184-190.
- Damstra T., Barlow S., Bergman A., Kavlock R. and Van Der Kraak G., 2002.** Global Assessment of the state-of-the-science of endocrine disrupters. International Programme on Chemical Safety
- Davies M.J., Fu S., Wan H. and Dean R.T., 1999.** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic. Biol. Med.* ; 27 (11-12) : 1151-1163.
- Deng X., Gao F. and May Jr W.S., 2003.** Bcl 2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. *Blood* ; 102 : 3179-3185.
- Desgrandchamps F., Tatoud R., Cussenot O., Teillac P. et Le Duc A., 1992.** Facteurs de croissance prostatique et hypertrophie de la prostate. Etat des connaissances actuelles et perspectives. *Prog. Urol.* ; 2 : 1031-1044.
- Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R., Van Arsdate T., Zhou Q., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Salvesen Q.S. and Reed J.C., 1998.** IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspase. *Embo. J.* ; 17 : 2215-2223.
- Di Ilio C., Aceto A., Bucciarelli T., Angelucci S., Felaco M., Grilli A. and Federici G., 1990.** Glutathione transferase isoenzymes from human prostate. *Biochem. J.* ; 27 : 481-485.
- Di Paolo O.A., Teitel C.H., Nowell S., Coles B.F. and Kadlubar F.F., 2005.** Expression of cytochromes P450 and glutathione S-transferases in human prostate, and the potential for activation of heterocyclic amine carcinogens via acetyl-CoA, PAPS- and ATP-dependent pathways. *Int. J. Cancer* ; 117 : 8-13.
- Dotan Y., Lichtenberg D. and Pinchuk I., 2004.** Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid. Res.* ; 43 : 200-227.
- Droge W., 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* ; 82 : 47-95.
- Ducros V., Ferry M., Faure P., Belin N., Renversez J.C., Ruffieux D. and Favier A., 2000.** Distribution of Selenium in Plasma of French Women : Relation to Age and Selenium Status. *Clin. Chem.* ; 46 : 731-733.
- Ellem S.J. and Risbridger G.P., 2007.** Treating prostate cancer : a rationale for targeting local oestrogens. *Nat. Rev. Cancer* ; 7 : 621-627.
- Ellman G., 1959.** Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* ; 32 : 70-77.
- Eskes R., Desagher S., Antonsson B. and Martinor J.C., 2000.** Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* ; 20 : 929-935.

- Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. and Jurgens G., 1992.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* ; 13(4) : 341-390.
- Fang J. and Iyer A.K., 2007.** Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J. Drug. Targ.* ; 15 : 475-486.
- FAO, 1996.** Elimination de grandes quantités de pesticides périmés dans les pays en développement. *Collection FAO, GCP/INT/ 572/ NET.*
- Favier A., 1997 :** Stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Biol. Clin.* ; 55: 9-16.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* ; 108-115.
- Feldman B. J. and Feldman D., 2001.** The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer.* ; 1 (1) : 34-45.
- Fénichel P. et Brucker-Davis F., 2008.** Perturbateurs endocriniens environnementaux et cancer du sein : de nouveaux facteurs de risque ? Breast risk cancer and environmental endocrine disruptors. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* ; 36 : 969-977.
- Fischer U., Janick R.U. and Schulze-Osthoff K., 2003.** Many cuts to ruin : a comprehensive update of caspase substrates. *Cell. Death. Differ.* ; 10 : 76-100.
- Fixemer T., Remberger K. and Bankhoff H., 2003.** Differential expression of estrogen receptor beta (ER beta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma. *Prostate* ; 51 : 79-87.
- Focant J.F., 2006.** Chromatographie bidimensionnelle en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GCxGC-TOFMS) : un nouvel outil pour la biosurveillance humaine. *Environnement, Risques & Santé* ; 5 (6) : 489-501.
- Fourcade R.O. et Tahan H., 2000.** Hypertrophie bénigne de la prostate. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, -A-10* : 18-550.
- Fridovich I., 1998.** The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci.* ; 7 (12) : 2688-2690.
- Gao S., Lee P., Wang H., Gerald W., Adler M., Zhang L., Wang Y.F. and Wang Z., 2005.** The androgen receptor directly targets the cellular Fas/FasL associated death domain protein-like inhibitory protein gene to promote the androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Mol. Endocrinol.* ; 19 : 1792-1802.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique* : 91-96.
- Green D.R. and Kroemer G., 2004.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* ; 305 (5684) : 626-629.
- Gupta C., 2000.** Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* ; 224(2) : 61-68.
- Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B., 1974.** Glutathion -S-transférase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* ; 249: 7130-7139.

- Haldar S., Negrini M., Monne M., Sabbioni S. and Croce C.M., 1994.** Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* ; 54 :2095-2097.
- Hammerich K.H., Ayala G.E. and Wheeler T.M., 2009.** Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. In : Hricak H. and Scardino P.T., prostate cancer. *Cambridge University Press* ; pp 223.
- Haouzi D., Lekehal M., Tinel M., Vadrot N., Caussanel L., Letteron P. Moreau A., Feldmann G., Fau D. and Pessayre D., 2001.** Prolonged, but not acute, glutathione depletion promotes Fas-mediated mitochondrial permeability transition and apoptosis in mice. *Hepatology* ; 33(5) : 1181-1188.
- Harden S.V., Sanderson H., Goodman S.N., Partin A.A., Walsh P.C., Epstein J.I. and Sidransky D., 2003.** Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J. Natl. Cancer. Inst.* ; 95 (21) : 1634-1637.
- Hayes J.D., Flanagan J.U. and Jowsey I.R., 2005.** Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* ; 45 : 51-88.
- Heinlein C.A. and Chang C., 2002.** The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol. Endocrinol.* ; 16 : 2181-2187.
- Hermabessière J. et Taillandier J., 1993.** Physiologie de la prostate. *Urologie* ; 10 : 18-500.
- Hess-Wilson J.K. and Knudsen K.E., 2006.** Endocrine disrupting compounds and prostate cancer. *Cancer Lett.* ; 241 (1) : 1-12.
- Ho S.M., Tang W.Y., Belmonte de Frausto J. and prins G.S., 2006.** Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increase susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulate phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* ; 66 (11) : 5624-5632.
- Hoerni B., Bécoudrn Y., Brunet R., Bui N.B., Bussi eres E., Eghbali H., Evrard S., Fonck M., Kantor G., Mauriac L., Robert J. and Soubeyran P., 2001.** Canc erologie et h ematologie. *Masson, Paris* ; p : 199-201.
- Hong J.H., Kim M.J., Park M.R., Kwag O.G., Lee I.S., Byun B.H., Lee S.C., Lee K.B. and Rhee S.J., 2004.** Effects of vitamine E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin. Chim. Acta.* ; 340 : 107-115.
- Hughes S., Yoshimoto M., Beheshti B., Houlston R.S., Squire J.A. and Evans A., 2006.** The use of whole genome amplification to study chromosomal changes in prostate cancer : insights into genome-wide signature of preneoplasia associated with cancer progression. *BMC Genomics* ; 7 : 65.
- Hulbert A.J., 2005.** On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* ; 234 : 277-288.
- Iqbal M, Som DS, Yasumasa O, Masayoshi F. and Shigero O., 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. *Pharmacol. Toxicol.*; 92: 33-38.
- Janssen T. et Schulman C., 1994.** Antig ne prostatique sp cifique : un bilan 15 ans apr s sa d couverte. *Prog. Urol.* ; 4 : 171-180.

- Jeronimo C., Usadel H., Henrique R., Oliveira J., Lopes C., Nelson W.G. and Sidransky D., 2001.** Quantitation of GSTP1 Methylation in Non-neoplastic Prostatic Tissue and Organ-Confined Prostatic Adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* ; 93 (22) : 1747-1752.
- Jin Z. and EL-Deiry W.S., 2005.** Overview of cell death signaling pathways. *Cancer. Biol. Ther.* ; 4 : 139-163.
- Joanny Menvielle-Bourg F., 2005.** La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie* ; 3 (3) : 118-121.
- Jung K., Seidel B., Rudolph B., Lein M., Cronauer M.V., Henke W., Hampel G., Schnorr D. and Loening S.A., 1997.** Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. *Free Radic. Biol. Med.* ; 23 (1): 127-133.
- Kang J.H., Katayama Y. and Kondo F., 2006.** Biodegradation or metabolism of bisphenol A : From micro organisms to mammals. *Toxicology* ; 217 (2-3) : 81-90.
- Kastan M.B., Onyekwere O. and Craig W., 1991.** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* ; 51 : 6304-6311.
- Kaufmann S.H and Hengartner M.O., 2001.** Programmed cell death : alive and well in the new millennium. *Trends. Cell. Biol.* ; 11 : 526-534.
- Kelce W.R., Lambright C.R., Gray L.E., and Robert K., 1997.** Vinclozolin and p, p'-DDE alter androgen dependent gene expression : *In vivo* conformation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* ; 142 : 192-200.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R., 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* ; 26 (4) : 239-257.
- Khandrika L., Kumar B., Koul S., Maroni P. and Koul H.K., 2009.** Role of Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Cancer Lett.* ; 282 (2) : 125-136.
- Kim S.B., Kanno A., Ozawa T., Tao H. and Umezawa Y., 2007.** Nongenomic activity of ligands in the association of androgen receptor with SRC. *ACS Chem. Biol.* ; 2 : 484-492.
- Krieg M., Nass R. and Tunn S., 1993.** Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* ; 77 (2) : 375-381.
- Kroemer G. and Jäätelä M., 2005.** Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* ; 5 : 886-897.
- Kronz J.D., Allan C.H., Shaikh A.A. and Epstein J.I., 2001.** Predicting cancer following a diagnosis of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy : data on men with more than one follow-up biopsy. *Am. J. Surg. Pathol.* ; 25 : 1079-1085.
- Kumar B., Koul S., Khandrika, L. Meacham R.B. and Koul H.K., 2008.** Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res.* ; 68 : 1777-1785.
- Kumar S., 2007.** Caspases function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* ; 14 (1) : 32-43.

- Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H., Latterich M., Schneider R., Green D.R. and Newmeyer D.D., 2002.** Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* ; 111 :331-342.
- Kwabi-Addo B., Chung W., Shen L., Ittmann M., Wheeler T., Jelinek J. and Issa J.P.J., 2007.** Age-Related DNA Methylation Changes in Normal Human Prostate Tissues. *Clin. Cancer. Res.* ; 13 : 3796-3802.
- Kwiatek W.M., Banaś A., Banaś K., Cinque G., Dyduch G., Falkenberg G., Kisiel A., Marcelli A. and Podgórczyk M., 2007.** Micro and bulk analysis of prostate tissues classified as hyperplasia. *Spectrochim. Acta Part B* ; 62 : 707-710.
- Kyprianou N., Tu H. and Jacobs S.C., 1996.** Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Hum. Pathol.* ; 27 : 668-675.
- Lambright C., Ostaby J., Bobseine K., Wilson V., Hotchkiss A.K., Mann P.C. and Gray Jr., L.E., 2000.** Cellular and molecular mechanisms of action of linuron : an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformation in male rats. *Toxicol. Sci.* ; 56 : 389-399.
- Lauwreys R.R., 1992.** Toxicologie Industrielle ET Intoxications Professionnelles. 3<sup>e</sup> éd, Masson, Paris : 547 – 605.
- Laws S.C., Yavanhxay S., Cooper R.L. and Eladridge J.C., 2006.** Nature of the binding interaction for 50 structurally diverse chemicals with rat estrogen receptors. *Toxicol. Sci.* ; 94 (1) :46-56.
- Leoz-Garziandia E., 2003.** Programme pilote national de surveillance des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). *INERIS* ; 876 (2) : 1-36.
- Levi Y., 1999.** Les micropolluants à effets modulateurs endocriniens. *Spectra. Analisis* ; 208 (5-6): 19-22.
- Levine R.L., 2002.** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* ; 32 : 790-796.
- Li J.J., Fan M. and Colburn N.H., 1998.** Inhibition of AP-1 and NF-kappaB by manganese-containing superoxide dismutase in human breast cancer cells. *FASEB J.* ; 12 : 1713-1723.
- Lin X., Tascilar M., Lee W.H., Vles W.J., Lee B.H., Veeraswamy R., Asgari K., Freije D., van Rees B., Gage W.R., Bova G.S., Isaacs W.B., Brooks J.D., DeWeese T.L., De Marzo A.M. and Nelson W.G., 2001.** GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am. J. Pathol.* ; 159 : 1815-1826.
- Linos C.M., Azzolini C.B.F., Nunes D.S.V., Silva J.M.R. and da Silveira I.N., 1998.** Methods for the determination of organochlorine pesticide residues in human serum. *Journal of Chromatography B* ; 716 : 147-152.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. et Wang X., 1996.** Induction of apoptotic program in Cell-free extracts : requirement for d ATP and cytochrome. *Cell* ; 86 : 147-157.
- Lou Z. et Chen J., 2006.** Cellular senescence and DNA repair. *Exp. Cell. Res.* ; 312 : 2641-2646.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* ; 193 : 265-275.

- Lukaszewicz-Hussain A., 2001.** Organophosphate Insecticide Chlorfenvinphos Affects Superoxide Dismutase, Catalase and Malondialdehyde in Rat Liver. *Polish J. Environ. Stud.* ; 10 (4) : 279-282.
- Lukaszewicz-Hussain A. and Moniuszko-Jakoniuk J., 2003.** Liver Catalase, Glutathione Peroxidase and Reductase activity, Reduced Glutathione and Hydrogen Peroxide Levels in Acute Intoxication with Chlorfenvinphos, an organophosphate Insecticide. *Polish J. Envir. Stud.* ; 13 (3) : 303-309.
- Lúthi A.U. and Martin S.J., 2007.** The Casbah : a searchable database of caspase substrates. *Cell. Death. Differ.*, 14 : 641-650.
- Luzardo O.P., Mahtani V., Troyano J.M., Alvarez de la Roza M., Padilla-Pérez A.I., Zumbado M., Almeida M., Burillo-Putze G., Boada C. and Boada L.D., 2009.** Determinants of organochlorine levels detectable in the amniotic fluid of women from Tenerife Island (Canary Islands, Spain). *Environ. Res.* ; 109 (5) : 607-613.
- Ly J.D., Grubb D.R. and Lawen A., 2003.** The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ) in apoptosis ; an update. *Apoptosis* ; 8 : 115-128.
- Madersbacher S., Haidiner G., Temml C. and Christian P., 1998.** Prevalence of lower urinary tract symptoms in Austria as assessed by an open survey of 2096 men. *Eur. Urol.* ; 34 : 136-141.
- Madersbacher S., Alivizatos G., Nordling J., Sanz C.R., Emberton M. and de la Rosette J.J., 2004.** Guidelines on assessment, therapy and follow-up of men with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction (BPH-guidelines). *Eur. Urol.* ; 46 : 547-554.
- Mannheim B., 1998.** Apoptosis and cell proliferation. *GmbH, Biochemica, 2<sup>e</sup> ed, Germany* ; pp 143.
- Marc J. 2004.** Effets toxiques d'herbicides à base de glyphosate sur la régulation du cycle cellulaire et le développement précoce en utilisant l'embryon d'oursin. Thèse de doctorat, *Université de Rennes I, France*, pp : 127.
- Marker P.C., Donjacour A.A., Dahiya R. and Cunha G.R., 2003.** Hormonal, Cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.*, 253 : 165-174.
- Marnett L.J., 1999.** Chemistry and Biology of DNA damage by Malondialdehyde. *IARC Sci. Publ.* ; 150 : 17-27.
- Martin P.M., Muracciobe X., Berenguer C., Boudouresque F. et Ouafik L'H., 2008.** Evaluation de la cellule normale à la cellule cancéreuse prostatique hormonodépendante-hormono-indépendante. *Med. Nuc.* ; 32 : 5-23.
- Mate M.J., Ortiz-Lombardia M., Boitel B., Haouz A., Tello D., Susin S.A., Penninger J., Kroemer G. and Alzari P.M., 2002.** The crystal structure of the mouse apoptosis inducing factor AIF. *Nat. Struct. Biol* ; 9 : 442-446.
- Mazel S., Burtrum D. and Petrie H.T., 1996.** Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression : a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J. Exp. Med.* ; 183 : 2219-2226.
- Mc-Cunney R.J., 2005.** Asthma, genes and air pollution. *J. Occup. Environ. Med.* ; 47 : 1285-1291.
- McNair H. and Miller J.M., 1998.** Basic gas chromatography. *A Wiley-Interscience Publication*, pp : 194.



- Mcperson S.J., Ellem S.J., Simpson E.R., Patchev V., Fritzemeier K.H. and Risbridger G.P., 2007.** Essential role for estrogen receptor beta in stomal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* ; 148 : 566-574.
- Meagher E.A. and Fitzgerald G.A., 2000.** Indices of lipid peroxidation in vivo : strengths and limitation. *Free Radic. Biol. Med.* ; 28 : 1745-1750.
- Medina C.M., Pitarch E., Portolés T., López F.J. and Hernández F., 2009.** GC-MS/MS multi-residue method for the determination of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in human breast tissues. *J. Sep. Sci.* ; 32 (12) : 2090-2102.
- Mehraein-Ghomi F., Lee E., Church D.R., Thompson T.A., Basu H.S. and Wilding G., 2008.** JunD mediates androgen-induced oxidative stress in androgen dependent LNCaP human prostate cancer cells. *Prostate* ; 68 : 924-934.
- Mendham J., Denney R.C., Barnes J.D., Thomas M.J.K., 2005.** Analyse chimique quantitative de Vogel. *De Boeck, 6<sup>e</sup> éd ; pp 890.*
- Michalowicz J. and Duda W., 2006.** Phenols-Sources and Toxicity. *Polish J. Environ. Stud.* ; 16 (3) : 347-362.
- Micheau O. and Tschopp J., 2003.** Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* ; 114 : 181-190.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P. and Moll U.M., 2003.** P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell.* ; 11 : 577-590.
- Mimeault M. and Batra S.K., 2011.** Frequent Gene Products and Molecular Pathways Altered in Prostate Cancer -and Metastasis- Initiating Cells and Their Progenies and Novel Promising Multitargeted Therapies. *Mol. Med.*; 17 (9-10): 949-964.
- Mirza A., McGuirk M., Hockenberry T.N., Wu Q., Asha H., Black S., Wen S.F., Wang L., Kirschmeier P., Bishop W.R., Nielsen L.L., Pickett C.B. and Liu S., 2002.** Human survivin is negatively regulated by wild-type p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* ; 21 :2613-2622.
- Miyake H., Hara I., Gleave M.E. and Eto H., 2004.** Protection of androgen-dependent human prostate cancer cells from oxidative stress-induced DNA damage by over-expression of clusterin and its modulation by androgen. *Prostate* ; 61 : 318-323.
- Monge M., 2006.** Cancer de la prostate. In : Monge M., Bergeron C., Lacroise I., Olichon D., et Schlageter M.H., Cancérologie et biologie. Marqueurs tumoraux organe par organe. *Elsevier Masson ; p : 1-27.*
- Monteiro H.P. and Stern A., 1996.** Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free. Rad. Biol. Med.* ; 21 : 323-333.
- Mottet N., Costa P. et Bali J.P., 1999.** Système nerveux végétatif et physiologie prostatique. Particularités du système alpha adrénergique. *Prog. Urol.* ; 9 : 26-36.
- Multigner L., Ndong J.-R., Oliva A. et Blanchet P., 2008.** Polluants environnementaux et cancer de la prostate. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* ; 36 : 848-856.
- Nakano K. and Vousden K.H., 2001.** PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell.* ; 7 : 683-694.

- Nantermet P.V., J.Xu, Yu Y., Hodor P., Holder D., Adamski S., Gentile M.A., Kimmel D.B., Harada S., Gerhold D., Freedman L.P. and Ray W.J., 2004.** Identification of Genetic Pathways Activated by the Androgen Receptor during the Induction of Proliferation in the Ventral Prostate Gland. *J. Biol. Chem.* ; 279 (2) : 1310-1322.
- Nastiuk K.L., Kim J.W., Mann M. and Krolewski J.J., 2003.** Androgen regulation of FLICE-like inhibitory protein gene expression in the rat prostate. *J. Cell. Physiol.* ; 196 : 386-393.
- Nelson W.G., deMarzo A.M., deWeese T.L. and Isaacs W.B., 2004.** The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J. Urol.* ; 172 : S6-11.
- Nicholson D.W., 1999.** Caspase structure, proteolytic substrats, and function during apoptotic cell death. *Cell. Death. Differ.* ; 6 : 1028-1042.
- Nomura S., Daidoji T., Inoue H., and Yobeota H., 2008.** Differential metabolism of 4-n-and 4-tert-octylphenols in perfused rat liver. *Life Sci.*, 83(5-6) : 223-228.
- Novara G., Galfano A., Berto R.B., Ficarra V., Navarrete R.V. and Artibani W., 2006.** Inflammation, Apoptosis, and BPH: What is the Evidence? *Europ. Urol. Supp.* ; 5 : 401-409.
- Nulton-Persson A.C., 2001.** Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* ; 276 : 23357-23361.
- Nupponen N.N. and Visakorpi T., 2000.** Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microsc. Res. Tech.* ; 51 : 456-463.
- O’Kane H.F., Watson C.J., Johnston S.R., Petak I., Watson R.W. and Williamson K.E., 2006.** Targeting death receptors in bladder, prostate and renal cancers. *J. Urol.* ; 175 (2) : 432-438.
- O’Reilly L.A., Huang D.C.S. and Strasser A., 1996.** The cell death inhibitor Bcl-2 and its hologues influence control of cell cycle entry. *EMBO. J.* ; 15 (24) : 6979-6990.
- Oberley T.D., 2002.** Oxidative damage and cancer. *Am. J. Path.* ; 160 : 403-408.
- Okano H., Shiraki K., Inoue H., Kawakita T., Yamanaka T., Deguchi K. and Nakano T., 2003.** Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a heptocellular carcinoma. *Lab. Invest* ; 83 : 1033-1043.
- Okhawa H., Ohishi N. and Yagi K., 1979.** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem.* ; 95: 351-358.
- Olinski R., Zastawny T.H., Foksinski M., Barecki A. and Dizdaroglu M., 1995.** DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia. . *Free Radic. Biol. Med.* ; 18 (4) : 807-813.
- Oropeza-Hernandez L.F., Sierra-Santoyo A., Cebrian M.E., Manno M. and Albores A., 2001.** Ovariectomy modulates the response of some cytochrome P450 isoenzymes to lindane in rat. *Toxicol. Lett.* ; 124 : 91.
- Orrenius S., 2007.** Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug. Metab. Rev.* ; 39 : 443-455.
- Owusu-Ansah E., Yavari A., Mandal S. and Banerjee U., 2008.** Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat. Genet.* ; 40 : 356-361.

- Ozmen H., Erulas F.A., Karatas F., Cukurovali A. and Yalcin O., 2006.** Comparison of the concentration of trace metals (Ni, Zn, Co, Cu and Se), Fe, vitamins A, C and E, and lipid peroxidation in patients with prostate cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* ; 44 : 175-179.
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N., 1967.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* ; 70 : 158-169.
- Pang G.F., Cao Y.Z., Zhang J.J., Fan C.L., Liu Y.M., Li X.M., Jia G.Q., Li Z.Y., Shi Y.Q., Wu Y.P. and Guo T.T., 2006.** Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* ; 1125 : 1–30
- Pang S., Cao J.Q., Katz B.H., Hayes C.L., Sutter T.R. and Spink D.C., 1999.** Inductive and inhibitory effect of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls on estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 1B1. *Biochem. Pharmacol.* ; 58(1) : 29-38.
- Papp L.V., Lu J., Holmgren A. and Khanna K.K., 2007.** From selenium to selenoproteins : synthesis, identity and their role in human health. *Antioxid. Redox. Signal* ; 9(7) : 775-806.
- Pastore A., Federici G., Bertini E. and Piemonte F., 2003.** Analysis of glutathione : implication in redox and detoxification. *Clin.Chim. Acta.* ; 333 : 19-39.
- Pasupathi P., Saravanan G. and Farook J., 2009.** Oxidative Stress Bio Markers and Antioxidant Status in Cigarette Smokers Compared to Nonsmokers. *J. Pharm. Sci. & Res.* ; 1 (2) : 55-62.
- Petronilli V., Nicolli A., Costantini P., Colonna R. and Bernardi P., 1994.** Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochem. Biophys. Act.* ; 1187 : 255-259.
- Pichon V., 2006.** Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques. *Techniques d'ingénieur, pp* : 2.
- Pincemail J., Defraigne J.O., Meurisse M. et Limet R., 1998.** Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 2ème partie: la vitamine E. *Prévention, Medi Sphere* ; pp : 5.
- Pincemail J., Lecomte J., Collart E., Castiaux J.P. et Defraigne J., 2001.** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaisseaux, Cœur, Poumons* ; 6 (5) : 1-3.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J-O., 2002.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nut. Clin. Met.* ; 16 : 233–239.
- Prins G.S. and Korach K.S., 2008.** The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* ; 73 : 233-244.
- Putnam C.D., Arvai A.S., Bourne Y. and Tainer J.A., 2000.** Active and Inhibited Human Catalase Structures : Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism
- Qian J., Wollan P. and Bostwick D.G., 1997.** The extent and multicentricity of high grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* ; 28 : 143-148. *J. Mol. Biol.* ; 296 : 295-309.
- Rathmell F.C. and Thompdon C.B., 2002.** Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* ; 109 : 97-107.

- Reed J.C., 1999.** Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* ; 17 : 2941-2953.
- Riedl S.J. and Shi Y., 2004.** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* ; 5 : 897-907.
- Ripple M.O., Henry W.F., Rago R.P. and Wilding G., 1997.** Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* ; 89 : 40-48.
- Robles A.I., Bemmels N.A., Foraker A.B. and Harris C.C., 2001.** APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res.* ; 61 : 6660-6664.
- Roger P., Sahla M.E., Makela S., Gustafsson J.A., Baldet P. and Rochefort H., 2001.** Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* ; 60 : 2537-2541.
- Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S. and Reed J.C., 1997.** The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo. J.* ; 16 : 6914-6925.
- Rubio-Moscardo F., Blesa D., Mestre C., Siebert R., Blasas Y., Benito A., Rosenwald A., Climent J., Martinez J.I., Schilhabel M., Karran E.L., Gesk S., Esteller M., deLeeuw R., Staudt L.M., Fernandez-Luna J.L., Pinkel D., Dyer M.J. and Martinez-Climent J.A., 2005.** Characterisation of 8p21-3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma : TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* ; 106 : 3214-3222.
- Saelens X., Festjens N., Vande Wall L., Van Gurp M., Van Lov G. and Vandenabeele P., 2004.** Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* ; 23 : 2861-2874.
- Safe S. and Krishnar V., 1995.** Chlorinated hydrocarbons : estrogens and antiestrogens. *Toxicol. Lett.* ; 82-83 : 731-736.
- Saillenfait A.M. et Laudet-Hesbert A., 2005.** Phtalates. *EMC-Toxicologie-Pathologie* ; 2 (1) : 1-13.
- Saint-Laurent L. et Rhains M., 2004.** Les phtalates : Etat des connaissances sur la toxicité et l'exposition de la population generale. *Communiqué de veille toxicologique.* pp : 9.
- Saito K., Sjödin A., Sandau C.D., Davis M.D., Nakazawa H., Matsuki Y. and Patterson Jr D.G., 2004.** Development of accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis. *Chemosphere* ; 57 : 373-381.
- Saker W.A., Grignon D.J., Crissman J.D., Heilbrun L.K., Cassin B.J., Pontes J.J. and Haas G.P., 1994.** High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69 : an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* ; 8 : 439-443.
- Salido G.M. and Rosado J.A., 2009.** Apoptosis : Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis. *Springer* ; pp 235.
- Samir M. and el Kholy N.M., 1999.** Thiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer. *Clin. Otolaryngol* ; 24 : 232-234.
- Sanderson J.T., Seinen W., Giesy J.P. and Van den Berg M., 2000.** 2-chloro -s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells : a novel mechanism for estrogenicity ? *Toxicol. Sci.* ; 54 : 121-127.

- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Kramer P.H. and Peter M.E., 1998.** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo. J.* ; 17 : 1675-1687.
- Schmitt S. et Bertrand R., 2001.** Mécanismes de régulation de l'apoptose : implication dans le traitement des cancers. *Reviews in Biology and Biotechnology* ; 1 (2) : 2-16.
- Schrader T.J. and Cooke G.M., 2000.** Examination of selected food additives and organochlorine food contaminants for androgenic activity in vitro. *Toxicol. Sci.* ; 53-(2) : 278-288.
- Schulze-Osthoff K., 2008.** How cells die: Apoptosis and other cell death pathways. In : Roche Diagnostics GmbH. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation, 4<sup>e</sup> ed, Germany ; pp 178.
- Schutte B., Henfling M., Kolgen W., Bouman M., Meex Leers M.P., Nap M., Bjorklund V., Bjorklund P., Bjorklund B., Lane E.B., Omary M.B., Jörnvall H. and Ramaekers F.C., 2004.** Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp. Cell. Res.* ; 297 : 11-26.
- Sherwood E., Fong C., Lee C. and Kozlowski J., 1992.** Basic fibroblast growth factor : a potential mediator of stromal growth in the human prostate. *Endocrinology* ; 130 : 2955-2963.
- Sikka S.C. and Wang R., 2008.** Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl.* ; 10 (1) : 134-145.
- Simpson R.J., 1997.** Benign prostatic hyperplasia. *Br. J. Gen. Pract.* ; 47 : 235-240.
- Singleton D.W. and Khan S.A., 2003.** Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Frontiers in Bioscience* ; 8 : 110-118.
- Sohal R.S. and Weindruch R., 1996.** Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* ; 273 : 59-63.
- Solétormos G., Semjonow A., Sibley P. E.C., Lamerz R., Petersen P.H., Albrecht W., Bialk P., Gion M., Junker F., Schmid H-P. and Van Poppel H., 2005.** Biological Variation of Total Prostate-Specific Antigen: A Survey of Published Estimates and Consequences for Clinical Practice. *Clin. Chem.* ; 51 (8) : 1342-1351.
- Sonnenschein C. and Soto A.M., 1998.** An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* ; 65 (1-6) : 143-150.
- Stephan C., Jung K., Lein M. and Diamandis E.P., 2007.** PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. *E.J.C.* ; 43 : 1918-1926.
- Tamura H., Maness S.C., Reischmann K., Dorman D.C., Gray L.E. and Gaido K.W., 2001.** Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion. *Toxicol. Sci.* : 60 : 56-62.
- Tavares R.S Martins F.C., Oliveira P.J., Ramalho-Santos J. and Peixoto F.P., 2009.** Parabens in male infertility- Is there a mitochondrial connection? *Reproductive Toxicology* ; 27 : 1-7.
- Taylor R. C., Cullen S. P. and Martin S. J., 2008.** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* ; 9 : 231-241.
- Tazi K., El Fassi J., Karmouni T., Koutani A., Hachimi M. et Lakrissa A., 2001.** Léiomyosarcome prostatique (à propos de deux cas). *Progrès en Urologie* ; 11 : 86-90.

- Testud F. et Grillet JP., 2007.** Produits phytosanitaires : Intoxications aiguës et Risques professionnels. *ESKA, Paris* : 87-204.
- Tomlins S.A., Mehra R., Rhodes D.R., Cao X., Wang L., Dhanasekaran S.M., Kalyanasundaran S., Wei J.T., Rubin M.A., Pienta K.J., Shah R.B. and Chinnaiyan A.M., 2007.** Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat. Genet.* ; 39 : 41-51.
- Tostain J., Rossi D. and Martin P.M., 2004.** Physiology of androgens in adult men. *Prog. Urol.* ; 14 : 629-660.
- Townsend D.M., Tew K.D. and Tapiero H., 2003.** The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* ; 57 : 145-155.
- Toyama T., Momotani N., Ogata Y., Miyamori Y., Inoue D., Sei K., Mori K., Kikuchi S. and Ike M., 2010.** Isolation and Characterization of 4-tert-Butylphenol- Utilizing *Sphingobium fuliginus* strains from *Phragmites australis* Rhizosphere sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 76 (20) : 6733-6740.
- Trzeciak A.R., Nyaga S.G., Jaruga P., Lohani A., Dizdaroglu M. and Evans M.K., 2004.** Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis* ; 25 (8) : 1359-1370.
- Tsujii T., Azuma H., Yamaguchi T. and Oshima H., 1992.** A possible role of decreased relaxation mediated by beta-adrenoceptors in bladder outlet obstruction by benign prostatic hyperplasia. *Br. J. Pharmacol.* ; 107 : 803-807.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J. and Telser J., 2004.** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* ; 266 : 37-56.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* ; 160 : 1-40.
- Van den Berg M., Sanderson T., Kurihara N. and Katayama A., 2003.** Role of metabolism in the endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems. *Pure Appl. Chem.* ; 75 (11-12) : 1917-1932.
- Van der Hoff G.R. and van Zoonen P., 1999.** Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* ; 843 : 301-322.
- Van Gurp M., Festjens N., Van Loo G., Saelensx. and Vandenameele P., 2003.** Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ; 304 : 487-497.
- Van Leenders G.J., Gage W.R., Hicks J.L. van Balken B., Aalders T.W., Schalken J.A. and De Marzo A.M., 2003.** Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am. J. Pathol.* ; 162 (5) : 1529-1537.
- Van Zoonen P., 1996.** Analytical Methods for pesticides Residues in Foodstuffs. In : Drukkerij T.O. and Offset B.V., The Inspectorate for Health Protection Ministry of Public Health, Welfare and Sport. *Maasstricht, The Netherlands.*
- Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Slike J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J. and Vaux D.L., 2000.** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* ; 102 : 43-53.

- Verhagen A.M., Silke J., Ekert P.G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L.M., Day C.L, Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R.L., Simpson R.J. and Vaux D.I., 2002.** HTrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem* ; 277 (1) : 445-454.
- Vermeulen A., Kaufman J.M., Goemaere S., and Van Pottelberg I., 2002.** Estradiol in elderly men. *Aging Male* ; 5 : 98-102.
- Wang W., and Ballatori N., 1998.** Endogenous glutathione conjugates : occurrence and biological functions. *Pharm. Rev.* ; 50 (3) : 335-355.
- Watson C.S., Bulayeva N.N., Wozniak A.L. and Alyea R.A., 2007.** Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids* ; 72 (2) : 124-134.
- Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H., Lindstein T., Panoutsakopoulou V., Ros A.J., Roth K.A., Mac Gregor G.R., Thompson C.B. and Korsmeyer S.J., 2001.** Proapoptotic Bax and Bak : a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* ; 292 : 727-730.
- Weihua Z., Warner M. and Gustafsson J.A., 2002.** Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol. Cell. Endocrinol.* ; 193 : 1-5.
- Widlak P. and Garrard W.T., 2005.** Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J. Cell. Biochem.* ; 94 : 1078-1087.
- Wittke K., Hajimiragha H., Dunemann L. and Begerow J., 2001.** Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure. *Journal of Chromatography B* ; 755 : 215-228.
- Wittkowski R. and Matissek R., 1990.** Capillary Gas Chromatography in Food Control and Research. *Lancaster Basel, pp* : 377.
- Ye H., Cande C., Stephanou N.C., Jiang S., Curbuxani S. and Wu H., 2002.** DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* ; 9 : 680-684.
- Yin X.M., Oltvai Z.N. and Korsmeyer S.J. 1994.** BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* ; 369 : 321-323.
- Yuan J.J., Coplen D.E., Petros J.A., Figenschau R.S., Ratliff T.L., Smith D.S. and Catalona W.J., 1992.** Effects of rectal examination, prostatic massage, ultrasonography and needle biopsy on serum prostate specific antigen levels. *J. Urol.* ; 147 (3) : 810-814.
- Zachara B.A., Gromadzińska J., Wąsowicz W. and Zbróg Z., 2006.** Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. *Acta Biochimica Polonica* ; 53 (4) : 663-677.
- Zamzami N. and Kroemer G., 2001.** The mitochondrion in apoptosis : how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* ; 2 : 67-71.
- Zelko I.N., Marian T.J. and Folz R.J., 2002.** Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the Cu Zn-SOD (SOD 1), Mn-SOD (SOD 2), and EC-SOD (SOD) gene structures, evolution and expression. *Free Rad. Biol. Med.* ; 33 (3) : 337-349.
- Zhang H., Xu Q., Krajewski S., Krajewska M., Xie Z., Fuess S., Ktada S., Pawlowski K., Godzik A. and Reed J.C., 2000.** BAR : an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; 97 : 2597-2602.

**Zhao G., Wang Z., Zhou H. and Zhao Q., 2009.** Burdens of PBBs, PBDEs and PCBs in tissues of the cancer patients in the e-waste disassembly sites in Zhejiang, China. *Science of the Total Environment* ; 407 : 4831-4837.

**Zhu Y.S., Cai L.Q., Huang Y., Fish J., Wang L., Zhang Z.K. and Imperato-McGinley J.L., 2005.** Receptor isoform and ligand-specific modulation of dihydrotestosterone-induced prostate tumor cell growth by estrogens. *J. Androl.* ; 26 : 500-510.

**Ziada A., Rosenblum M. and Crawford E.D., 1999.** Benign prostatic hyperplasia : an overview. *Urology* ; 53 : 1-6.

**Zong W.X., Li C., Hatzivassiliou G., Lindsten T., Yu Q.C., Yuan J. and Thompson C.b., 2003.** Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell. Biol* ; 162 : 59-69.



# *Annexes*

**Annexes****Annexe 1****Préparation de la solution de Lowry*****Solution alcaline***

Carbonate de calcium anhydre .....	189 mM (20 g/l)
Tartrate de sodium et de potassium.....	7 mM (0,2 g/l)
Hydroxyde de sodium.....	0,1 N (4 g/l)

***Solution cuivrique***

Sulfate de cuivre (II).....	40 mM (10 g/l)
Acide sulfurique concentré (18N).....	1 goutte

La solution de Lowry est composée d'un mélange de 15 ml de la solution alcaline et de 150  $\mu$ l de la solution cuivrique. Elle doit être préparée le jour du dosage.

**Annexe 2****Tableau 4.** Les caractéristiques des pics N° 11, 14, 30, 51 et 81 du chromatogramme du premier échantillon d'adénome prostatique.

N° du pic	Nom du composé	Temps de rétention (min)	Base m/z	Surface %
11	2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)-phénol	6,087	191,15	1,79
14	Diethyl phtalate	7,225	149,05	0,19
30	2,6 diisopropyl naphtalene	10,267	197,15	0,14
51	Dibutylphtalate	14,590	149,10	2,40
81	1-phenanthrene carboxylic acid, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, [1r-(1 $\alpha$ ,4a $\beta$ ,10a $\alpha$ )]-	22,681	123,10	0,24

**Tableau 5.** Les caractéristiques des pics N° 68, 83, 85, 91, 105, 111 et 123 du chromatogramme du deuxième échantillon d'adénome prostatique.

N° du pic	Nom du composé	Temps de rétention (min)	Base m/z	Surface %
68	1,3-diméthyle-naphtalène	6,527	156,10	0,22
83	1,4,6-triméthyle-naphtalène	7,738	155,05	0,15
85	2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)-phénol	7,880	191,10	3,09
91	1,6,7-triméthyle-naphtalène	8,533	155,10	0,12
111	2,6-diisopropyl-naphtalène	10,997	197,10	0,14
123	Dibutyl phtalate	14,850	149,05	0,99

ZABAIYOU Nada	Directeur de recherche : Pr. LAHOUEL Mesbah
<b>Thème : Contribution à l'étude de l'implication du stress oxydatif et de l'apoptose dans l'adénome prostatique et de sa relation avec les xénoestrogènes</b>	
<p><b>Résumé</b></p> <p>Afin de démontrer l'implication de certains facteurs dans le développement de l'adénome prostatique, nous nous sommes dirigés vers l'étude du stress oxydatif et de l'apoptose dans les tissus prostatiques de 10 malades atteints d'adénomes prostatiques et d'un malade ayant une néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade, ainsi que vers la recherche des xénoestrogènes y pouvant être présents.</p> <p>Nous avons donc mesuré quelques paramètres du stress oxydatif et delà, démontré qu'il est impliqué et de manière très importante dans cette pathologie.</p> <p>Nous avons également mis en évidence l'existence d'une liaison entre le développement de l'adénome et des cancers prostatiques et l'apoptose, due à l'inhibition de cette dernière, au moins, au niveau de la phase de l'exécution assurée par les caspases effectrices -3. En fin, nous avons recherché la présence des xénoestrogènes par GC/MS, substances pouvant conduire à des perturbations endocriniennes prostatiques. Nous avons révélé la présence seulement de certains phénols et phtalates alors que les pesticides étaient totalement absents.</p> <p>En conclusion, notre travail souligne que l'adénome prostatique résulte de l'association d'une multitude de facteurs endogènes et exogènes conduisant, <i>in fine</i>, à une perturbation de l'homéostasie cellulaire prostatique quelque soit le mécanisme.</p> <p><b>Mots clés :</b> Adénome prostatique, Néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade, Stress oxydatif, Apoptose, Xénoestrogènes.</p>	
<p><b>Abstract</b></p> <p>To reveal the involvement of some factors in the development of prostatic adenoma, we headed towards the study of oxidative stress and apoptosis in the prostatic tissues of 10 patients with prostatic adenoma and one with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, as well as research of xenoestrogens can be present in these tissues. We measured several parameters of oxidative stress and demonstrated that it is involved and is very important in this disease.</p> <p>We also highlighted the existence of a link between the development of prostatic adenoma and prostate cancers and apoptosis, due to the inhibition of the latter, at least, at the execution phase executed by effector caspases -3. In the end, we investigated the presence of xenoestrogens by GC/MS, substances that can lead to prostate endocrine disruption. We only revealed the presence of some phenols and phtalates while the pesticides were completely absents. In conclusion, our work highlights that prostatic adenoma results from the combination of a multitude of endogenous and exogenous factors leading, ultimately, to a disruption of prostate cell homeostasis, whatever the mechanism.</p> <p><b>Key words :</b> Prostatic adenoma, High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, Oxidative stress, Apoptosis, Xenoestrogens.</p>	
<p style="text-align: right;"><b>ملخص</b></p> <p>من اجل التعرف على إمكانية تدخل بعض العوامل في بروز وتطور مرض تضخم البروستاتا الحميد، اتجهنا نحو دراسة الإجهاد التأكسدي والموت الخلوي المبرمج لدى 10 أشخاص مصابين بتضخم البروستاتا الحميد ومريض آخر مصاب بالورم النيوپلازي البروستاتي، هذا بالإضافة إلى البحث عن الاستروجينات الخارجية المحتمل وجودها هناك.</p> <p>وفي هذا الصدد قمنا بقياس بعض معلمات الإجهاد التأكسدي وتأكيد تدخل هذا الأخير وبدرجة مهمة في هذا المرض. هذه الدراسة بينت أيضاً وجود علاقة بين تطور المرض وظاهرة الموت الخلوي المبرمج راجعة إلى تثبيط هذه الأخيرة خلال المرحلة التنفيذية المنفذة بواسطة الكاسباس 3.</p> <p>في النهاية، وبواسطة كروماتوغرافيا الغاز/ مطيافية الكتلة، قمنا بالبحث عن الاستروجينات الخارجية، هذه الأخيرة تؤدي إلى اضطرابات هرمونية على مستوى البروستاتا. بعض الفينولات و الفثالات كانت موجودة لكن المبيدات كانت غائبة تماماً. وكخلاصة، يمكننا القول أن تضخم البروستاتا الحميد ينتج عن تراكم عدة عوامل داخلية وخارجية والتي بدورها تؤدي إلى اختلالات في التوازن الخلوي على مستوى البروستاتا أياً كانت الآلية.</p> <p><b>الكلمات المفتاحية :</b> تضخم البروستاتا الحميد، الورم النيوپلازي البروستاتي، الإجهاد التأكسدي، الموت الخلوي المبرمج، الاستروجينات الخارجية.</p>	