



Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel
Faculté de sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

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

Thèse

Présentée par

M^{me} LARICHE Nesrine

En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat 3^{ème} Cycle (LMD)

Spécialité : BIOLOGIE ET SANTÉ

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

Modulation par féruléol de l'activité anticancéreuse et ciblage de protéines Bcl2 et Hsp90 au cours d'un cancer pulmonaire induit expérimentalement par le Benzo[a]pyrène

Soutenue publiquement le : 17/ 12/ 2017

Membres de Jury:

Président : Pr LEGHOUCI Essaid (Université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel)

Rapporteur : Pr LAHOUEL Mesbah (Université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel)

Examineurs: Pr NAIMI Dalila (Ecole Nationale de Biotechnologie de Constantine)

Pr ARRAR Lekhmici (Université de Sétif 1)

Pr RECHRECHE Hocine (Université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel)

Année universitaire: 2016/2017

Remerciements

C'est un honneur et un plaisir pour moi de pouvoir remercier ici les personnes dont l'aide, le soutien et les conseils m'ont été si précieux tout au long de la réalisation de cette thèse.

En premier lieu, je tiens à remercier **DIEU** le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donnée durant toutes les années d'études.

Je tiens à apporter le témoignage de ma respectueuse reconnaissance au Pr. **Mesbah LAHOUEL**, Professeur à la Faculté de sciences de la nature et de la vie de l'université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel, directeur et chercheur du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire qui a su guidé mes premiers pas dans le monde passionnant de la recherche. Je vous remercie de votre confiance et de l'immense disponibilité que vous avez toujours consacrés ainsi, que votre aide et vos précieux conseils tout au long de ce travail. J'ai pu également apprécier votre grande rigueur et votre gentillesse. C'est une immense joie et honneur de l'avoir aujourd'hui à mes côtés, comme toujours d'ailleurs, dans la concrétisation de l'avènement d'aujourd'hui.

Mes plus sincères remerciements s'adressent au Pr. **Essaïd LEGHOUCI**, Professeur à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel. Je suis particulièrement sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse. Je suis heureuse de vous exprimer mon profond respect.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance au Pr. **Dalila NAIMI**, Sous - directrice et Professeur à l'Ecole Nationale de Biotechnologie de Constantine pour m'avoir fait l'honneur d'être l'un des membres examinateurs de ce travail. Je vous remercie pour le temps et l'effort que vous avez consacrés pour la révision de cette thèse. Votre sérieux et votre professionnalisme ont suscité mon respect.

Je tiens tout particulièrement à signifier ma profonde reconnaissance au Pr. **Lekhmici ARRAR**, Professeur à l'université de Sétif 1 pour m'avoir fait l'honneur d'être l'un des membres examinateurs de ce travail. Je vous remercie d'être présent et accessible pour évaluer mon travail de thèse. Je vous prie de croire en l'expression de ma vive gratitude.

J'exprime mes vifs remerciements au Pr. **Hocine RECHRECHE**, Professeur à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel. J'ai eu le privilège de bénéficier de votre enseignement clair et rigoureux. J'ai toujours admiré votre sérieux. Je vous remercie pour m'avoir honoré d'être examinateur de cette thèse.

J'aimerais spécialement présenter ma reconnaissance infinie au **Pr. Bassem JAMOUSSEI**, Directeur de l'Institut Supérieur d'Education et de Formation Continu à Tunis, pour m'avoir intégrée au sein de son équipe. Je suis heureuse de lui exprimer toute ma gratitude pour la sollicitude qu'il m'a témoigné au cours de ce travail. L'aide scientifique qu'il m'a toujours apporté est inestimable.

Je tiens à remercier vivement **Pr. Naziha MARRAKCHI**, Professeur à la Faculté de Médecine de Tunis et chercheur associé à l'Institut Pasteur de Tunis, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans la conduite de mes travaux. Les périodes de travail intenses et enrichissantes m'ont aidé dans la réalisation d'une partie de ma thèse. Je la remercie pour ses orientations et ses conseils scientifiques.

Je profite également de cette occasion pour remercier **Pr. Ammar ZELLAGUI** pour son aide précieux au sein de son Laboratoire de Substances Bioactives de l'université d'Oum el Bouaghi et **Dr. Lamia BENGUEDOUAR**, chercheuse associée au Laboratoire de Toxicologie Moléculaire pour m'avoir aidé dans le laboratoire et pour sa disponibilité.

Je remercie **Dr. Mustapha FEZANI**, chercheur adjoint au laboratoire de Toxicologie Moléculaire pour ses conseils dans le domaine d'informatique et sa disponibilité.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, et notamment à **Dr. Ali Bey HAMEL**, Docteur en anatomie et cytologie pathologique, qui nous a accueilli dans son laboratoire d'histopathologie et qui nous a appris avec rigueur les coupes histologiques pulmonaires. Sans oublier de remercier *Samia et Lamia*. Aussi mes sincères remerciements s'adressent à **Dr. LIAMINI- EI MAJAAT Chadia**, Docteur en Cytologie pathologiques et Immunohistochimie à Sétif d'avoir accepté de réaliser au sein de son laboratoire des analyses immunohistochimiques.

J'aimerais également remercier **Yahia BOUSDJIRA, Assia BOULKOUR et Wahiba FRIOUI**, techniciens du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire pour leurs aides durant cette thèse.

Je remercie toute les doctorantes du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire qui ont partagé avec moi les meilleurs comme les pires moments en particulier : **Salima AISSAOUI, Ilhem BENCHOUIEB, Hamida BOURIDANE, Hadjer BRIHOUM et Karima RIANE**.

Que toute personne ayant pris part de près ou de loin à la réalisation de ce travail trouve ici l'expression de mes très vives reconnaissances.

Dédicaces

Ce travail est dédié...

A mes très chers parents

Je vous remercie pour votre amour et vos encouragements.

Merci pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi sans jamais douter.

J'espère que ce travail sera le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A mon Mari

Pour ton indéfectible soutien, tes encouragements, ta générosité et ta patience.

A mes chers frères et mes très chères sœurs

En témoignant de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et connaissance.

A mes chers petits Bout de chou « Mohammed Wail » et « Alaà »

C'est à toi mes adorables anges, ma joie, mes petits trésors que maman dédie ce travail pour vous dire que vous resterez pour toujours le rayon de soleil qui égaye ma vie.

A toute ma famille et ma belle famille

Pour leur bienveillance et leur soutien moral.

A vous tous qui êtes là, aujourd'hui, à mes côtés.

Résumé

Le féruléol, un sesquiterpène coumarine, est extrait de la plante endémique du Sahara Algérien «*Ferula vesceritensis*». Ce sesquiterpène possède des effets pro-oxydants et anti-prolifératifs contre une large gamme de cancers. **Objectif** : cette thèse est conçue pour étudier l'effet anticancéreux du féruléol en ciblant les protéines apoptotiques Bcl-2, Hsp90 et la glycoprotéine membranaire P-gp dans le cancer pulmonaire expérimental induit par le B[a]P et aussi de tester l'action anti-tumorale du féruléol sur les cellules de l'adénocarcinome pulmonaire humaine A549. **Matériels et méthodes** : La viabilité et la prolifération via le test MTT ainsi que l'adhésion des cellules A549 ont été évaluées en présence de différentes concentrations du féruléol. Quatre groupes de rats Wistar Albinos mâles ont été répartis et traités par le B[a]P et /ou le féruléol. Les rats du groupe 1 servent de contrôles, ceux du groupe 2 ont été injectés par le B[a]P à une dose unique de 100 mg/kg/IP pendant une durée de 24 semaines, les rats du groupe 3 ont été traités par le féruléol à 50 mg/kg/IP après 24 semaines d'injection du carcinogène (comme le groupe 2) et le dernier groupe, les rats ont été injecté par le féruléol seul à 50 mg/kg/IP. Sur des mitochondries pulmonaires isolées, du B[a]P et du féruléol ont été utilisés pour évaluer leurs impacts sur le fonctionnement mitochondrial. **Résultats** : l'effet anticancéreux et cytotoxique du féruléol s'est traduit par une inhibition de la survie et de la prolifération de cellules A549. L'implication de l'effet pro-oxydant du féruléol pour le traitement du cancer pulmonaire induit par le B[a]P est confirmée par une élévation du taux de la MDA et une réduction des capacités antioxydantes enzymatiques et non enzymatique (SOD, CAT, GPx, GST et GSH). Au niveau mitochondrial, une augmentation importante de la production de l' $O_2^{\circ-}$ et aussi du gonflement mitochondrial a été observée après traitement par le B[a]P et le féruléol de même qu'une élévation du taux de la MDA mitochondriale et une diminution de la Mn/SOD. L'effet pro-apoptotique du féruléol s'est révélé par une sur-expression de Bax et une sous-expression de Bcl-2 et d'Hsp90 ce qui permet d'activer l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires. Une inhibition de l'expression de la P-gp augmente l'accumulation intracellulaire du féruléol. **Conclusions** : le féruléol est considéré comme un principe actif du *Ferula vesceritensis* capable d'altérer le fonctionnement de mitochondries pulmonaires par son effet pro-oxydant et de l'utiliser en chimiothérapie par son effet anticancéreux et pro-apoptotique en ciblant les protéines Bcl-2 et Hsp90.

Mots clés : benzo[a]pyrène, féruléol, Bcl-2, Hsp90, P-gp, cancer pulmonaire.

Abstract

Ferulenol, a sesquiterpene coumarin, is extracted from the indigenous plant of Algerian Sahara "*Ferula vesceritensis*". This sesquiterpene has pro-oxidant and anti-proliferative effects against a wide range of cancers. **Objective:** this thesis is designed to study the anticancer effect of ferulenol by targeting the apoptotic proteins Bcl-2, Hsp90 and the membrane glycoprotein P-gp in experimental lung cancer induced by B[a]P and test the anti-tumor action of ferulenol on human adenocarcinoma cells A549. **Materials and methods:** The viability and proliferation via the MTT test as well as the adhesion of the A549 cells were evaluated in the presence of different concentrations of ferulenol. Four groups of male Wistar rats were treated with B[a]P and / or ferulenol. Rats of group 1 were served as controls, rats of group 2 were injected with B[a]P at a single dose of 100 mg/kg /IP for 24 weeks, rats of group 3 were treated with ferulenol at 50 mg/ kg/IP after 24 weeks of the carcinogen injection (as in group 2) and the last group, rats were injected with ferulenol alone at 50 mg/kg/IP. In isolated pulmonary mitochondria, B[a]P and ferulenol were used to assess their impact on mitochondrial function. **Results:** The anticancer and cytotoxic effect of ferulenol resulted an inhibition of the survival and proliferation of A549 cells. The implication of the pro-oxidant effect of ferulenol for the treatment of lung cancer induced by B[a]P is confirmed by an increase in the level of MDA and a reduction of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant (SOD, CAT, GPx, GST and GSH). At the mitochondrial level, a significant increase in O_2° production and mitochondrial swelling was observed after treatment with B[a]P and ferulenol as well as an increase in the mitochondrial MDA level and a decrease in Mn/SOD. The pro-apoptotic effect of ferulenol was revealed by over-expression of Bax and a down-expression of Bcl-2 and Hsp90, which activate the apoptosis of lung cancer cells and the inhibition of the expression of P-gp increases the intracellular accumulation of ferulenol. **Conclusions:** Ferulenol is considered a bioactive substance in *Ferula vesceritensis*, which can alter the function of lung mitochondria by its pro-oxidant effect and it use in chemotherapy with its anticancer and pro-apoptotic effect by targeting Bcl-2 and the Hsp90 proteins.

Key words: benzo[a]pyrene, ferulenol, Bcl-2, Hsp90, P-gp, lung cancer.

ملخص

يعتبر الفيريلينول من السسكتربينات الكومارينية المستخلص من نبتة أصلية من الصحراء الجزائرية و المعروفة علميا باسم *Ferula vesceritensis* حيث تحتوي هذه السسكيتربينات على تأثيرات فعالة محفزة للأوكسدة و مضادة لنمو أنواع عديدة من السرطانات. **الهدف:** تأتي هذه الدراسة لتسليط الضوء على دور الفيريلينول كمكون فعال ضد السرطان من خلال استهداف البروتينات الأوبوتوزية Bcl-2 و Hsp90 و كذلك الغليكوبروتين P-gp أثناء تطور سرطان الرئة التجريبي عن طريق حقن مادة البنزوبيرين و كذلك اختبار قدرة الفيريلينول ضد الأورام السرطانية A549. **المواد وطرق العمل:** تم تقييم و دراسة نمو وتكاثر الخلايا السرطانية A549 عن طريق عدة تركيزات لمادة الفيريلينول باستعمال تجربة MTT. قسمنا في هذه الدراسة 04 مجموعات من سلالة جرد ذكر ابيض Wistar albinos حيث تم حقنها بمادة البنزوبيرين و/أو الفيريلينول. جردان المجموعة الأولى تم استعمالها كشاهد، جردان المجموعة الثانية حقنت بالبنزوبيرين بتركيز 100مغ/كغ لمدة 24 أسبوعا، جردان المجموعة الثالثة تم معالجتها بالفيريلينول بتركيز 50 مغ/كغ بعد 24 أسبوعا من حقن البنزوبيرين أما المجموعة الأخيرة فقد تم حقنها فقط بالفيريلينول بتركيز 50مغ/كغ. تم استعمال البنزوبيرين و الفيريلينول على ميتوكوندريا الرئة لتقييم تأثيرها على عمل الميتوكوندريا. **النتائج:** عمل الفيريلينول من خلال دوره كمضاد سرطاني على تثبيط نمو وتكاثر الخلايا السرطانية A549. إشراك التأثير المحفز للأوكسدة للفيريلينول لعلاج سرطان الرئة الناجم عن البنزوبيرين و المؤكد من خلال ارتفاع مستوى MDA و انخفاض القدرة المضادة للأوكسدة الأنزيمية و الغير الأنزيمية (SOD, CAT, GPx, GST et GSH). لوحظ على مستوى الميتوكوندريا ارتفاع كبير في إنتاج $O_2^{\cdot -}$ و كذلك ارتفاع هام بعد معالجتها بالبنزوبيرين و الفيريلينول و ارتفاع مستوى MDA الميتوكوندري و انخفاض نسبة Mn/SOD. إضافة إلى ذلك لاحظنا تأثير الفيريلينول المحفز للأوبوتوز لخلايا السرطان من خلال ارتفاع نسبة البروتين Bax وانخفاض نسبة البروتينات Bcl-2 و Hsp90 مما يسمح بتنشيط الموت الأوبوتوزي لخلايا سرطان الرئة. كذلك تثبيط نشاط P-gp أدى إلى ارتفاع تكاثف الفيريلينول داخل الخلايا السرطانية. **الاستنتاج:** يعتبر الفيريلينول المستخلص من النبتة *Ferula vesceritensis* مادة فعالة قادر على تغيير عمل ميتوكوندريا الرئة من خلال تأثيراته المحفزة على الأوكسدة الخلوية و كذلك استعماله كمادة للعلاج الكيميائي للسرطان وتأثيره المحفز للأوبوتوز باستهدافه للبروتينات Bcl-2 و Hsp90.

الكلمات الدالة: البنزوبيرين, الفيريلينول , Bcl-2 , Hsp90 , P-gp , سرطان الرئة.

Liste des abréviations

ADN mt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
AHH	Aryle Hydrocarbone Hydrolase
AhR	Aryle hydrocarbone Receptor
AKR	Aldo-Céto réductase
ANT	Adénine Nucléotide Translocase
ARE	Antioxydant Response Element
ARNT	AhR Nuclear Translocator
B[a]P	Benzo[a]pyrene
BH	Bcl-2 Homologie
BPD	B[a]P- Dihydrodiol
BPDE	B[a]P- diol-époxyde
BPQ	B[a]P-O- Quinone
CAPE	Caffeic Acid Phenethyl Ester
CAT	Catalase
CDNB	Chloro-2-4 Dinitrobenzène
Cu/Zn-SOD	Superoxyde dismutase cytosolique
CYP	Cytochrome
DD	Dihydrodiol Déshydrogénase
DMF	N, N Diméthylformamide
DTNB	Dithiobis (2- Nitrobenzoic Acid)
EH	Epoxyde Hydrolase
EGFR	Epithelium Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
γ -GCS	γ - Glutamyl Cystéine

GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
GTP	Guanosine Tri-phosphate
HAPs	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
Hsp	Heat Shok Protein
IP	Intrapéritonéale
MDA	Malondialdéhyde
Mn/SOD	Superoxyde dismutase mitochondriale
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
NBT	Nitrobleutétrazolium
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
PL	Peroxydation Lipidique
RIP-1	Receptor Interacting Protein -1
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memoriel Institute
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SOD	Superoxyde dismutase cytosolique
SQ	Anion semiquinone
SVF	Sérum de Veau Foetal
TRP	Tétratricopeptide de liaison répétée
VDAC	Voltage- dependant Anion Channel

Table des illustrations

Liste des Figures

Figure 1 : Structure du Benzo[a]pyrène.....	3
Figure 2 : Structure chimique du Benzo[a]pyrène (cancérogène) et du pyrène (non cancérogène).....	4
Figure 3 : Principale voie de métabolisation du B[a]P.....	6
Figure 4 : Principaux adduits de l'ADN du BPDE.....	7
Figure 5 : Formation du radical cation.....	8
Figure 6 : Principaux adduits de l'ADN du radical cation du B[a]P.....	9
Figure 7 : voie des quinones.....	10
Figure 8 : Phosphorylation oxydative, production de superoxyde et les voies d'élimination dans les mitochondries.....	11
Figure 9 : Détoxification des métabolites du B[a]P.....	13
Figure 10 : représentation schématique du mécanisme de la carcinogénicité du B[a]P. (A) Initiation tumorale via la formation d'adduits à ADN. (B) Promotion tumorale via la signalisation de l'AhR.....	16
Figure 11 : Schéma simplifié de la structure des protéines de la famille Bcl-2.....	22
Figure 12 : Modulation des voies apoptotiques par les protéines Hsp.....	25
Figure 13 : Structure du féruléol.....	28
Figure 14 : Différents étapes du protocole expérimental.....	33
Figure 15 : (A) Variation des taux du MDA cytosolique de rats traités par le B[a]P et / ou le féruléol. (B) Variation des taux de MDA mitochondriale pulmonaire en présence du féruléol à différentes concentrations.....	50
Figure 16 : Variation des taux du GSH cytosolique de rats traités par le B[a]P et / ou le féruléol.....	53
Figure 17 : (A) Variations des taux de la SOD cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. (B) Variation des taux de la SOD mitochondriale pulmonaire en présence du féruléol à différentes concentrations (n=3). (C) Variations des taux de la CAT cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. (D) Variations des taux de la GST cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. (E) Variations des taux de la GPx cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol.....	57
Figure 18 : Pourcentage de production de l'O ₂ ^{•-} par les mitochondries de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol.....	61
Figure 19 : Production de l'anion superoxyde par les mitochondries pulmonaires en présence du féruléol à différentes concentrations(n=3). (A) la cinétique de production pendant 360 secondes. (B) Pourcentage de production après 360 secondes.....	62
Figure 20 : Production <i>in vitro</i> du radical hydroxyl (OH [•]) par le féruléol à	

différentes concentrations.....	65
Figure 21 : Effet du féruléol sur le gonflement mitochondrial pulmonaire de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol.....	66
Figure 22 : Gonflement de mitochondries pulmonaires en présence du féruléol à différentes concentrations.....	67
Figure 23 : Effet <i>in vitro</i> du B[a]P à différentes concentrations sur la production mitochondriale pulmonaire de l'anion superoxyde.....	68
Figure 24 : Effet <i>in vitro</i> du B[a]P à différentes concentrations sur le gonflement mitochondrial pulmonaire.....	69
Figure 25 : Effet du féruléol sur l'accumulation de protéines Bcl-2/Bax dans le tissu pulmonaire de rat.....	70
Figure 26 : Effet du féruléol sur l'expression de la protéine Hsp90 dans le tissu pulmonaire de rat.....	74
Figure 27 : Détection par immunohistochimie l'expression de la protéine Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats traités par le B[a]P et /ou le féruléol.....	75
Figure 28 : Effet du féruléol sur l'expression de la P-glycoprotéine dans le tissu pulmonaire.....	79
Figure 29 : Examen macroscopique de poumons de rats de différents groupes.....	83
Figure 30 : Photomicrographie de sections de poumons des rats témoins et traités par le B[a]P et/ ou le féruléol.....	85
Figure 31 : Détection immunohistochimique du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67 dans le tissu pulmonaire de rats atteints le cancer pulmonaire par le B[a]P et traités par le féruléol.....	88
Figure 32 : Effet du féruléol sur la viabilité cellulaire.....	89
Figure 33 : Effet du féruléol sur la prolifération cellulaire.....	91
Figure 34 : Effet du féruléol sur la viabilité de cellules A549 pré-traitées par le B[a]P.....	93
Figure 35 : Effet du féruléol sur l'adhésion des cellules A549.....	94

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effet du féruléol sur la variation du poids corporel des rats.....	48
Tableau 2 : Classification TNM du cancer pulmonaire.....	81

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
Chapitre I : Cancer pulmonaire induit par le Benzo[a]pyrène.....	3
1. Métabolisme du Benzo[a]pyrène.....	4
1.1.Voie des cytochromes.....	6
1.2.Voie d'oxydation mono-électrique par les peroxydes.....	8
1.3.Vois des quinones.....	9
2. Mécanismes moléculaires de la cancérogénicité pulmonaire du Benzo[a]pyrène..	10
3. Rôle de la mitochondrie dans la mécanistique moléculaire du développement et la progression du cancer pulmonaire.....	18
3.1.Mitochondrie au cœur de la machinerie apoptotique des cellules cancéreuses pulmonaires.....	19
3.2.Régulation protéique dans les cellules cancéreuses pulmonaires	19
3.2.1. Régulation de protéines de la famille de Bcl-2.....	20
3.2.2. Régulation des protéines de stress : Heat Shoc Protein 90 « Hsp90 ».....	23
Chapitre II: Effets du sesquiterpène coumarine de la plante <i>Ferula vesceritensis</i>..	27
1. Le féruléol, coumarine sesquiterpénique, extrait du <i>Ferula vesceritensis</i>	27
2. Effets cytotoxiques du féruléol.....	28
PARTIE EXPERIMENTALE	
MATERIEL & METHODES	
Modèle animal.....	31
I. Effet du traitement par le féruléol au cours d'un cancer pulmonaire induit par le benzo[a]pyrène et ciblage de protéines apoptotiques Bcl-2, Hsp90 et P-gp.....	31
1. Matériel.....	31
1.1.Produits chimiques.....	31
1.2.Préparation du féruléol.....	31
1.3.Entretien et traitement des animaux.....	31

1.4.Prélèvements biologiques.....	32
2. Méthodes.....	34
2.1.Détection des radicaux libres générés.....	34
2.1.1. Extraction de mitochondries pulmonaires.....	34
2.1.2. Mesure de la production mitochondrial de l'anion superoxyde.....	34
2.1.3. Mesure <i>in vitro</i> de la production du radical hydroxyl (OH [•]) par le féruléolol...	35
2.2.Mesure des dégâts cellulaires.....	35
2.2.1. Mesure de la peroxydation lipidique : Test TBARS.....	35
2.3.Mesure de capacités antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques.....	36
2.3.1. Mesure du taux du glutathion « GSH » cytosolique.....	36
2.3.2. Mesure du taux du superoxyde dismutase « SOD » cytosolique.....	36
2.3.3. Mesure du taux de la catalase « CAT » cytosolique.....	37
2.3.4. Mesure du taux de la glutathion –S transférase « GST » cytosolique.....	37
2.3.5. Mesure du taux du glutathion peroxydase « GPx » cytosolique.....	38
2.4. Mesure de l'apoptose.....	39
2.4.1. Mesure du gonflement mitochondrial.....	39
2.5. Evaluation de l'expression de protéines du tissu pulmonaire.....	39
2.5.1. Extraction de protéines totales.....	39
2.5.2. Electrophorèse et immunodétection par Western blot de Bcl2, Bax, Hsp90 et P-gp.....	39
2.6. Evaluation histopathologique.....	40
2.7. Détection immunohistochimique du marqueur de prolifération Ki-67.....	41
II. Etude <i>in vitro</i> du benzo[a]pyrène et du féruléolol sur les fonctions mitochondriales pulmonaires.....	42
1. Préparation des solutions du B[a]P et du féruléolol.....	42
1.1. Préparation des dilutions du féruléolol.....	42
1.2. Préparation des dilutions du B[a]P.....	42
2. Isolement des mitochondries pulmonaires.....	42
2.1. Stimulation des mitochondries pulmonaires <i>in vitro</i>	43
2.2. Extraction de la matrice mitochondriale.....	43
2.2.1. Mesure de la production de l'anion superoxyde <i>in vitro</i> par les mitochondries pulmonaires du rat.....	44
2.2.2. Mesure du gonflement mitochondrial <i>in vitro</i> des mitochondries pulmonaires du rat.....	

2.2.3. Dosage de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale (Mn/SOD).....	44
2.2.4. Mesure de la peroxydation lipidique mitochondriale <i>in vitro</i>	44
Modèle cellulaire.....	46
1. Lignée cellulaire.....	46
2. Entretien des cellules A549.....	46
2.1. Etude de la viabilité cellulaire par le test « MTT ».....	47
2.2. Etude de la viabilité cellulaire par le test « MTT » des cellules A549 prétraitées par le B[a]P.....	47
2.3. Effet du féruléol sur l'adhésion cellulaire.....	48
2.4. Analyse statistique.....	48
RESULTATS & DISCUSSION.....	49
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	95
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	98
ANNEXES.....	112

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer pulmonaire est la cause de décès la plus importante dans les pays en développement. On estime que 1.2 millions de décès chaque année. Les statistiques sur le cancer du poumon sont évaluées pour causer 10 millions de décès par an d'ici 2030. Le benzo[a]pyrène (B[a]P) est l'un des hydrocarbures aromatiques polycycliques, reconnu par des études épidémiologiques et expérimentale comme cancérigène chez l'homme et chez l'animal. Le B[a]P est le plus étudié et le plus cancérigène qui cause le cancer pulmonaire.

La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques capables de freiner ou stopper la croissance tumorale constitue l'un des principaux thèmes de recherche en cancérologie. L'une des stratégies pour arrêter cette prolifération tumorale est l'activation dans les cellules cancéreuses pulmonaires le processus de mort cellulaire apoptotique. Ces molécules sont le plus souvent naturelles qui sont sélectionnées pour leurs actions antiprolifératives sur des lignées cancéreuses en culture. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés par le genre « *Ferula* », qui fait partie à la famille des Apiaceae, répartis dans toute la méditerranée jusqu'à l'Asie centrale.

Les plantes médicinales contenant le genre *Ferula* ont été utilisées dans la médecine traditionnelle. De nombreuses études menées sur la plante *Ferula communis* L. ont indiqué la présence de sesquiterpène coumarine. Ainsi, la toxicité de ces plantes est due à la présence du féruléol, une sesquiterpène coumarine, qui induit une hémorragie létale chez les animaux d'expérience. Plusieurs études indiquent que le féruléol provoque d'autres propriétés biologiques telles que l'activité anti-tumorale et les effets antimicrobiens. Le féruléol est également capable d'induire un dysfonctionnement mitochondrial en altérant le potentiel membranaire et la chaîne respiratoire mitochondriale.

Dans ce travail de thèse, nous avons voulu apporter des éléments de réponse à la problématique suivante : l'étude de l'expression de protéines apoptotiques au cours d'un cancer pulmonaire induit par le B[a]P et traité par le féruléol apporte des éléments contribuant à la compréhension des mécanismes de la cancérogénèse permette –elle de mettre en valeur des protéines Bcl-2, Hsp90 et P-gp comme de nouvelles cibles d'intérêt clinique ?

Nous avons choisi dans notre thèse, le cancer pulmonaire induit par le B[a]P comme un modèle d'étude. Ce cancer présente la surexpression de la protéine Bcl-2 et donc une résistance à l'apoptose. Notre travail s'est ainsi focalisé sur l'étude de l'influence du féruléol sur l'expression de deux protéines d'apoptose Bcl-2 et Hsp90 et la glycoprotéine P-gp dans les tumeurs pulmonaires.

Cette thèse implique des aspects de cancérogénèse, s'est organisée autour de trois principaux axes :

Le premier axe visait à moduler l'effet anti-tumoral du féruléol par le ciblage de protéines Bcl-2, Hsp90 et P-gp exprimées dans le cancer pulmonaire induit par le B[a]P ainsi de détecter et de quantifier les radicaux libres produit dans les cellules pulmonaires. Cette première partie de l'étude permet d'étudier les mécanismes de l'apoptose et de la spécificité tissulaire des protéines apoptotiques, ce qui permet d'envisager dans l'avenir le développement d'inhibiteurs naturels comme des candidats sérieux à l'intervention thérapeutiques, aussi d'identifier les molécules qui rétablissent le programme d'apoptose réprimés dans les cellules tumorales tout en préservant les cellules saines et d'imaginer de nouvelles stratégies de traitement du cancer pulmonaire par l'utilisation du féruléol qui induit la mort de cellules tumorales. Ainsi, pour augmenter l'efficacité anti-tumorale du féruléol, nous souhaitons de potentialiser l'efficacité de ce traitement qui va agir sur le stress cellulaire. Pour cela, une expérimentation *in vivo* chez l'animal a été réalisée. Ce type de modèle d'étude induit des tumeurs malignes et volumineuses chez le rat Wistar dont les résultats renseignent sur l'effet génotoxique et pro-oxydant du B[a]P aux niveaux de cellules pulmonaires.

Le second axe de la thèse repose sur une expérimentation *in vitro* sur des mitochondries pulmonaires isolées permettant l'évaluation de l'effet du féruléol et du B[a]P à différentes concentrations molaires au terme de quantification de ROS (O_2°) et de mesure de l'apoptose par la mesure du « swelling mitochondrial ».

Le dernier axe implique l'étude de la cytotoxicité du féruléol sur la lignée cancéreuse pulmonaire humaine A549 par la mesure de la viabilité et la prolifération des cellules A549 en présence ou non de différentes concentrations du féruléol et / ou du B[a]P.

Chapitre I : Cancer pulmonaire induit par le Benzo[a]pyrène

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) sont des contaminants environnementaux les plus répandus, qui sont formés principalement par la combustion incomplète de matières organiques et également associés à la combustion des moteurs, de chauffage domestique, la combustion de la biomasse et les activités industrielles (Phillips, 2002). Comme tous les polluants, les HAPs sont une préoccupation majeure parce que certains de ces composés ont été reconnus comme mutagène, cancérigène et tératogène chez l'homme (Ellard et al., 1991). L'un des HAPs le plus étudié et le plus puissant est le Benzo[a]pyrène (B[a]P), (figure 1) qui est souvent utilisé comme un substitut toxicologique ou prototype pour tous les HAPs cancérigènes et est présent partout dans l'environnement. Le B[a]P est le premier cancérigène pour être détecté dans la fumée de cigarette (Besaratina et Pfeifer, 2003). Comme le mécanisme de la cancérogenèse est similaire chez les animaux et les humains et sur la base des études expérimentales chez l'animal, le B[a]P a été classé comme cancérigène chez l'homme par le Centre Internationale pour la Recherche sur le Cancer (CIRC) (groupe1) (IARC, 1983).

Il existe trois principales voies d'exposition au B[a]P: (i) par l'exposition de la peau, (ii) par l'apport alimentaire; estimé à environ 76 ng par jour (Sinha et al., 2005), et (iii) par inhalation; par exemple le tabagisme, calculée autour de 9 ng du B[a]P par cigarette, ou l'exposition à la pollution de l'air.

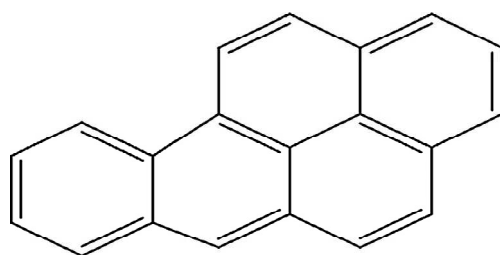


Figure 1: Structure du benzo[a]pyrène (Kasala et al., 2015).

Le B[a]P est un composé chimique solide qui a un poids moléculaire de 252.32 g/mol, une solubilité (Log P) égale à 6 et un point de fusion de 175°C; il est soluble dans les solvants organiques (hydrocarbures aromatiques), cependant sa solubilité dans l'eau est faible (0,2 à

6,1 mg/L) (Bonnard et al., 2007). Il est constitué de deux régions qui sont des sites de réactions chimiques (Marie, 2007) (Figure 2). Une région k de grande densité électronique et de haute activité métabolique qui comprise entre le quatrième et cinquième carbone, et une région baie (pour être cancérigène) considérée comme étant très réactive, comprise entre le neuvième et le douzième carbone (Marie, 2007).

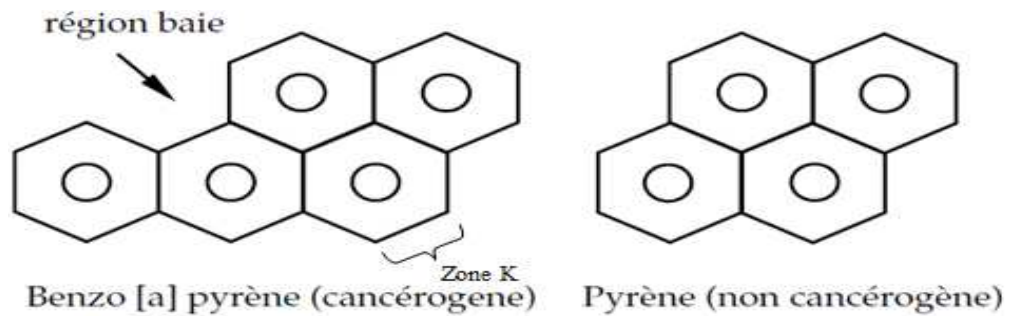


Figure 2 : Structure chimique du benzo[a]pyrène (cancérigène) et du pyrène (non cancérigène) (Marie, 2007).

1. Métabolisme du Benzo[a]pyrène

La capacité du B[a]P à induire un cancer pulmonaire est indépendante de la voie d'administration. Il a été montré que le B[a]P induit ce type de tumeur par les différentes voies, notamment par la voie orale, sous-cutanée, l'instillation intratrachéale, l'inhalation et la voie systémique (Panwar et al., 2005, Rajendran et al., 2008). La puissance et la spécificité du B[a]P peut être mise en évidence après une administration unique intrapéritonéale (IP) à une dose de 100 mg / kg où les souris développent des tumeurs du poumon dans 20 à 22 semaines (Yan et al., 2005) ou par voie orale (50 mg / kg) deux fois par semaine pendant 4 semaines, les souris développent des tumeurs pulmonaires entre 16 à 18 semaines (Rajendran et al., 2008), après l'administration du cancérigène. En outre, des modèles à imiter une situation d'exposition humaine (exposition continue au B[a]P) ont également été développés. Dans ce modèle, le B[a]P a été administré de manière chronique pendant plusieurs semaines (soit 3 mmol une fois par semaine pendant 8 semaines, la dose totale 24 mmol), les résultats en matière de développement des adénocarcinomes qui peuvent être observés dans les 18 semaines après l'administration du B[a]P (Hecht et al., 1999).

Lorsqu'il est inhalé, l'absorption à travers l'épithélium pulmonaire est rapide, cependant, sa vitesse d'absorption dépend de la taille des particules sur lesquelles le B[a]P est adsorbé. Immédiatement après inhalation d'un aérosol de [³H]-B[a]P (rat, 500µg/l, 1h, diamètre aérodynamique moyen 1-2µm) des quantités significatives de molécules radioactives sont

distribués via le sang dans le tractus respiratoire, les ganglions lymphatiques thoraciques, les reins et le foie ; les concentrations dans le cerveau, les testicules et la rate sont plus faibles (Mitchell, 1982). Étant lipophile, le B[a]P traverse les barrières pulmonaires et intestinales par diffusion passive (Marie, 2007). La clairance pulmonaire est biphasique avec des demi-vies de 2h à 25-56h ; cette dernière est probablement due à la métabolisation du B[a]P et à la fixation des métabolites aux macromolécules. La majeure partie de la radioactivité est éliminée du foie et du rein en 24h, mais elle reste constante dans le cerveau, la rate et les testicules. Le pic d'accumulation dans la lumière intestinale atteint son maximum entre 3 et 6h après l'exposition et diminue rapidement (Mitchell, 1982).

Le B[a]P est un procancérogène qui nécessite une activation métabolique pour exercer ces effets toxiques. Il existe trois principales voies de métabolisation de B[a]P (Figure 3). La plus importante implique la famille des cytochromes P450 (CYP1A1 et 1B1) qui catalyse la monooxygénation de B[a]P en époxyde. La 2^{ème} voie repose sur la formation d'un radical cation suite à l'oxydation à un électron de B[a]P, catalysée par des cytochromes P450 peroxydase. Enfin une voie mise en évidence plus récemment implique la formation de B[a]P-*o*-quinones (BPQ) à partir de catéchols, catalysée par des dihydrodiol déshydrogénase (Xue et Warshawsky, 2005).

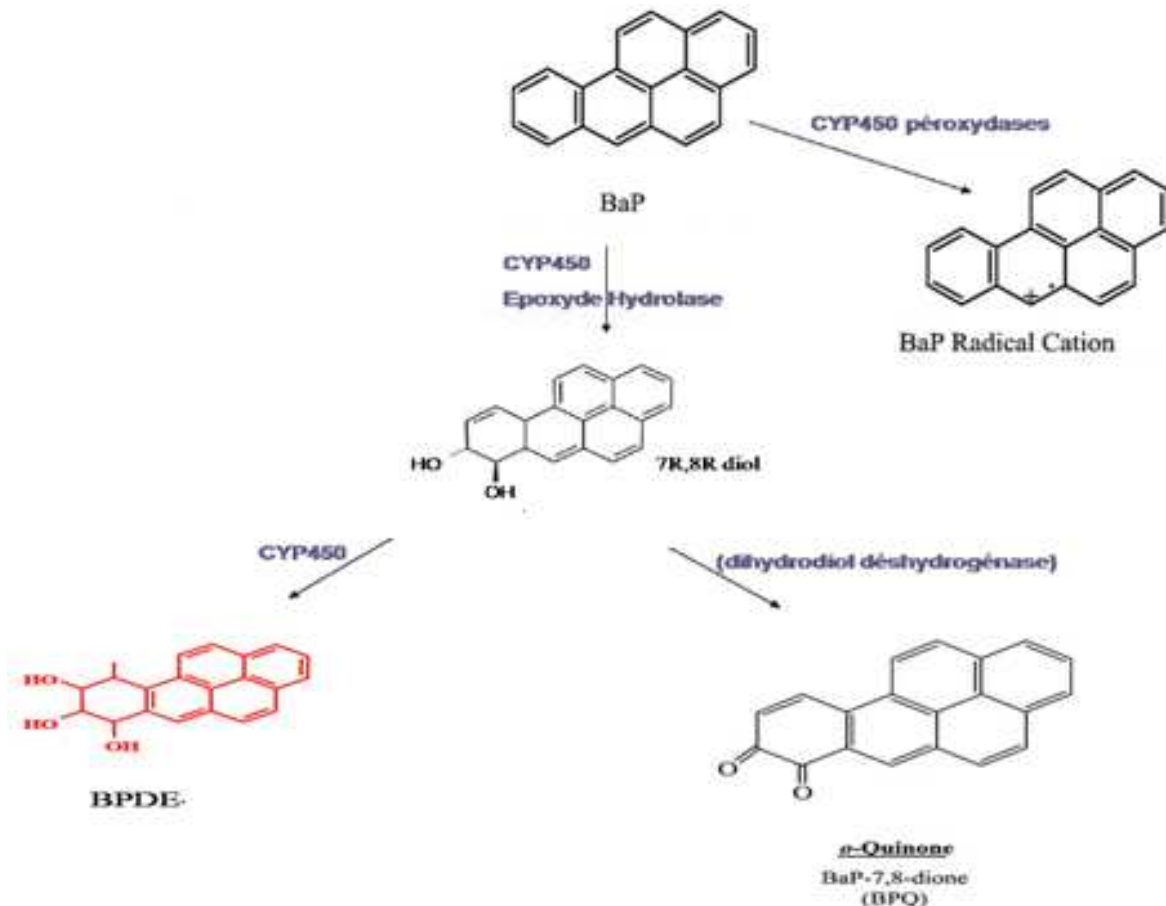


Figure 3 : Principales voies de métabolisation du B[a]P d'après Xue et Warshawsky, 2005.

1.1. Voie des cytochromes

Des études faites sur les poumons des rats exposés au B[a]P mentionnent que le métabolisme de ce dernier se fait principalement par les cytochromes extra-hépatique 1A1 et 1B1 et avec un faible pourcentage par 1A2 (Harrigan et al., 2006, Guéguen et al., 2006).

La mono-oxygénation du B[a]P en époxyde sur les carbones C7 et C8 pour former BaP-7,8-diol est réalisée par les cytochromes 1A1/1B1 (1A2 sont incapables de former le 7,8 diol). L'hydrolyse de cet époxyde par une époxyde hydrolase (EH) conduit à la formation d'un dihydrodiol (B[a]P-dihydrodiol : BPD) qui subit une nouvelle époxydation sur les carbones C9 et C10 par les CYP1A1/1B1/1A2 pour donner un 7,8-dihydro-9,10-époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene qui est couramment appelé B[a]P-diol-époxyde (BPDE), un métabolite ultime du B[a]P. Cet époxyde (BPDE) comporte deux diastéréoisomères *syn* et *anti* qui eux-mêmes possèdent deux énantiomères optiquement actifs (+) et (-) ((±)-*syn*-BPDE et (±)-*anti*-BPDE respectivement) (Xue et Warshawsky, 2005).

Notons que les cytochromes P450 ne participent pas uniquement à l'activation métabolique des HAPs par la formation de diol-époxydes. D'autres activités enzymatiques, telles que des

hydroxylations, permettent la formation de dérivés phénoliques du B[a]P tels que le 3-hydroxybenzo[a]pyrène (3-OHB[a]P), (Besaratina et Pfeifer, 2003). Ces composés non électrophiles ne sont pas réactifs vis-à-vis de l'ADN et sont éliminés après conjugaison.

Le BPDE, de nature électrophile, est extrêmement réactif vis-à-vis de l'ADN (Uppstad et al., 2010, Lin et al., 2004). Il se lie préférentiellement aux groupes amino exocycliques de la dGuo et dAdo de l'ADN (Marie, 2007). Les adduits principaux du BPDE se forment sur les atomes N2 de la dGuo (l'adduit BaP-7,8-diol-9,10-epoxide-N2-deoxyguanosine (BPDE-N2-dG)), et N6 de la dAdo, (Xue et Warshawsky, 2005) (Figure 4). Ces adduits conduisent à des transversions G → T qui sont trouvés dans le cancer pulmonaire induit par le B[a]P au niveau des gènes TP53 et KRAS (Luch, 2005).

Actuellement, la formation du BPDE-N2-dG est considérée comme un évènement critique dans la cancérogénèse par B[a]P. La formation des adduits de BPDE-N2-dG se fait exclusivement dans les cellules épithéliales des bronches par rapport au parenchyme (Rojas et al., 2004).

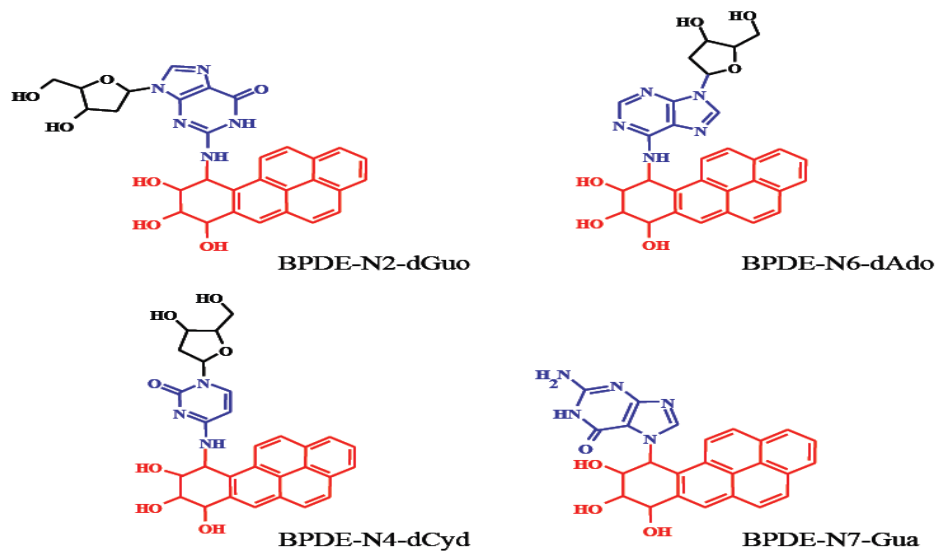


Figure 4 : Principaux adduits de l'ADN du BPDE (Marie, 2007).

Cette voie peut entraîner la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, la réduction de l'oxygène (O_2) en eau par les cytochromes lors de la réaction d'oxygénation de leur substrat peut être incomplète et provoque la formation d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$), de peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et de radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}). Ces réactions abortives sont fréquentes avec les CYP 1A1.

1.2. Voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases :

La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases est basée sur l'arrachement d'un électron au B[a]P via les peroxydases cellulaires et/ou potentiellement par les cytochromes P450 (Figure 5). Elle conduit à la formation des radicaux cations (Xue et Warshawsky, 2005).

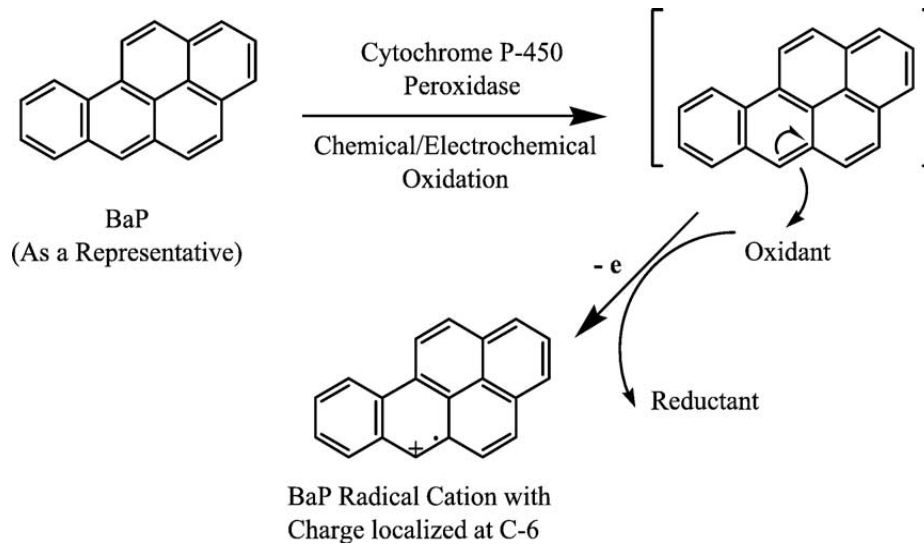


Figure 5 : Formation du radical cation (Xue et Warshawsky, 2005).

Ce dernier est de nature électrophile, capable d'interagir avec l'ADN qui est nucléophile et former des adduits (Xue et Warshawsky, 2005). Les adduits de la voie du radical cation ne peuvent être produits que si le radical cation est produit à proximité de l'ADN ou de nucléosides. Les adduits ont été synthétisés par électrochimie et sont les adduits dépurinants BaP-N7-Gua, BaP-C8-Gua ainsi que les adduits stables BaP-C8-dGuo, BaP-N2-dGuo et BaP-N3-dGuo. En présence de dAdo, l'adduit BaP-N7-Ade est formé (Figure 6) (Marie, 2007). Le radical cation, contrairement au BPDE est chimiquement instable (Xue et Warshawsky, 2005).

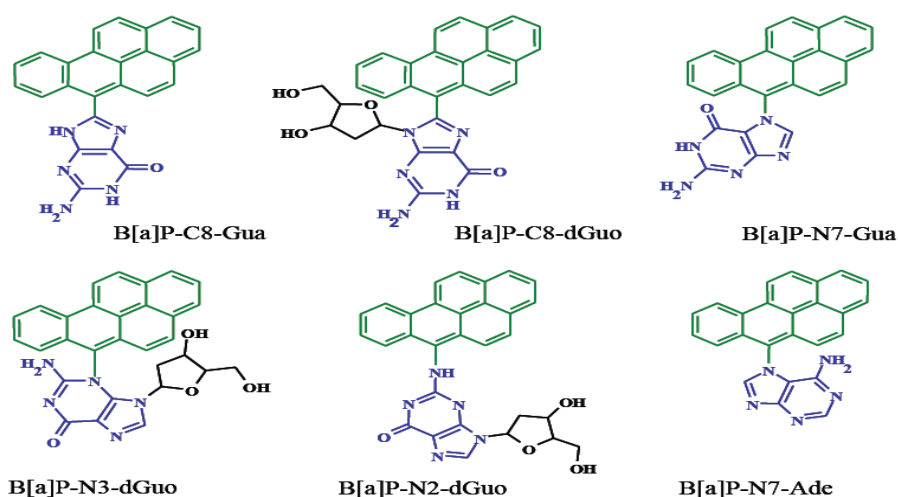


Figure 6 : Principaux adduits de l'ADN du radical cation du B[a]P (Marie, 2007).

1.3.Voie des quinones :

La voie métabolique des quinones met en jeu des dihydrodiol déhydrogénases (DD), enzymes appartenant à la superfamille des aldo-céto réductases (AKR). Premièrement le B[a]P-diol est oxydé par les AKR1A1 et AKR1C1-1C4 pour former un céto qui est spontanément réarrangé pour donner un catéchol sous l'action de DD (Figure 7). Ce catéchol subit deux oxydations pour former le B[a]P-*o*-quinone (B[a]P-7,8-dione (BPQ)). La première oxydation produit un anion semiquinone (SQ) et de l' H_2O_2 suivi par une deuxième oxydation qui conduit à la formation de BPQ et d' $\text{O}_2^{\cdot-}$. En présence d'équivalents réducteurs cellulaires (ex: NADPH), l'*o*-quinone peut aussi être réduite en catéchols entraînant des cycles rédox supplémentaires qui amplifient la production d'ERO : H_2O_2 et $\text{O}_2^{\cdot-}$. En présence de métaux rédox tels que Fe^{2+} ou Cu^+ , H_2O_2 peut donner OH^{\cdot} par une réaction appelée réaction de Fenton (Xue et Warshawsky, 2005)

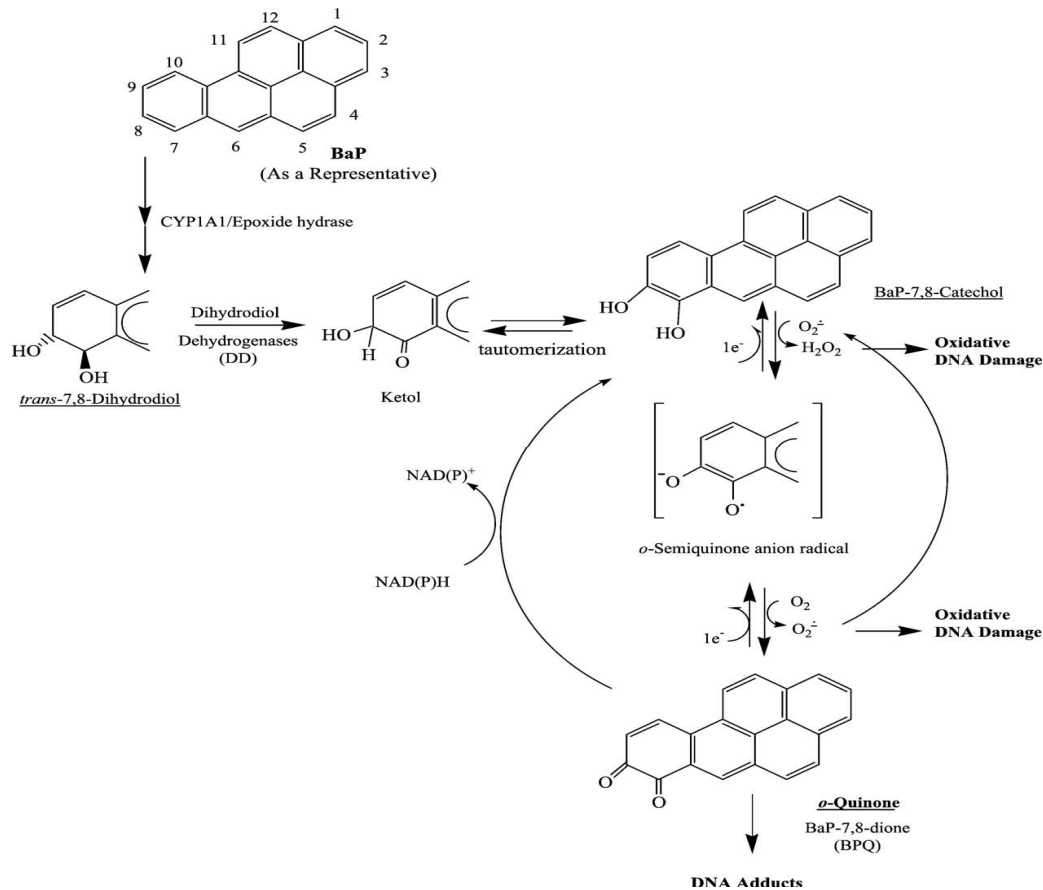


Figure 7 : Voie des quinones (Xue et Warshawsky, 2005).

Le BPQ est à l'origine d'une production des espèces réactive oxygénés mais peut également former des adduits à l'ADN (Xue et Warshawsky, 2005). Elle peut réagir avec les groupes amino de la dGuo en position N2 ou en position N6 de l'Ade pour former des adduits stables. Elle peut également former des adduits dépurinants en position N7 de la Gua ou N7 de l'Ade. Des adduits dépurinants en position C8 de la Gua mais aussi C8 et N3 de l'Ade sont également possibles (Penning et al., 1999).

2. Mécanismes moléculaires de la cancérogénicité pulmonaire du Benzo[a]pyrène

La production des ROS par le B[a]P se fait par la voie de cytochromes, et principalement par la voie de quinone lors du cycle redox de quinone. Le stress oxydatif est suggéré pour expliquer les dégâts provoqués par le B[a]P et notamment le cancer pulmonaire, il participe à la destruction des macromolécules contenues dans les cellules, notamment l'ADN, les lipides et les protéines (Harrigan et al., 2006).

La mitochondrie est la source primordiale de ROS et plus précisément au niveau de la chaîne respiratoire. Elle produirait 90% des ROS cellulaires (Balaban et al., 2005). Environ 1 à 3 % de l'oxygène utilisé par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent ces

espèces radicalaires (Boveris et Chance, 1973). Mais ces évaluations sont réalisées à partir de mesure sur des mitochondries isolées « *in vitro* » en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il existe deux sites principaux de production de ROS par la mitochondrie : les complexes I et III (Figure 8).

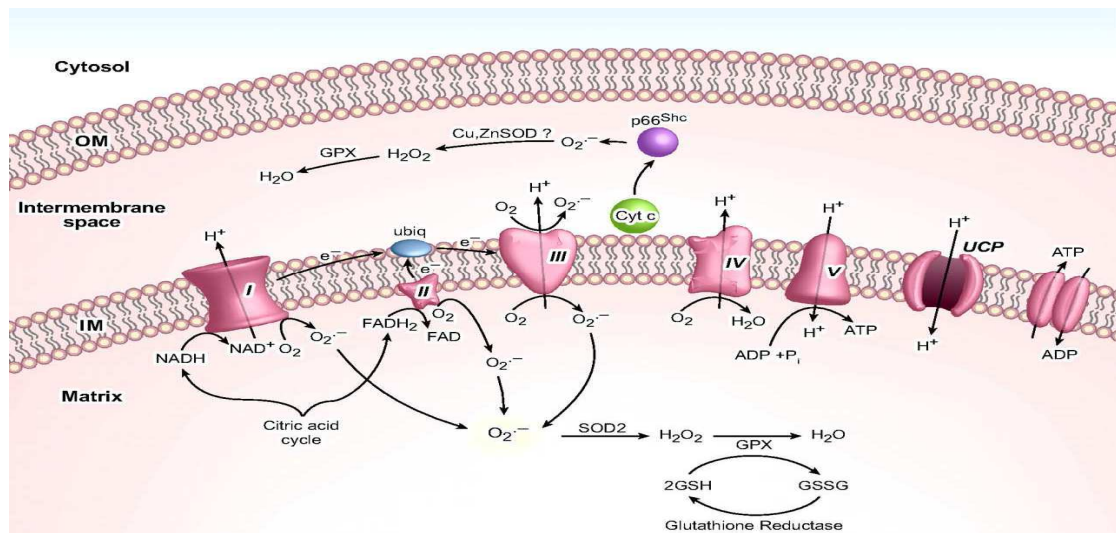


Figure 8 : Phosphorylation oxydative, production de superoxyde et les voies d'élimination dans les mitochondries (Madamanchi et Runge, 2007).

Ces deux complexes contiennent des quinones qui sont potentiellement des sources majeures de ROS. Le complexe I est la principale source de l' $O_2^{\bullet-}$ par le complexe flavine mononucléotidique (Liu et al., 2002). Mais également le site ubiquinone du complexe III désigné comme un site important de production de ROS (Chen et al., 2003). En effet, ce site catalyse la conversion de l'oxygène moléculaire en $O_2^{\bullet-}$ par le transfert d'un électron de l'oxygène moléculaire.

Expérimentalement, si le succinate est utilisé comme substrat en absence de roténone, la production d' H_2O_2 est très importante, ce qui a mis à jour l'importance du flux inverse d'électrons du complexe II au complexe I. Ce flux inverse d'électrons est dû au fait qu'en absence d'ADP, les électrons dérivés du succinate peuvent remonter au complexe I et réduire de NAD^+ en $NADH$ (Liu et al., 2002).

Trois hypothèses sont dégagées : cette production aurait lieu au niveau :

- 1°) Des quinones (Q)
- 2°) Du groupe des flavines mononucléotides (FMN) (Liu et al., 2002)
- 3°) Du centre Fer-soufre [Fe-S] (Genova et al., 2001)

Comme ces trois structures sont très proches et interagissent les unes avec les autres, il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production de ROS.

La production de ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice tandis que cette production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matricielle ainsi que dans l'espace inter-membranaire (St-Pierre et al., 2006).

L'anion superoxyde produit dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn/SOD), l' H_2O_2 alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme. L' $\text{O}_2^{\circ-}$ produit dans l'espace intermembranaire est : soit transformé par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase cytosolique (Cu/Zn- SOD), soit détoxifier par le Cytochrome C ou soit transféré dans le cytoplasme via un canal voltage dépendant VDAC. L'anion superoxyde est alors pris en charge par le Cu/Zn- SOD (Han et al., 2003).

Sous les conditions normales, les poumons sont protégés contre les métabolites réactifs du B[a]P et ces dommages oxydatives par le système de défense cellulaire. Ce système comporte les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Plusieurs réactions de détoxification ont été démontrées dans les poumons (Figure 9). Les voies majeures de conjugaison des métabolites du B[a]P dans les poumons sont la glucuronidation, et la sulfation, cette dernière est la voie prédominante dans les tissus humains normaux. En effet, on a montré par la culture des cellules bronchiales humains que la voie majeure de conjugaison des métabolites de B[a]P était la sulfation. Des quantités importantes de glutathion conjugués ont été observées chez les différentes espèces lors de la conjugaison des métabolites dérivés du B[a]P (Cohen, 1990).

Les enzymes qui catalysent ces réactions de détoxification sont induites à partir d'un mécanisme dépendant de l'activation de l'Ahr par B[a]P. Pour les ROS, ils sont détoxifiés par la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion S-transférase (GST), la glutathion peroxydase (GPx)...etc. :

- La SOD est une enzyme qui catalyse la dismutation de l' $\text{O}_2^{\circ-}$ en H_2O_2 ($2\text{O}_2^{\circ-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$) qui pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Dans les poumons, la Cu/Zn-SOD est principalement exprimés dans l'épithélium des branches, la Mn/SOD qui est induit par les oxydants et les cytokines, dans les macrophages alvéolaire et l'épithélium, et le SOD extracellulaire dans les macrophages alvéolaires et le fluide extracellulaire.

- La catalase, exprimée dans les pneumocytes, les neutrophiles, les macrophages, et l'épithélium des branches (Delaunoy, 2004), est aussi responsable de l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2 . Contrairement à la GPx, l'affinité de la CAT pour l' H_2O_2 est élevée seulement lorsque les contenus en H_2O_2 sont accrues (MatÉs et al., 1999).
- Les GSTs sont connues pour jouer un rôle clé dans la détoxification et la réduction des radicaux libres oxygénés. Elles inactivent des composés électrophiles toxiques et des produits de la peroxydation lipidique (4-hydroxynonéal) en les conjuguant au glutathion (Desmots, 2000). Outre ce principal rôle, les GSTs peuvent avoir des activités peroxidase, isomérase, éthérase ou thiol transférase (Todorova et al., 2007).
- Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart des composants antioxydants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent d'être apportés par l'alimentation sauf pour le glutathion réduit (GSH) dont les poumons sont l'une des plus importantes zones de stockage (6,1- 7,5 mM/ mg de poumon). Le GSH réduit l' H_2O_2 et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la GPx. Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (MatÉs et al., 1999). Le rapport GSH réduit/ GSH oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le GSH réduit est consommé et le GSSG augmenté (Ji et al., 1991).

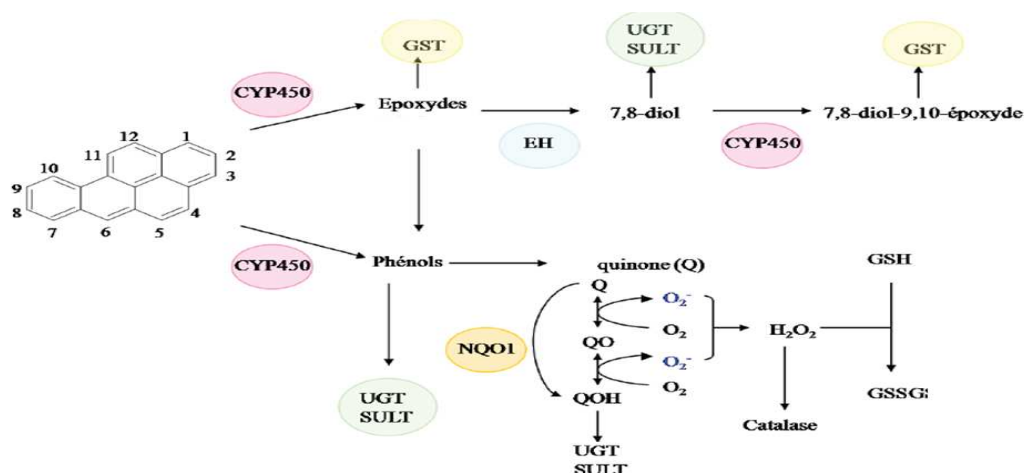


Figure 9 : Détoxification des métabolites du B[a]P.

Il est bien connu que la génération des ROS provoque des dommages au niveau de l'ADN mais aussi au niveau d'autres composants cellulaires y compris les lipides. Une peroxydation de ces derniers nous donne le malondialdéhyde (MDA), un biomarqueur de stress oxydatif,

qui est à leur tour peut altérer les protéines, l'ADN, l'ARN et d'autres biomolécules (Selvendiran et al., 2004). Au niveau de l'ADN, le MDA peut réagir avec les bases azotés G, A et C et former des adduits M1dGuo (pyrimido-[1,2 α]purin-10(3*H*)-un), M1dA (N⁶-(3-oxo-propenyl)deoxyadenosine) et M1dC (N³-(3-oxo-propenyl)deoxycytidine), qui sont des lésions mutagènes (Valko et al., 2006).

Le 4-hydroxynonéal (4-HNE) est un autre produit de la peroxydation lipidique par les ERO, il est aussi responsable de mutation de *TP53* au niveau du codon 249 (Hussain et al., 2001).

Selon des études *in vivo*, la lipoperoxydation mitochondrial est hautement significative au cours d'un cancer pulmonaire induit par le B[a]P (Anandakumar et al., 2008).

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS générés pendant la métabolisation du B[a]P au niveau des poumons (Kim et Lee, 1997). Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyl dans la protéine (Peng et al., 2000). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu²⁺ et le Fe²⁺, peuvent être classées en deux catégories : 1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique, 2°) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...etc.) (Levine, 2002).

De vaste investigations *in vitro* et *in vivo* ont démontré la capacité du B[a]P à imposer une variété de facteurs létaux capables d'être des instigateurs et / ou des promoteurs du processus de cancérogenèse pulmonaire. Le B[a]P lui-même est un procarcinogène, mais peut agir comme cancérogène chez les animaux lorsqu'il est activé par le métabolisme provoquant ainsi des mutations dans les gènes cruciaux en se liant à l'ADN, cette étape est appelé comme «initiation» de tumeur et la phase qui suit, nommé une étape de «promotion» tumorale est marquée par une croissance de cellules transformées de manière irréversible (Kasala et al., 2015).

- ***Initiation tumorale: Formation d'adduits à ADN***

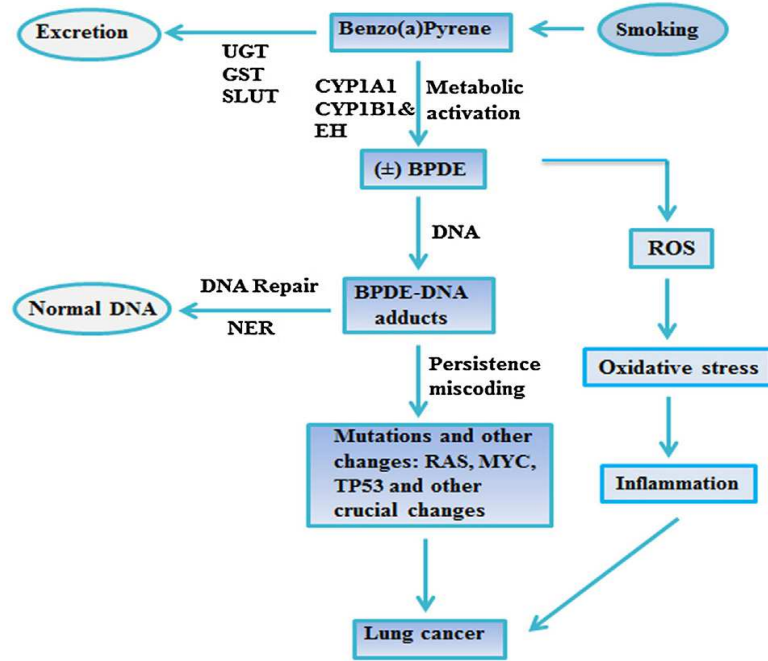
Les principaux métabolites du B[a]P résultants des trois voies majeurs de son métabolisme (voir figure 3) sont responsables de plusieurs lésions mutagènes à travers la formation d'adduits persistants à l'ADN.

Dans la première voie du métabolisme, la CYP peroxydase en présence d'un substrat peroxyde va catalyser le clivage de la liaison peroxyde des états d'oxydation du fer qui peut être réduits en présence de B[a]P, formant un B[a]P radical cation très réactif qui alkyle l'ADN (Penning, 2004). Les radicaux cations de B[a]P génèrent des adduits apuriniques comprenant B[a]P-6-C8- Guanosine, B[a]P-6-N7-Guanosine et B[a]P-N7-Adenosine (Jiang et al., 2007). La formation de ces adduits causent des transversions G→T, notamment dans les proto-oncogène RAS (Jiang et al., 2007). Les métabolites dérivés des radicaux cations, B[a]P-1,6- et B[a]P-3,6-dione peuvent aussi activer l'EGFR via la génération de peroxyde d'hydrogène conduisant à l'augmentation de la prolifération cellulaire chez les cellules MCF10A, suggérant un rôle potentiel dans la promotion tumorale.

La seconde voie est stéréosélective, le B[a]P est convertie en B[a]P-7,8-oxyde par les CYP1A1 et 1B1 puis hydrolysé par l'EH donnant le BPD et représente le substrat pour les deux voies restantes. Le BPD peut subir une mono-oxygénation catalysée par les CYP 1A1 et 1B1 aboutissant à la formation du BPDE (7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene). Le BPDE, comme tous les diol époxydes formés à partir de HAPs, forme des adduits covalents avec l'ADN, en position exocyclique N2 des résidus guanines et en N6 des adénines (Smith et al., 2000), cela aboutit à l'apparition des transversions G→T. Ou bien, le BPD subit une oxydation NADP⁺ dépendantes catalysée par les AKRs et qui va aboutir à la formation d'un O-quinone réactif et redox actif ; le BPD (Penning, 2004). Le BPD forme des adduits stables et hydratés en N2-dG, N6-dA ainsi que des adduits apuriniques en N7-Dg. Les adduits de type N7-dG donnent lieu à des transversions G→T observées dans le proto-oncogène ras et aussi dans le supresseur de tumeur p53 (Jiang et al., 2007).

La transversion G→T est le type de mutation le plus fréquent dans les cancers broncho-pulmonaires. Ce type de mutations ponctuelles survient via un mécanisme dit : *error-prone trans-lesional synthesis* où des ADN polymérases répliquent des modèles d'ADN endommagés (Figure 10).

(A)



(B)

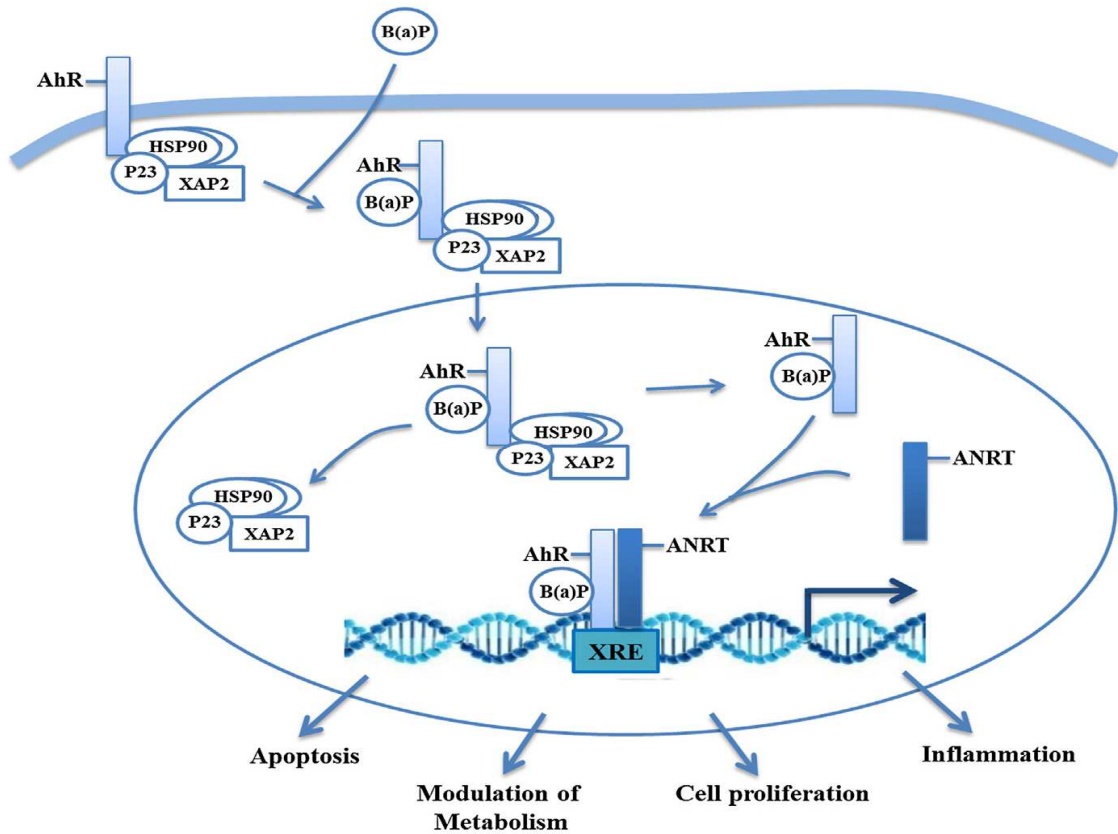


Figure 10: Représentation schématique du mécanisme de la carcinogénicité du B[a]P. (A) Initiation tumorale via la formation d'adduits à ADN. (B) Promotion tumorale via la signalisation par l'AhR (Kasala et al., 2015).

- ***Promotion et progression tumorale: Signalisation via le récepteur AhR***

Des agents cancérigènes, notamment le B[a]P sont capables de favoriser la croissance de cellules transformées et de contribuer à la production de masses visibles de cellules tumorales, un phénomène appelé « la promotion tumorale » dans la carcinogénèse. Le B[a]P aide à la promotion de la tumeur par la transduction du signal via le récepteur aryl-hydrocarbure (AhR). L'AhR joue un rôle important dans la cancérogenèse induite par le B[a]P. Des études sur l'animal ont montré une corrélation significative entre l'induction de l'activité enzymatique « arylhydrocarbures hydroxylase » et la carcinogénèse pulmonaire induite par le B[a]P (Ross et al., 1995). L'exposition au B[a]P est une préoccupation majeure car, une fois entré dans le corps, le B[a]P traverse facilement la membrane cellulaire comme il est un composé lipophile. Dans le cytoplasme, il se lie à l'AhR, qui forme un complexe avec des protéines chaperonnes: protéine de choc thermique 90, XAP2 et p23 (Reyes et al., 1992). La liaison du B[a]P à l'AhR assiste à l'activation et à la translocation du complexe dans le noyau cellulaire. Après hétérodimérisation avec le *AhR nuclear translocator* (ARNT), le complexe se lie à la séquence consensus TNGCGTG dans les éléments de réponse aux xénobiotiques (XREs) dans la région de promoteur de plusieurs gènes tels que CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GST, UDP-GT, et la quinone oxydoréductase (Gelboin, 1980) et induit l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme du B[a]P, y compris les isoformes de CYP 1A1 et 1B1 (Figure 11B). Des études réalisées ont montré que l'AhR joue un rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire. Par exemple, l'activation de l'AhR par les HAPs y compris le B[a]P conduit à l'induction d'hydrocarbure aryle hydroxylase (AHH) aboutit à la production de métabolites réactifs, qui contribuent à l'apoptose et à d'autres dommages cellulaires dans le système biologique (Nebert et al., 2000).

3. Rôle de la mitochondrie dans la mécanistique moléculaire du développement et la progression du cancer pulmonaire

L'influence des mitochondries sur la santé humaine est un sujet en pleine expansion dans la littérature scientifique en raison de leurs rôles dans la mort cellulaire et la survie. La biologie et les altérations de la fonction mitochondriale ont d'abord été liées au cancer dans les années 1956 avec la découverte de l'effet Warburg (Warburg, 1956). Le dysfonctionnement mitochondrial au cours d'un cancer est élargi pour inclure les défauts de la génomique et de la biogenèse mitochondriale, la signalisation apoptotique et la dynamique mitochondriale.

Le nombre d'études portant sur le rôle de la fonction mitochondriale dans la carcinogenèse est en augmentation, mais de comprendre les dernières contributions dans le domaine de la dynamique mitochondriale peut influencer sur notre compréhension de la tumorigenèse et la progression du cancer.

Au cours de la respiration mitochondriale, les complexes I, II et III sont tous capables de générer des ROS pendant la phosphorylation oxydative et le stress oxydatif, qui est le résultat d'un déséquilibre entre la production de ROS et les antioxydants.

Le complexe I a une signification particulière dans la progression tumorale et les métastases. Si le complexe I est muté, il ne peut pas interagir avec le complexe III, ce qui se traduit par le transfert incorrect d'électrons et éventuellement la surproduction de ROS. Dans le cancer pulmonaire, le complexe I apparaît fréquemment être modifiée, en particulier chez les patients non fumeurs, ce qui explique que la surexpression de complexe I muté dans les mitochondries augmente l'invasion tumorale, des particules de superoxydes et la prolifération *in vitro* (Dasgupta et al., 2012). L'ADN mitochondrial (ADNmt) est également sensible aux dommages causés par des carcinogènes environnementaux, tels que le tabac (Chatterjee et al., 2011). Une inégalité entre la fréquence et la nature des mutations de l'ADNmt entre les patients atteints de cancer du poumon (fumeurs et non fumeurs) a été récemment révélé à élargir l'impact du tabagisme sur la tumorigenèse du poumon. Cependant, la majorité des mutations de l'ADNmt identifiées ciblent principalement le complexe I de la chaîne respiratoire et l'expression ectopique de ces mutations a augmenté la prolifération cellulaire, l'invasion et la production de ROS dans les cellules cancéreuses du poumon (Dasgupta et al., 2012). Pour appuyer cette observation, l'activité du complexe I a été montrée pour être diminuée dans les cellules ayant un potentiel métastatique élevé (Ishikawa et al., 2008).

3.1.Mitochondrie au cœur de la machinerie apoptotique des cellules cancéreuses pulmonaires

Les cellules cancéreuses ont une variété de moyens pour prévenir l'apoptose, telles que la mutation des protéines apoptotiques, des protéines anti-apoptotiques, et le dysfonctionnement mitochondrial (Solaini et al., 2011). Des mutations de l'ADN mitochondrial apparaissent également pour permettre aux cellules cancéreuses de s'échapper à l'apoptose. Il est important de comprendre les événements moléculaires qui contribuent à l'apoptose induite par un médicament et la façon dont les tumeurs échappent à la mort cellulaire apoptotique autant que traitements du cancer cherchent à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses, mais l'activation du mécanisme apoptotique n'est pas toujours efficace.

Les défauts dans le traitement induisant l'apoptose sont impliqués à la fois dans la tumorigenèse et la résistance aux médicaments, et ces défauts sont une des causes des échecs de chimiothérapie. Le type de cancer détermine la sensibilité à l'apoptose. Par exemple, dans le cancer du poumon, par rapport aux cancers bronchiques non à petite cellules (NSCLC), les cancers bronchiques à petites cellules (SCLC) étaient plus susceptibles à l'apoptose spontanée (Joseph et al., 1999). Par conséquent, l'absence de l'apoptose spontanée et l'inefficacité du traitement induisant l'apoptose dans les cancers bronchiques non à petites cellules suggère que des anomalies dans le processus apoptotique peuvent être responsables de leur résistance à la thérapie anticancéreuse.

Semblable aux autres types de cancer, des mutations génétiques (par exemple, P53, c-myc, Akt) et l'expression altérée des régulateurs de l'apoptose sont également détectés dans le cancer pulmonaire. Il a été suggéré que la sensibilité différente aux agents thérapeutiques qui induisent l'apoptose peut être liée à l'expression de régulateurs de l'apoptose dans le cancer pulmonaire (Joseph et al., 2001). Les caspases, une famille de protéases à cystéine, sont les régulateurs centraux de l'apoptose. Ils médient les deux formes de l'apoptose : la voie intrinsèque (qui est activée par le stress et contrôlées par les mitochondries) et la voie extrinsèque (qui est activé par la voie des récepteurs de mort) de la signalisation apoptotique.

3.2.Régulation protéique dans les cellules cancéreuses pulmonaires

De par leur grande complexité structurelle et fonctionnelle, les protéines sont souvent fragiles face aux agressions de l'environnement. Un stress thermique, oxydatif, de déshydratation ou l'invasion d'un pathogène, peut provoquer le dépliement partiel de certaines protéines sensibles et causer une perte de fonction. La séquence primaire des protéines devrait, en

principe, contenir toutes les informations nécessaires pour qu'elles puissent spontanément se plier en structure native et fonctionnelle. Pourtant, certaines protéines partiellement dépliées par un stress, peuvent se tromper et, au lieu de se replier nativement, acquérir une structure non native ou « mal pliée » enrichie en feuillets bêta, et exposant des surfaces hydrophobes (Anfinsen, 1972). Cherchant à se stabiliser, les surfaces hydrophobes peuvent s'associer spontanément aux membranes de la cellule et aux régions hydrophobes d'autres protéines mal pliées, formant des accumulations protéiques stables (Dobson, 1999).

La P-glycoprotéine est une pompe d'efflux dépendante de l'énergie associée à la membrane plasmique. Elle est codée par le gène MDR1 chez l'homme et son implication dans le phénomène de résistance à plusieurs médicaments est documentée (Arora et al., 2005, Sugihara et al., 2006). La pertinence clinique de la P-gp dans le cancer pulmonaire est examinée (Abe et al., 1994) et observée dans des lignées cancéreuses capable de diminuer l'accumulation intracellulaire de molécules thérapeutiques (Abolhoda et al., 1999).

Le traitement de rat par le B[a]P démontre une induction transcriptionnelle du gène MDR1 codant pour la P-gp (Fardel et al., 1996, Mathieu et al., 2001). Cette induction de MDR1 peut être en relation avec l'activité des enzymes du métabolisme de B[a]P. Il a été suggéré que les métabolites de B[a]P étaient impliqués dans un niveau transcriptionnel important de MDR1.

Dans de nombreux cancers humains, la sur-expression de la P-gp est un déterminant de la pharmacorésistance intrinsèque et acquise (Choi, 2005). En inhibant la P-gp, il semble que les cellules tumorales pourraient être éliminées (Li et al., 2007).

3.2.1. Régulation des protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 régule l'efflux de protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie. Les protéines Bcl-2 semblent être responsables pour déterminer l'assemblage ou non du complexe pro-caspase / apoptosome. Les homologies de séquence et de fonctions entre CED-9 et Bcl-2 semblent indiquer que les protéines de la famille Bcl-2, tout comme CED-9, jouent un rôle majeur dans la régulation des caspases et plus généralement de l'apoptose. La genèse du champ remonte à la réalisation que Bcl-2 favorise la survie des cellules sans affecter directement la prolifération cellulaire. Cela a été la première démonstration que la modification d'une voie apoptotique pourrait mener au développement de la tumeur (Vaux et al., 1988).

Bcl-2, le gène de fondation dans cette famille a été identifié parce qu'il est juxtaposée à l'immunoglobuline promoteur de la chaîne lourde dans les lymphomes à cellules B contenant la translocation chromosomique t (14; 18) (Hockenbery et al., 1990).

Depuis ces premières observations, environ 20 polypeptides de Bcl-2 associés aux mammifères ont été identifiés. Sur la base des critères fonctionnels et structurels ces polypeptides peuvent être divisés en trois groupes (Figure 11), les membres anti-apoptotiques, les membres pro-apoptotiques multi-domaines et les membres pro-apoptotiques à domaine BH3.

- **Les membres anti-apoptotiques:** qui comprennent Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 / bfl, 1 Boo / Diva, nrf3 et Bcl-B (Cory et al., 2003) protège les cellules d'une grande variété d'agents cytotoxiques, y compris la privation de cytokine, UV, l'irradiation et les médicaments chimiothérapeutiques (Huang et al., 1997). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 contiennent généralement quatre domaines courts conservés BH (Bcl-2 homologie) :BH1-BH4 et la plupart contiennent un domaine transmembranaire C-terminal qui les adresse aux surfaces cytoplasmiques de diverses membranes intracellulaires, y compris la membrane externe mitochondriale et le réticulum endoplasmique.
- **Les membres pro-apoptotiques multi-domaines (protéines effectrices):** qui comprennent Bax, Bak, et Bok, ces protéines ont dépourvu du domaine N-terminal BH4, mais contiennent les autres domaines BH (Gross et al., 1999).
- **Les membres pro-apoptotiques à domaine BH3:** qui comprennent Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA, et Bcl-G, sont une collection plus hétérogène de polypeptides qui partage une homologie de séquence limitée uniquement dans l'acide aminé-15 du domaine BH3 (Hockenbery et al., 1990, Cory et al., 2003). Les protéines à domaine BH3 fonctionnent dans différents scénarios de stress cellulaire et sont subdivisés sur la base de leur capacité à interagir avec les protéines anti-apoptotique Bcl-2 ou les protéines anti-apoptotiques et les effecteurs. Les protéines à domaine BH3 qui se lient seulement protéines anti-apoptotiques sont appelés «sensibilisateur» et / ou les protéines à domaine BH3 «dérépresseur ». Ces protéines à domaine BH3 sont considérées comme des "activateurs directs". Les interactions entre: protéine anti-apoptotique, activateur direct / sensibilisateur / les protéines à domaine BH3 dérépresseur et les effecteurs déterminent le MOMP et l'apoptose (Chipuk et al., 2010).

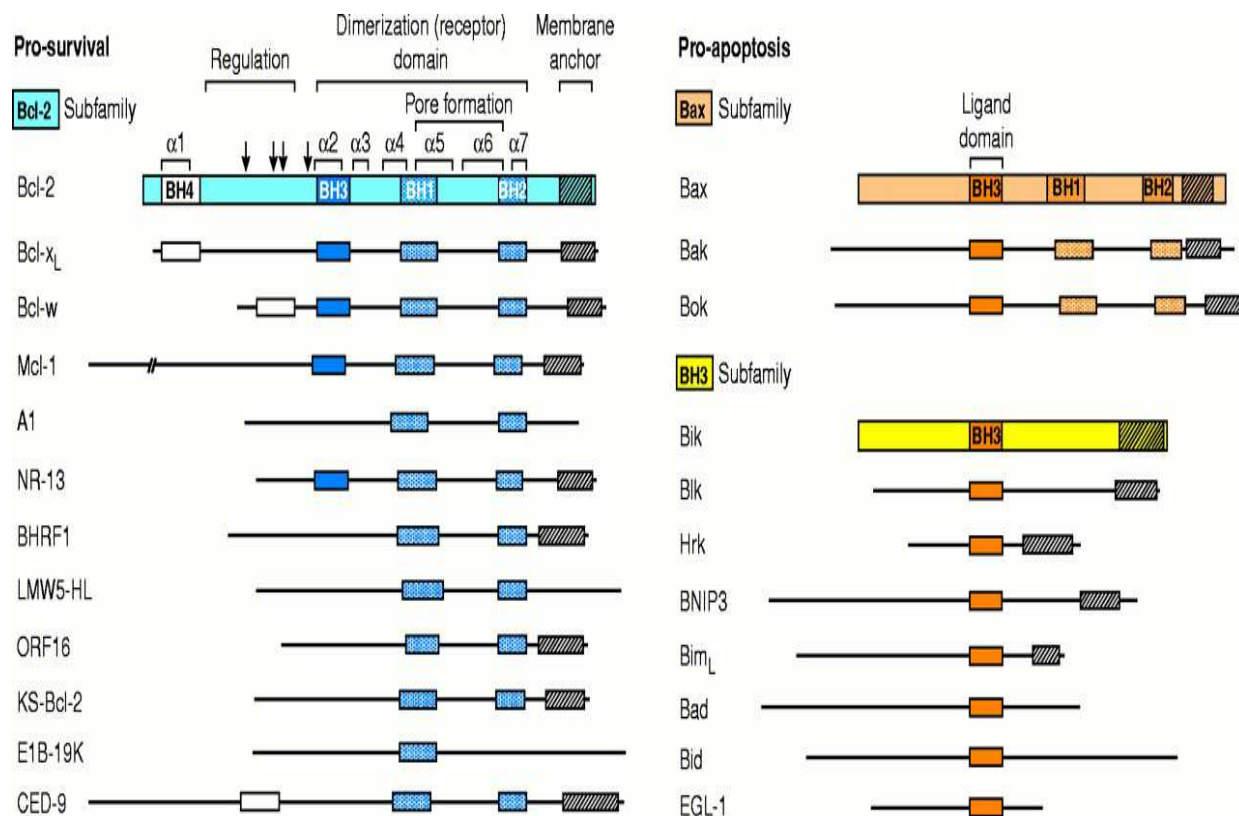


Figure 11: Schéma simplifié de la structure des protéines de la famille Bcl-2 (Adams et Cory, 1998).

Dans plusieurs cancers, y compris certains cancers du poumon, les protéines anti-apoptotiques ont été amplifiées, ce qui suggère que les cellules malignes peuvent échapper à l'apoptose par l'activation de la protéine Bcl-2, signalant à la cellule pour éviter la mort cellulaire (Beroukhim et al., 2010). La libération de cytochrome C et l'apoptose est lancée lorsque des protéines à domaine BH3 seulement, Puma et Bim, se lient et inhibent les protéines de survie de la famille Bcl-2. Cette inhibition de la protéine permet aux protéines pro-apoptotique Bax et Bak à perméabiliser la membrane mitochondriale externe (MOMP) induisant des événements apoptotiques par oligomérisation (Willis et al., 2007). La résistance à l'apoptose a été observée dans des cellules dépourvues de Bim, Puma, et Bid, indiquant que ces protéines sont nécessaires pour activer Bax et Bak au signal apoptotique (Ren et al., 2010). Dans le cancer bronchique non à petites cellules (NSCLC), l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est plus élevée dans les carcinomes épidermoïdes par rapport aux adénocarcinomes (Joseph et al., 2000). En outre, l'expression de la protéine Bcl-2 est en corrélation avec le statut ganglionnaire dans le NSCLC et l'immunomarquage de Bcl-2 est considéré comme un marqueur de l'invasivité loco-régionale (Groeger et al., 1999). Il a été

montré que l'expression de la protéine Bcl-2 est plus élevée dans SCLC que dans NSCLC (Joseph et al., 2000); Cependant, une autre étude a démontré que le développement de la SCLC était indépendant de l'expression de Bcl-2 (Maitra et al., 1999).

Les membres de la famille Bcl-2 contrôlent la fonction du MPTP (Tsujiimoto et Shimizu, 2000). Bcl-2 agit pour maintenir le MPTP inactif par son interaction avec le VDAC. Lorsque le MPTP est activé, Bax s'associe avec le VDAC et permet l'afflux soluté de la matrice, y compris le calcium et d'autres ions, qui favorisent la transition de perméabilité mitochondriale par dépolarisation de la membrane mitochondriale. Cela conduit à MOMP et la libération subséquente de protéines de l'espace intermembranaires, comme le cytochrome C.

Paradoxalement dans le NSCLC, en utilisant une analyse immunohistochimique pour évaluer l'expression de Bax, il y a une forte expression fréquente de Bax pro-apoptotique au cours de la prolifération néoplasique. Cependant, aucune corrélation n'a été identifiée entre l'expression de Bax et les paramètres clinico-pathologiques (exp., grade de la tumeur, le type histologique) (Caputi et al., 1998). Malgré cela, dans les poumons et d'autres types de tumeurs, il existe une tendance telle que les protéines anti-apoptotiques sont actifs dans la formation de tumeurs alors que les protéines pro-apoptotiques sont inhibées (Hernandez et al., 2011).

3.2.2. Régulation des protéines de stress : Heat Shoc Protein 90 « Hsp90 »

La cellule devra maintenir des mécanismes de défense et de réparation capables de réduire la concentration des espèces mal pliées au fur et à mesure que celles-ci se forment, et de les garder en dessous d'un seuil critique d'agrégation toxique. Les bactéries, suivies des eucaryotes ont su développer très tôt dans l'évolution de tels systèmes de défense contre la délinquance des protéines agrégées. Ces systèmes sont composés principalement de deux classes de protéines : les chaperones moléculaires (typiquement les protéines de choc thermique : Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp27) et les protéases ATP-dépendantes (Tomoyasu et al., 2001). Les dommages cellulaires peuvent engager deux réponses cellulaires fondamentaux: l'apoptose, une forme précisément réglementé de la mort cellulaire; et la protéine de choc thermique (Hsp), ou la réponse au stress, qui sert à protéger les cellules et à la médiation d'une reprise après une lésion accélérée.

L'Hsp90 est une protéine chaperonne, très abondante, exprimée par toutes les cellules eucaryotes (Jego et al., 2013). Chez l'homme, les membres les plus importants de cette famille sont les isoformes : Hsp90 alpha (Hsp90a) et Hsp90 bêta (Hsp90b) (maintenant appelé aussi

HSPC1 et HSPC3, respectivement) (Jego et al., 2013) qui sont principalement cytoplasmique (Subbarao Sreedhar et al., 2004), GRP94 dans le réticulum endoplasmique (Argon et Simen, 1999) et TRAP1 dans la matrice mitochondriale (Felts et al., 2000). Ces isoformes sont étroitement (86%) associées aux protéines et les structures cristallines des deux domaines N-terminaux sont très similaires (Stebbins et al., 1997).

Plus précisément, l'Hsp90 est l'une des protéines les plus abondantes (1- 2%) dans le cytoplasme des cellules non stressées où il exerce des fonctions d'entretien, de contrôle de la stabilité, de la maturation, de l'activation et de la disposition intracellulaire et protéolytique turn-over d'une pléthore de protéines généralement appelées « protéines clientes » (Pratt, 1997). Ce cycle de conformation est réglementée par les co-chaperons spécifiques, tels que Hsp70, Hop, immunophilines, Cdc37 et p23, qui se complexe avec l'Hsp90 et à s'assembler dans la machinerie de la chaperon Hsp90, afin d'aider le chargement et la libération de protéines clientes (Young et al., 2001). La protéine Hsp90 a été démontré à s'associer à un certain nombre de protéines de signalisation, y compris des facteurs de transcription ligand-dépendant, tels que récepteur de stéroïde (Nathan et Lindquist, 1995), des facteurs de transcription ligand- indépendante, tels que MyoD (Shaknovich et al., 1992), les tyrosine kinases telles que v-Src (Hartson et Matts, 1994), et de la sérine / thréonine kinases tels que Raf-1 (Wartmann et Davis, 1994), et leur principal rôle de chaperon est la promotion de la maturation conformationnelle de ces facteurs de transcription et de transduction du signal kinases (Hinault et Goloubinoff, 2006).

L'Hsp90 existe comme un homodimère et contient trois domaines:

- Le domaine N-terminal, avec une poche de liaison de l'adénine, est responsable de l'activité d'ATPase de la protéine;
- La région de liaison médiane chargée avec une forte affinité pour les co-chaperons (p50CDC37, p23, Aha1) et protéines clientes;
- Le domaine C-terminal de dimérisation qui contient le motif tétratricopeptide de liaison répétée (TRP).

Différentes modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, nitrosylation) semblent réguler la fonction des Hsp90 (Jego et al., 2013).

Une des voies de signalisation intracellulaire déclenchée par TNF α conduit à l'activation des facteurs de transcription du facteur nucléaire kappa B (NF-kB) qui empêchent généralement la mort cellulaire. L'Hsp90 interagit avec lui et stabilise the Receptor Interacting Protein-1

(RIP-1) kinase, une protéine qui relie les récepteurs de mort à l'activation du NF- κ B. En l'absence d'Hsp90, RIP-1 est dégradée, ce qui empêche l'activation de NF- κ B par TNF α et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par cette cytokine (Parcellier et al., 2003). L'action anti-apoptotique de l'Hsp90 se traduit également par sa capacité à interagir avec sérine / thréonine kinase phosphorylés (Akt / PKB), une protéine qui produit un signal de survie, en réponse à la stimulation du facteur de croissance. Akt phosphorylée peut phosphoryler la protéine de la famille Bcl-2 « Bad » et aussi « caspase-9 » (Cardone et al., 1998) conduisant à leur inactivation et à la survie cellulaire. Mais Akt a été également montré pour phosphoryler la kinase I κ B qui se traduit par la promotion de l'inhibition de l'apoptose médiée par NF- κ B (Ozes et al., 1999). La liaison de l'Hsp90 protège Akt de la déphosphorylation médiée par la protéine phosphatase 2A (PP2A) et empêche donc l'inactivation d'Akt (Sato et al., 2000) (Figure 12).

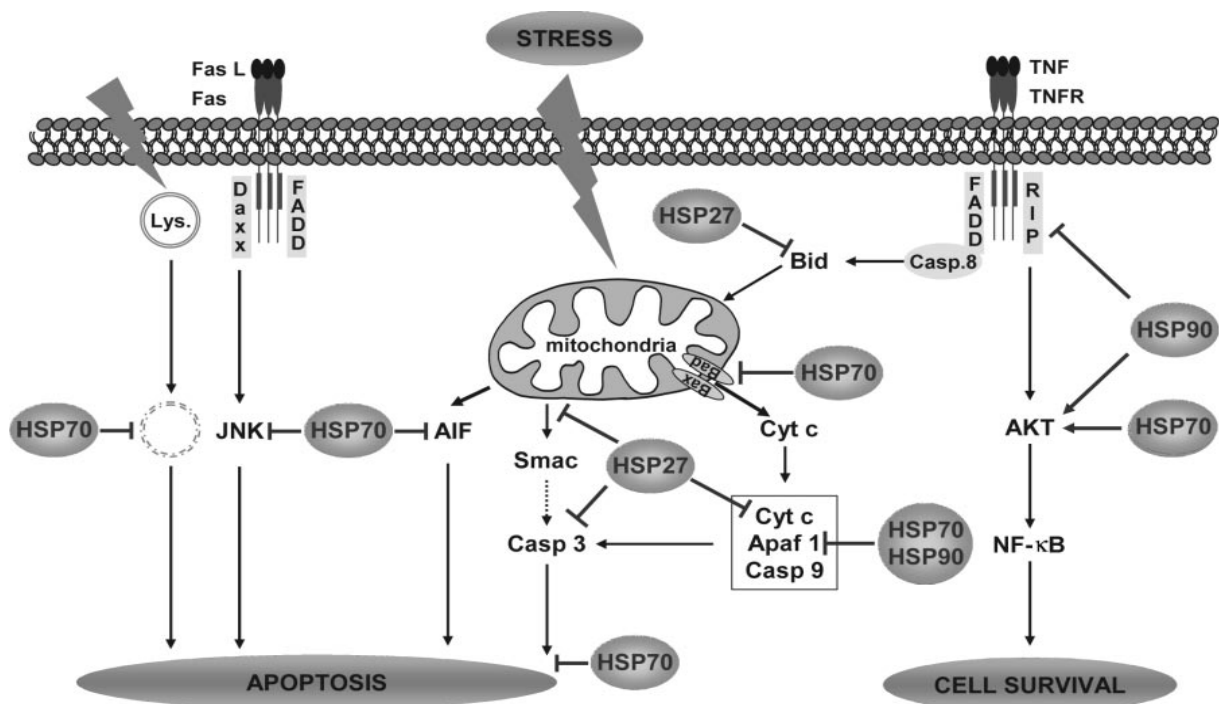


Figure 12: Modulation des voies apoptotiques par les protéines Hsp.

Les Hsps sont surexprimées dans une large gamme de cancers humains y compris les tumeurs solides et les tumeurs malignes hématologiques (Neckers, 2007) et sont impliqués dans la prolifération, la différenciation, l'invasion, la métastase, la mort et la reconnaissance par le système immunitaire des cellules tumorales (Ciocca et Calderwood, 2005). Cela peut être une réponse adaptative par les cellules cancéreuses afin de maintenir l'homéostasie protéique et

favoriser la survie des cellules dans un environnement défavorable, de même que pour stimuler la prolifération cellulaire et inhiber la mort cellulaire (Whitesell et Lindquist, 2005). Des quantités accrues d'Hsp permet aux cellules cancéreuses de tolérer les changements de l'intérieur, telles que des mutations potentiellement mortels qui ont un rôle dans l'oncogénèse (Takayama et al., 2003).

La surexpression de la Hsp90, contrairement à celle de Hsp27 ou Hsp70, a été démontrée pour augmenter le taux d'apoptose dans la lignée cellulaire monoblastoid U937 après induction avec le facteur de nécrose tumorale (TNF) et le cycloheximide (Galea-Lauri et al., 1996). Toutefois, dans ces mêmes cellules l'Hsp90 peut inhiber la mort cellulaire induite par la staurosporine et peut empêcher l'activation des caspases dans les extraits cytosoliques traités par le cytochrome C. Il a rapporté que l'Hsp90, comme l'Hsp70, inhibe l'apoptose à la suite d'un effet négatif sur la fonction de l'Apaf-1. L'Hsp90 se lie directement à l'Apaf-1 et inhibe son oligomérisation et le recrutement ultérieur de procaspase-9 (Pandey et al., 2000). Ces observations contradictoires peuvent refléter une différence dans la signalisation entre les différents stimuli apoptotiques.

Chapitre II: Effets du sesquiterpène coumarine de la plante *Ferula vesceritensis*

Les plantes ont une longue histoire comme des outils thérapeutiques dans le traitement des maladies humaines et ont été utilisées comme sources de médicaments. Dans la recherche de nouveaux produits naturels biologiquement actifs, de nombreuses plantes et herbes utilisées dans la médecine traditionnelle sont sélectionnés pour des produits naturels ayant une activité pharmacologique (Gliszczynska et Brodelius, 2012).

1. Le féruléol, coumarine sesquiterpénique, extrait du *Ferula vesceritensis*

Les sesquiterpènes coumarines constituent une famille intéressante de produits naturels. Ils constituent un groupe de molécules dont les structures sont basées sur un fragment C15 terpénique lié, soit par une liaison éther avec le groupe 7-hydroxy de Umbelliferane (7-hydroxycoumarine), scopolétine (7-hydroxy-6-méthoxycoumarine) ou isoflaxidin (7-hydroxy-6,8-diméthoxycoumarine) ou par l'intermédiaire d'une liaison C-C avec du carbone 3 de 4-hydroxycoumarine. Les sesquiterpénoïdes de type prenyl-furocoumarine constituent un groupe distinct de sesquiterpènes coumarines.

Les sesquiterpènes coumarines sont trouvés dans certaines plantes de la famille des Apiacées (Umbelliferae), Asteraceae (Compositae) et Rutaceae. Le genre *Ferula* est une source très riche de sesquiterpènes coumarines. Il comprend plus de 150 espèces répandues en Asie centrale, Moyen-Orient et dans la région méditerranéenne. La systématique de *Ferula* est encore un sujet de controverse. Les variétés chimiques des différents types de plantes issues de différentes régions sont encore le principal but des études de nombreux groupes de recherche.

Les sesquiterpènes coumarines ont été utilisés comme des marqueurs chimiosystématiques. Les études sur les constituants chimiques de ce genre se sont développées rapidement au cours des 20 dernières années et environ 130 différentes sesquiterpènes coumarines ont été signalés dans ce genre (Lee et al., 2009). Plusieurs espèces du genre *Ferula* sont utilisées comme épices et sont bien connue comme les plantes médicinales avec une large gamme d'activités biologiques documentées.

Les sesquiterpènes coumarines isolés principalement du genre *Ferula* possèdent des activités antivirales, antibactériennes, anti-leishmania, anti-inflammatoire et anti-tumorale (Gliszczynska et Brodelius, 2012).

Ainsi, il existe un intérêt considérable dans la chimie et de la pharmacologie des plantes appartenant au genre *Ferula*. *Ferula vesceritensis* est indigène du Sahara algérienne (Ozenda, 1983). Selon l'enquête ethnobotanique, la décoction de fruits a été utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter les maux de tête, la fièvre et les infections de la gorge. Une étude effectuée sur les racines de *Ferula vesceritensis* a conduit à l'isolement des deux nouveaux sesquiterpènes coumarines: 13-3-hydroxyfeselol et angeloxycoladin, en plus de deux des composés connus : coladin et coladomin (Ahmed et al., 2007). Le féruléol a également été isolé de ses racines (Lahouel et al., 2007), il représente un métabolite secondaire qui se trouve dans le genre *Ferula*. Actuellement, il y a un intérêt considérable dans la chimie et de la pharmacologie des espèces *Ferula* qui n'a pas été beaucoup étudié auparavant.

2. Effets cytotoxiques du féruléol

Le 4-hydroxycoumarine prénylée "féruléol" (figure 13) représente les principaux toxiques de *Ferula vesceritensis*, répartis dans la région méditerranéenne. Le féruléol a été rapporté pour provoquer des hémorragies « ferulosis » (Monti et al., 2007) et produit une toxicité et une activité anticoagulante.

Des études antérieures chez l'animal traité par le féruléol indiquent une forte diminution de l'activité de plusieurs facteurs de coagulation (Tligui et al., 1994). Par conséquent, ils ont d'abord mis l'accent sur les effets globaux du féruléol sur la cascade de la coagulation, en utilisant le temps de prothrombine (PT) de dosage de plasma normal additionné de différentes concentrations de féruléol (0,1 - 5 μ M).

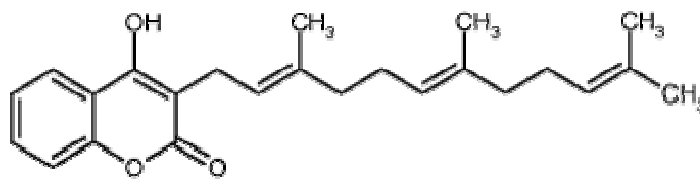


Figure 13 : Structure du féruléol (Monti et al., 2007).

Il a été estimé que la valeur de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est inférieure à 2,5 g / ml pour la croissance de *S. aureus*, *Streptomyces scabies*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* et de *Pseudomonas aeruginosa* et à 4,5 à 5,0 g / ml pour *E. coli*, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus Niger* (Ahmed et al., 2005). Ces résultats des constatations antérieures ont confirmé que le féruléol et son acétate présente une activité antibactérienne vers

Mycobacterium intracellulare, *M. xenopei*, *M. chelonae* et *M. smegmatis* (Al-Yahya et al., 1998, Mossa et al., 2004) avec des valeurs de CMI beaucoup plus faibles (1,25 à 5,0 lg / ml) que celle des témoins positifs (sulfate de streptomycine, l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH) et sulfate d'amikacine). En outre, leur action synergique avec l'hydrazide de l'acide isonicotinique vers les mêmes souches de *Mycobacterium* a augmenté l'effet biologique de plus de 50%. La toxicité du féruléol et d'autres 4-hydroxycoumarines farnésylées naturels et synthétiques a été aussi rapportée contre la croissance rapide des souches mycobactériennes: *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. aurum*, et *M. smegmatis* (Appendino et al., 2004). La modification structurale du féruléol a montré que l'introduction d'un groupe hydroxy ou acetoxy à la position C-12 a provoqué une réduction de la puissance, alors qu'un substituant benzoyloxy à C-12 a donné lieu à une plus grande activité contre les souches de *Mycobacterium* testées.

Le féruléol montre une cytotoxicité substantielle, bien que dépendante de la lignée cellulaire étudiée. Il a été suggéré que le féruléol exerce une activité cytotoxique dose-dépendante contre diverses lignées cellulaires tumorales humaines (Bocca et al., 2002).

Les rapports initiaux ont indiqué que certains coumarines présentent une activité anti-tumorale dans une gamme de tumeurs malignes avancées, y compris le cancer de la prostate. Plus récemment, une série de dérivés naturels et synthétiques coumarinés ont été rapportés à exercer des effets cytotoxiques dans différentes lignées cellulaires de mélanome et ont été proposés pour un rôle chimiothérapeutique (Maucher et al., 1993). De plus, nous avons précédemment montré que certains composés coumarinés inhibent la croissance de diverses lignées de cellules tumorales, probablement par une interaction avec le système microtubulaire (Bocca et al., 2002).

Le féruléol n'a pas influencé l'assemblage de la tubuline induite par le GTP, mais stimule la polymérisation de la tubuline en l'absence de GTP, avec un profil de polymérisation moins étendue à une concentration de 100 pM. Le mode d'action de féruléol pour la polymérisation est apparemment semblable à celle du paclitaxel, un composé naturel diterpénique anti-tumoral, bien connu qui favorise la polymérisation de la tubuline en microtubules stables (Bocca et al., 2002). Le féruléol diminue la colchicine radio-marquée liée par la tubuline, d'une manière dépendante de la dose et de manière significative à la concentration de 1 μ M.

Le féruléol inhibe le processus de phosphorylation oxydative par une interaction avec l'ANT et le complexe II de la chaîne respiratoire. Ces dernières observations ont conduit à la suggestion que les mitochondries peuvent être impliquées dans la cytotoxicité du féruléol. Ainsi, les propriétés structurales du noyau 4-hydroxy-coumarine du féruléol sont compatibles avec une interaction potentielle avec le complexe II de la chaîne respiratoire

mitochondriale, mais le sort de l'espèce réduite impliqués dans cette étape de piègeage des électrons apparaît largement différent du sort de réduction les espèces de l'ubiquinone. Ces observations peuvent être à l'origine de l'inhibition du complexe II mitochondrial par le féruléol et peuvent expliquer la neutralisation de l'ubiquinone dans les dosages biologiques (Lahouel et al., 2007).

**MATERIEL &
METHODES**

Modèle animal

Les expériences ont été menées dans le respect de la convention sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à des fins scientifiques. L'ensemble de l'expérimentation sur le rat de cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire de l'université de Jijel.

I. Effet du traitement par le féruléol au cours d'un cancer pulmonaire induit par le Benzo[a]pyrène et ciblage de protéines apoptotiques Bcl-2/Bax, Hsp90 et P-gp

1. Matériel

1.1. Produits chimiques

Nous avons utilisé le Benzo[a]pyrène (cat n°. B10080, Sigma Aldrich.) ; il a été solubilisé dans l'huile d'olive à une concentration de 100 mg/kg et administré aux rats par voie IP.

1.2. Préparation du féruléol

Le féruléol a été extrait, par le Pr. Zellagui au sein du Laboratoire de Substances Bioactives d'Oum Bouaghi, des racines de la plante *Ferula vesceritensis* recueillies de la région M'zab-Ghardaïa, Algérie. Environ 1,5 kg de la poudre de racines a été séchées à l'air et dissous dans un mélange dichlorométhane-méthanol à une température ambiante pendant 48 h ceci a donné 30 g d'une huile visqueuse. Cet extrait a été préfractionné sur une colonne de gel de silice éluée avec du n-hexane contenant des quantités croissantes de dichlorométhane.

La fraction n-hexane-chlorure de méthylène (1: 1) comprenait plusieurs composés qui ont été en outre séparé par Chromatographie sur colonne répétée sur une colonne de gel de silice (n-hexane-chlorure de méthylène-méthanol (7: 4: 1). Le féruléol (70 mg) a été ensuite purifié par Chromatographie sur couche mince développé dans le n-hexane-éther diéthylique (1: 2) sur le gel de silice (60F254) étalé sur une feuille d'aluminium (0,2 mm).

Le féruléol de structure $C_{24}H_{30}O_3$ est dissout dans le DMSO à une concentration de 50 mg/kg et administré par voie IP.

1.3. Entretien et traitement des animaux

Dans cette étude, nous avons utilisé des rats mâles « Wistar Albinos » âgés de 11 à 12 semaines de l'institut Pasteur d'Algérie. L'élevage des rats a été effectué au niveau de l'animalerie de l'université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel.

Les animaux pesants environs 150 à 200 g sont élevés dans des cages. Les rats ont été soumis à une période d'adaptation d'une semaine environ, aux conditions de l'animalerie, à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une photopériode (12/12h). Ils ont un accès libre en eau et alimentation composée de maïs, saccharose, soja, son, C.M.V et huile.

Les animaux ont été répartis en quatre groupes de huit rats chacun. En plus d'une nourriture simple et d'eau potable, du B[a]P et/ou du féruléol à des proportions définies auparavant ont été administré : une seule administration du B[a]P à 100 mg/kg (Likhachev et al., 1992) (administration unique pour une durée de 24 semaines) et du féruléol à 50 mg/kg (une seule administration pour une durée d'une semaine) correspond à une durée totale de 25 semaines (durée suffisante pour le développement et traitement d'un cancer broncho-pulmonaire).

Les différents traitements des rats sont comme suit :

Groupe 01 « Témoin (T) » : Huit rats reçoivent une dose unique (IP) de 0.5 ml de l'huile d'olive (véhicule 01).

Groupe 02 « Benzo[a]pyrène (B) » : Huit rats reçoivent une seule injection de B[a]P de 100 mg/kg dissout dans 0.5 ml d'huile d'olive par voie IP. Après 24 semaines, ils reçoivent 1ml du véhicule 02 (DMSO) en une injection unique IP.

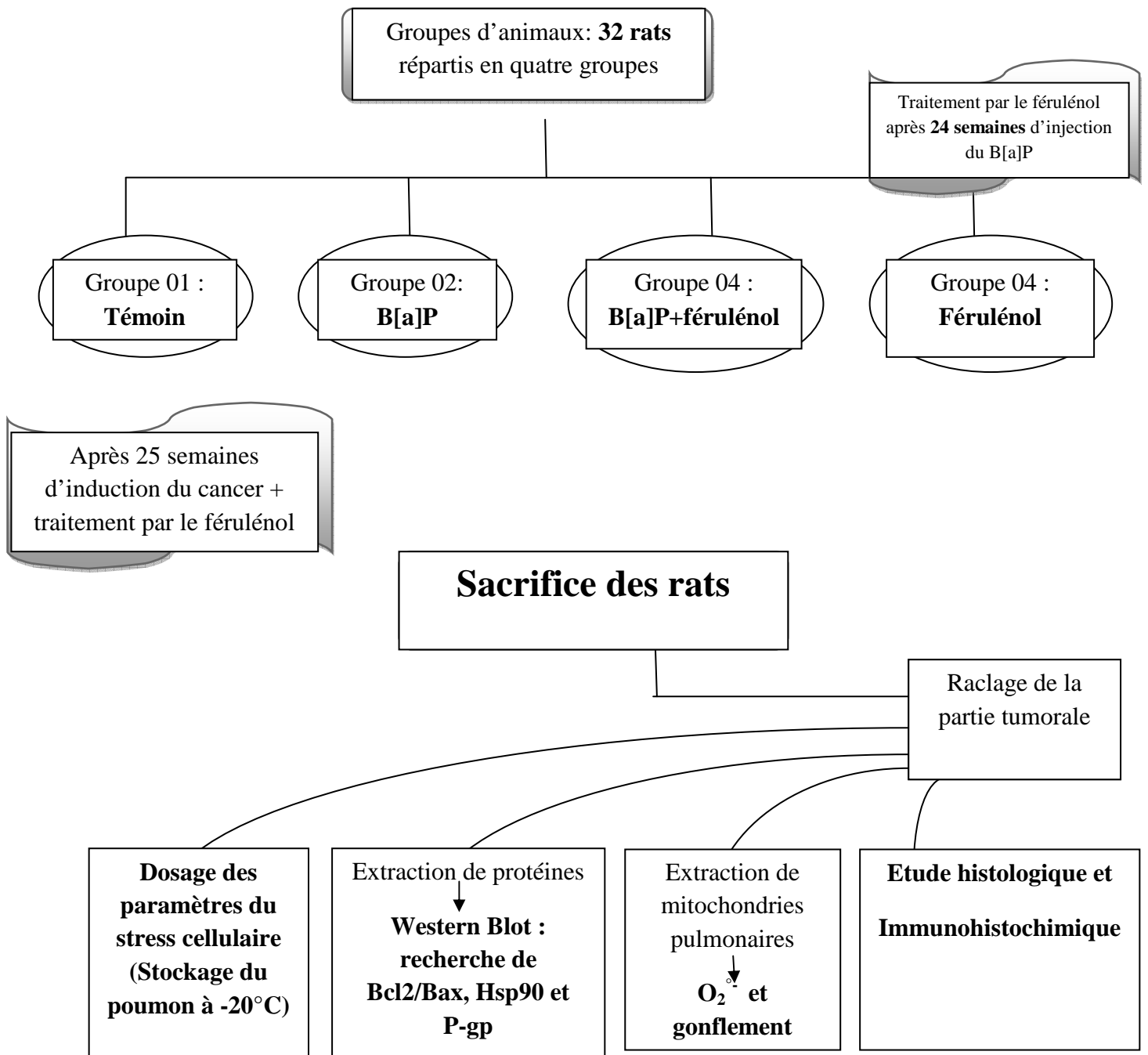
Groupe 03 « Benzo[a]pyrène + féruléol (BF50) » : Huit rats reçoivent une seule injection de B[a]P de 100 mg/kg dissout dans 0.5 ml d'huile d'olive par voie IP. Après 24 semaines, ils reçoivent une dose unique IP de 50 mg/kg du féruléol dissout dans DMSO.

Groupe 04 « Féruléol (F50) » : Huit rats reçoivent une dose unique IP du féruléol à 50 mg/kg dissout dans DMSO.

1.4. Prélèvements biologiques

Tous les rats ont été sacrifiés après anesthésie par l'éther, une semaine après l'administration du féruléol. Chaque poumon a été collecté, lavé à plusieurs reprises dans le NaCl 0.9% et imbibé en papier buvard pour débarrasser du sang, puis pesé et soumis à un examen macroscopique. Ainsi, une partie des poumons a été stockée à -20°C pour l'évaluation des paramètres du stress oxydatif cellulaire, une deuxième partie a été utilisée immédiatement pour la préparation de la fraction mitochondriale, une troisième partie servira pour l'extraction des protéines totales pour le Western blot et une dernière partie a été fixée dans le formol 10% pour l'étude histopathologique.

In vivo



In vitro

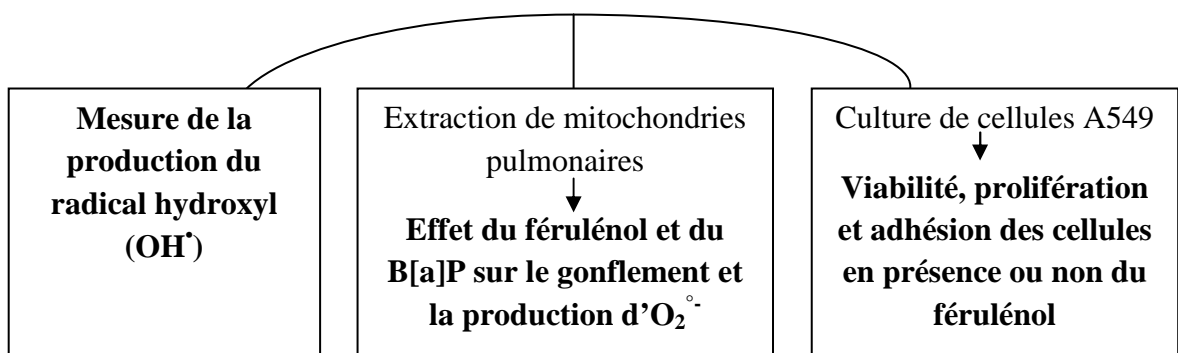


Figure 14 : Différentes étapes de l'étude expérimentale

2. Méthodes

2.1. Détection des radicaux libres générés

2.1.1. Extraction des mitochondries pulmonaires

L'extraction des mitochondries a été faite selon la méthode basée sur une centrifugation différentielle (Rustin et al., 1994).

Après le sacrifice des rats des différents groupes, les poumons ont été prélevés et coupés finement dans le tampon d'isolement (Sucrose 250 mM, Tris base 20 mM, EGTA 10 mM pH 7.4). Les particules coupées sont ensuite rincées deux fois dans le même tampon et potérisées dans un potter de DOUNCE, ce qui permet la destruction des cellules et la libération de mitochondries. L'homogénat récupéré est centrifugé à 800 g pendant 10 minutes à 4°C permettant ainsi l'élimination de gros débris cellulaires. Le surnageant issu de cette centrifugation est centrifugé une deuxième fois à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C et le culot obtenu est resuspendu dans le tampon d'isolement puis centrifugé à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C. Un dernier rinçage semblable est effectué et le culot mitochondrial est finalement resuspendu dans le tampon d'isolement. Un dosage des protéines mitochondriales est effectué en utilisant la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2.1.2. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde

La génération de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ est évaluée en mesurant la réduction du nitrobleutétrazolium (NBT^{2+}) par le superoxyde en monoformazan, qui absorbe à 560 nm, selon la réaction suivante :



Dans un volume final de 1.2 ml de tampon respirant avec roténone, nous avons introduit 0.2 mg/ml de suspension mitochondriale, 1.2 µl de la cyclosporine (1 µM), 12 µl du NBT^{2+} (100 mM). Après une incubation pendant 1 minute, nous avons additionné 7.2 µl du succinate (6 mM) et la variation de l'absorbance est suivie à 560 nm pendant 360 secondes.

Le pourcentage de production de l' $O_2^{\circ-}$ est calculé en prenant le 100% du contrôle.

2.1.3. Mesure *in vitro* de la production du radical hydroxyl (OH[•]) par le féruléol

La génération du radical hydroxyl (OH[•]) par le féruléol a été réalisée *in vitro* dans une solution contenant 1ml de Phenanthroline, 1ml du tampon phosphate (0.02 M, pH= 7.4), 1ml d'eau distillée ou 1ml de la solution du féruléol à différentes concentration : 10⁻¹M, 10⁻²M, 10⁻⁴M, 10⁻⁶ M et 10⁻⁸ M et 1ml de FeSO₄ (2.5 mM). La réaction commence par l'addition d'1ml d'H₂O₂ (20 mM). Après un temps d'incubation d'une heure et 30 sec à 37°C, la lecture de l'absorbance est effectuée à 536 nm.

Le pourcentage de la production du radical hydroxyl est donné par l'équation suivante :

$$\% \text{ de production} = \left[\frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \right] \times 100\%$$

A_b= Absorbance quand 1ml d' H₂O₂ est remplacé par 1ml d'eau distillée.

A_s = Absorbance quand 1ml d'eau distillée est remplacé par 1ml du ferulenol à différentes concentrations.

A_p = Blanc sans H₂O₂.

2.2. Mesure des dégâts cellulaires

2.2.1. Mesure de la peroxydation lipidique : Test TBARS

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la peroxydation lipidique qui résulte de la coupure, par les radicaux libres, des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. La réaction de l'acide thiobarbiturique avec la MDA permet la formation d'un chromophore rose mesurable à 532 nm.

200 mg de poumon des différents groupes ont été coupés en morceau et finement broyés à froid à l'aide d'un Potter de DOUNCE en présence de 1.8 ml d'une solution de KCl 1.15% pour obtenir un homogénat.

Pour ce dosage, nous avons utilisé la méthode décrite par Ohkawa et al., (1979). A 0.5 ml de l'homogénat nous avons additionnée 0.5 ml d'acide trichloracétique 20% et 1ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67%. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 min à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant à 532 nm. Le taux du MDA est déduit à partir d'une

gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant une solution du tétraéthoxypropane. La concentration du MDA est exprimé en nM/ mg de protéines.

2.3. Mesure des capacités antioxydantes enzymatiques et non-enzymatiques

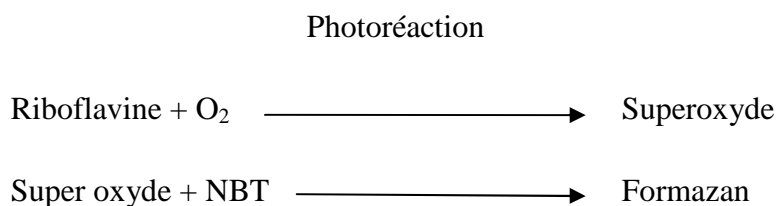
2.3.1. Mesure du taux de glutathion cytosolique

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode d'Ellman (1959). Le principe de la réaction consiste en l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm.

200 mg de poumons des différents groupes ont été coupés et homogénéisés avec l'acide trichloracétique TCA (5%) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. Puis l'homogénat est centrifugé à 2000 rpm et 50 µl du surnageant ont été dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH= 8). 20 µl du DTNB (0.01M) ont été ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 15 min d'incubation, la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%). La concentration du GSH est exprimé en mM/ g de tissu.

2.3.2. Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité enzymatique de la SOD est déterminée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich, (1971). Cette activité enzymatique dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitroblu-tetrazolium (NBT) par l' $O_2^{\circ -}$ produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'élection comme la méthionine selon la réaction suivante :



500 mg de poumon des différents groupes ont été coupés et homogénéisés avec le tampon phosphate (0.1 M, pH= 7.4) contenant du KCl 1.15M à l'aide du broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min à 4°C pour séparer les débris cellulaires. Le surnageant est centrifugé à 10000 rpm pendant 45 min à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source enzymatique.

A 2 ml du milieu réactionnel (Cyanide de sodium 10^{-2} M solution du NBT $1,76 \times 10^{-4}$ M, EDTA 66×10^{-3} M et la riboflavine 2×10^{-6} M), nous avons ajouté 5 μ l de la source enzymatique. Après, le mélange est irradié avec une lampe de 15 watt pendant 10 min et l'absorbance est mesurée à 560 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions mais sans source enzymatique.

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

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{abs du contrôle} - \text{abs de l'essai}) / \text{abs du contrôle}] \times 100$$

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

2.3.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la catalase (CAT) est déterminée par la méthode de Claiborne, (1985). Le principe de cette technique est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de la source enzymatique.

Dans la cuve de mesure, nous avons mis 1ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 0.1M, pH= 7.2), 950 μ l d' H_2O_2 (0.019M) et 25 μ l de la source enzymatique. La lecture de la densité optique est effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes.

$$[\text{CAT}] (\mu\text{mole/min/ mg de protéines}) = (2.3033/ T \times \log A_1/A_2) / \text{mg de protéines}$$

Sachant que : A_1 : Absorbance au temps 0 mn.

A_2 : Absorbance après 1 mn.

T : Intervalle de temps en mn.

2.3.4. Mesure de l'activité enzymatique du glutathion S-transférase (GST)

L'activité enzymatique de la GST est déterminée selon la méthode de Habig et al., (1974). Cette activité enzymatique est étudiée en cinétique. Le substrat utilisé est le chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) préparé dans l'éthanol 95°. L'enzyme a besoin d'un second substrat pour être active, additionné sous forme de glutathion. L'enzyme permet le transfert du glutathion riche en électron ($\text{GSH} = \text{GS}^- + \text{H}^+$) sur le CDNB chargé positivement par gain d'un proton.

La mesure de l'activité enzymatique est effectuée au spectrophotomètre à 340 nm et à 25°C. Dans la cuve de mesure, nous avons introduit 850 µl du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0.1 M, pH = 6.5), 50 µl de CDNB (20 mM), après 10 minutes d'incubation à 37°C, 50 µl de glutathion (20 mM) et 50 µl de l'homogénat (cytosol) sont ajoutés à la cuve de mesure. L'absorbance est suivie pendant 5 minutes à 340 nm.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$[\text{GST}] \text{ (nmol GST/ min/mg de protéines)} = \frac{\text{DA} \times \text{V total} \times \text{D}}{9.6 \times \text{V ech}}$$

DA= Abs T5 - Abs T1

D= Dilution

V ech= Volume de l'échantillon à tester.

2.3.5. Mesure de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la GPx a été mesurée selon la méthode de Flohe et Gunzler, (1984). Le principe de cette méthode est basé sur la réduction d'H₂O₂ en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



100 mg du poumon des différents groupes ont été broyés à froid à l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE avec 1 ml d'une solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) pour obtenir un homogénat. À 0.2 ml de ce dernier, nous avons ajoutés 0.4 ml de GSH (0.1 mM) et 0.2 ml du tampon TBS. Après une incubation au bain marie à 25°C pendant 5 min, nous avons additionné 0.2 ml d'H₂O₂ (1.3mM) pour initier la réaction. Après 10 min, 1 ml de TCA (1%) a été ajouté au mélange pour stopper la réaction. Puis une centrifugation de 10 min à 3000 rpm a été réalisée après un temps d'incubation de 30 min dans la glace. À 0.48 ml du surnageant, nous avons ajoutés 2.2 ml du TBS et 0.32 ml de DTNB (1mM). Le mélange est incubé 5 min puis une lecture de la densité optique a été effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

$$X = \frac{(DO \text{ échantillon} - DO \text{ étalon}) \times 0.04}{DO \text{ étalon}}$$

$$GPx (\mu\text{mol GSH} / \text{mg protéine}) = \frac{\text{Quantité GSH disparu}}{[\] \text{ de protéine}}$$

2.4. Mesure de l'apoptose

2.4.1. Mesure du gonflement mitochondrial

Le gonflement mitochondrial est quantifié par spectrophotométrie : la lumière absorbée par une suspension de mitochondries étant inversement proportionnelle à la taille des particules (mitochondrie), le gonflement mitochondrial est estimé en mesurant la décroissance de l'absorption de la suspension mitochondriale à 540 nm.

Nous avons utilisé le protocole décrit par Elimadi et al., (1997). Dans un volume final de 1.8 ml du tampon respirant nous avons introduit 0,2 mg/ml de mitochondries, 10.8 μ l du succinate à 6 mM. Après une minute d'incubation nous avons ajouté 2.25 μ l du Ca Cl_2 à 100 mM. La décroissance de l'absorbance est suivie à 540 nm chaque minute pendant 3 min.

2.5. Evaluation de l'expression de protéines du tissu pulmonaire

2.5.1. Extraction de protéines totales

L'expression de protéines totales des tissu pulmonaires des différents groupes a été préparé par la lyse du tissu pulmonaire dans un tampon de lyse [NaCl 150 mM, NP-40 1% ou Triton \times -100 0.1%, Sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, Tris-HCl 50mM, pH= 8 et les inhibiteurs de protéase]. L'homogénat a été soniqué, à froid, 3 fois pendant 2 secondes chacun puis il a été centrifugé à 13000 g pendant 15 min à 4°C pour sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant obtenu a été utilisé pour la mise en évidence de protéines Bcl-2/Bax, Hsp90 et P-gp.

2.5.2. Electrophorèse et immunodétection par western blot de Bcl-2, Bax, Hsp90 et P-gp

Les échantillons ont été mélangés avec le tampon (Tris 40 mM, SDS 1%, glycérol 6%, B-mercaptoéthanol 1%, pH= 6.8). Les homogénats ont été ensuite chauffés à 100°C pendant 5

minutes, puis déposés sur un gel de polyacrylamide. Un marqueur de taille permet de localiser les protéines Bcl2, Bax, Hsp90 et P-gp.

Après la migration électrophorétique, les protéines ont été transférées à voltage constant en milieu humide sur une membrane de nitrocellulose. Une fois le transfert réalisé, les sites de fixation non-spécifique des anticorps ont été saturés par une incubation avec de lait écrémé en poudre [10g/ 200 ml de tampon TBS (Tris 20mM, NaCl 140mM, pH= 7.6)]. Les membranes ont été ensuite incubées avec les anticorps primaires spécifiques des protéines Bcl-2 (mouse, 1:200, cat n°. M0887, Dako), Bax (rabbit, 1:100, cat n°. A3533, Dako), Hsp90 (rabbit, 1:500, cat n°. SAB4501461, Sigma-Aldrich), P-gp (mouse, 1:71, cat n°. C219, Invitrogen) et β -actine (mouse, 1:3000, cat n°. ab11003, Abcam) toute la nuit à 4°C. Après 3 lavage successifs de 10 minutes avec du tampon TBS-T [(Tris 20 mM, NaCl 140 mM, pH= 7.6)- tween 20 0.1%], les membranes ont été alors incubées avec l'anticorps secondaires (rabbit anti-mouse, ab 97046 ou goat anti-rabbit, ab 97051, Abcam) anti-immunoglobuline couplé à la horseradish peroxidase (HRP). Les membranes ont été à nouveau rincées 2 fois pendant 10 minutes avec du tampon TBS-T, puis une dernière fois avec le tampon TBS.

L'immunodétection a été réalisée avec un Kit ECL (Enhanced Chimiluminescence, RPN 2106, Amersham). Les photographies des membranes ont été analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image.

2.6. Evaluation histopathologique

Pour la préparation des coupes histologiques, les prélèvements pulmonaires des différents groupes ont été préalablement enrobés par passage de chaque prélèvement dans une série de bains d'alcools de concentrations croissantes (Shander Citadel 2000, Thermo scientific, Germany) qui déshydratent et dissolvent les graisses figurées intra-tissulaires ensuite de permettre l'imprégnation de la paraffine dans le tissu. L'imprégnation a été effectuée grâce à un distributeur automatique de paraffine (Shandon Histocenter 3, Thermo electron corporation, Germany). La coupe du bloc de paraffine au microtome (Leica, RM 2125 RT) nous a permis de réaliser des coupes très fines de 2 microns d'épaisseur. Les coupes ainsi obtenus sont déposées et collées sur des lames en verre.

Enfin, les coupes histologiques ont été déparaffinées au xylène et réhydratées dans des bains d'alcools de concentrations décroissantes. Pour permettre la mise en évidence des différentes structures tissulaires et cellulaires, les coupes obtenues ont été colorées par l'hématoxyline /

éosine (HE) (Shandon Varistain 24-4, Thermo electron corporation, Germany) ; technique de coloration usuelle associant un colorant nucléaire (hématoxyline) et un colorant cytoplasmique (éosine).

L'examen au microscope optique permettant l'évaluation des changements pathologiques tissulaires du poumon a été réalisée après montage de la préparation sous lamelle.

2.7.Détection immunohistochimique du marqueur de prolifération Ki-67

Dans cette partie de la thèse, nous avons réalisé une étude immunohistochimique des facteurs de prolifération et de l'apoptose pour savoir si leur présence avait un intérêt pronostique. Pour cela, l'expression du Ki-67 et de l'Hsp90 dans le tissu pulmonaire de rats traités par le B[a]P et / ou le féruléol a été recherchée.

Nous avons mesuré le facteur de prolifération cellulaire Ki-67 par un anticorps MIB-1 en immunohistochimie à partir d'échantillons de poumons formol-arrangés et paraffinés de quatre groupes d'animaux (T, B, BF50 et F50) de notre étude.

Après inclusion en paraffine, nous avons réalisé de coupes fines (5 µm) montées à l'eau sur des lames de verre polysineTM (LABONORD S.A, Templemars, France). Après un séchage pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C, nous avons placés les lames à l'étuve à 56°C pendant quelques heures. Après, ces dernières ont été déparaffinées et les sites antigéniques ont été démasqués en tampon citrate pH=6 pendant 20 min à 97°C. Après un rinçage avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH=7.6 pendant 5 min, un blocage des peroxydes endogènes avec le réactif En VisionTM FLEX peroxidase Blocking Reagent soit avec un tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, NaN₃ 15 mmol/ l et un détergent pendant 5 min a été réalisé. Un lavage de 5 min a été ensuite effectué. Nous avons incubés les lames avec l'anticorps primaire anti Ki-67 (Anti Ki-67 monoclonal : MIB-1, dilution 1 : 50, DAKO, réf : M7240) pendant 1 heure et après un rinçage de 5 min, nous avons fait une incubation pendant 15 min avec l'anticorps secondaires puis un lavage de 15 min à été effectué. Par la suite, le dépôt d'un polymère marqué avec En VisionTM FLEX/HRP pendant 20 min a été réalisé. Nous avons rincé deux fois pendant 5 min et une révélation chromogène avec En VisionTM FLEX substrate buffer (solution tamponnée diluant une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et le chromogène diaminobenzidine (DAB) et un agent conservateur) a été faite pendant 10 min. Après un rinçage de 5 min, une contre coloration avec En VisionTM FLEX Hematoxylin soit une solution aqueuse d'hématoxyline

pendant 5 min et après un dernier rinçage à l'eau distillée, le montage à l'Eukitt ® (LABONORD S.A, Templemars, France) après une déshydratation par des bains successifs d'éthanol à 70°, 96° et 100° a été pratiqué.

II. Etude *in vitro* du Benzo[a]pyrène et du féruléol sur les fonctions mitochondriales pulmonaires

1. Préparation des solutions du B[a]P et du féruléol

1.1. Préparation des dilutions du féruléol

La substance bioactive « féruléol » est extraite de la plante *Ferula vesceritensis*, elle a été préparée dans le DMSO. La solution mère est préparée à une concentration de 10^{-1} M et à partir de laquelle les concentrations utilisées (10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-6} M) sont ensuite préparées par dilution dans le DMSO.

1.2. Préparation des dilutions du B[a]P

Le B[a]P est dilué dans le DMF (N,N Diméthylformamide). Cette solution est considérée comme une solution mère (0.1M) et à partir de laquelle, nous avons réalisé une gamme de concentrations (10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M).

2. Isolement des mitochondries de poumon

L'isolement des mitochondries pulmonaires se fait par la méthode décrite par Willet et ses collaborateurs avec une légère modification (Willet et al., 2000). Cette méthode est basée sur le principe de la centrifugation différentielle. Toutes les étapes suivantes ont été exécutées à 4°C. Après sacrifice des rats, les poumons ont été immédiatement prélevés et lavés dans le NaCl 0,9 % froid. Les lobes des poumons ont été séparés, les majeures bronches visibles et les vaisseaux sanguins éliminés et les tissus lavés plusieurs fois dans un milieu d'homogénéisation TSE (0,25 M Sucrose, 0,01 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA, pH = 7,4). Les poumons ont été coupés en petits morceaux et homogénéisés dans la solution de TSE selon le poids du poumon, (4ml TSE pour 1g de poumon) et broyés dans un broyeur de DOUNCE ce qui permet la destruction des cellules et la libération des mitochondries. Les homogénats récupérés ont été centrifugés une première fois à 2000 xg pendant 10 min par une centrifugeuse (Sigma 3-16 Pk) permettant ainsi l'élimination des gros débris cellulaires et la fraction de surnageant a été recentrifugée à 17500 xg pendant 10 minutes. Les culots ainsi obtenus de la deuxième centrifugation ont été remis en suspension dans 1,5 ml dans le milieu

d'isolement, puis centrifugés à 600 xg pendant 10 minutes. Le surnageant issu de cette centrifugation est centrifugé à nouveau à 19000 xg pendant 12 min, le culot obtenu est suspendu dans 1 ml du tampon TSE et centrifugé pendant 12 min à 19000 xg. Le culot final constitue les mitochondries, il est reprise dans 350µl de tampon TSE, permettant de conserver les fonctions physiologiques des mitochondries en suspension qui sert à étudier la production de l'O^{2°-}, le gonflement mitochondrial, le dosage du MDA mitochondrial et la mesure du taux de la Mn/SOD.

2.1. Stimulation des mitochondries *in vitro*

Après l'extraction des mitochondries pulmonaires, le culot final est suspendu dans 350 µl du TSE, ensuite le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford, 1976. La suspension mitochondriale a subi plusieurs traitements à différentes concentrations :

Dans un volume final de 500 µl, 400 µl de la solution mitochondriale d'une concentration de protéines de 0,4mg/ml a été additionnée avec 50 µl du TSE et 50 µl de la substance à tester à différentes concentrations (B[a]P ou féruléol), les contrôles sont préparés comme suit :

-Contrôle B[a]P : 50 µl DMF (solvant du B[a]P) + 50 µl du TSE + 400 µl de la suspension mitochondriale.

- Contrôle féruléol: 50 µl de DMSO (solvant du féruléol) + 50 µl du TSE + 400 µl de la suspension mitochondriale.

Après cinq minutes d'incubation, une centrifugation de 15000 rpm pendant 20 min et à 4°C a été effectuée, le culot obtenus est suspendus dans 100 µl de la solution hypotonique (25 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, pH 7.2), la suspension mitochondriale est subdivisée en des aliquotes pour effectuer l'extraction de la matrice mitochondriale.

2.2. Extraction de la matrice mitochondriale

Les mitochondries traitées et récupérées dans la solution hypotonique ont été subit une série de 6 à 8 congélation-décongélation répétées avec broyage vigoureux après chaque décongélation afin d'éclater les mitochondries et libérer les enzymes mitochondriales, puis une centrifugation de 20 minutes à été effectuée à 9600 rmp à 4c°. Le surnageant obtenu est utilisé comme source enzymatique qui sert pour le dosage l'activités de la Mn/SOD (Belli et al., 2010).

2.2.1. Mesure de la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) *in vitro* par les mitochondries pulmonaires de rats

L'anion superoxyde est généré par les mitochondries notamment par le complexe I et III de la chaîne respiratoire (Dupic et al., 2010). La génération de l' $O_2^{\circ-}$ par les mitochondries a été évaluée selon la méthode de Zini et ses collaborateurs (1998) en mesurant la réduction du NBT (de couleur jaune) par le superoxyde en monoformazan (de couleur bleue) qui absorbe à 560nm.

La suspension mitochondriale est utilisée à 0,2 mg/ml dans un mélange réactionnel de volume final de 1.2 ml du tampon respirant avec roténone contenant 1 μ M CsA, 100 μ M NBT, et enfin 120 μ l de l'extrait à tester à différentes concentrations (B[a]P ou féruléol). Après incubation pendant 1min, la réaction est amorcée par addition de succinate (6mM), le taux de NBT réduit est mesuré au spectrophotomètre à 560nm pendant 4min, le pourcentage de production d' $O_2^{\circ-}$ est calculé en prenant le 100% du contrôle.

2.2.2. Mesure du gonflement mitochondrial *in vitro* par les mitochondries pulmonaires de rats

La mesure du gonflement mitochondrial a été réalisée en adoptant la méthode d'Elimadi et al., (1997). Dans un volume final de 1,8 ml du tampon respirant nous avons introduit 0,2 mg/ml de mitochondries et 10,8 μ l du succinate à 6 mM. Après une minute d'incubation nous avons ajouté 180 μ l de différentes concentrations de l'extrait à tester (B[a]P ou féruléol). La décroissance de l'absorbance est suivie à 540 nm chaque minute pendant 3 min.

2.2.3. Dosage de l'activité enzymatique de la Superoxyde dismutase mitochondriale (Mn/SOD)

L'activité de la Mn/SOD est mesurée sur le surnageant de la matrice mitochondriale par la mesure de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du NBT par l' $O_2^{\circ-}$ produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine (Beauchamps et Fridovich, 1971).

2.2.4. Mesure de la peroxydation lipidique mitochondriale *in vitro*

La peroxydation lipidique dans la mitochondrie pulmonaire est évaluée par le dosage du malondialdéhyde (MDA) selon la méthode d'Ohkawa et al., (1979). *In vitro*, cette peroxydation lipidique est induite par le $FeCl_2/FeCl_3$ dont le principe est l'induction de la

réaction de Fenton et la formation du radical hydroxyle qui attaque les acides gras polyinsaturés. En milieu chaud et à 100°C, une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbituriques (TBA) pour former un complexe coloré en rose qui absorbe à 530 nm.

Pour le dosage du MDA, les mitochondries pulmonaires sont suspendues dans le NaCl à 0.9% de façon à obtenir une concentration finale de 0,2 mg/ml. La peroxydation lipidique des membranes de mitochondries pulmonaires a été réalisée en utilisant un mélange réactionnel, de volume final de 1 ml, contenant 800 µl de la suspension mitochondriale dans 0.9% NaCl, additionnée de 100 µl de la substance à tester à différentes concentrations (B[a]P ou féruléol). Après incubation pendant 10 min à 37°C, l'ajout de 100µl de la solution oxydante FeCl₂/ FeCl₃ (v/v). Après une deuxième incubation de 30 min dans un bain marie à 37°C, la réaction est stoppée par l'addition de 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) 3% et de 1 ml de d'acide thiobarbiturique de 1% (TBA) préparé dans le NaOH à 2N. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain-marie à 100°C pendant 30 min. Après refroidissement, une centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min est effectuée, et l'absorbance est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm. Le blanc de la réaction est réalisé en présence de la suspension mitochondriale mais en absence de solution oxydante FeCl₂/FeCl₃.

La concentration du MDA est déterminée en µM / mg de protéine selon la réaction suivante :

$$[\text{MDA}] (\mu\text{M}) = \text{DO} / 0.0184$$

Modèle cellulaire

1. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire A549, un adénocarcinome pulmonaire humain, est utilisée comme une lignée tumorale pour les tests du féruléol *in vitro*.

Dans la nature, ces cellules A549 sont squameuses et responsables de la diffusion de certaines substances telles que l'eau et les électrolytes à travers les alvéoles des poumons. Si les cellules A549 sont cultivées *in vitro*, ils se développent sous forme de cellules adhérentes en monocouches ou attachées au flasks. Cette lignée est caractérisée par son pouvoir hautement invasif.

2. Entretien de cellules A549

Les cellules A549 sont offerte par le Pr. José Luis (INSERM U911 (CRO2), Marseille, France). Elles sont cultivées en présence du milieu complet composé principalement de RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) auquel on ajoute 10% (V/V) de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 1% (V/V) de Pénicilline Streptomycine (PS) 10000 UI/ml (Invitrogen), 1% (V/V) de glutamine 200 mM (Invitrogen) et 1% (V/V) de pyruvate (Invitrogen).

Les cellules sont amplifiées dans des flasks de 25cm³ et placées dans un incubateur à 37°C, à 95% d'humidité et à 5% de CO₂.

A confluence de tapis cellulaire, le milieu complet est prélevé et les cellules sont rincées avec une solution de PBS-EDTA 10 mM, pH= 7.4 (Sigma) chauffé préalablement à 37°C. Les cellules A549 sont ensuite détachées par addition de 2 ml de trypsine-EDTA (Invitrogen) pendant 3- 4 minutes à 37°C, l'action de la trypsine est stoppée par l'addition du milieu complet. Après une centrifugation de 3 min à 1500 rpm, le surnageant est éliminé et le culot constitué de cellules est resuspendu dans un nouveau milieu complet etensemencé dans de nouveaux flasks.

Pour le stockage de cellules A549, ces dernier sont congelées dans du SVF auquel on ajoute 10% (V/V) de DMSO (Sigma). Les cellules A549 sont ensuite congelées progressivement dans des cryotubes placés à -20°C pendant 30 min puis à -80°C pour une nuit et enfin transférées dans l'azote liquide à -160°C.

L'ensemencement des cellules n'est effectué que si leur taux de mortalité dans la suspension d'ensemencement est inférieur à 10%, ce qui est vérifié préalablement par coloration au bleu trypan.

2.1. Etude de la viabilité cellulaire par le test MTT

Le test au MTT permet d'évaluer l'effet du féruléol sur la viabilité des cellules cancéreuses pulmonaires A549. Il est basé sur la réduction du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromidedes) par le succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. Les cristaux de formazan ainsi formés sont solubilisés par le DMSO et détectés spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 560 nm pour connaître la quantité relative de cellules vivantes et active métaboliquement.

Le test est réalisé dans des plaques de microtitration. Les cellules A549 sont ensemencées à raison de 10000 cellules/ puit dans leur milieu de culture spécifique. Après 24h d'incubation, le milieu est renouvelé en présence ou en absence des différentes concentrations du féruléol (100 μ M, 80 μ M, 50 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M et 5 μ M). Après 24h, les puits sont lavés au PBS, puis 50 μ l/ puit de la solution du MTT : sigma (5mg/ml +RPMI) sont ajoutés. Après l'incubation des cellules avec du MTT pendant 3h à 37°C, il est nécessaire de dissoudre les cellules dans du DMSO 10% en ajoutant 100 μ l/ puit. Une lecture de densité optique au spectrophotomètre à 560 nm permet de connaître la quantité relative des cellules vivantes.

Pour étudier l'effet du féruléol sur la prolifération des cellules A549, le même protocole du test MTT est réalisé mais les cellules sont incubées pendant 72h après traitement par les différentes concentrations du féruléol (traitement par des concentrations non toxiques et efficaces).

2.2. Etude de la viabilité par le test MTT des cellules A549 pré-traitées par le B[a]P

Le test est réalisé en ensemencant 5000 cellules/ puit dans une plaque de microtitration. Après 24h d'incubation, le milieu est renouvelé par un autre qui contient du B[a]P (20 μ M) et les cellules sont cultivées pendant 48h à 37°C (Tampio et al., 2008). Après 48 h d'incubation, il suffit donc de traiter les cellules avec les différentes concentrations du féruléol (100 μ M, 80 μ M, 50 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M et 5 μ M) et les incubées pendant 24h à 37°C. Après les puits sont lavés au PBS et 50 μ l/ puit de la solution du MTT sont additionnés. Après 3h

d'incubation, les cellules A549 sont dissout dans du DMSO 10%. Une lecture de densité optique à 560 nm permettant de connaitre la quantité des cellules actives métaboliquement.

2.3. Effet du féruléol sur l'adhésion cellulaire

Le but de ce test est de quantifier la capacité des cellules A549 à adhérer sur des protéines purifiées de la matrice extracellulaire. Les protéines d'adhésion sont préparées en recouvrant les puits d'une plaque de microtitration à fond plat (Nunc) par 50 µl d'une solution protéique : Fibrinogène (Fg) à 50 µg/ml, Collagène type I (Coll I) à 10 µg/ml et la Polylysine (PL) à 10 µg/ml, pendant 2h à 37 °C. Les puits sont ensuite saturés avec du PBS/BSA 0.5% (50 µl/ puit) pendant 1h à 37 °C.

Les cellules A549 sont décrochées par du PBS/EDTA et rincées deux fois avec du tampon d'adhésion (RPMI ; Na HCO₃ 1.2 g/l ; HEPES 15 mM pH = 7.3 et BSA 0.2 %). Pour tester le féruléol, les cellules A549 sont pré-incubées avec les différentes concentrations du féruléol (40µM, 20µM et 10µM) pendant 30 min à température ambiante sous agitation avant de les déposer dans les puits. 50 µl de la suspension cellulaire à raison de 50 000 cellules/ ml d tampon d'adhésion sont ajoutés par puits et incubés 2h à 37 °C.

Après 2h d'incubation, les cellules non adhérentes sont éliminées et les cellules adhérentes sont fixées au glutaraldéhyde 1% pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, elles sont rincées deux fois à l'eau distillée et colorées pendant 30 min par du cristal violet à 0.1 %. Après lavage, le colorant est solubilisé avec du SDS à 1%.

L'adhésion des cellules A549 est quantifiée par mesure de la densité optique à 600 nm avec un lecteur de plaque.

2.4. Analyse statistique

Les résultats graphiques des deux études *in vivo* et *in vitro* sont présentés sous forme de moyenne et d'écart-type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par la B[a]P seul à celles des groupes témoins d'une part, et d'autre part à celles traités par le féruléol en utilisant le test T de Student :

p >0.05 : la différence n'est pas significative (ns). p <0.05 : la différence est significative (*).
p <0.01 : la différence est très significative (**). p <0.001 : la différence est hautement significative(***)).

RESULTATS & DISCUSSION

La présente étude est la première qui porte sur l'effet du féruléol sur les paramètres de stress oxydatif, l'expression de protéines apoptotiques et anti-apoptotiques chez les rats exposés aux B[a]P et traités par le féruléol « *in vivo* » et l'effet anticancéreux de cette substance bioactive sur les cellules A549 « *in vitro* ».

I. Effet du traitement par le féruléol au cours d'un cancer pulmonaire induit par le Benzo[a]pyrène

De nombreux chercheurs (Kim et lee, 1997, Anandakumar et al., 2008, Rajendran et al., 2008) ont constaté que chez les souris ou les rats ayant reçu le B[a]P, les niveaux de ROS et les peroxydes lipidiques étaient significativement plus élevés, et les niveaux d'antioxydants et d'enzymes mitochondriaux ont diminué. Ils croyaient que le cancer pulmonaire induit par le B[a]P pourrait impliquer des dommages oxydatif médiés par le stress (Chen et al., 2011).

I.1. Effet du féruléol sur la croissance corporelle

La variation de la croissance corporelle des animaux ayant reçus les différents traitements sont rassemblés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Effet du féruléol sur la variation du poids corporel des rats. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=8). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

Groupes	Croissance corporelle (g)
T	247.66 \pm 18.22
B	178.77 \pm 6.04 a***
BF50	222.9 \pm 10.53 b***
F50	245.23 \pm 7.61

Tous les animaux ont montré une bonne tolérance au féruléol et au B[a]P. Il n'y avait pas de mortalité à des facteurs expérimentaux pendant toute l'étude. L'induction d'un cancer pulmonaire par le B[a]P chez le rat (G2) montre une perte hautement significative ($p < 0.001$) de poids corporel par rapport aux rats témoins. Ce résultat est en accord avec ceux de Ravichandran et al., (2011). Au contraire, l'administration du féruléol aux rats atteints d'un cancer pulmonaire (G3) montre une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) du poids

des rats malades. Aucun changement n'a été observé chez les rats traités par le féruléol seul (50 mg/kg/IP) qui est significatif de la nature non toxique du féruléol.

I.2. Influence du féruléol sur la peroxydation des lipides membranaires des cellules pulmonaires

Les variations des taux de malondialdéhyde du tissu pulmonaire après traitement des rats par le B[a]P (100 mg/kg/IP) et / ou par le féruléol (50 mg/kg/IP) sont rapportés dans la figure 15A. Nous constatons chez les rats traités par le B[a]P seul une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) des taux du MDA par rapport aux témoins. Cette concentration atteint 15.22 ± 2.65 nM/ mg de protéines contre 8.08 ± 0.48 nM/ mg de protéines chez les témoins au délai de 24 semaines (= 168 jours). Après traitement, par le féruléol, des rats atteint le cancer pulmonaire par le B[a]P, les taux du MDA sont augmentés de façon significative ($p < 0.05$) atteindre 17.42 ± 0.498 nM/ mg de protéines contre 15.22 ± 2.65 nM/ mg de protéines chez les rats malades. L'augmentation est beaucoup moins prononcée dans le groupes d'animaux traités par le féruléol seul (2.37 ± 1.59 nM/ mg de protéines contre 8.08 ± 0.48 nM/ mg de protéines chez les témoins). La figure 15B montre les variations de MDA mitochondrial induit par le $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ en présence des différentes concentrations du féruléol. Le résultat net de cet événement se traduit par l'accumulation de divers peroxydes lipidiques et le MDA.

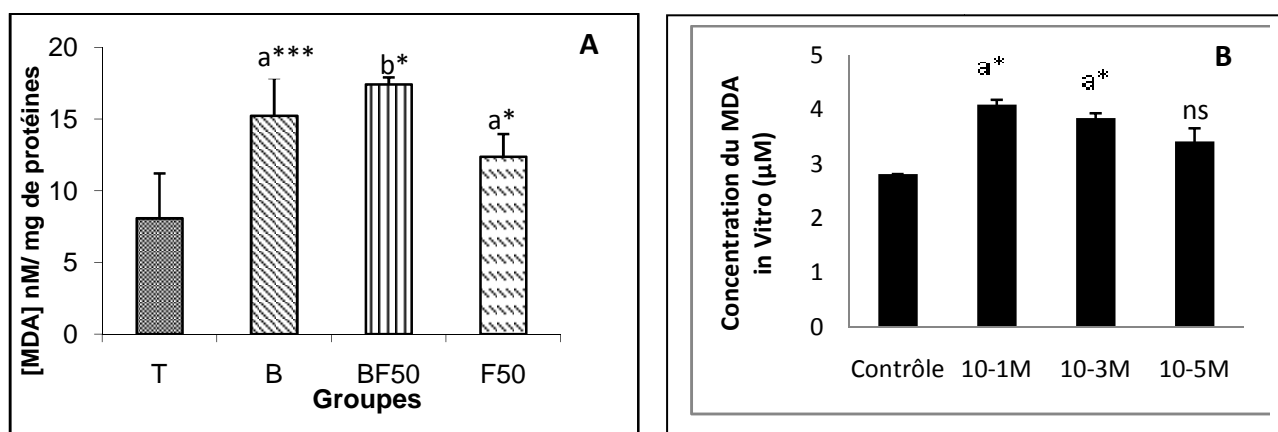


Figure 15 : (A) Variations des taux du MDA cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=8). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. (B) Variation des taux de MDA mitochondriale pulmonaire en présence du féruléol à différentes concentrations (n=3). a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

Les dommages du poumon et sa pathogénie impliquent la peroxydation des acides gras polyinsaturés, qui affecte la fonction de membrane, inactive les récepteurs attachés de membrane et augmente la perméabilité du tissu. Les aldéhydes qui sont produits pendant le processus de la peroxydation lipidique (PL) ont été associés au stress oxydatif dans le tissu (Khan et al., 2013). Nos résultats de l'augmentation de la peroxydation lipidique par le B[a]P sont en accord avec les études de Selvendiran et al., (2004), Das et al., (2007) et Ravichandran et al., (2011) ont démontré une augmentation de la peroxydation lipidique au cours du cancer pulmonaire induit par le B[a]P chez les souris. Cette peroxydation est induite par les ROS générés lors du métabolisme du B[a]P par la voie des cytochromes ou la voie des quinones. Il est bien connu que les formes cancérigènes ultimes résultant de l'activation du B[a]P sont les dihydrodiol époxydes (Dix et Marnett, 1983). La peroxydation lipidique, induite par les radicaux libres produits lors du métabolisme qui participent à l'époxydation du B[a]P, provoque probablement l'excrétion accrue du MDA pendant les premiers jours après l'injection du B[a]P. Une deuxième augmentation du taux de MDA a été manifesté après la formation de tumeurs et qui peut être dû aux radicaux libres et au TNF produit par les cellules malignes.

Une augmentation de la peroxydation des lipides a été observée aussi après traitement par le féruléol (50 mg/kg/IP), ce qui peut être expliqué par une altération, par ce sesquiterpène coumarine, des lipides membranaires par les ROS générés dans des cellules cancéreuses pulmonaires. La PL est considéré comme le processus le plus dommageable connu pour se produire dans tous les organismes vivants. La PL, dans la membrane cellulaire et la membrane des organites, a lieu quand des niveaux de ROS, au dessus du seuil, sont atteints. Ce qui affecte non seulement le fonctionnement cellulaire normal, mais il aggrave également l'état de stress oxydatif grâce à la production des radicaux dérivés de lipides (Montillet et al., 2005).

L'étape d'initiation comprend des complexes de métaux de transition, en particulier ceux de fer et du cuivre. Cependant, l' O_2° et le H_2O_2 sont capables d'initier ces réactions, mais le radical hydroxyle est suffisamment réactif; l'initiation de la peroxydation lipidique d'une membrane est commencée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène, dans une chaîne d'acyle gras insaturé d'un résidu d'acide gras polyinsaturé, principalement par l' OH^{\bullet} . Dans l'environnement aérobie du tissu pulmonaire, l'oxygène est ajouté à l'acide gras sur le carbone centré du radical lipidique pour donner naissance à une molécule de ROO° . Une fois initiée, le ROO° peut en outre propager la réaction en chaîne de la peroxydation par l'abstraction d'un

atome d'hydrogène de chaînes latérales adjacentes d'acide gras polyinsaturé. L'hydroperoxyde lipidique résultant peut facilement se décomposer en plusieurs espèces réactives, notamment: aldéhydes MDA, ... etc. L'effet de la peroxydation lipidique est donc : diminuer la fluidité de la membrane; rendre plus facile les échanges entre les deux bicouches phospholipidiques; augmenter la perméabilité de la membrane aux substances qui ne peuvent pas les traversés, inactiver des récepteurs, des enzymes, et des canaux ioniques (Gill et Tuteja, 2010).

En effet, nous avons trouvé une augmentation significative des taux du MDA aux concentrations 10^{-1} M et 10^{-3} M et non significative à la concentration 10^{-5} M au niveau des mitochondries traitées par le féruléol, cette augmentation s'explique par une production excessive de ROS. Nous avons estimé que l'attaque par ces ROS des acides gras polyinsaturés des lipides provoque alors une augmentation croissante de la perméabilité des membranes induisant une altération irréversible du fonctionnement mitochondrial due à une mutation de l'ADN mitochondrial, cette hypothèse est confirmée par (Backer et Weinstein, 1982).

I.3. Influence du féruléol sur la réserve des cellules pulmonaires en glutathion

Les résultats de variation des taux du glutathion cytosolique du tissu pulmonaire des rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol sont représentés dans la figure 16.

Les rats traités par le B[a]P seul montrent une augmentation des taux du glutathion dans les cellules pulmonaires par rapport aux témoins. Cette augmentation est très significative ($P < 0.01$) après 24 semaines du traitement (3.33 ± 0.76 mM/ g de tissu contre 2.19 ± 0.48 mM/ g de tissu chez les témoins). Par contre, comme présente la figure 17, on assiste à une diminution significative chez les rats malades ayant reçu une dose unique du féruléol (50 mg/kg/IP), cette diminution du taux de glutathion atteint 2.18 ± 0.99 mM/ g de tissu contre 3.33 ± 0.76 mM/ g de tissu chez le groupe d'animaux malades. Aucune modification du taux de glutathion cytosolique n'a été observé après traitement des rats sains avec le féruléol seul (50 mg/kg/IP) (2.04 ± 0.15 mM/ g de tissu contre 2.19 ± 0.48 mM/ g de tissu chez les témoins).

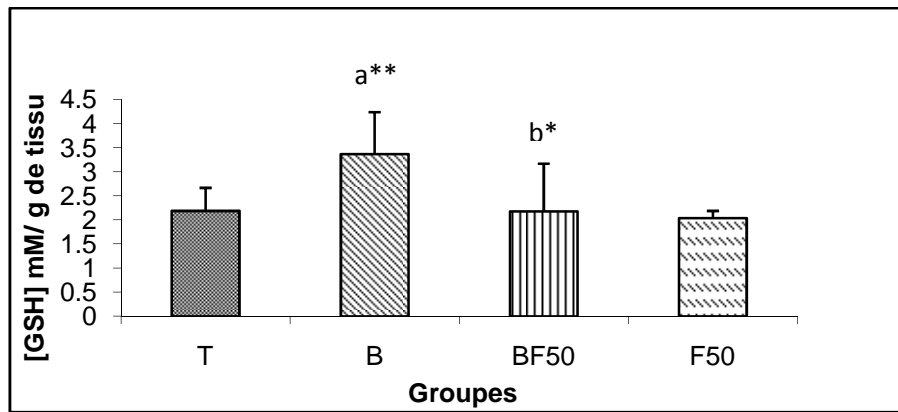


Figure 16 : Variations des taux du GSH cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=8). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

Afin de se défendre contre les agressions causées par les métabolites électrophiles et les radicaux libres, les cellules pulmonaires disposent de nombreuses voies de détoxifications. Les métallothionéines ont prouvées leur effet protecteur contre des dommages à l'ADN causés par le B[a]P (Takaishi et al., 2009). La conjugaison au glutathion constitue une voie majeure de défense contre le stress induit par les BPQs (Rahman et MacNee, 1999). Le GSH est un tripeptide ubiquitaire essentiel contenant un groupement sulfhydryle qui le rend capable de protéger les cellules contre les oxydants, les composés électrophiles et les xénobiotiques. Le GSH apparaît comme un mécanisme de défense fondamental contre les dommages pulmonaires induits par l'oxydation et l'inflammation.

Les poumons sont l'une des plus importantes zones de stockage du GSH (6,1-7,5 mM/mg de poumon). Le fluide extracellulaire de l'épithélium de revêtement est riche en GSH afin de détoxifier les oxydants, les ROS, les HAPs, et les composés électrophiles (Rahman et MacNee, 1999). Donc, le GSH présent dans le poumon peut protéger les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires du stress oxydatif et aide au maintien fonctionnel du surfactant pulmonaire.

Nos résultats montrent qu'il y a une augmentation très significative du taux du glutathion (GSH) dans les cellules pulmonaires des rats traités par le B[a]P (groupe 02) par rapport au témoin contrairement à la littérature où la réserve de glutathion a été diminuée à cause de sa consommation lors des réactions de conjugaison avec les métabolites de B[a]P, avec les produits de la peroxydation lipidique et avec l' H_2O_2 (Rahman et MacNee, 1999). Nos résultats peuvent être expliqués par une mutation au niveau de l'EH. La mutation (TC) au

niveau de l'exon 3 est associée à une diminution de l'activité de l'enzyme de près de 50 % et à une diminution de la quantité d'adduits BPDE à l'ADN (Pastorelli et al., 1998). Sachant que la voie du GSH est très importante pour la détoxification du BPDE (Srivastava et al., 1999), donc la diminution de la formation de BPDE conduit à la diminution de la consommation du GSH.

Après traitement par le féruléol aux rats atteint du cancer pulmonaire, nous avons remarqué une déplétion du taux de GSH cytosolique, cette déplétion rend l'environnement cellulaire plus oxydé était concomitante avec le déclenchement de l'apoptose, il a été aussi démontré que la libération du cytochrome C de la mitochondrie était une réponse cellulaire du GSH. Comme résultat du stress oxydatif, le GSH peut former un disulfide avec les sulfhydryl des protéines. Le GSH subit aussi des oxydations et forme des GSSG et des groupements thiols toxiques pour les cellules. La relation entre la baisse du contenu en GSH, l'augmentation en GSSG ou des protéines-disulfides et l'augmentation de la sensibilité cellulaire au féruléol qu'impose le stress oxydatif est bien établie.

Le maintien d'un rapport GSH/GSSG à la hausse minimise l'accumulation intracellulaire des disulfides. Néanmoins, si le stress oxydatif altère le rapport GSH/GSSG, la conséquence de ce changement influence une variété de processus cellulaire (l'activation du facteur de transcription AP1 et le nuclear factor NF- κ B) (Rahman et MacNee, 1999). Le taux de synthèse du GSH est contrôlé par les quantités de γ - glutamyl Cystéine (γ -GCS) qui y sont présentes, la disponibilité de la cystéine et l'inhibition par feed-back exercé par le GSH sur la γ -GCS. Une fois synthétisée, le γ -GCS est rapidement convertie en GSH donc l'activité de γ -GCS détermine le taux de synthèse du GSH.

Le stress oxydatif peut initialement causer la déplétion de GSH, suivie par une augmentation du GSH intracellulaire comme résultat de l'induction de la γ -GCS, enzyme responsable de la synthèse de novo de GSH et qui consiste en une sous unité catalytique lourde (γ -GCS-HS) et une sous unité régulatrice légère (γ -GCS-LS). Il a été démontré que le promoteur des gènes des γ -GCS-HS et γ -GCS-LS contiennent des régions AP-1 (Activator protein-1) et ARE nécessaires à l'expression de la γ -GCS en réponse à divers stimuli.

La diminution du taux de glutathion cytosolique par le féruléol peut être expliquée par :

- 1) l'inhibition du transport de la cystine, qui est une forme oxydé de la cystéine, cette dernière est ensuite réduite pour être utilisée dans divers processus métaboliques dont la synthèse de

GSH. L'inhibition d'un transporteur anionique d'acide aminé Na⁺-dépendant dont les pneumocytes de type II avaient ce système de transport actif constitutif, non-inductible qui transport le GSH et ses analogues γ -glutamyl contre le gradient de concentration permet de diminuer le transport membranaire de la cystine et de glutamate conduisant à la diminution de la synthèse de GSH dans les cellules pulmonaires.

2) la diminution de l'expression de l'ARNm de la γ -GCS apparait comme une cible par le féruléol par l'inhibition des gènes qui codent pour le GSH ce qui agit vraisemblablement comme un mécanisme de diminution de protection antioxydante. Il a été démontré qu'après déplétion du GSH par les oxydants comme le H₂O₂ ou par le cycle redox, une augmentation dans le GSH après 12 à 24 h dans les cellules pulmonaires *in vivo* et *in vitro* a été observé et que cette augmentation est associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm de la γ -GCS. La diminution du taux de la GSH par inhibition de l'ARNm de la γ -GCS dans les cellules de l'épithélium alvéolaire *in vivo* explique le rôle pro-oxydant du féruléol car la synthèse du GSH implique des actions consécutives de la γ -GCS et de la GSH-synthase qui sont les deux enzymes exclusivement cytosoliques qui contrôle la synthèse du GSH.

I.4. Influence du féruléol sur la capacité des enzymes antioxydants

Dans la présente étude, nous avons remarqué des variations des taux des enzymes antioxydants du tissu pulmonaire des rats traités par le B[a]P et /ou le féruléol. Les résultats de cette variation sont rassemblés dans les figures 17(A), 17(B), 17(C), 17(D) et 17(E).

En comparaison avec le groupe d'animaux témoins, l'activité de la SOD est largement diminuée et de façon hautement significative ($p < 0.001$) après traitement des rats par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 24 semaines. Après traitement des rats, atteint d'un cancer pulmonaire, par le féruléol à 50 mg/kg/IP, nous avons remarqué aussi une diminution hautement significative ($p < 0.001$) du taux de la SOD cytosolique. Ainsi chez les rats ayant reçu le féruléol seul, aucune influence significative de ce sesquiterpène coumarine sur l'activité de la SOD dans le tissu pulmonaire n'a été enregistré (figure 17A). On constate que le féruléol entraîne une augmentation significative ($p < 0.05$) à la concentration de 10^{-5} M par rapport au contrôle, et une diminution significative ($p < 0.05$) à la concentration 10^{-1} M (figure 17B).

Le traitement des rats par le B[a]P à 100 mg /kg/IP pendant 24 semaines a abaissé l'activité de la catalase. Cette activité a été diminuée de façon hautement significative ($p < 0.001$) par

rapport à celle des témoins (1.14 ± 0.84 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les rats traités contre la valeur du témoin $6.41 \pm 0,84$ UI/g $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), tel qu'il est montré dans la figure 17C. On note aussi chez les animaux malades traités par le féruléol à 50 mg /kg/IP une diminution significative ($p < 0,05$) atteint $0,377 \pm 0,05$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines contre 1.14 ± 0.84 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les traités par le B[a]P. Le traitement par le féruléol seul a entraîné une diminution significative ($p > 0,05$) du taux de la catalase du tissu pulmonaire sein atteint $2.94 \pm 1,89$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines contre $6.41 \pm 0,84$ UI/g $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins.

Comme le montre aussi la figure 17D, le B[a]P entraîne une nette diminution ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique de la GST cytosolique et ce après 24 semaines du traitement (4.84 ± 0.57 nmole/min/mg de protéines contre $36.80 \pm 1,96$ nmole/min/mg de protéines chez les témoins). De même, chez les animaux atteints le cancer pulmonaire et ayant reçu le féruléol, l'activité de la GST a été encore diminuée et de façon très significative ($p < 0,01$) qui atteint 3.43 ± 0.89 nmole/min/mg de protéines contre 4.84 ± 0.57 nmole/min/mg de protéines chez le groupe traité par le B[a]P.

L'administration intrapéritonéale du B[a]P à une dose de 100 mg/kg de poids corporel pendant 24 semaines a entraîné une diminution significative ($p < 0.05$) du taux de la GPx dans le tissu pulmonaire (0.0237 ± 0.006 $\mu\text{mole GSH}/\text{mg}$ de protéine contre 0.0426 ± 0.014 $\mu\text{mole GSH}/\text{mg}$ de protéine chez les témoins), ainsi on note qu'une légère augmentation non significative ($p > 0.05$) de l'activité de la GPx a été observé après traitement des rats malades par le féruléol à une dose de 50 mg/kg/IP (0.0292 ± 0.0045 $\mu\text{mole GSH}/\text{mg}$ de protéine contre 0.0237 ± 0.006 $\mu\text{mole GSH}/\text{mg}$ de protéine chez les rats injectés par le B[a]P). En revanche, chez les animaux reçus le féruléol seul, une diminution significative du taux de la GPx a été signalée dans le poumon en comparaison avec le groupe témoin (Figure 17E).

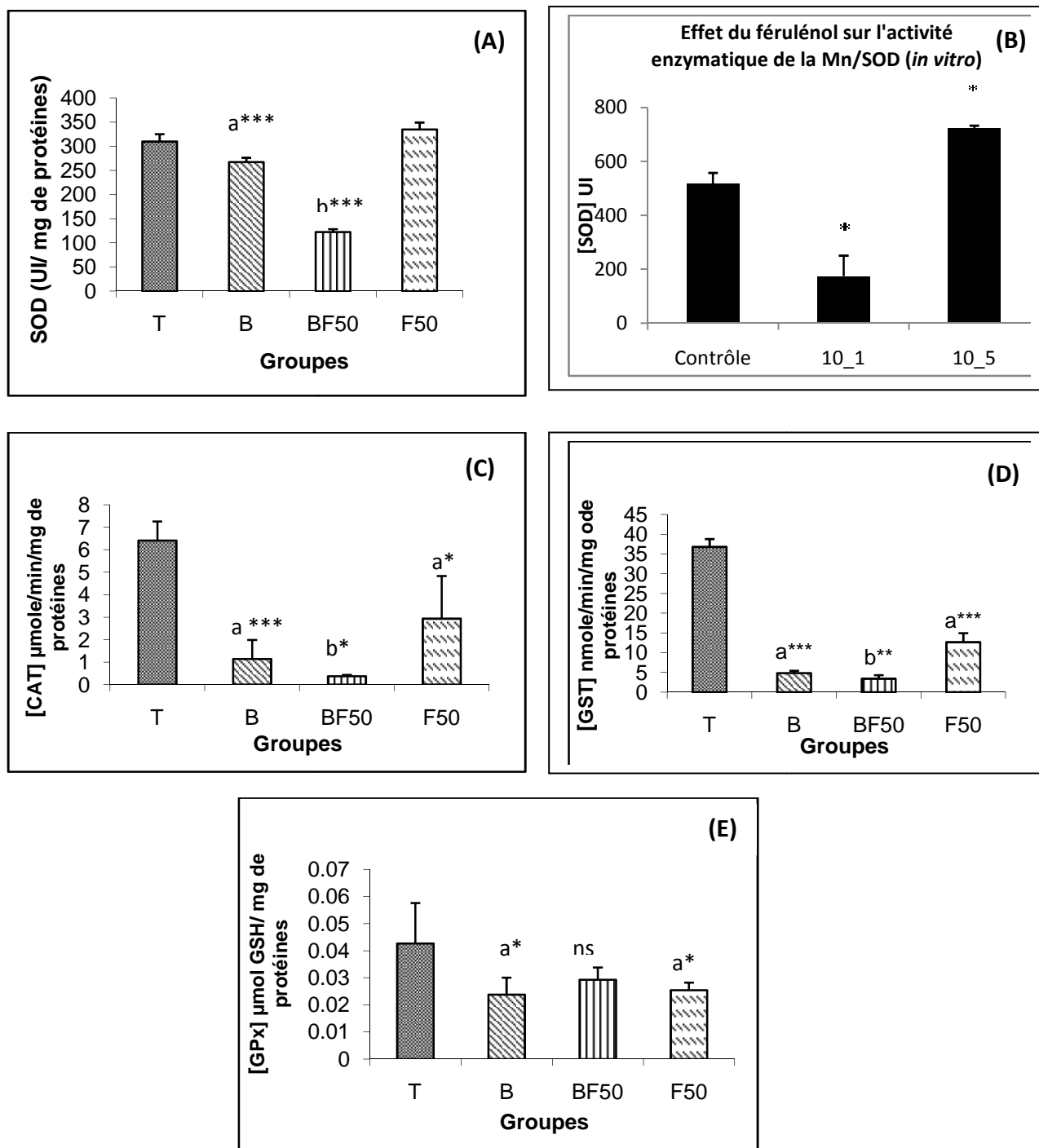


Figure 17 : (A) Variations des taux de la SOD cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. (B) Variation des taux de la SOD mitochondriale pulmonaire en présence du féruléol à différentes concentrations (n=3). (C) Variations des taux de la CAT cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. (D) Variations des taux de la GST cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. (E) Variations des taux de la GPx cytosolique de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=8). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

Les mutations peuvent affecter les gènes qui codent pour les enzymes de métabolisation des xénobiotiques, produisant ainsi des polymorphismes conduisant à une altération de l'affinité aux ligands et aussi l'altération de l'activité, ou influencer l'expression de gènes cibles en aval, entraînant ainsi une susceptibilité différentielle vers les toxiques environnementaux. Bien que, les polymorphismes des gènes liés au stress oxydatifs (Mn/SOD, CAT, GPx et GST) peuvent ne pas être directement associés à un risque de cancer, il est possible que des défauts cumulés dans la protection contre le stress oxydatif puissent entraîner un risque accru de la maladie (Ryter et al., 2007).

Les antioxydants enzymatiques de piègeage des radicaux libres constituent la première ligne de protection contre les dérivés radicalaires de l'oxygène, l'action de la SOD doit toutefois être couplée à celle d'enzymes qui dégradent le peroxyde d'hydrogène, comme la CAT, la GPx et la GST, afin d'éviter l'augmentation des concentrations en H₂O₂ ce qui en présence de fer induirait fatalement la formation du radical hydroxyl OH[•] par la réaction de Fenton.

La SOD, qui convertit les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène, est largement distribué dans les cellules ayant un métabolisme oxydatif et qui protège ces cellules contre les effets toxiques de l'anion superoxyde. La CAT est une hémoprotéine qui catalyse la dégradation directe du peroxyde d'hydrogène en eau. Il protège les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs (Shimeda et al., 2005). La GPx catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène et d'hydroperoxyde en produits non toxiques et balaye les peroxydes lipidiques hautement réactifs dans la phase aqueuse de la membrane cellulaire (Vijayalakshmi et al., 1997). La GST est un groupe de protéines multifonctionnelles qui exécutent des tâches allant de catalyse la détoxification des composés électrophiles à la protection contre les dégâts de peroxydation (Sener et al., 1979).

En effet, l'équilibre entre ces enzymes est le processus principal d'élimination effective du stress oxygéné dans les organelles intracellulaires. Un large ensemble de données indique que les cellules tumorales chez les animaux possèdent un manque dans les complexes enzymatiques, qui exercent normalement une protection en piégeant des espèces d'oxygène toxiques, tels que l'O₂^{•-}, l'H₂O₂ et des radicaux hydroperoxydes (Masotti et al., 1988). Nos résultats de diminution de l'activité des enzymes SOD, CAT, GPx et GST chez les rats traités par le B[a]P sont en accord avec ceux de (Selvendiran et al., 2004), (Rajendran et al., 2008), (Anandakumar et al., 2008) et (Kiruthiga et al., 2010). Cette altération de l'expression des enzymes antioxydants servent de marqueurs pour les tissus (pré) néoplasiques (Sun, 1990).

Cette réduction est en relation avec la régulation négative des gènes qui codent pour ces enzymes par les radicaux libres ainsi que par certains facteurs humoraux (Slaga, 1995) qui s'explique par l'élimination inefficace de l' $O_2^{\circ-}$ et d' H_2O_2 produit au cours du métabolisme de B[a]P (Kiruthiga et al., 2010).

Dans notre étude, la diminution de la concentration de la SOD a été observée après traitement par le féruléol à 50 mg/kg/IP, cette diminution peut donner comme conséquence une réduction de l'élimination de l' $O_2^{\circ-}$ avec une accumulation accrue d' H_2O_2 . Cette diminution de la SOD peut être expliquée que le féruléol agit, par son effet cytotoxique, sur les gènes qui codent pour la SOD en diminuant l'expression de l'enzyme dans les cellules pulmonaires. Mn/SOD a été proposée comme un gène suppresseur de tumeur (Bravard et al., 1998). Une étude permet l'identification des éléments d'activation de promoteurs, le rôle des régulateurs de transcription et les mécanismes par lesquels ces régulateurs de transcription coopèrent pour induire l'expression synergétique du gène Mn/SOD (Mates, 2000).

La diminution de la dismutation de l' $O_2^{\circ-}$ par la SOD a été aussi renforcée par la diminution du taux de la CAT et de la GPx témoin d'une complémentarité entre ces enzymes pour éliminer ces espèces radicalaires de l'oxygène : $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 . La CAT, responsable de l'élimination de l' H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2 , a été diminué après traitement par le féruléol. Son affinité pour l' H_2O_2 est élevée seulement lorsque les teneurs en H_2O_2 sont accrues.

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme antioxydante qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques, à l'aide de glutathion réduit (Matés, 1999). La diminution de l'activité de la GPx, observée au cours du traitement par le B[a]P montre que le B[a]P produit une forte concentration de H_2O_2 et des peroxydes (Kiruthiga et al., 2010).

Les niveaux de la GPx ne sont pas significativement modifiés après traitement des rats atteints du cancer pulmonaire par le féruléol. Cela montre que ce sesquiterpène coumarine est lui-même capable de détoxifier les hydroperoxydes formés au cours du métabolisme du B[a]P, de sorte qu'il n'y a pas de nécessité pour des niveaux accrus de GPx. Dans la plupart des cellules, l' H_2O_2 est détoxifié par deux enzymes différentes la CAT et la GPx. Au cours du cycle catalytique, un séléniol (protéine-Se-) dans la GPx réagit avec du peroxyde (H_2O_2 ou du peroxyde lipidique, LOOH) résultant en une selenenic.

La glutathion S-transférase (GST) fait partie des enzymes de détoxification cellulaire qui catalyse la détoxification métabolique des médicaments et des substances cancérigènes et la conjugaison des électrophiles hydrophobe et les ROS avec le GSH et, ainsi, protège les cellules du cycle redox et du stress oxydatif. Les gènes codant pour cette enzyme de détoxification sont exprimés et induite de manière coordonnée en réponse à des agents pro-oxydants (Rushmore et Pickett, 1993). La détection de la mutagénicité et des essais de transfusion ont permis d'identifier « l'élément de réponse antioxydante (ARE) » dans les promoteurs de différents gènes d'enzymes de détoxification, qui régulent l'expression et l'induction coordonnée de gènes de ces enzymes (Matés, 2000).

L'induction et l'expression de la GST qui métabolise le féruléol et le B[a]P joue un rôle important dans la détermination du risque de cancer. En d'autres termes, le B[a]P qui induit des néoplasmes est régulé par un équilibre entre la phase I (cytochromes P450, cytochromes P450 reductase, hydroxylases, lipoxygénases, peroxydases and oxydases) qui active la B[a]P et la phase II (détoxification) qui le détoxifie. La diminution de l'expression de la GST après l'induction du cancer pulmonaire et aussi après traitement par le féruléol suggère que le B[a]P et le féruléol agissent sur les gènes qui codent pour la GST et divers types de ces enzymes y compris la GST Ya et la GST P du rat sont codés par cinq familles de gènes. La diminution de la GST est associée à plusieurs types de cancer pulmonaire. Il a été rapporté que les facteurs de transcription nucléaire c-Jun, Jun-B, Jun-D, c-Fos, Fra1, Nrf1, Nrf2, YAB P, ARE-BP1, Ah (Aromatic hydrocarbon) receptor and le récepteur d'estrogène se lient aux ARE à partir de divers gènes (Matés, 2000).

De grandes quantités de superoxyde et d'autres espèces réactives sont toujours nécessaires pour garder les défenses cellulaires actives. Bien que l'inactivation de la GST et d'autres protéines défensives conduise à une augmentation significative des niveaux d'anion superoxyde et d'autres radicaux libres, la cellule pulmonaire peut exiger des facteurs de régulation négative comme le c-Fac pour garder alerte à l'expression d'enzymes de détoxification et d'autres gènes de défense (Matés, 2000).

I.5. Effet du féruléol sur la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) par les mitochondries pulmonaires *in vivo* et *in vitro*

La figure 18 montre une augmentation de la production de l' $O_2^{\circ-}$ par les mitochondries pulmonaires des rats traités par le B[a]P (100 mg/kg/IP) par rapport au groupe des rats témoins. Cette augmentation est observée après 24 semaines d'induction du cancer

pulmonaire, elle atteint 285.36 ± 12.07 par rapport à 100% du contrôle traduisant l'effet pro-oxydant du B[a]P. Toutefois, comme montre la figure 18, la génération de $l'O_2^{\circ-}$ est beaucoup plus importante dans le groupe d'animaux malades (cancéreux) ayant reçu 50 mg/kg/IP du féruléol après 24 semaines du traitement par le B[a]P. Cette augmentation est significative ($p < 0.05$) par rapport au groupe d'animaux malades et qui atteint un pourcentage de 360.36 ± 9.48 . Aussi une production significative ($p < 0.05$) de $l'O_2^{\circ-}$ est observé chez les rats traités par le féruléol seul par rapport au groupe témoin et qui atteint 234.14 ± 27.59 suggérant que le féruléol agit sur les mitochondries comme cible principale de production de $l'O_2^{\circ-}$.

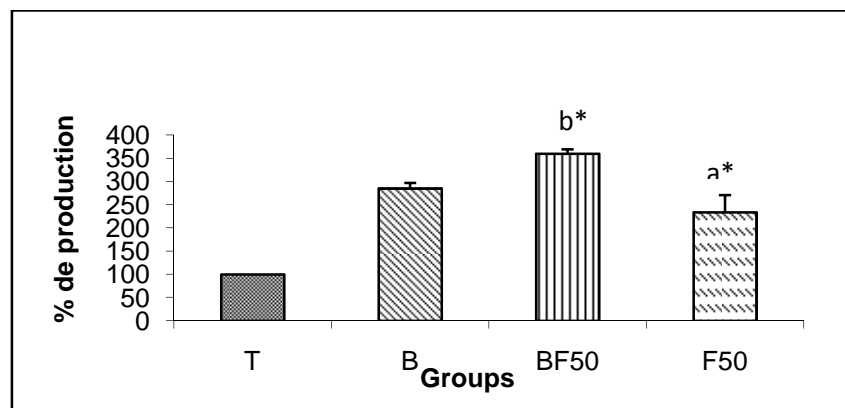


Figure 18 : Pourcentage de production de $l'O_2^{\circ-}$ par les mitochondries de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ($n=3$). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

Les résultats concernant la production de l'anion superoxyde par les mitochondries isolées de poumons de rat et traitées par différentes concentrations du féruléol sont regroupés dans la figure 19(A) et 19(B) ci-dessous. Les mêmes observations sont enregistrées avec le féruléol qui montrent une augmentation de la production de l'anion aux concentrations 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M et 10^{-6} M, allant jusqu'à un pourcentage de production de l'anion de 550 % à la concentration 10^{-2} M. En comparant ces résultats au contrôle, on constate que l'effet du féruléol sur la production du superoxyde induit un effet pro-oxydant à fortes doses et même à faible doses.

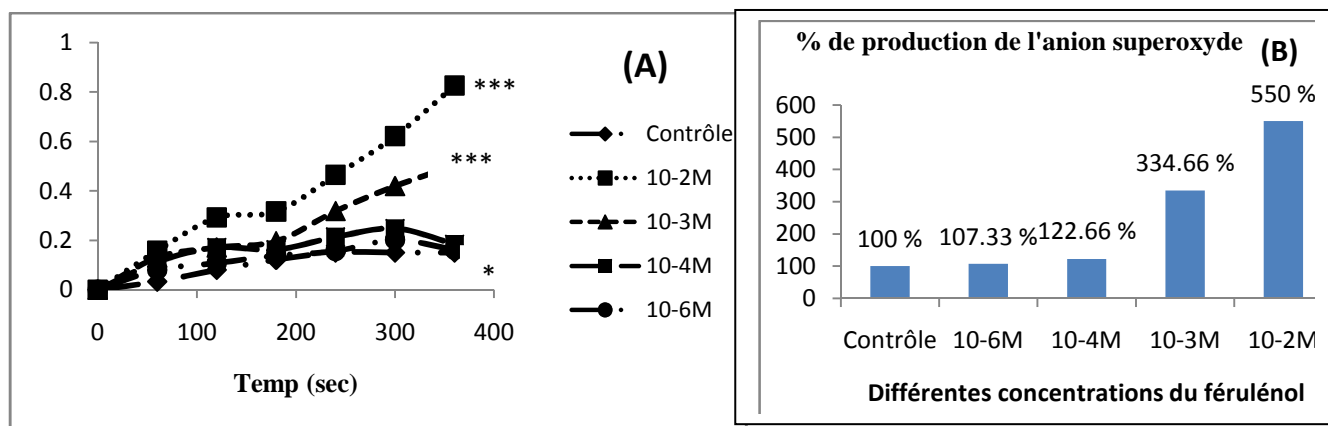


Figure 19 : Production de l'anion superoxyde par les mitochondries pulmonaires en présence du féruléol à différentes concentrations (n=3). (A) la cinétique de production pendant 360 secondes. (B) Pourcentage de production après 360 secondes.

Les poumons sont une cible primaire de la toxicité par l'oxygène en raison de leur exposition constante à des niveaux élevés d'oxygène et des polluants environnementaux. Les ROS sont des espèces radicalaires et non radicalaires dérivées de l'oxygène moléculaire. Ceux-ci comprennent l' $O_2^{\circ-}$, le OH^{\bullet} , le peroxyde, des radicaux alcoyles et le H_2O_2 (Halliwell et cross, 1994). Les mitochondries sont connues pour être un générateur intracellulaire majeur de ROS (Turrens, 2003). Plusieurs sites de production de l' $O_2^{\circ-}$ par les mitochondries ont été rapportés, à savoir la flavine dans les complexes I et II et les sites de liaison de l'ubiquinone dans les complexes I, II et III. Les principaux acteurs actuels de la production mitochondriale de ROS sont les complexes I et III de la chaîne de transport d'électrons (CTE) (Brand, 2010). Toutefois, jusqu'à 1 à 2% d'oxygène consommé au cours de la respiration mitochondriale est soumis à une réduction incomplète donnant de l' $O_2^{\circ-}$ et qui est produit principalement par le NADH-coenzyme Q réductase (complexe I) et le cytochrome c oxydase (complexe III). L' $O_2^{\circ-}$ est rapidement converti en H_2O_2 par la SOD. L'interaction de H_2O_2 avec des ions métalliques, tels que Fe^{2+} conduit à la formation de l' OH^{\bullet} (Chong et al., 2014).

Chez les eucaryotes, la chaîne de transport d'électrons mitochondriale comprend quatre complexes d'oxydo-réduction connus sous le nom de complexe I, II, III et IV. Les électrons fournis par le NADH et le $FADH_2$ sont transférés vers le complexe I et II, respectivement, au complexe III et éventuellement au complexe IV pour réduire l'oxygène moléculaire à l'eau (Liu et al., 2002). Dans le complexe I, la production de l' $O_2^{\circ-}$ est entraîné par la présence de NADH, ce qui donne des électrons à une série d'enzymes d'oxydo-réduction au sein du complexe lui-même, la flavine mononucléotide, les centres Fe-S et de la coenzyme Q10 (ubiquinone) (Hirst et al., 2003). La production de l' $O_2^{\circ-}$ a été lié à deux sites du complexe I,

qui est le mononucléotide flavine réduit et des sites de liaison à la quinone (Hirst et al., 2008). Le complexe I possède deux façons différentes à réduire l' O_2 à l' $O_2^{\circ-}$ dans les mitochondries isolées: 1) lorsque l'ATP est en faible demande et la force proton-motrice (PMF) est saturé, 2) lorsque le ratio $NADH / NAD^+$ est élevé et l'ATP est continuellement synthétisé avec une faible force proton-motrice (Murphy, 2009). Le premier mécanisme, également connu sous le nom du transfert inverse d'électrons, se produit lorsque la force proton-motrice est saturé ou les électrons donnés par les succinates au complexe II sont inversement transféré vers le complexe I ce qui provoque aux électrons de se lier au site de liaison de la quinone, ce qui permet aux électrons de fuir et réduire l'oxygène molécule (Murphy, 2009). En outre, la production de ROS a été augmenté de façon significative au lieu de la diminution du roténone dans les mitochondries tumorales (Moreno-Sánchez et al., 2013).

Le deuxième mécanisme, connu sous le nom du transfert d'électrons vers l'avant, nécessite la flavine réduite pour donner des électrons à la molécule d'oxygène pour la production de l' $O_2^{\circ-}$. Ceci dépend d'un niveau élevé du ratio $NADH/NAD^+$ ou d'un rapport d'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale par l'ischémie, la perte de cyt C ou d'une mutation entraînant une charge d'électrons sur la flavine et une fuite ultérieure de ces dernier pour réduire la molécule d'oxygène. En revanche, au cours des états physiologiques où le ratio $NADH/NAD^+$ est relativement faible, de petites quantités d' $O_2^{\circ-}$ sont produites à partir du complexe I (Murphy, 2009). Ceci peut être expliqué par une diminution relative de la réduction de la flavine dans le complexe I comme des électrons sont rapidement transférés à travers la chaîne respiratoire mitochondriale. Néanmoins, cela ne rejette pas la possibilité qu'une augmentation du flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale pourrait induire une production plus élevée d' $O_2^{\circ-}$ que plus d'électrons sont transférés et réapprovisionnées dans la flavine et la quinone, ce qui augmente la possibilité d'une fuite d'électrons pour la réduction de l'oxygène molécule. Par la suite, les électrons, partant du complexe I, passent à travers le complexe III avant de mettre fin au complexe IV pour la réduction de la molécule d'oxygène à l'eau. Pendant ce transfert d'électrons, il est proposé que la semiquinone dans le complexe III soit capable de réduire la molécule d'oxygène pour produire l' $O_2^{\circ-}$ par les fuites d'électrons. A cet égard, l'inhibition de la formation de la semiubiquinone par l'utilisation d'antimycine A était capable d'induire la production de l' $O_2^{\circ-}$. De même, l'épuisement du cyt C peut également moduler la production de l' $O_2^{\circ-}$.

Théoriquement, les ROS générée par le complexe III sont plus susceptible de participer à la signalisation cellulaire par rapport ceux produit par le complexe I. L' $O_2^{\circ-}$ généré par le

complexe III est libéré dans l'espace intermembranaire et pourrait avoir un accès plus facile au cytosol. De plus, l'anion superoxyde peut également être canalisé à travers le VDAC, situé à la membrane mitochondriale externe (Chong et al., 2014).

Une augmentation du taux de $\text{l'O}_2^{\circ-}$ a été observé chez les rats ayant reçu du B[a]P (G2), ces résultats sont en accord avec ceux de Rajendran et al., 2008. Cette production excessive de $\text{l'O}_2^{\circ-}$ s'explique que le B[a]P subit deux oxydations successives à l'intérieur de la cellule pulmonaire dont la première produit un anion semiquinone (QO) et de $\text{l'H}_2\text{O}_2$ et la deuxième oxydation donne naissance à un radical B[a]P-O-quinone et de $\text{l'O}_2^{\circ-}$ suggérant l'accumulation importante de ce dernier dans le tissu pulmonaire des rats atteints d'un cancer. Toutefois, une augmentation de la génération de $\text{l'O}_2^{\circ-}$ après traitement des rats atteints d'un cancer pulmonaire par le féruléol a été aussi observée. Ces résultats d'augmentation de la production de $\text{l'O}_2^{\circ-}$ par le féruléol sont en accord avec ceux de Lahouel et al., 2007 et qui sont expliqués que le féruléol inhibe spécifiquement le succinate ubiquinone réductase (complexe II) au niveau du cycle de l'ubiquinone et il est reconnu que le complexe II mitochondrial catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et transfère les électrons libérés lors de cette réaction au cycle de l'ubiquinone (Cecchini, 2003). Ainsi, les propriétés structurales du noyau 4-hydroxy-coumarine du féruléol sont compatibles, avec une interaction potentielle, avec le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, mais le sort de l'espèce réduite impliqués dans cette étape de piégeage d'électrons apparaît largement différent du sort de réduction les espèces d'ubiquinone. Ceci est à l'origine de l'inhibition du complexe II mitochondrial observée avec le féruléol et peut expliquer la neutralisation de l'ubiquinone dans les dosages biologiques. En effet, de nombreuses études suggèrent que le dysfonctionnement de complexe II est couplé à une grande variété de troubles cliniques (Greene et al., 1993, Baysal et al., 2001). La production d'anion superoxyde après le traitement par le féruléol peut être expliquée par un transfert inverse d'électrons qui se produit lorsque des électrons transférés du succinate au complexe II, sont inversement transférés au complexe I ou la production du superoxyde peut être due que les électrons donnés par la succinate sont transférés du complexe I au complexe III, ce dernier devient un générateur de $\text{l'O}_2^{\circ-}$, la source de $\text{l'O}_2^{\circ-}$ dans le complexe III peut être le cytochrome b_{566} , le radical semiubiquinone ou le centre Fe-S. L'un des deux électrons cédés par l'ubiquinone au complexe III est capturé par le centre Fe-S et cédé au cyt C_1 puis au cyt C, l'autre électron s'engage dans le cycle Q ; il atteint via les cyt b_{566} et b_{562} la face matricielle du complexe, où

il est capté par une molécule de COQ pour donner le radical ionisé COQ^{\bullet} qui peut céder son électron à l'oxygène moléculaire pour donner naissance au superoxyde.

I.6. Effet du féruléol sur la production du radical hydroxyl (OH^{\bullet}) *in vitro*

Les résultats de l'effet *in vitro* du féruléol sur la production du radical hydroxyl (OH^{\bullet}) sont présentés dans la figure 20. Selon la figure, la production du radical OH^{\bullet} est dose-dépendante. Le féruléol entraine une augmentation importante dans la production du OH^{\bullet} aux concentrations 10^{-1} et 10^{-2}M et une diminution dans la synthèse aux concentrations 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8} par rapport au contrôle et aucun effet du DMSO (solvant du féruléol) n'a été remarqué sur la production de ce radical toxique.

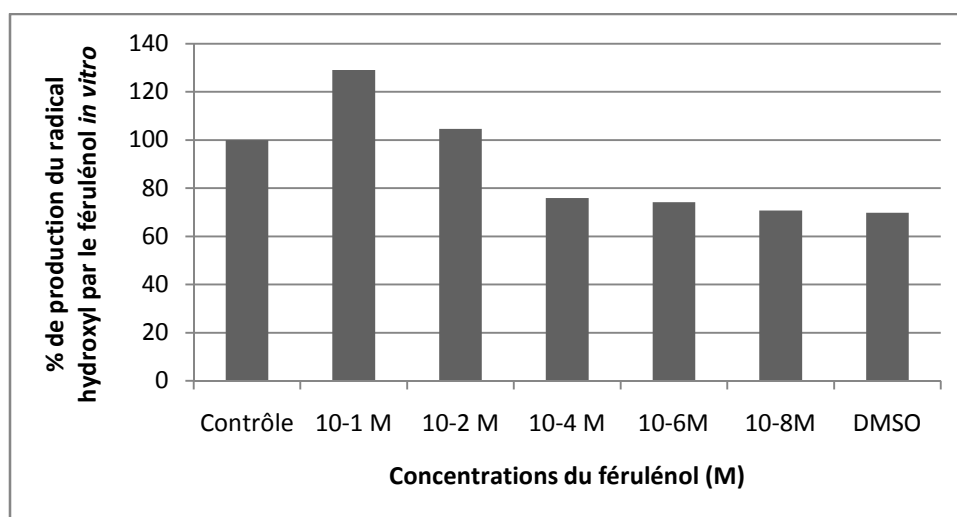


Figure 20 : Production *in vitro* du radical hydroxyl (OH^{\bullet}) par le féruléol à différentes concentrations.

Le radical hydroxyl (OH^{\bullet}) est le radical le plus délétère. Il présente une extrême réactivité, une demi-vie limitée (10^{-10} s dans les systèmes biologiques) et une toxicité importante en altérant l'ADN, les protéines, les lipides, les sucres et les métaux. Le féruléol en présence dans une mixture de réaction avec l' H_2O_2 et le FeSO_4 cause une augmentation reproductible dans la génération du OH^{\bullet} aussi en présence du phenanthroline qui est susceptible de former des complexes de couleur rouge orangé avec le fer ferreux Fe(II) ou Fe^{2+} . Ce dernier joue un rôle stimulant important dans les réactions de production de radicaux libres en réagissant avec l' H_2O_2 pour donner le OH^{\bullet} (Laughton et al., 1989). Donc la production *in vitro* du OH^{\bullet} par le féruléol suit la loi de Fenton qui représente une réaction aboutissant à la formation du OH^{\bullet} où l' H_2O_2 oxyde le fer ferreux. L'efficacité de la production d' OH^{\bullet} par le peroxyde est accélérée en présence de concentrations élevées du féruléol (10^{-1} et 10^{-2}M) et aux faibles

concentrations, il y a toujours cette production de OH^\bullet mais elle est inférieure par rapport au contrôle (sans féruléol). Alors, le féruléol dans ce cas là joue le rôle d'un inducteur de la synthèse du OH^\bullet par la réaction de Fenton.

I.7. Effet du féruléol sur le gonflement des mitochondries pulmonaires *in vivo* et *in vitro*

L'effet du féruléol sur le changement du statut de la perméabilité mitochondriale a été évalué par la mesure du gonflement mitochondrial où nous avons remarqué une augmentation du gonflement chez les rats malades par rapport aux témoins. Après traitement des rats cancéreux par le féruléol, le statut du gonflement des mitochondries pulmonaires est beaucoup plus important remarqué par une décroissance importante de l'absorbance de la suspension mitochondriale ce qui explique l'effet apoptotique du féruléol sur les cellules pulmonaires atteintes d'un cancer (Figure 21).

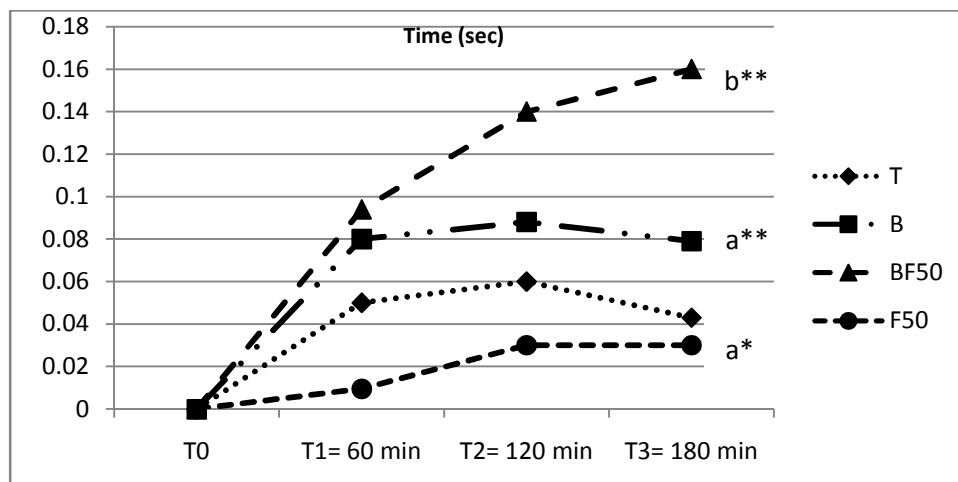


Figure 21 : Effet du féruléol sur le gonflement mitochondrial pulmonaire de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=3). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

Les mêmes effets ont été observés *in vitro* sur des mitochondries du poumon (figure 22) incubées avec les différentes concentrations du féruléol, ce qui confirme que l'augmentation du gonflement mitochondrial par le féruléol conduit à la rupture de la membrane mitochondriale et de l'initiation de l'apoptose.

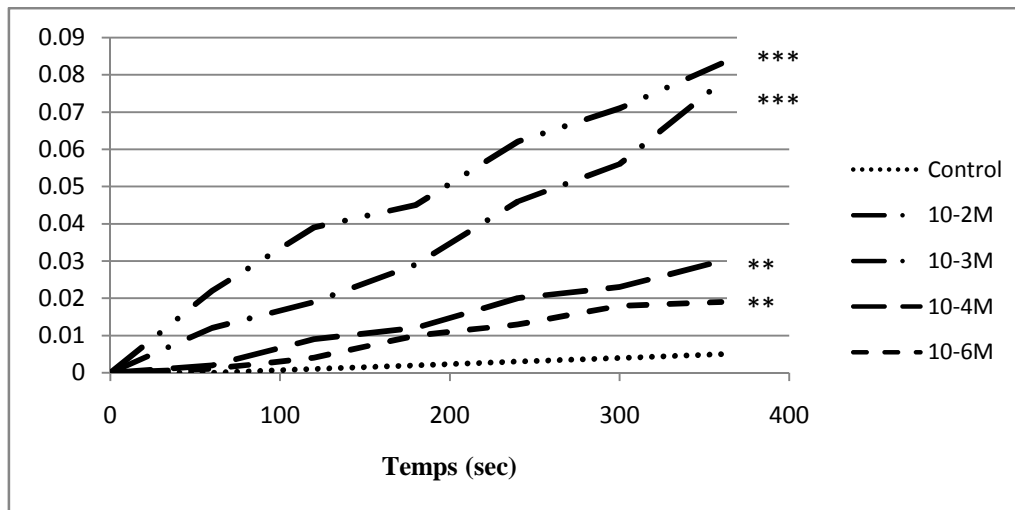


Figure 22 : Gonflement de mitochondries pulmonaires en présence du féruléol à différentes concentrations (n=3).

L'augmentation du gonflement mitochondrial par le féruléol peut être expliquée par l'ouverture du MPTP. L'ouverture du pore peut être induite par la production de ROS ainsi que par la présence de la protéine Bax. L'ouverture du pore augmente la perméabilité de la membrane interne mitochondriale vis-à-vis de protéines de poids moléculaire inférieur à 1,5 kda. Ceci entraîne une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial (proton-dépendant), un déséquilibre chimique entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale, ainsi qu'un découplage de la phosphorylation oxydative, provoquant alors un gonflement osmotique pouvant conduire à la rupture de la membrane externe. Il a été suggéré que la quantité d'ATP accessible après l'ouverture du pore est un facteur déterminant dans l'induction de la mort par nécrose ou par apoptose. Cette hypothèse du méga-canal est confortée par l'effet apoptotique de ce sesquiterpène coumarine qui peut agir comme un ligand de l'ANT. De plus, les membres de la famille Bcl-2 peuvent réguler l'ouverture du pore : Bcl-2 peut prévenir cette ouverture alors que Bax provoque une chute du potentiel membranaire mitochondrial et en favorisant l'ouverture.

I.8. Influence du B[a]P sur le fonctionnement de mitochondries pulmonaires *in vitro*

Plusieurs axes de recherches sur des modèles mammifères indiquent que les mitochondries sont les principales cibles de la toxicité des HAPs à l'intérieur des cellules, ainsi, ces études révèlent que ces HAPs se localisent dans les mitochondries et sont en corrélation avec une diminution de la production d'ATP (Jung et al., 2009). Cette étude de l'influence du B[a]P sur les mitochondries pulmonaires n'a jamais fait l'objet d'autres études et presque rien n'est connu en termes de rôle des HAPs y compris le B[a]P dans l'intégrité de la mitochondrie

pulmonaire *in vitro* et son fonctionnement. Pour cela nous nous sommes orientées vers la recherche des effets *in vitro* du B[a]P sur notre modèle de mitochondries isolée des poumons. Nous avons testé différentes concentrations croissantes du B[a]P dilué dans le DMF (de 10^{-3} M à 10^{-6} M) sur les mitochondries isolées des poumons des rats Wistar albinos. Les résultats sont représentés dans la figure 23 ci-dessous.

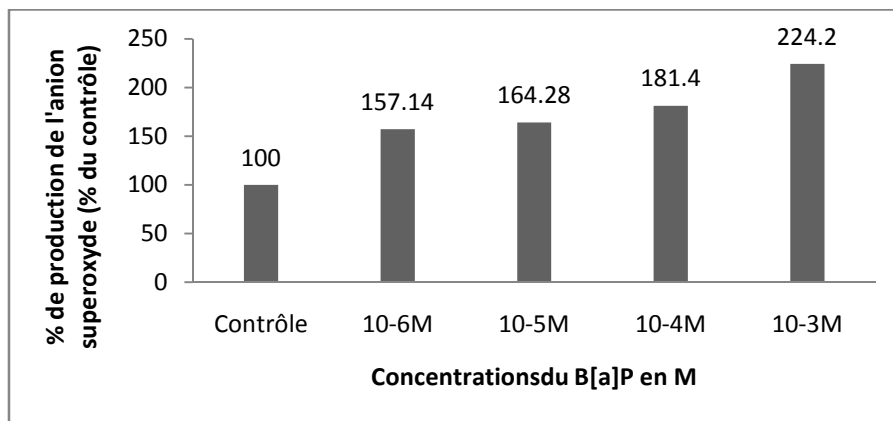


Figure 23 : Effet *in vitro* du B[a]P à différentes concentrations sur la production mitochondriale pulmonaire de l'anion superoxyde.

Nous avons enregistré une augmentation dose dépendante de la production de l'anion superoxyde comparé au contrôle sur la gamme étudiée (de 10^{-6} M à 10^{-3} M). Cette augmentation atteint près de 220% pour les doses fortes de B[a]P et près de 50% aux faibles doses (10^{-6} M). Cette augmentation est un indicateur de la toxicité du B[a]P à forte concentrations, de cela, on peut déduire l'effet pro-oxydant du B[a]P.

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de Rajandran et ces collaborateurs (Rajandran et al., 2008) qui ont rapporté qu'il y a une augmentation au taux des ROS, y compris l' $O_2^{\circ-}$ dans le groupe des animaux traités par le B[a]P. Ces résultats renforcent aussi ceux de Mendikute et collaborateurs (Gómez-Mendikute et al., 2002) qui présentent une augmentation de la quantité d' $O_2^{\circ-}$ au niveau des hématocytes de moules traités *in vitro* par le B[a]P.

La figure 24 présente l'effet du B[a]P à différentes concentrations sur le gonflement mitochondrial.

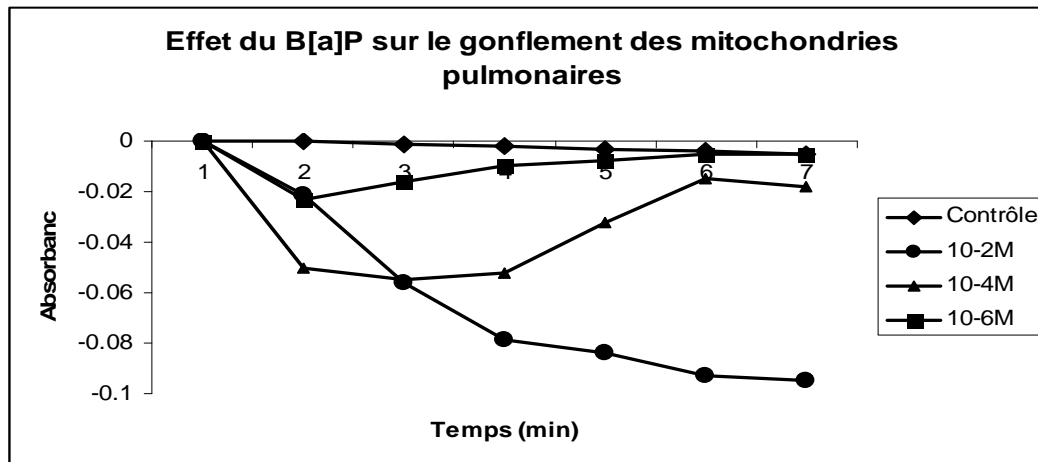


Figure 24 : Effet *in vitro* du B[a]P à différentes concentrations sur le gonflement mitochondrial pulmonaire.

I.9. Effet du féruléol sur l'expression de protéines apoptotiques du tissu pulmonaire des rats

Le lysat du tissu pulmonaire d'animaux traités et non traités ont été ciblés avec des anticorps appropriés pour identifier le taux d'expression de protéine Bcl-2 et Bax par Western Blot. La figure 25 montre le niveau d'accumulation de protéines Bcl-2 et Bax. La protéine Bcl-2 est sous-exprimée après le traitement par le féruléol dans le cancer pulmonaire induit par le B[a]P. Bax, une protéine pro-apoptotique, est accumulée dans les cellules pulmonaires après traitement par le féruléol. La β -actine a été utilisée comme témoin, qui donne des bandes d'intensité égale, ce qui confirme la concentration identique de protéines dans tous les échantillons.

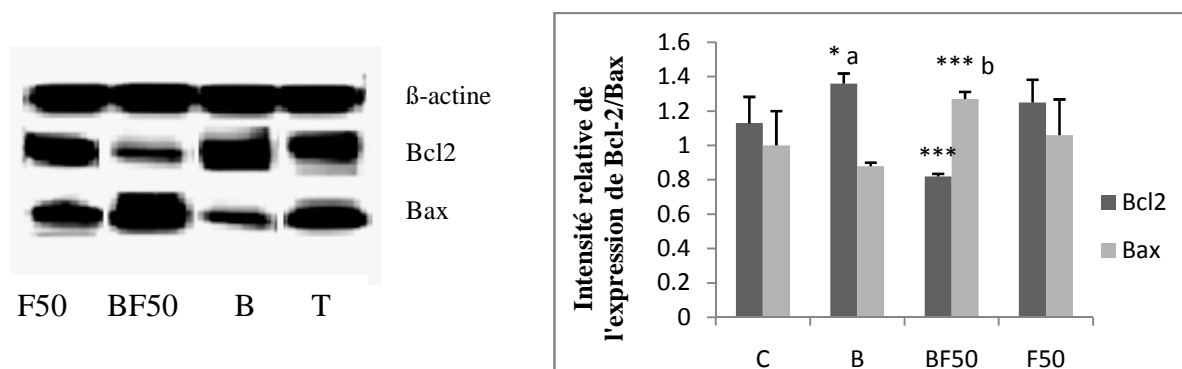


Figure 25 : Effet du féruléol sur l'accumulation de protéines Bcl-2/Bax dans le tissu pulmonaire de rat. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=3). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

La régulation et le contrôle des événements apoptotiques mitochondriaux a lieu à travers les membres des protéines de la famille Bcl-2 (Cory et Adams, 2002), qui peuvent être considérées comme des régulateurs clés de l'apoptose (Youle et Strasser, 2008) et leurs effets sur le métabolisme redox mitochondrial (Chen et Pervaiz, 2010). Le principal site d'action des protéines de la famille Bcl-2 est la membrane mitochondriale (Kroemer et Reed, 2000): elles peuvent être divisées en protéines anti-apoptotiques multidomaines (Bcl2, Bcl-x1, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1) qui contiennent quatre domaines courts conservés BH (Bcl-2 homologie) (BH1234) et des protéines pro-apoptotiques multidomaines (Bax, Bak), qui contiennent trois domaines BH (BH123) et des protéines pro-apoptotiques à domaine BH-3 (Bid, Bad, Bim) (Letai et al., 2002).

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pourraient agir comme des inhibiteurs de leurs homologues pro-apoptotiques, sans effets indépendants sur d'autres protéines mitochondriales (Kroemer et al., 2007). Par exemple, la suppression de la perméabilisation des membranes mitochondriales peut être réalisée par une interaction directe avec des pores qui forment les membres Bcl-2 ou indirectement par la neutralisation des protéines à domaine BH3 (Letai et al., 2002). Dans ce cas, les molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-x1 empêchent la formation de pore au sein de la mitochondrie par la liaison avec la protéine Bcl-2 pro-apoptotique ou d'interagir directement avec Bax en inhibant sa translocation vers les mitochondries (Karpnich et al., 2002).

Le gène de la protéine Bcl-2 est étroitement lié à la plupart des cancers humains (Gu et al., 2009). Korsmeyer (1992) a suggéré que des altérations du gène de Bcl-2; qui régule la mort cellulaire, pourrait être une aberration primaire fréquente sans s'y limiter au lymphome folliculaire mais se produisant dans d'autres types de néoplasme (Korsmeyer, 1992). La

surexpression de protéines anti-apoptotiques qui agissent comme des antioxydants cellulaires "protéine Bcl-2" et la sous-expression de la protéine pro-apoptotique " Bax" permet aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose dans le cancer pulmonaire induit par le B[a]P. Notre observation dans le groupe d'animaux ayant un cancer du poumon avec une accumulation positive de Bcl-2 et avec une progression relativement lente suggère que peut être dans ces types de tumeurs, l'expression de Bcl-2 agit comme un oncogène initiale, comme dans le lymphome folliculaire, conduisant à une croissance moins agressive des tumeurs. La cause de cette expression anormale de Bcl-2 dans les tumeurs pulmonaires est inconnue. La cause classique de la surexpression de Bcl-2 – la translocation T14; 18 - n'a pas été détectée dans le cancer du poumon, ni avoir d'autres anomalies du chromosome 18. Cependant, il ne vaut rien que depuis cette protéine peut être surexprimé dans un certain lymphome folliculaire ne constitue pas la seule cause du dérèglement de Bcl-2 dans les cellules néoplasiques (Pezzella et al., 1990). La découverte que la protéine est absente ou faiblement exprimée dans la prolifération des lymphocytes après stimulations *in vitro*, suggèrent une régulation post-transcriptionnelle comme un éventuel mécanisme physiologique contrôlant l'expression de Bcl-2 (Reed et al., 1987). Si tel est le cas, les modifications dans le contrôle de la traduction de l'ARN messager pourraient conduire à une accumulation anormale de la protéine Bcl-2 dans le cancer pulmonaire induit par le B[a]P.

Bien que les mécanismes sous-jacents de la mort cellulaire dans le cancer pulmonaire en réponse au féruléol n'ont pas été signalés. Des études antérieures ont suggéré que le mécanisme anticancéreux de n'importe quelle substance comprend l'arrêt du cycle cellulaire après la mort apoptotique par de nombreuses et concurrentes voies de dégénérescence. Pour identifier les mécanismes potentiels de la mort cellulaire impliqués dans le traitement par le féruléol, l'analyse par Western blot a été utilisé pour dépister les altérations de l'expression des protéines cellulaires dans le cancer du poumon induit par le B[a]P. Les changements dans l'accumulation de Bax et Bcl-2 sont particulièrement intéressant car ils sont rapportés à moduler les processus cancérogènes par l'arrêt du cycle cellulaire, l'initiation et l'amélioration de la mort apoptotique.

Après traitement des rats atteint d'un cancer pulmonaire par le féruléol à 50 mg/kg, une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une augmentation de l'expression de la protéine proapoptotique Bax ont été observés, la régulation négative de la protéine Bcl-2 par le féruléol peut être expliqué que le stress oxydatif produit par le féruléol qui est caractérisée par la production de ROS mitochondriaux et leurs élimination par les

systèmes anti-oxydantes de la défense. La perturbation dans cet équilibre peut entraîner des effets toxiques à travers l'accumulation de peroxydes et des radicaux libres qui endommagent la cellule et ses composants. Certains ROS peuvent agir comme des messagers à travers la régulation redox des voies de signalisation cellulaires. L'expression de Bcl-2 est étroitement régulée par des mécanismes qui incluent la transcription, la dimérisation et de la dégradation (Willimot et Wagner, 2010). Parmi eux, la dégradation de Bcl-2 est un mécanisme clé de la régulation de cette protéine pendant l'apoptose (Chanvorachote et al., 2006). Des études antérieures ont montré que la dégradation de Bcl-2 est médiée principalement par la voie ubiquitine-protéasome et est associée à la génération de ROS (Luanpitpong et al., 2011). Dans les cellules cancéreuses pulmonaires, la formation de ROS induite par le féruléol a été montrée pour être impliqués dans la régulation de Bcl-2. Des preuves croissantes suggèrent que la régulation post-traductionnelle des protéines par la réaction redox peut servir comme un mécanisme clé pour contrôler la fonction des protéines (Yang et al., 2012). Les objectifs clés pour la régulation redox des protéines sont des résidus cystéine (Yang et al., 2012). La protéine Bcl-2 contient quatre domaines d'homologies BH (BH1-BH4) avec deux résidus cystéine à la position 158 dans le domaine $\alpha 5$ et la position 229 dans le domaine carboxy-terminal d'ancrage à la membrane (Cys-158 et Cys-229) (Luanpitpong et al., 2013). Il a été bien établi que les ROS apparaissent en production continue par le féruléol par la réduction des molécules d' O_2 , et il est reconnu qu'un seul électron est transféré et le résultat est l'anion superoxyde. Ce dernier est détruit en le convertissant ensuite au H_2O_2 par la SOD.

Souvent, la perte progressive du potentiel membranaire mitochondrial est accompagnée d'une augmentation de la production de ROS, lequel le traitement par le féruléol sature les systèmes de défense antioxydants et induit l'altération fonctionnelle des mitochondries, en retardant la phosphorylation oxydative (Lahouel et al., 2007). Ainsi, la production de ROS dans les mitochondries a été caractérisée comme un événement pro-apoptotique précoce qui se produit avant que les cellules subissent l'apoptose (Forbes-Hernández et al., 2014). La production excessive d' $O_2^{\circ -}$ résulte à une consommation de la SOD conduit à une accumulation d' H_2O_2 dans les cellules pulmonaires. Des expériences ont montré que l'accumulation d' H_2O_2 est une étape cruciale pour les anticancéreux qui induit la mort des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. L' H_2O_2 , une molécule de signalisation générée au cours du stress oxydatif et en réponse à divers stimuli de l'apoptose (Wang et al., 2008), semble être un acteur clé dans le stress oxydatif induit la mort des cellules cancéreuses. De nombreux agents anticancéreux augmentent les taux d' H_2O_2 (Alexandre et al., 2006), ce

dernier est connu pour être un inducteur efficace de la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses (López-Lázaro, 2007). Cet effet sélectif d'H₂O₂ a également été observé dans des cellules dérivées de tumeurs solides (Martin-Cordero et al., 2012). En utilisant des cellules de cancer du poumon et des fibroblastes pulmonaires non malignes dans les mêmes conditions expérimentales, il a été récemment constaté que des concentrations spécifiques d'H₂O₂ et de pyrogallol, agent qui génère H₂O₂, induit une destruction sélective des cellules cancéreuses (López-Lázaro et al., 2011).

La surexpression de Bcl-2 dans les cellules de l'épithélium pulmonaire permet l'inhibition de l'apoptose, ce qui indique le rôle anti-apoptotique de Bcl-2, en accord avec la fonction connue de cette protéine. L'oxydation de la cystéine du bcl-2 a été observée à des taux élevés d'H₂O₂ qui induit l'apoptose, ce qui suggère le rôle potentiel d'oxydation de la cystéine dans le processus de signalisation de la mort. L'inhibition de l'oxydation de la cystéine de la protéine Bcl-2 par une mutation spécifique du site des résidus de cystéine (Cyt-158 et Cyt-229) inhibe fortement l'effet apoptotique d'H₂O₂ (Luanpitpong et al., 2013). Diverses mutations de Bcl-2 ont été rapportés dans les cancers, bien que l'analyse directe de la fonction des protéines mutées est limitée (Matolcsy et al., 1996, Packham, 1998). Notre étude a démontré la contribution des résidus cystéine de Bcl-2 promu pour son activité anti-apoptotique, ce qui peut contribuer au développement du cancer du poumon induit par le B[a]P, et une telle modification de Bcl-2 via la formation Cys-SOH a établi son rôle dans la régulation de l'apoptose induite par l'H₂O₂. Une telle modification de Bcl-2 provoque la disruption du complexe Bcl-2-ERK, menant à Bcl-2 la régulation, l'activation d'ERK et l'apoptose.

Par conséquent, la surexpression de la protéine proapoptotique Bax après traitement par le féruléol peut être expliquée que cette protéine a subit une modification post-traductionnelle (par déphosphorylation et de clivage), ce qui entraîne son activation et sa translocation vers les mitochondries, conduisant ainsi à l'apoptose. Ce qui donne des nouvelles découvertes sur le mécanisme de régulation de l'apoptose par les protéines Bcl-2 après le traitement par le féruléol chez les rats atteints d'un cancer pulmonaire.

I.10. Effet du féruléol sur l'expression de l'Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats atteints le cancer pulmonaire par le B[a]P

L'analyse par immunoblot a révélé l'expression de la protéine chaperonne Hsp90 dans le tissu pulmonaire de rats traités par le B[a]P et/ou le féruléol (Figure 26). L'expression de l'Hsp90 dans la cellule pulmonaire de rats ayant reçu le B[a]P était significativement plus élevée par rapport aux rats témoins. Tandis que, l'expression de cette protéine était le plus faible dans le groupe de rats ayant reçu le B[a]P et traités par le féruléol après 24 semaines d'injection du carcinogène. Aucun effet indésirable du féruléol sur l'expression de l'Hsp90 n'a été observé entre les animaux témoins et ceux traités par le féruléol seul à 50 mg/kg IP.

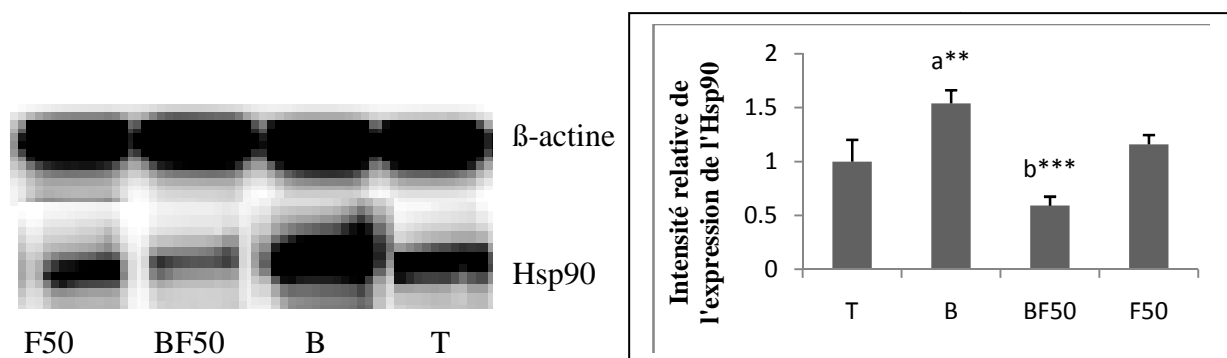
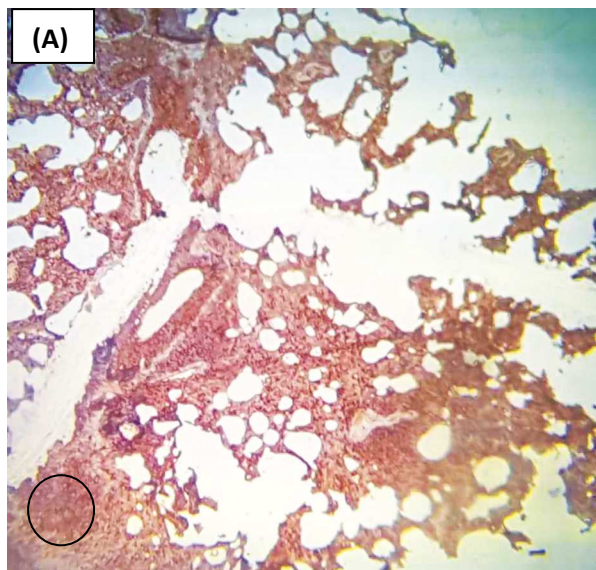


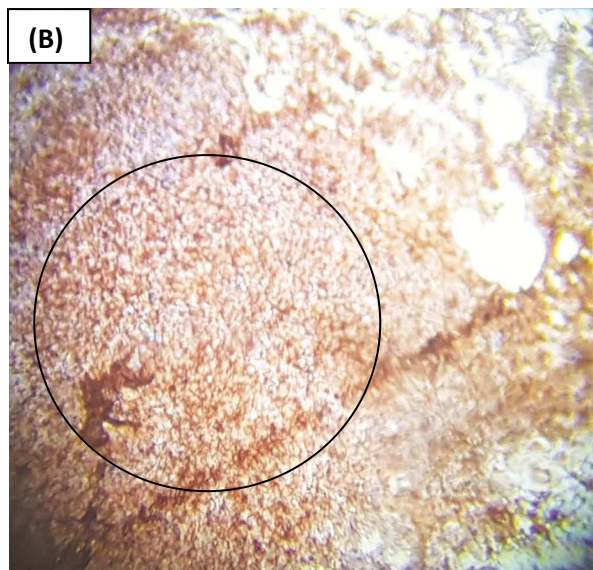
Figure 26 : Effet du féruléol sur l'expression de la protéine Hsp90 dans le tissu pulmonaire de rat. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=3). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

L'évaluation de l'expression de l'Hsp90 en immunohistochimie nécessite cependant une méthode technique standardisée sur automate, afin de limiter la variabilité technique. En effet, contrairement au Western Blot, il n'est pas possible de normaliser les valeurs obtenues à l'expression d'une protéine de référence. Par rapport au Western Blot, cette technique a par contre l'intérêt d'être plus simple et rapide, moins coûteuse, nécessitant peu de matériel et utilisable sur tissu fixé dans le formol et inclus en paraffine. Elle est ainsi particulièrement adaptée à des cohortes comportant plusieurs dizaines d'échantillons. De plus, contrairement à l'immunohistochimie, il n'est pas possible en Western Blot d'isoler les cellules tumorales des cellules du stroma et des protéines contaminantes de la matrice extra-cellulaire.

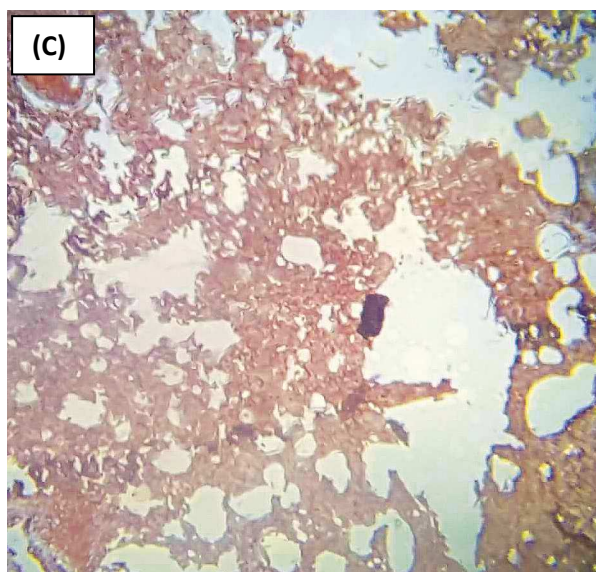
Un marquage membranaire important de l'Hsp90 a été détecté dans le tissu pulmonaire des rats traités par le B[a]P (groupe 2) suggérant le pouvoir prolifératif et anti-apoptotique des cellules pulmonaires du rat. Cependant l'expression de cette protéine a été diminuée après traitement, par le féruléol, des rats malades (Figure 27).



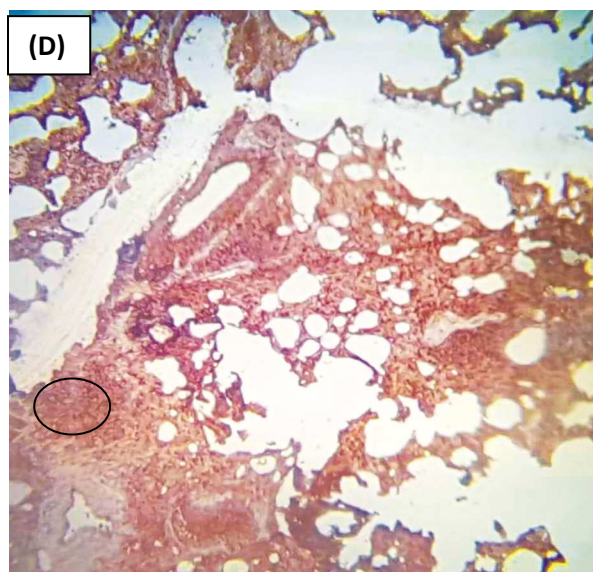
Marquage membranaire faible (cercle) de l'Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats témoins (X100).



Marquage membranaire important (cercle) de l'Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats traités par le B[a]P (X100).



Une diminution du marquage membranaire de l'Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats cancéreux traités par le féruléol (X100).



Marquage membranaire faible (cercle) de l'Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats traités par le féruléol seul (X100).

Figure 27 : Détection par immunohistochimie l'expression de la protéine Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats traités par le B[a]P et /ou le féruléol. (A) rats contrôles, (B) rats cancéreux, (C) rats cancéreux et traités par le féruléol et (D) rats traités par le féruléol seul.

Puisque des études précoces ont montré que la fonction de l'Hsp90 cytoplasmique est essentielle pour la viabilité et la croissance normales des cellules (Borkovich et al., 1989), il était difficile, sinon impossible, de considérer l'hsp90 comme une cible thérapeutique potentielle. Les évaluations précliniques et cliniques d'une variété d'inhibiteurs de l'hsp90 ont montré un effet anti-tumoral en tant qu'agent unique et en combinaison avec la chimiothérapie. Cependant, étant donné que la geldanamycine (GA) a été démontrée pour posséder des effets anticancéreux puissants en inhibant l'Hsp90 (Supko et al., 1995, Whitesell et al., 1994), de nombreux efforts ont été consacrés à ce domaine et une diversité des inhibiteurs de l'hsp90 ont été identifiés ou synthétisés (Cheung et al., 2005).

La faisabilité de cibler l'Hsp90 pour la thérapie du cancer est bien soutenue: (i) Premièrement, l'Hsp90 participe à la maturation et à la stabilisation d'un large éventail de protéines client oncogéniques cruciales pour l'oncogénèse et la progression maligne de cellules (Kamal et al., 2004) particulièrement dépendantes de la fonction d'Hsp90 (Chiosis et Neckers, 2006).

(ii) Les conditions environnementales difficiles rencontrées dans des tumeurs telles que l'hypoxie, le faible pH et le mauvais état nutritionnel peuvent avoir tendance à déstabiliser les protéines, ce qui les rend encore plus dépendantes de l'activité de l'Hsp90 (Solit et Chiosis, 2008). La dépendance extraordinaire des cellules tumorales pour l'Hsp90 est cohérente avec un rapport que l'Hsp90 comprend jusqu'à 4 à 6% des protéines totales dans les cellules tumorales en comparaison avec 1 à 2% dans les cellules normales (Chiosis et Neckers, 2006).

(iii) Une autre explication de la sélectivité tumorale des inhibiteurs d'Hsp90 provient de l'observation que dans les cellules cancéreuses l'Hsp90 existe principalement comme un complexe multi-chaperon avec une affinité inhabituellement élevée pour l'ATP et le médicament, tandis que dans les cellules normales l'Hsp90 est présente dans un état non complexé ou latent (Chiosis et Neckers, 2006).

(iv) Enfin, une accumulation spécifique de cellules tumorales pour un certain nombre d'inhibiteurs d'Hsp90, tels que le 17-AAG, le 17-DMAG, l'IPI-504 et des dérivés de radicicol (Chiosis et Neckers, 2006). Ainsi, cette sélectivité peut ne pas être due aux propriétés structurales ou physico-chimiques d'une classe spécifique de composés, mais plutôt aux propriétés d'Hsp90 elle-même (Solit et Chiosis, 2008).

Un grand nombre d'études ont montré que l'expression de l'Hsp90 pourrait être induite par des contaminants environnementaux, de métaux lourds et autres produits chimiques (Liu et al., 2015) et nos résultats ont également confirmé ce modèle d'expression. Lorsque des rats Wistar ont été injectés par le B[a]P à 100 mg/kg IP, l'expression de la protéine Hsp90 s'est révélée augmenter de façon importante pendant 24 semaines d'administration de ce carcinogène. qui est dépendant du aryl hydrocarbure récepteur AhR non lié, ce dernier est retenu dans le cytoplasme sous forme d'un complexe protéique inactif constitué d'un dimère d'Hsp90 (Denis et al., 1988), de prostaglandine E synthase 3 (p23) (Shetty et al., 2003) et d'une molécule unique XAP2. Le dimère d'Hsp90, avec la protéine p23, a un rôle multifonctionnel dans la protection de récepteur contre la protéolyse, limitant le récepteur dans une conformation réceptive à la liaison du ligand et empêchant la liaison prématurée de l'ARNT (Shetty et al., 2003). XAP2 interagit avec la terminaison carboxyle de l'Hsp90 et se lie à la séquence de localisation nucléaire de l'AhR empêchant le passage inapproprié du récepteur dans le noyau (Petruilis et al., 2003). L'augmentation de l'expression de l'Hsp90 peut être expliquée que la pénétration du B[a]P dans les cellules pulmonaire permet sa liaison avec l'AhR, donnant naissance à une dissociation de l'Hsp90, ce qui entraîne une translocation d'AhR dans le noyau et une dimérisation avec ARNT, entraînant des changements dans la transcription génique des enzymes de phase I de métabolisation des xénobiotiques CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1... etc. et induit l'expression des gènes qui codent pour l'Hsp90 et de différents gènes impliqués dans la transformation maligne, la régulation de l'apoptose et le cycle cellulaire. L'activation de l'AhR par le B[a]P conduit à l'accumulation de l'Hsp90 dans les cellules pulmonaires aboutissant à la production de métabolites réactifs, qui contribuent aux dommages cellulaires dans le système biologique.

Différents substances naturelles ont été connues pour leurs effets inhibiteurs de l'Hsp90 parmi lesquelles, la novobiocine (Workman et al., 2007), un antibiotique coumariné isolé d'une espèce de *Streptomyces*, se lie à l'Hsp90 à un site de liaison ATP C-terminal avec une activité relativement faible (Marcu et al., 2000). L'inhibition de l'Hsp90 par la novobiocine a induit des réponses cellulaires similaires à celles des inhibiteurs N-terminaux, c'est-à-dire la déstabilisation d'une gamme de protéines clientes d'Hsp90 telles que Her-2, Raf-1 et p53 par la voie ubiquitine-protéasome (Allan et al., 2006). Aussi, une autre substance qui est l'isoflavone derrubone de l'arbre indien *Derris robusta* (Hadden et al., 2007). Ils ont trouvé que le derrubone perturbe l'interaction de l'Hsp90 et de Cdc37 avec la kinase eIF2 (HRI), une kinase cliente de l'Hsp90, ce qui présente une activité antiproliférative dans des lignées

cellulaires de cancer du sein humain (Hadden et al., 2007). Ils a été aussi montré que le 3-gallate d'épigallocatechine (EGCG) inhibait l'activité transcriptionnelle du récepteur AhR par un mécanisme impliquant une liaison directe d'EGCG à l'extrémité C terminal de l'Hsp90 (Palermo et al., 2005). Ces résultats peuvent fournir de nouvelles structures de produits naturels pour faciliter le développement de nouveaux inhibiteurs d'Hsp90.

Dans la présente étude, le traitement des rats atteints d'un cancer pulmonaire par le féruléol montre une diminution de l'expression de l'Hsp90. Ces résultats peuvent être expliqués que le féruléol inhibe l'expression de l'Hsp90 soit par:

- Le blocage de la liaison à l'ATP,
- La perturbation des interactions co-chaperon / Hsp90,
- L'antagonisme des associations de protéines clients / Hsp90,
- L'interférence avec des modifications post-traductionnelles de l'Hsp90,
- L'inhibition de la transcription du gène qui code pour l'AhR
- L'interaction avec le récepteur AhR
- L'inhibition du gène qui code pour l'Hsp90.

I.11. Effet du féruléol sur l'expression de la P-gp dans le tissu pulmonaire de rats atteints le cancer pulmonaire par le B[a]P

L'analyse par Western blot a révélé l'expression de la P-gp dans le tissu pulmonaire de rats de différents groupes (Figure 28). L'expression de la P-gp dans le tissu pulmonaire de rats traités par le B[a]P était significativement plus élevée par rapport aux rats témoins. Néanmoins, l'expression de cette glycoprotéine était plus faible dans le groupe de rats ayant reçu le B[a]P et traités par le féruléol. Aucun effet indésirable du féruléol sur l'expression de la P-gp n'a été observé entre les animaux témoins (groupe1) et ceux traités par le féruléol seul (groupe 4).

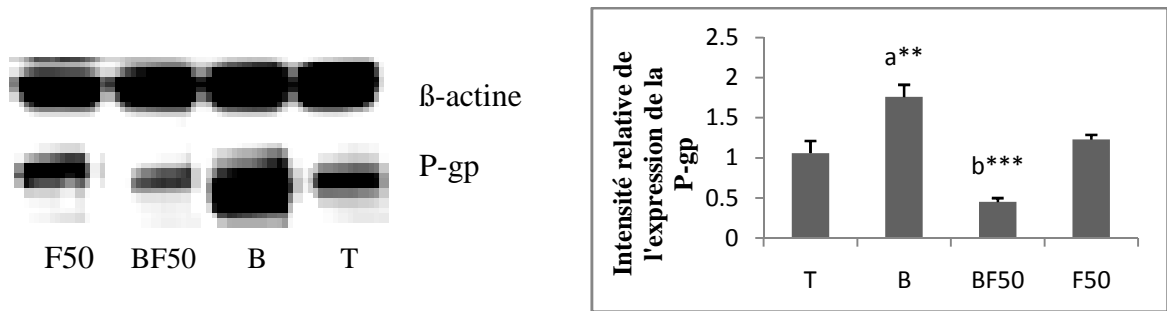


Figure 28 : Effet du féruléol sur l'expression de la P-glycoprotéine dans le tissu pulmonaire. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=3). T : rats témoin, B : rats traités par le B[a]P, BF50 : rats traités par le B[a]P+ féruléol et F50 : rat traités par le féruléol. a : comparaison par rapport au T, b : comparaison par rapport au B.

En termes de transport membranaire médié par la P-gp, un effet significatif sur la disposition de la substance causé par des changements dans l'expression de la P-gp a été rapporté pour de nombreuses molécules (Fromm, 2002, Fromm, 2003). Cependant, il n'a pas été reconnu si le B[a]P, un polluant environnemental puissant, possède une influence sur la disposition de molécules (liées à la P-gp) dans les tissus pulmonaires de rats. Parce que la P-gp est un déterminant critique de la disposition des médicaments (Borst et Schinkel, 1997), il est important de déterminer si la P-gp peut ou non influencer la rétention intracellulaire de médicaments.

Pour déterminer si la P-gp influence le mouvement transcellulaire du féruléol au cours d'un cancer pulmonaire induit par le B[a]P, cette étude nous permet de définir et pour ces deux substances : le féruléol et le B[a]P, les interactions avec la P-gp dans le tissu pulmonaire. Le modèle expérimental utilisé dans cette étude a montré que l'expression des rats aux B[a]P pourrait influencer la disposition des médicaments par l'induction de la P-gp. Mathieu et ses collaborateurs (Mathieu et al., 2001) suggèrent que l'induction de MDR1 par le B[a]P semble être dû à ces métabolites plutôt que le B[a]P lui-même. Le métabolisme du B[a]P génère de ROS, ces espèces radicalaires semblent être impliquées dans le déclenchement de l'activation de la P53 en association à des lésions à l'ADN. De même, la génération de ROS par le B[a]P induit l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Il est rapporté que l'activation de NF- κ B induit l'expression de MDR1 du rat (Felix et Barrand, 2002). La translocation du féruléol, classé comme un inhibiteur de la P-gp (Nazari et Iranshahi, 2011), est importante dans le tissu pulmonaire de rats ayant un cancer pulmonaire. Ceci est dû à l'inhibition de cette glycoprotéine par le féruléol et ce qui explique que l'accumulation intracellulaire et la distribution tissulaire du féruléol n'a pas été affectée par la P-gp.

I.12. Examen macroscopique et microscopique (histopathologique) du tissu pulmonaire des rats de différents groupes

L'un des carcinogènes le plus puissant, le plus remarquablement et le plus étudié est le B[a]P et son aptitude à induire des tumeurs pulmonaires est bien documentée dans des modèles animaux. Le B[a]P génère généralement des cellules tumorales pulmonaires squameuses chez l'animal, y compris le rat, la souris et le hamster (Hoffmann et al., 2001). Plus important encore, ces tumeurs possèdent des similitudes morphologiques et moléculaires à celles observées chez les humains et les doses de B[a]P administrés sont comparables à l'exposition rencontrée par un fumeur pendant sa vie (Hecht, 1998). Lors de l'administration systémique du B[a]P, les souris auraient montré une plus grande sensibilité au développement de tumeurs pulmonaires. En outre, le carcinome à cellules squameuses induit chez le rat représente le cancer pulmonaire non à petites cellules. Par conséquent, ce modèle de rat amélioré est un choix approprié pour la chimiothérapie et la radiothérapie pour l'étude du cancer pulmonaire non à petites cellules. Les investigations épidémiologiques ont montré que les différents facteurs cancérigènes induits des cancers pulmonaires, les hommes développent principalement des carcinomes épithéliaux squameux et les femmes développent des adénocarcinomes. La formation des tumeurs chez les rats traités par le B[a]P est limitée au système respiratoire. Aucune tumeur n'a été observée dans le cerveau, le foie, les reins, l'estomac, l'intestin ou le côlon.

Selon le tableau de la classification TNM "tumeur, ganglions lymphatiques, métastases" du cancer pulmonaire non à petite cellules (tableau 2) qui prend en compte :

- La taille et la localisation de la tumeur primitive,
- Le nombre et le site des ganglions lymphatiques régionaux qui contiennent des cellules cancéreuses,
- La propagation du cancer, ou métastases, vers une autre partie du corps.

On constate que le cancer pulmonaire induit par le B[a]P génère des adénocarcinomes au stade IA (T1a, N0, M0).

Tableau 2 : Classification TNM du cancer pulmonaire.

Tumeur primitive (T)
<ul style="list-style-type: none">• TX : (Ia) Tumeur ne peut être évaluée ou est démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie.• T0 : Pas d'évidence de tumeur primitive (c'est-à-dire pas de tumeur).• Tis : Carcinome in situ.• T1 : Tumeur de 3 centimètres (cm) ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale (membrane qui tapisse toute la surface du poumon), sans évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale (c'est-à-dire plus proche de centre du poumon) que la bronchique lobaire (c'est-à-dire pas la bronche souche).<ul style="list-style-type: none">• T1a : Tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension.• T1b : Tumeur de plus de 2 cm sans dépasser 3 cm dans sa plus grande dimension.• T2 : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes :<ul style="list-style-type: none">- atteinte de la bronche de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène (point où la trachée se divise en bronches souches gauche et droite).- invasion de la plèvre viscérale (membrane qui tapisse toute la surface du poumon).- présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare (du hile) sans atteindre l'ensemble du poumon (c'est-à-dire l'obstruction partielle des voies respiratoires possible sans toutefois causer l'affaissement total du poumon).• T2a : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 5 cm dans sa plus grande dimension.• T2b : Tumeur de plus de 5 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension.• T3 : Tumeur de plus de 7 cm :<ul style="list-style-type: none">- Ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris dans le cas de la tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleurale ou pariétale ou le péricarde.- Ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir,- Ou associée à une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive du poumon entier (c'est-à-dire l'affaissement total du poumon).- Ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe.• T4 : Tumeur de toute taille :<ul style="list-style-type: none">- envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, coeur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène.

- ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint.

Ganglions lymphatiques régionaux (N)

- **NX** : Les ganglions ne peuvent pas être évalués.
- **N0** : Pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale.
- **N1** : Métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux (du même côté), y compris par envahissement direct.
- **N2** : Métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux (du même côté) et/ou sous-carinaires.
- **N3** : Métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux contralatéraux, hilaires (du hile) contralatéraux (du côté opposé au côté atteint), scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou contralatéraux.

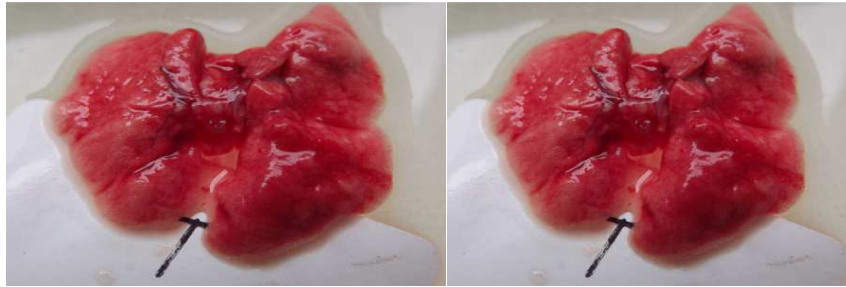
Métastases à distance (M)

- **MX** : Les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées.
- **M0** : Aucune métastase à distance.
- **M1** : Métastase à distance.
- **M1a** : Nodule(s) tumoral distinct dans un lobe contralatéral (du côté opposé au côté atteint); tumeur avec nodules pleuraux (au niveau de la plèvre) ou épanchement pleural (ou péricardique) malin.
- **M1b** : Métastase à distance.

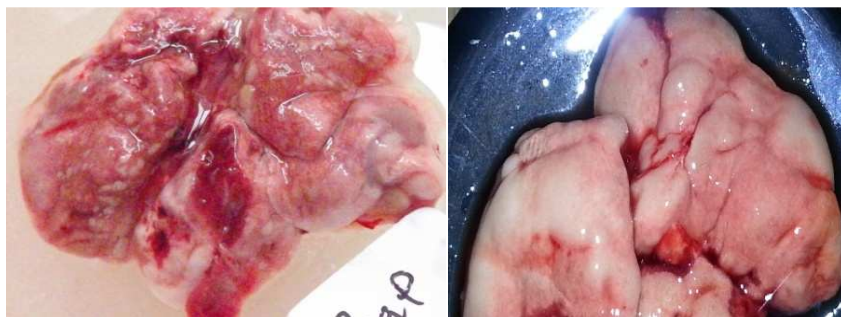
Regroupement des stades pour le CBNPC

- **Stade occulte** : **T_x + N0 + M0**
- **Stade 0** : **Tis + N0 + M0**
- **Stade IA** : **T1a, b + N0 + M0**
- **Stade IB** : **T2a + N0 + M0**
- **Stade IIA** : **T1a, b + N1 + M0 / T2a + N1 + M0 / T2b + N0 + M0**
- **Stade IIB** : **T2 + N1 + M0 / T3 + N0 + M0**
- **Stade IIIA** : **T1, T2 + N2 + M0 / T3 + N1, N2 + M0 / T4 + N0, N1 + M**
- **Stade IIIB** : **Tout T + N3 + M0 / T4 + N0, N1 + M0**
- **Stade IV** : **Tout T + Tout N + M1**

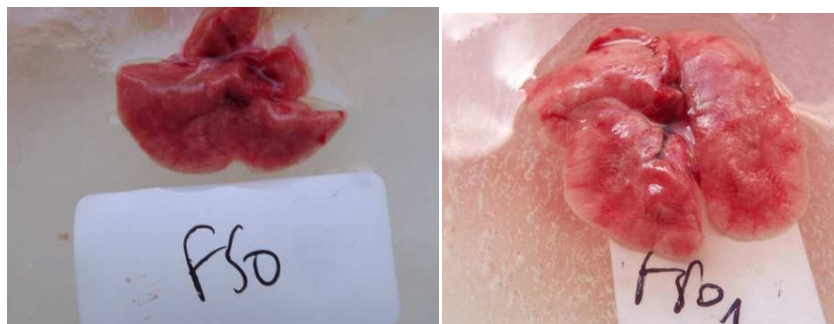
L'examen macroscopique des poumons de rats de différents groupes observé sous la loupe binoculaire est présenté dans la figure 29.



Poumons des rats témoins



Poumons des rats qui ont reçu le B[a]P 100 mg/kg/IP



Poumons des rats traités par le féruléol seul 50 mg/kg/IP

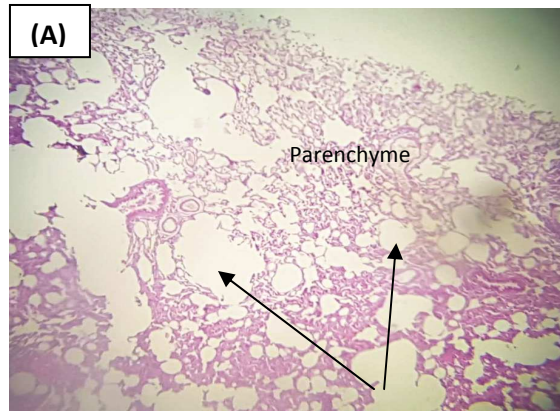


Poumons des rats qui ont reçu le B[a]P+ féruléol 50 mg/kg/IP

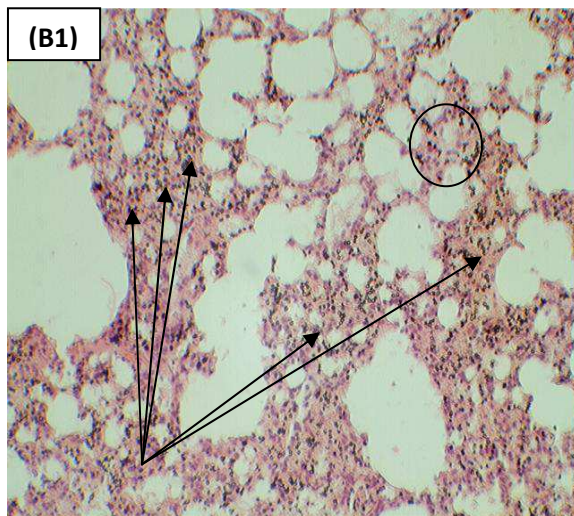
Figure 29 : Examen macroscopique de poumons de rats de différents groupes.

Les poumons des rats témoins présentent une couleur rose et homogène sur toute la surface du tissu avec une structure intacte et une lobulation bien définie. Alors que les poumons des rats traités par le B[a]P à 100 mg/kg/IP seul montre une surface ronflée de couleur blanchâtres ce qui peut être due à la formation des kystes résultant à des réactions inflammatoires, ces zones sont hétérogène et légèrement saillante sur la surface des poumons, une fusion des lobules pulmonaires pouvons être expliqués par une transformation cellulaire. Concernant les poumons des rats ayant reçu le B[a]P et traités par le féruléol à 50 mg/kg/IP, les poumons sont de couleur rose proche à celle des témoins avec un rétrécissement des zones inflammées qui ont été observés après traitement par le B[a]P. Aucune différence dans la structure pulmonaire n'a été observé après traitement par le féruléol seul ce qui signifie que cette substance bioactive n'a aucune influence sur le changement da la morphologie tissulaire pulmonaire.

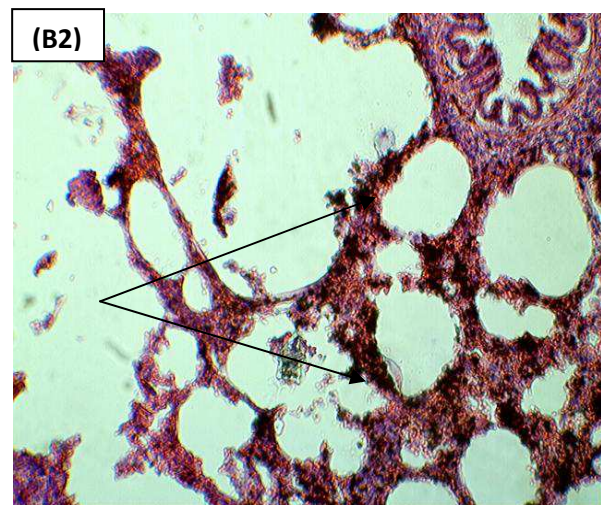
Pour l'examen microscopique, les coupes histologiques réalisées sur des poumons normaux, cancéreux et traités sont schématisées dans la figure 30 ci-dessous.



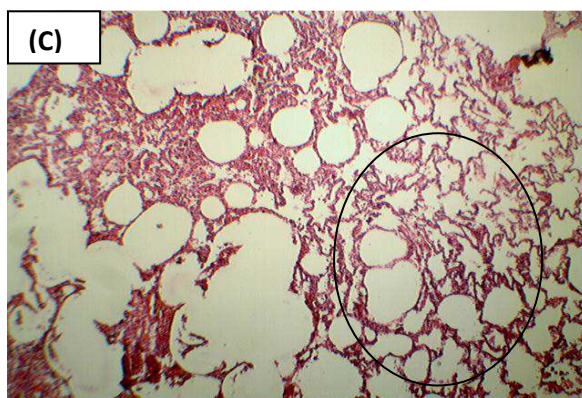
Poumon du rat témoin (X40)



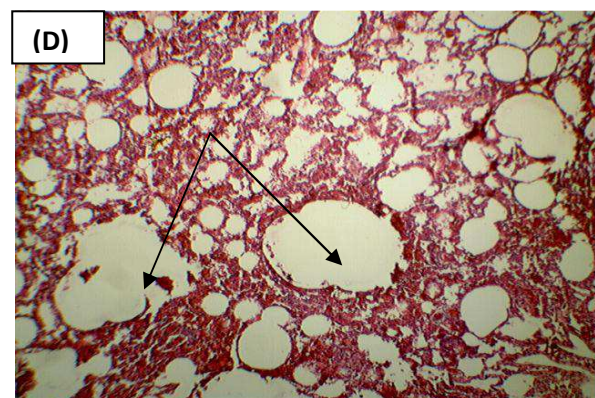
Poumon du rat traité par le B[a]P (X40)



Poumon du rat traité par le B[a]P (X400)



Poumon du rat traité (B[a]P+le féruléol)(X40)



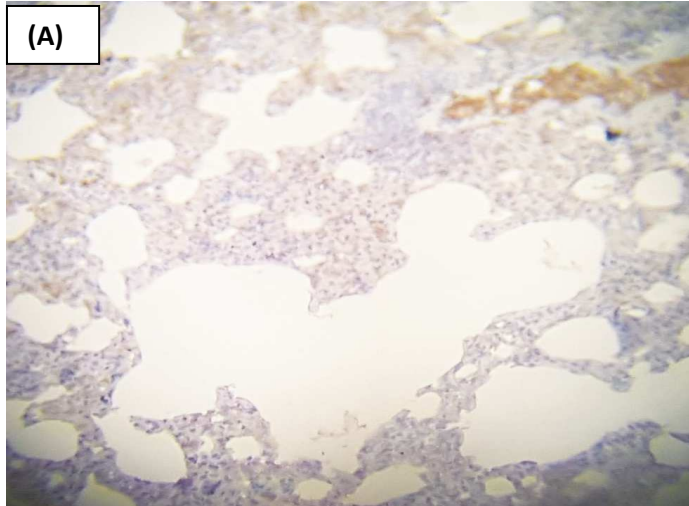
Poumon du rat traité par le féruléol (X40)

Figure 30 : Photomicrographie de sections de poumons des rats témoins et traités par le B[a]P et/ ou le féruléol. (Hématoxyline & Eosine). (A) rats contrôles : espace alvéolaire régulier (flèches) et parenchyme intacte, (B1) rats cancéreux : Cellules proliférantes remplis les alvéoles (cercles) et infiltrats inflammatoires lymphocytaires (flèches), (B2) rats cancéreux : Epaissement du septum (flèches), (C) rats cancéreux et traité par le féruléol : rétrécissement de l'inflammation et foyers nécrosés du parenchyme (cercle) et (D) : rats traités par le féruléol seul : Alvéoles intactes (flèches).

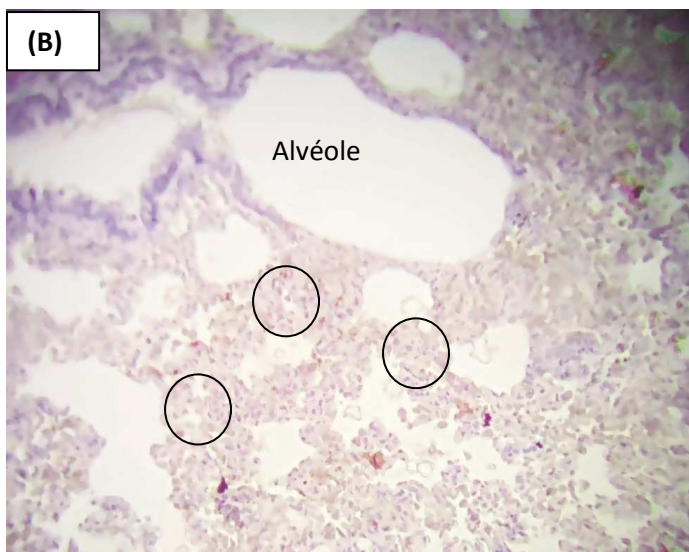
L'examen microscopique des coupes histologiques réalisées sur des poumons normaux montre des espaces alvéolaires de dimension régulière et une architecture intacte du parenchyme pulmonaire. Après 24 semaines d'injection de la première dose intrapéritonéale du B[a]P, les rats étaient confirmés pour commencer à développer des carcinomes pulmonaires par un épaissement du septum qui peut être lié à un envahissement des espaces alvéolaires par les cellules inflammatoires, soit par les cellules cancéreuses. Les nodules de tumeur pulmonaire comprenaient des zones bien circonscrites de prolifération des cellules polygonales aux cellules cuboïdale. Les cellules proliférantes alignés et remplis les alvéoles, de temps en temps présentant une vacuolisation cytoplasmique et la production de mucus. Aussi la présence des infiltrats inflammatoires lymphocytaires très denses entourant des bronchioles a été observée. L'architecture pulmonaire normale a été détruite, et le parenchyme adjacent était comprimé par les nodules de tumeur pulmonaire. Les coupes histologiques des rats ayant reçu le B[a]P et traités par le férulénol à 50 mg/kg/IP montrent un rétrécissement de l'inflammation en comparaison avec les coupes histologiques des rats traités par le B[a]P. Aussi, on remarque l'apparition des foyers nécrosés du parenchyme, ceci peut être associé aux dommages potentiels membranaires induit par les métabolites du férulénol. Ces changements de l'architecture tissulaire est en corrélation avec l'altération des activités de système de défense antioxydants. Une organisation tissulaire proche à celle des témoins est observée après traitement des rats par le férulénol seul à 50 mg/kg/IP.

I.13. Détection immunohistochimique du facteur de croissance tumorale Ki-67

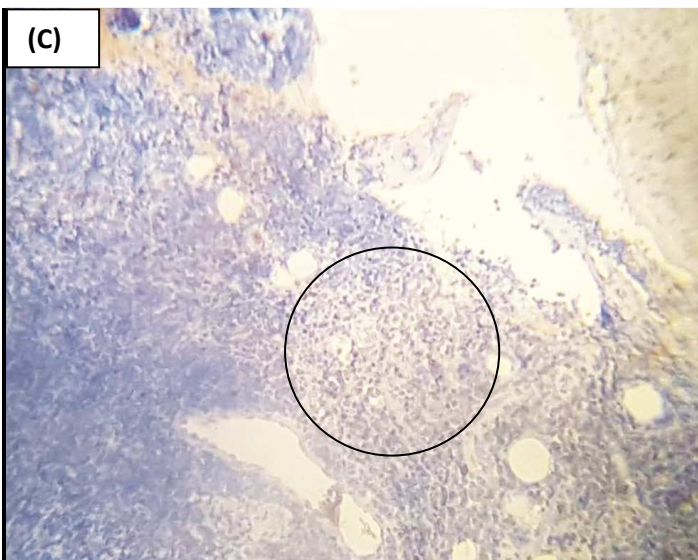
La figure 31 présente l'expression de l'antigène Ki-67 dans le tissu pulmonaire des rats cancéreux (par le B[a]P) et traité par le férulénol. Un marquage nucléaire important du Ki-67 a été obtenu dans le poumon des rats atteints le cancer pulmonaire par le B[a]P (résultat positif) dont on remarque une absence presque totale du marque de Ki-67 après traitement par le sesquiterpène coumarine « férulénol » ce qui signifie une diminution de la prolifération de cellules pulmonaires. Dans le tissu pulmonaire des rats témoins et ceux qui reçoivent le férulénol seul, une absence totale du marquage de Ki-67 (résultat négatif).



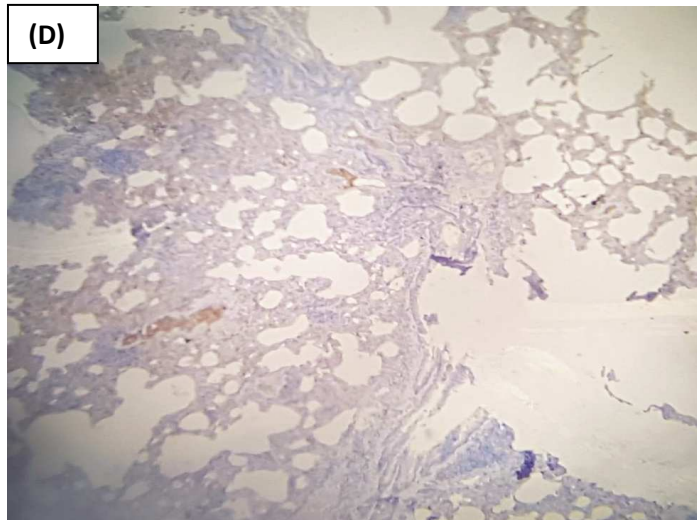
Absence de marquage du Ki-67 dans le tissu pulmonaire des rats témoins (X100).



Un très faible marquage du Ki-67 dans le tissu pulmonaire des rats malades traités par le féruléol (X100).



Un marquage important du Ki-67 dans le tissu pulmonaire des rats traités par le B[a]P (X100).



Absence de marquage du Ki-67 dans le tissu pulmonaire des rats traités par le féruléolé seul (X100).

Figure 31 : Détection immunohistochimique du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67 dans le tissu pulmonaire de rats atteints le cancer pulmonaire par le B[a]P et traités par le féruléolé (X100). (A) rats contrôles : Absence de marquage, (B) rats recevant B[a]P+ féruléolé : marquage faible pour le Ki-67 (cercles), (C) rats recevant le B[a]P : Très fort marquage nucléaire du Ki-67 (cercle) et (D) rats recevant le féruléolé seul : Absence de marquage.

L'évaluation de la prolifération cellulaire par l'immunohistochimie permet d'évaluer de façon fiable le pronostic du cancer pulmonaire induit par le B[a]P et traitement par le féruléolé. En particulier, en raison de son haut niveau d'expression (groupe 2) et d'une nette différence de marquage entre les sections pulmonaires de différents groupes d'animaux (groupe 1, 3 et 4), le Ki-67 apparait comme le marqueur le plus efficace pour identifier la prolifération cellulaire.

Le marqueur de prolifération Ki-67 est l'un des paramètres les plus controversés pour les décisions de traitement dans le cadre du Cancer. Le Ki-67 est une protéine nucléaire associée à une prolifération cellulaire et a été initialement identifiée par Gerdes et al., 1983 au début des années 1980, en utilisant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre un antigène nucléaire issu d'une lignée cellulaire descendante de lymphome de Hodgkin. La méthode d'analyse la plus répandue de l'antigène Ki-67 est l'évaluation immunohistochimique. Il a été démontré que l'antigène nucléaire Ki-67 est exprimé dans certaines phases du cycle cellulaire à savoir les phases S, G1, G2 et M, mais il n'existe pas dans G0 (Gerdes et al., 1984, Scholzen et Gerdes, 2000). Un index Ki-67 élevé, comme le montre l'image (C) de la figure 32, indique que les cellules cancéreuses pulmonaires se divisent rapidement et au moyen d'immunocoloration avec l'anticorps monoclonal MIB-1, chez les rats traité par le B[a]P, il est possible d'évaluer la fraction de la croissance néoplasique de la population cellulaire ce qui suggère une prolifération importante des cellules pulmonaires donnant naissance à une

tumeur. Bien que la fonction précise du Ki67 n'est pas connue mais sa participation au maintien du pouvoir prolifératif ou au contrôle du cycle cellulaire est suggérée. L'index de marquage du Ki-67 après traitement, par le féruléol, des rats atteints le cancer pulmonaire est presque absent représenté par un très faible pourcentage de noyaux colorés par l'anticorps MIB-1.

II. Effet du féruléol sur les cellules de l'adénocarcinome pulmonaire humain A549

Les études sont orientées vers la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives afin d'améliorer les traitements conventionnels et à développer de nouveaux traitements anticancéreux.

II.1. Effet du féruléol sur la viabilité des cellules A549

L'évaluation de la cytotoxicité du féruléol vis-à-vis des cellules tumorales A549 est estimée par le test au MTT. La viabilité des cellules est mesurée après 24h en présence ou non du féruléol. Les résultats montrent que, après 24h d'incubation des cellules A549 avec les différentes concentrations du féruléol (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 80 μ M et 100 μ M), ce sesquiterpène coumarine cause une cytotoxicité dose-dépendante. L'inhibition de la croissance des cellules A549 est limitée à une dose létale 50 de l'ordre de 40 μ M, après cette concentration (les concentrations 20 μ M, 10 μ M et 5 μ M) il n'y avait pas beaucoup d'inhibition de la croissance cellulaire (Figure 32).

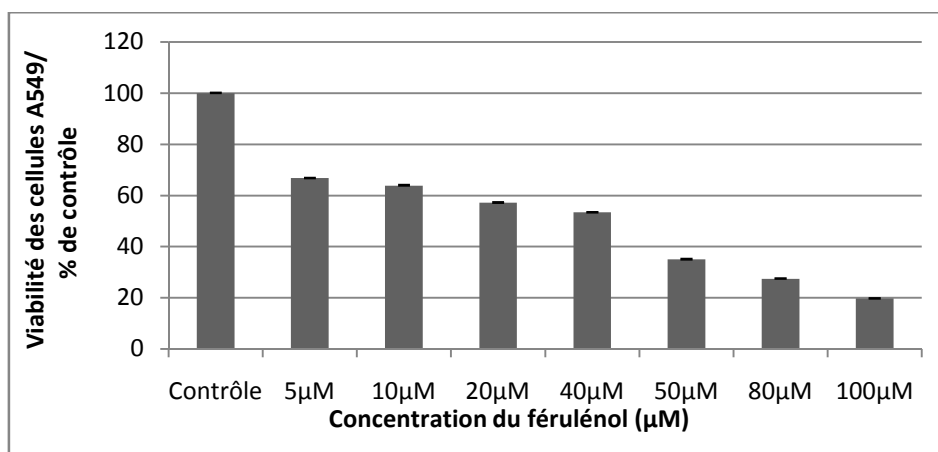
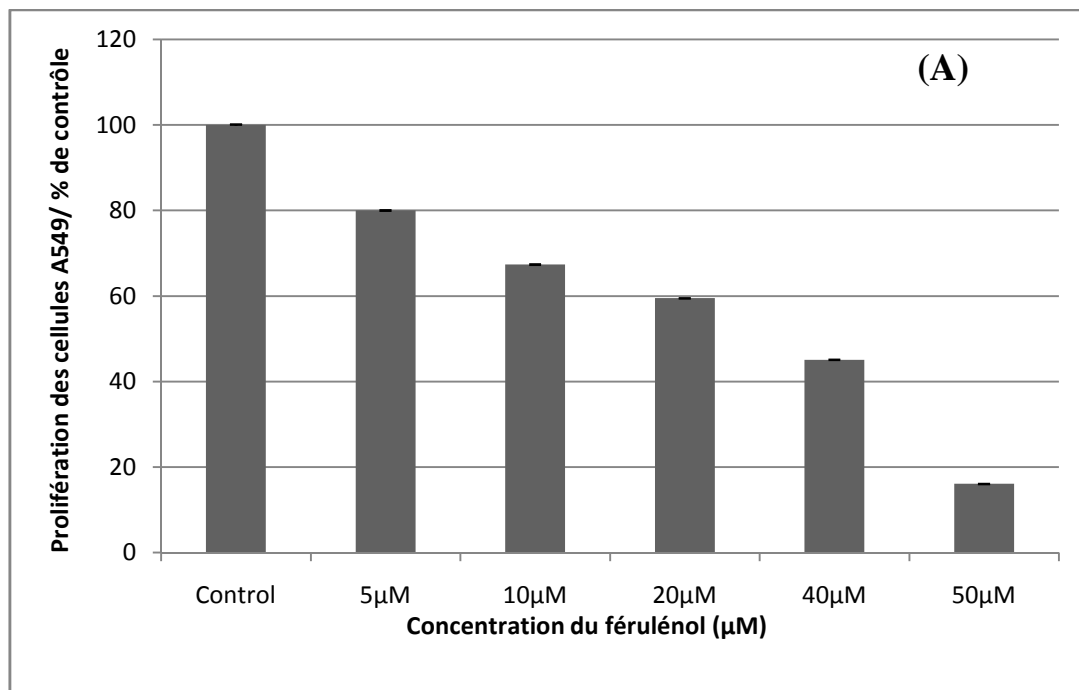


Figure 32 : Effet du féruléol sur la viabilité cellulaire (n=3). Les cellules A549 ont été traitées pendant 24h. La solution de MTT a été ensuite ajoutée pendant 4 h et la réaction a été stoppée par l'addition de 100 μ l de DMSO. L'absorbance a été mesurée à 560 nm.

Le traitement des cellules A549 par le féruléol à des concentrations non toxiques et efficaces permet d'étudier l'effet du féruléol sur la prolifération des cellules A549, le même protocole du test MTT est réalisé mais les cellules sont incubées pendant 72h. Les résultats, comme sont motionnés dans la figure 33, montrent une diminution de la prolifération des cellules A549 après incubation avec les concentrations 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM et 50 μM et avec une même dose létale 50 (40 μM).

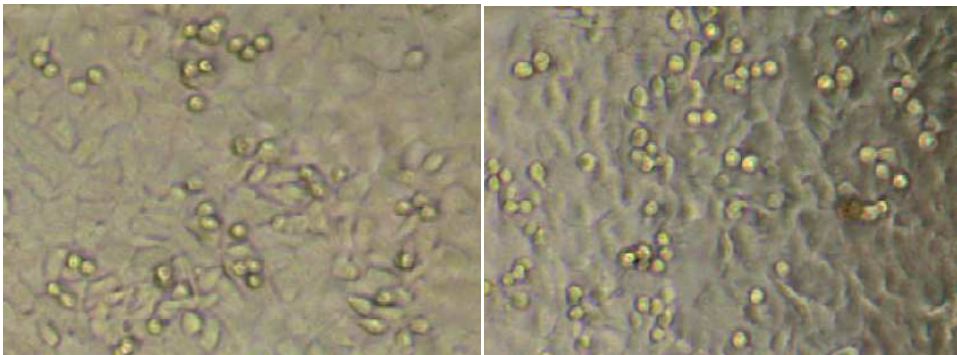


(B)



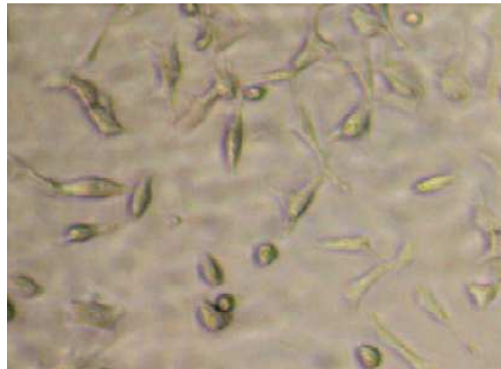
5 μ M

10 μ M



20 μ M

40 μ M



50 μ M

Figure 33 : Effet du féruléol sur la prolifération cellulaire (n=3). (A) Les cellules A549 ont été traitées pendant 72h. La solution de MTT a été ensuite ajoutée pendant 4 h et la réaction a été stoppée par l'addition de 100 μ l de DMSO. L'absorbance a été mesurée à 560 nm. (B) Photomicrographie des cellules A549 après incubation pendant 72h avec le féruléol à différentes concentrations.

Une grande attention a été consacrée aux propriétés cytotoxiques des hydroxycoumarines, y compris les sesquiterpènes coumarines sur diverses cellules tumorales (Egan et al., 1997). Dans deux études distinctes : en 1997, Miglietta et ces collaborateurs ont démontré que certains composés coumarinés tels que la géipraverine interagissent avec des systèmes microtubulaires dans diverses lignées de cellules tumorales, inhibant ainsi la croissance et la prolifération des cellules (Miglietta et al., 1997). Par la suite, Saleem et ces collaborateurs ont indiqué que le féruléol exerce des effets anticancéreux et fournit une protection contre les pathologies médiés par les radicaux libres (Saleem et al., 2001).

Dans la recherche de composés naturels cytotoxiques qui peuvent avoir une activité pharmacologique, Bocca et al., 2002 ont identifié le féruléol comme un agent cytotoxique et ont expliqué que le mécanisme sous-jacent à cet effet est l'interaction avec la tubuline à la fois *in vitro* et *in vivo*, ils ont prouvé que le féruléol suit le même mécanisme que les composés coumarinés similaires testés précédemment; c-à-d qu'elle provoque une cytotoxicité en altérant le système microtubulaire des cellules tumorales (Schiff et al., 1979).

Deuxièmement, ils ont évalué les effets cytotoxiques du féruléol sur diverses lignées cellulaires, y compris les cellules du sein humain (MCF-7), du colon (Caco-2), de l'ovaire (SKOV-3) et de la leucémie (HL-60) ce qui a entraîné un effet cytotoxique dose-dépendante. À des concentrations de 10 nm, 100 nm et 1 µM, les effets cytotoxiques étaient significatifs pour toutes les lignées cellulaires testées.

Enfin, en termes de morphologie, ils ont démontré que le féruléol modifiait la morphologie normale des cellules MCF-7, des noyaux réguliers aux noyaux gonflés contenant des zones semblables à des vésicules. En outre, ils ont constaté que le féruléol réorganise le réseau des microtubules en réarrangeant les microtubules en minces et courtes fibres (Schiff et Horwitz, 1980).

II.2. Effet du féruléol sur la viabilité des cellules A549 pré-incubées avec le B[a]P

Les résultats de la cytotoxicité du féruléol sur les cellules A549 pré-traitées par le B[a]P (20 µM) sont présentés dans la figure 34. La cytotoxicité du féruléol après incubation des cellules A549 avec le B[a]P pendant 48h et le traitement de ces cellules avec les différentes concentrations du féruléol pendant 24h indique que l'effet est dose-dépendant. Ce qui suggère que l'inhibition de la croissance cellulaire à partir de la dose 10 µM jusqu'à la dose 100 µM par rapport au contrôle est limitée à une DL50 de l'ordre de 40 µM.

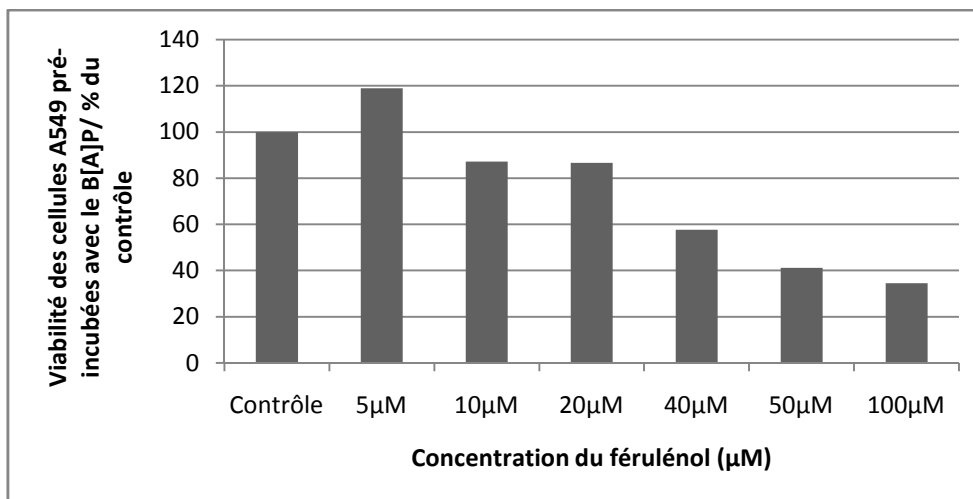


Figure 34 : Effet du féruléol sur la viabilité de cellules A549 pré-traitées par le B[a]P (n=3). Les cellules A549 ont été incubées pendant 48h avec le B[a]P puis traitées avec le féruléol pendant 24h. La solution de MTT a été ensuite ajoutée pendant 4 h et la réaction a été stoppée par l'addition de 100 μl de DMSO. L'absorbance a été mesurée à 560 nm.

L'activation du B[a]P dans la lignée cellulaire de l'adénocarcinome humain pulmonaire A549 a été provoquée par une augmentation de l'expression de la protéine p53 indiquant que ce dernier fait parti de la réponse aux lésions de l'ADN induites par le B[a]P. Les lésions de l'ADN des cellules A549 ont d'abord été étudiées par Rämetsch et ses collaborateurs (Rämetsch et al., 1995) où ils ont prouvé que ces lésions qui sont provoquées par le B[a]P sont en relation directe avec l'expression de la protéine p53.

En 2008, Tampio et ses collaborateurs ont testé le B[a]P sur deux lignées cancéreuses : MCF-7 et A549. Ils ont trouvé que le B[a]P induit la mort des cellules de sein humain (MCF-7) mais n'ont pas la mort des cellules de l'adénocarcinome humain pulmonaire A549. La croissance de cellules A549 après une pré-incubation avec le B[a]P (20 μM), nous a permis de tester l'effet du féruléol sur ce type de cellules. Le mécanisme, comme décrit précédemment, de cette cytotoxicité du féruléol sur les lignées cancéreuses est une altération du système microtubulaire des cellules tumorales. De même, une étude élaborée par Ulasli et ses collaborateurs (Ulasli et al., 2013) indique l'effet anticancéreux de trois substances naturelles : Thymoquinone, CAPE et resveratrol sur les cellules A549 exposées au B[a]P et ils ont trouvé que l'effet anti-tumoral est caractérisé principalement par une augmentation des niveaux de p53, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire G2/M et l'apoptose.

II.3. Effet du féruléol sur l'adhésion des cellules de l'adénocarcinome pulmonaire humain A549

Durant le processus cancéreux, les cellules cancéreuses fuient d'une tumeur principale et circulent dans le système sanguin pour aller envahir d'autres tissus. Cette étape exige que la cellule tumorale adhère et migre au travers de l'endothélium vasculaire du tissu cible. Bien que l'adhésion de la cellule tumorale à la monocouche de cellules endothéliales soit cruciale dans le processus d'extravasation, nous avons évalué l'effet du féruléol sur l'adhésion cellulaire.

Ainsi, les cellules A549 ont été traitées ou non avec 10 μM , 20 μM et 40 μM du féruléol avant d'être rajoutées dans les puits préalablement recouverts avec différentes matrices extracellulaires à savoir : le fibrinogène (Fg), le collagène (Cg) et la poly-L-Lysine (PL).

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 35. Ces résultats montrent que le féruléol n'affecte pas l'adhésion de ces cellules sur le fibrinogène et le collagène. Par ailleurs, aucune inhibition n'a pu être observée sur la poly-L-Lysine qui est un substrat d'adhésion indépendant des intégrines. Ce qui suggère que l'effet du féruléol sur l'adhésion des cellules A549 pourrait impliquer des récepteurs membranaires de type intégrines.

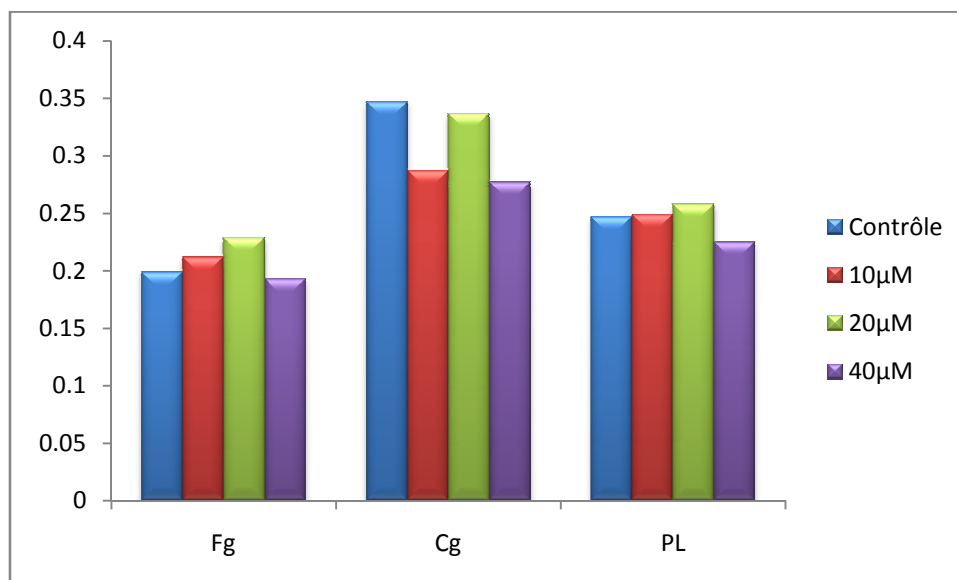


Figure 35 : Effet du féruléol sur l'adhésion des cellules A549.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Etant donné la gravité du cancer pulmonaire et surtout de ses complications, l'investigation dans ce domaine devient l'approche la plus importante. Ainsi, dans le laboratoire de toxicologie moléculaire, plusieurs molécules pharmacologiquement actives ont été caractérisées et testées sur les différents types de cancers. Parmi lesquelles, on peut distinguer les polyphénols de la propolis, les coumarines,...etc. Ces molécules se sont avérées des puissants inhibiteurs de la tumorigénèse.

Dans ce cadre, notre travail a visé sur l'évaluation de l'activité anticancéreuse du féruléol isolé à partir des racines de la plante *Ferula vesceritensis*. Ainsi, nous avons commencé par une extraction de ce sesquiterpène coumarine suivie par un préfractionnement sur une colonne de gel de silice et enfin une purification par une chromatographie sur couche mince.

L'évaluation de l'activité anti-tumorale du féruléol a été menée d'une part sur des cellules cancéreuses pulmonaires humaines A549 et d'autre part sur un cancer pulmonaire expérimental induit par l'un des polluants environnementaux « B[a]P ». Cette activité du féruléol a été focalisée sur le ciblage de certaines protéines apoptotiques (Bcl-2, Bax et Hsp90) et la glycoprotéine membranaire (P-gp).

En effet, notre travail de thèse *in vivo* chez le rat Wistar nous a permis de définir qu'une injection unique intrapéritonéale de B[a]P à 100 mg/kg pendant une période de 24 semaines provoque une altération du statut pro-oxydant/antioxydant des cellules pulmonaires ce qui suggère que le B[a]P engendre un stress oxydant par une synthèse importante de ROS *in vivo* conduisant à une transformation tumorale de cellules pulmonaires du rat et *in vitro* ce qui provoque une altération de mitochondries pulmonaires.

Les premiers résultats obtenus dans notre thèse établie *in vivo* chez le rat et *in vitro* sur les cellules A549 en culture présentent nettement un effet anticancéreux, pro-oxydant, pro-apoptotique et une altération mitochondriale du féruléol sur les cellules pulmonaires. Aucune mortalité de rats n'a été enregistrée durant la période de traitement mais plusieurs paramètres biochimiques en particulier les marqueurs du stress oxydant et d'apoptose étaient affectés. Les effets du féruléol sont à travers :

- ❖ Une inhibition de la survie et de la prolifération de cellules A549 à une DL50 de l'ordre de 40 µM. Le féruléol n'affecte pas l'adhésion de ces cellules sur le fibrinogène, le collagène et la poly-L-lysine.
- ❖ Une augmentation de la peroxydation de lipides membranaires de cellules pulmonaires cancéreuses, une diminution du taux tissulaire de la GSH et une diminution de l'activité enzymatique de la SOD, CAT, GPx et GST.

- ❖ Une inhibition de la phosphorylation oxydative par une interaction avec l'ANT et le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale donnant naissance à une production massive de ROS principalement l' $O_2^{\circ-}$ *in vivo* et *in vitro* sur les mitochondries pulmonaires.
- ❖ Une production dose-dépendante du radical hydroxyle a été observé *in vitro* par l'induction de la réaction de Fenton.
- ❖ Une diminution de l'expression de Bcl-2 dans les cellules pulmonaires entraîne des effets toxiques à travers l'accumulation de peroxydes et de ROS et une inhibition de l'apoptose, tandis qu'une surexpression de Bax a été observé se qui suggère l'activation de la voie apoptotique dans les cellules tumorales.
- ❖ Une inhibition de l'Hsp90 permet de bloquer en cascade plusieurs autres protéines nécessaires à la dissémination du cancer pulmonaire induit par le B[a]P soit par l'interaction avec le récepteur AhR soit par l'inhibition du gène qui code pour l'Hsp90.
- ❖ Une inhibition de la P-gp surexprimé dans le cancer pulmonaire ce qui permet l'accumulation intracellulaire et la distribution tissulaire du féruléol.
- ❖ Une diminution de l'expression de l'antigène de prolifération cellulaire Ki-67.

Les résultats de l'étude *in vivo* ont été renforcés par l'examen microscopique des sections pulmonaires qui ont montré une restitution et une régénération de la structure tissulaire, une protection des alvéoles des infiltrations par les cellules immunitaires et le parenchyme pulmonaire contre l'agression connu du B[a]P.

D'après ces résultats, le féruléol semble présenter un intérêt réel et potentiel par son effet pro-oxydant et anticancéreux au cours du cancer pulmonaire induit par l'un des HAPs le plus redoutable et le plus cancérigène qui est le B[a]P. Plusieurs études se sont intéressé à son effet cytotoxique, mettant en évidence la présence dans sa structure d'une moitié coumariné et d'autres sesquiterpénique ce qui lui confère son action bénéfique en produisant les radicaux libres, mais aussi sa richesse en propriétés indispensables pour son effet sur les cellules cancéreuses.

Pour conclure, les plantes médicinales du genre *Ferula* contient des principes actifs principalement le féruléol qui est apparait bénéfique pour lutter contre la dissémination de cellules cancéreuses ce qui donne l'avantage de le préconisé en chimiothérapie.

Afin d'approfondir l'étude sur les sesquiterpènes coumarines, nous envisageant d'essayer la détermination de l'implication du féruléol dans la cascade des transductions des signaux afin d'identifier son mécanisme d'action exacte sur les cellules cancéreuses pulmonaires. Egalement, nous pourrions pour compléter nos résultats d'évaluer son effet pro-apoptotique en mesurant d'autres paramètres biochimiques comme : les caspases 3, 9...etc., d'identifier les gènes qui codent pour certaines protéines impliquées dans le processus apoptotique par la mise en évidence de certaines mutations génétiques. Notre étude à été consacré sur l'effet du féruléol extrait de la racine du *Ferula vesceritensis*, donc l'extraction d'autres principes actifs de différentes régions de la plante permet d'affirmer les effets bénéfiques de cette plante indigène du Sahara Algérienne. Aussi faire tester le féruléol sur d'autres types de tumeurs pour individualiser le traitement anticancéreux et accélérer la recherche de nouveaux médicaments en oncologie. Et enfin, faire d'autres études approfondies pharmacocinétique et pharmacodynamique du féruléol qui seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, Y., Nakamura, M., Ota, E., Ozeki, Y., Tamai, S., Inoue, H., Ueyema, Y., Ogata, T. & Tamaoki, N. 1994. Expression of the Multidrug Resistance Gene (MDR1) in Non-small Cell Lung Cancer. *Japanese journal of cancer research*, 85, 536-541.
- Abolhoda, A., Wilson, A. E., Ross, H., Danenberg, P. V., Burt, M. & Scotto, K. W. 1999. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clinical Cancer Research*, 5, 3352-3356.
- Adams, J. M. & Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326.
- Ahmed, A. A., Bishr, M. M., EL-Shanawany, M. A., Attia, E. Z., Ross, S. A. & Paré, P. W. 2005. Rare trisubstituted sesquiterpenes daucanes from the wild *Daucus carota*. *Phytochemistry*, 66, 1680-1684.
- Ahmed, A. A., Hegazy, M.-E. F., Zellagui, A., Rhouati, S., Mohamed, T. A., Sayed, A. A., Abdella, M. A., Ohta, S. & Hirata, T. 2007. Ferulsinaic acid, a sesquiterpene coumarin with a rare carbon skeleton from *Ferula* species. *Phytochemistry*, 68, 680-686.
- AL-Yahya, M. A., Muhammad, I., Mirza, H. H. & EL-Feraly, F. S. 1998. Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phytotherapy Research*, 12, 335-339.
- Alexandre, J., Batteux, F., Nicco, C., Chéreau, C., Laurent, A., Guillevin, L., Weill, B. & Goldwasser, F. 2006. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *International journal of cancer*, 119, 41-48.
- Allan, R. K., Mok, D., Ward, B. K. & Ratajczak, T. 2006. Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90 evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 7161-7171.
- Anadakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Vinodhkumar, R. & Devaki, T. 2008. Stabilization of pulmonary mitochondrial enzyme system by capsaicin during benzo (a) pyrene induced experimental lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62, 390-394.
- Anfinsen, C. B. 1972. Studies on the principles that govern the folding of protein chains.
- Appendino, G., Mercalli, E., Fuzzati, N., Arnoldi, L., Stavri, M., Gibbons, S., Ballero, M. & Maxia, A. 2004. Antimycobacterial Coumarins from the Sardinian Giant Fennel (*Ferula communis*). *Journal of natural products*, 67, 2108-2110.
- Argon, Y. & Simen, B. B. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Seminars in cell & developmental biology*, 1999. Elsevier, 495-505.
- Arora, A., Seth, K., Kalra, N. & Shukla, Y. 2005. Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in K562 leukemic cells by indole-3-carbinol. *Toxicology and applied pharmacology*, 202, 237-243.
- Backer, J. M. & Weinstein, I. B. 1982. Interaction of benzo (a) pyrene and its dihydrodiol-epoxide derivative with nuclear and mitochondrial DNA in C3H10T½ cell cultures. *Cancer research*, 42, 2764-2769.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 483-495.
- Baysal, B. E., Rubinstein, W. S. & Taschner, P. E. 2001. Phenotypic dichotomy in mitochondrial complex II genetic disorders. *Journal of molecular medicine*, 79, 495-503.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44, 276-287.

- Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J. & Urashima, M. 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463, 899-905.
- Besaratinia, A. & Pfeifer, G. P. 2003. Enhancement of the mutagenicity of benzo (a) pyrene diol epoxide by a nonmutagenic dose of ultraviolet A radiation. *Cancer research*, 63, 8708-8716.
- Bocca, C., Gabriel, L., Bozzo, F. & Miglietta, A. 2002. Microtubule-interacting activity and cytotoxicity of the prenylated coumarin ferulenol. *Planta medica*, 68, 1135-1137.
- Borst, P. & Schinkel, A. H. 1997. Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends in Genetics*, 13, 217-222.
- Bonnard, M., Brondeau, M. T., Clavel, T., Falcy, M., Jargot, D., Lafontaine, M., Reynier, M., & Schneider, O. 2007. Benzo(a)pyrène. INRS fiche toxicologique FT 144.
- Borkovich, K., Farrelly, F., Finkelstein, D., Taulien, J. & Linsquist, S. 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and cellular biology*, 9, 3919-3930.
- Boveris, A. & Chance, B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134, 707-716.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Brand, M. D. 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology*, 45, 466-472.
- Bravard, A., Cherbonnel-Lasserre, C., Reillaudou, M., Beaumatin, J., Dutrillaux, B. & Luccioni, C. 1998. Modifications of the antioxidant enzymes in relation to chromosome imbalances in human melanoma cell lines. *Melanoma research*, 8, 329-335.
- Caputi, M., Groeger, A., Esposito, V., De Luca, A., Murabito, M., Tahir, T., Giordano, G., Baldi, F., Giordano, A. & Wolner, E. 1998. Frequent high expression of bax pro-apoptotic protein in non-small cell lung cancer. *Anticancer research*, 19, 825-827.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J. C. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282, 1318-1321.
- Cecchini, G. 2003. Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain*. *Annual review of biochemistry*, 72, 77-109.
- Chanvorachote, P., Nimmannit, U., Stehlik, C., Wang, L., Jiang, B.-H., Ongpipatanakul, B. & Rojanasakul, Y. 2006. Nitric oxide regulates cell sensitivity to cisplatin-induced apoptosis through S-nitrosylation and inhibition of Bcl-2 ubiquitination. *Cancer research*, 66, 6353-6360.
- Chatterjee, A., Dasgupta, S. & Sidransky, D. 2011. Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer prevention research*, 4, 638-654.
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Maghaddas, S., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 36027-36031.
- Chen, Z. & Pervaiz, S. 2010. Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death & Differentiation*, 17, 408-420.
- Chen, Z., Zhang, Y., Yang, J., Jin, M., Wang, X.-W., Shen, Z.-Q., Qiu, Z., Zhao, G., Wang, J. & Li, J.-W. 2011. Estrogen promotes benzo [a] pyrene-induced lung carcinogenesis through oxidative stress damage and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathways in female mice. *Cancer letters*, 308, 14-22.

- Cheung, K.-M. J., Matthews, T. P., James, K., Rowlands, M. G., Boxall, K. J., Sharp, S. Y., Maloney, A., Roe, S. M., Prodromou, C. & Pearl, L. H. 2005. The identification, synthesis, protein crystal structure and in vitro biochemical evaluation of a new 3, 4-diarylpyrazole class of Hsp90 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15, 3338-3343.
- Chiosis, G., Neckers, L. 2006. Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive. *ACS Chemical Biology*, 1, 279–284.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. & Green, D. R. 2010. The BCL-2 family reunion. *Molecular cell*, 37, 299-310.
- Choi, C.-H. 2005. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer cell international*, 5, 1.
- Chong, S. J. F., Low, I. C. C. & Pervaiz, S. 2014. Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. *Mitochondrion*, 19, 39-48.
- Ciocca, D. R. & Calderwood, S. K. 2005. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress & chaperones*, 10, 86-103.
- Claiborne, A. Catalase activity. 1985. In: CRC handbook of methods for oxygen radical research; Greenwald RA, Ed.; CRC Press: Boca Raton. 283-284pp.
- Cohen, G. M. 1990. Pulmonary metabolism of foreign compounds: its role in metabolic activation. *Environmental health perspectives*, 85, 31.
- Cory, S. & Adams, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2, 647-656.
- Cory, S., Hhuang, D. C. & Adams, J. M. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22, 8590-8607.
- Das, R. K., Banerjee, S. & Bhattacharya, S. 2007. Amelioration of benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in strain A mice by diphenylmethyl selenocyanate. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 58, 351-360.
- Dasgupta, S., Soudry, E., Mukhopadhyay, N., Shao, C., Yee, J., Lam, S., Lam, W., Zhang, W., Gazdar, A. F. & Fisher, P. B. 2012. Mitochondrial DNA mutations in respiratory complex-I in never-smoker lung cancer patients contribute to lung cancer progression and associated with EGFR gene mutation. *Journal of cellular physiology*, 227, 2451-2460.
- Delaunoy, L. M. 2004. Mechanisms in pulmonary toxicology. *Clinics in chest medicine*, 25, 1-14.
- Denis, M., Cuthill, S., Wikstrom, A.-C., Poellinger, L. & Gustafsson, J.-Å. 1988. Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 155, 801-807.
- Desmots, F. 2000. Caractérisation d'un nouveau gène codant une glutathion transférase de la classe Alpha, la GSTA 4, étude de sa régulation au cours de la régénération hépatique et de la surcharge en fer. Thèse. Université de Rennes, France.
- Dix, T. A. & Marnett, L. J. 1983. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives to ultimate carcinogens during lipid peroxidation. *Science*, 221, 77-79.
- Dobson, C. M. 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in biochemical sciences*, 24, 329-332.
- Dupic, L., Huet, O., Harrois, A. & Duranteau, J. 2010. Hypoxie et fonction mitochondriale. *Réanimation*, 19, 399-405.
- Egan, D., James, P., Cooke, D. & O'kenedy, R. 1997. Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin. *Cancer letters*, 118, 201-211.

- Elimadi, A., Morin, D., Sapena, R., Chauvet-Monges, A., Crevat, A. & Tillement, J. 1997. Comparison of the effects of cyclosporine A and trimetazidine on Ca²⁺-dependent mitochondrial swelling. *Fundamental & clinical pharmacology*, 11, 440-447.
- Ellard, S., Mohammed, Y., Dogra, S., Wolfel, C., Doehemer, J. & Parry, J. M. 1991. The use of genetically engineered V79 Chinese hamster cultures expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. *Mutagenesis*, 6, 461-470.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82, 70-77.
- Fardel, O., Lecureur, V., Corlu, A. & Guillouzo, A. 1996. P-glycoprotein induction in rat liver epithelial cells in response to acute 3-methylcholanthrene treatment. *Biochemical pharmacology*, 51, 1427-1436.
- Felix, R. A. & Barrand, M. A. 2002. P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: Evidence for regulation by transient oxidative stress. *Journal of neurochemistry*, 80, 64-72.
- Felts, S. J., Owen, B. A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D. B. & Toft, D. O. 2000. The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 3305-3312.
- Flohe, L. & Gunzler, W. A. 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 115-121.
- Forbes-Hernandez, T. Y., Giampieri, F., Gasparini, M., Mazzoni, L., Quiles, J. L., Alvarez-Suarez, J. M. & Battino, M. 2014. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 154-182.
- Fromm, M. 2003. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *European journal of clinical investigation*, 33, 6-9.
- Fromm, M. F. 2002. Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk. *Toxicology*, 181, 299-303.
- Galea-Lauri, J., Richardson, A. J., Latchman, D. S. & Katz, D. R. 1996. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *The Journal of Immunology*, 157, 4109-4118.
- Gelboin, H. V. 1980. Benzo [alpha] pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiological reviews*, 60, 1107-1166.
- Genova, M. L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G. & Lenaz, G. 2001. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS letters*, 505, 364-368.
- Gerdes, J., Schwab, V., Lemke, H. & Stein, H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*, 31, 13-20.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. & Stein, H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology*, 133, 1710-1715.
- Gill, S. S. & Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48, 909-930.
- Gliszczynska, A. & Brodelius, P. E. 2012. Sesquiterpene coumarins. *Phytochemistry Reviews*, 11, 77-96.

- Gomez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I. & Cajaraville, M. P. 2002. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo (a) pyrene. *Marine environmental research*, 54, 431-436.
- Greene, J. G., Porter, R. H., Eller, R. V. & Greenamyre, J. 1993. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *Journal of neurochemistry*, 61, 1151-1154.
- Groeger, A. M., Caputi, M., Esposito, V., Baldi, A., Rossiello, R., Santini, D., Mancini, A., Kaiser, H. E. & Baldi, F. 1999. Expression of p21 in non small cell lung cancer relationship with PCNA. *Anticancer research*, 20, 3301-3305.
- Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13, 1899-1911.
- Gu, Q., Hu, C., Chen, Q., Xia, Y., Feng, J. & Yang, H. 2009. Development of a rat model by 3, 4-benzopyrene intra-pulmonary injection and evaluation of the effect of green tea drinking on p53 and bcl-2 expression in lung carcinoma. *Cancer detection and prevention*, 32, 444-451.
- Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J., Batt, A., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J. & Gourmelon, P. 2006. Les cytochromes P450: métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Annales de biologie clinique*, 535-548.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Hadden, M. K., Galam, L., Gestwicki, J. E., Matts, R. L. & Blagg, B. S. 2007. Derrubone, an inhibitor of the Hsp90 protein folding machinery. *Journal of natural products*, 70, 2014-2018.
- Halliwell, B. & Cross, C. E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, 102, 5.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D. & Cadenas, E. 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 5557-5563.
- Harrigan, J. A., McGarrigle, B. P., Sutter, T. R. & Olson, J. R. 2006. Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo (a) pyrene. *Toxicology in vitro*, 20, 426-438.
- Hartson, S. D. & Matts, R. L. 1994. Association of Hsp90 with cellular Src-family kinases in a cell-free system correlates with altered kinase structure and function. *Biochemistry*, 33, 8912-8920.
- Hecht, S. S. 1998. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chemical research in toxicology*, 11, 559-603.
- Hecht, S. S., Kenney, P. M., Wang, M., Trushin, N., Agarwal, S., Rao, A. V. & Upadhyaya, P. 1999. Evaluation of butylated hydroxyanisole, myo-inositol, curcumin, esculetin, resveratrol and lycopene as inhibitors of benzo [a] pyrene plus 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer letters*, 137, 123-130.
- Hernandez, J. M., Farma, J. M., Coppola, D., Hakam, A., Fulp, W. J., Chen, D.-T., Siegel, E. M., Yeatman, T. J. & Shibata, D. 2011. Expression of the antiapoptotic protein survivin in colon cancer. *Clinical colorectal cancer*, 10, 188-193.
- Hinault, M.-P. & Goloubinoff, P. 2006. L'agrégation toxique des protéines: une forme de «délinquance moléculaire» activement combattue dans la cellule par les chaperones moléculaires et les protéases. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 55, 74-78.

- Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J. & Walker, J. E. 2003. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1604, 135-150.
- Hirst, J., King, M. S. & Pryde, K. R. 2008. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society Transactions*, 36, 976-980.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348, 334-336.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I. & EL-Bayoumi, K. 2001. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical research in toxicology*, 14, 767-790.
- Huang, D. C., Cory, S. & Strasser, A. 1997. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene*, 14, 405-414.
- Hussain, S. P., Amstad, P., Raja, K., Sawyer, M., Hofseth, L., Shields, P. G., Hewer, A., Phillips, D. H., Ryberg, D. & Haugen, A. 2001. Mutability of p53 hotspot codons to benzo (a) pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer research*, 61, 6350-6355.
- Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y. & Hayashi, J.-I. 2008. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*, 320, 661-664.
- Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. 2013. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters*, 332, 275-285.
- Ji, L., Wu, E. & Thomas, D. 1991. Effect of exercise training on antioxidant and metabolic functions in senescent rat skeletal muscle. *Gerontology*, 37, 317-325.
- Jiang, H., Gelhaus, S. L., Mangal, D., Haevey, R. G., Blair, I. A. & Penning, T. M. 2007. Metabolism of benzo [a] pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography–mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*, 20, 1331-1341.
- Joseph, B., Ekedahl, J., Lewensohn, R., Marchetti, P., Formstecher, P. & Zhivotovsky, B. 2001. Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 20, 2877-2888.
- Joseph, B., Ekedahl, J., Sirzen, F., Lewensohn, R. & Zhivotovsky, B. 1999. Differences in expression of pro-caspases in small cell and non-small cell lung carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 262, 381-387.
- Joseph, B., Lewensohn, R. & Zhivotovsky, B. 2000. Role of Apoptosis in the Response of Lung Carcinomas to Anti-Cancer Treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926, 204-216.
- Jung, D., Cho, Y., Collins, L. B., Swenberg, J. A. & Di Giulio, R. T. 2009. Effects of benzo [a] pyrene on mitochondrial and nuclear DNA damage in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated and reference site. *Aquatic toxicology*, 95, 44-51.
- Kamal, A., Boehm, M. F. & Burrows, F. J. 2004. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends in molecular medicine*, 10, 283-290.
- Karpinich, N. O., Tafani, M., Rothman, R. J., Russo, M. A. & Farber, J. L. 2002. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 16547-16552.
- Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Sriram, C. S. & Gogoi, R. 2015. Benzo (a) pyrene induced lung cancer: role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports*, 67, 996-1009.

- Khan, S., Parvez, S., Chaudhari, B., Ahmad, F., Anjum, S. & Raisuddin, S. 2013. Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats. *Food and chemical toxicology*, 58, 210-219.
- Kim, K. B. & Lee, B. M. 1997. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo (a) pyrene. *Cancer letters*, 113, 205-212.
- Kiruthiga, P., Pandian, S. K. & Devi, K. P. 2010. Silymarin protects PBMC against B (a) P induced toxicity by replenishing redox status and modulating glutathione metabolizing enzymes—an in vitro study. *Toxicology and applied pharmacology*, 247, 116-128.
- Korsmeyer, S. J. 1992. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 80, 879-886.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87, 99-163.
- Kroemer, G. & Reed, J. C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine*, 6, 513-519.
- Lahouel, M., Zini, R., Zellagui, A., Rhouati, S., Carrupt, P.-A. & Morin, D. 2007. Ferulic acid specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochemical and biophysical research communications*, 355, 252-257.
- Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., Robin, J. & Hoult, S. 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical pharmacology*, 38, 2859-2865.
- Lee, C.-L., Chiang, L.-C., Cheng, L.-H., Liaw, C.-C., Abd EL-Razek, M. H., Chang, F.-R. & Wu, Y.-C. 2009. Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assafoetida*. *Journal of natural products*, 72, 1568-1572.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S. & Korsmeyer, S. J. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell*, 2, 183-192.
- Levine, R. L. 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease 2, 3. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 790-796.
- Li, X., Li, J., Yuan, H., Gao, X., Qu, X., Xu, W. & Tang, W. 2007. Recent advances in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance reversal mechanisms. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 29, 607-618.
- Likhachev, A. J., Beniashvili, D. S., Bykov, V. J., Dikun, P. P., Tyndyk, M. L., Savochkina, I. V., Yermilov, V. B. & Zabezhinski, M. A. 1992. Biomarkers for individual susceptibility to carcinogenic agents: excretion and carcinogenic risk of benzo [a] pyrene metabolites. *Environmental health perspectives*, 98, 211.
- Lin, P., Chang, J. T., Ko, J.-L., Liao, S.-H. & Lo, W.-S. 2004. Reduction of androgen receptor expression by benzo [a] pyrene and 7, 8-dihydro-9, 10-epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo [a] pyrene in human lung cells. *Biochemical pharmacology*, 67, 1523-1530.
- Liu, T., Pan, L., Cai, Y. & Miao, J. 2015. Molecular cloning and sequence analysis of heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and their expression analysis when exposed to benzo (a) pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Gene*, 555, 108-118.
- Liu, Y., Fiskum, G. & Schubert, D. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 80, 780-787.
- Lopez-Lazaro, M. 2007. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer letters*, 252, 1-8.

- Lopez-Lazaro, M., Calderon-Montano, J. M., Burgos-Moron, E. & Austin, C. A. 2011. Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I-and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, ger006.
- Luanpitpong, S., Chanvorachoye, P., Stehlik, C., Tse, W., Callery, P. S., Wang, L. & Rojanasakul, Y. 2013. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 24, 858-869.
- Luanpitpong, S., Nimmannit, U., Chanvorachote, P., Leonard, S. S., Pongrakhananon, V., Wang, L. & Rojanasakul, Y. 2011. Hydroxyl radical mediates cisplatin-induced apoptosis in human hair follicle dermal papilla cells and keratinocytes through Bcl-2-dependent mechanism. *Apoptosis*, 16, 769-782.
- Luch, A. 2005. *The carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons*, World Scientific.p. 1-19.
- Madamanchi, N. R. & Runge, M. S. 2007. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation research*, 100, 460-473.
- Maitra, A., Amirkhan, R. H., Saboorian, M. H., Frawley, W. H. & Ashfaq, R. 1999. Survival in small cell lung carcinoma is independent of Bcl-2 expression. *Human Pathology*, 30, 712-717.
- Marcu, M. G., Chadli, A., Bouhouche, I., Catelli, M. & Neckers, L. M. 2000. The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 37181-37186.
- Marie, C. 2007. Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme.Thèse. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Martin-Cordero, C., Jose Leon-Gonzalez, A., Manuel Calderon-Montano, J., Burgos-Moron, E. & Lopez-Lazaro, M. 2012. Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Current drug targets*, 13, 1006-1028.
- Massotti, L., Casali, E. & Galeoti, T. 1988. Lipid peroxidation in tumour cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 4, 377-386.
- Mates, J. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83-104.
- Matés, J. M. 1999. Antioxidant Enzymes and their Implications in Pathophysiologic Processes. *Frontiers in Bioscience*, 4, d339-345.
- Matés, J. M., Pérez-Gomez, C. & DE Castro, I. N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32, 595-603.
- Mathieu, M.-C., Lapierre, I., Brault, K. & Raymond, M. 2001. Aromatic hydrocarbon receptor (AhR)- AhR nuclear translocator-and p53-mediated induction of the murine multidrug resistance mdr1 gene by 3-methylcholanthrene and benzo (a) pyrene in hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 4819-4827.
- Matolcsy, A., Casali, P., Warnke, R. A. & Knowles, D. M. 1996. Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood*, 88, 3937-3944.
- Maucher, A., Kager, M. & Von Angerer, E. 1993. Evaluation of the antitumour activity of coumarin in prostate cancer models. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 119, 150-154.
- Miglietta, A., Bocca, C., Rampa, A., Bisi, A. & Gabriel, L. 1997. Geiparvarin and derivatives in combination with taxol: effect on microtubular organization in 3T3 fibroblasts. *Anti-cancer drug design*, 12, 607-620.

- Mitchell, C. 1982. Distribution and retention of benzo (a) pyrene in rats after inhalation. *Toxicology letters*, 11, 35-42.
- Monti, M., Pinotti, M., Appendino, G., Dallochio, F., Bellini, T., Antognoni, F., Poli, F. & Bernardi, F. 2007. Characterization of anti-coagulant properties of prenylated coumarin ferulenol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770, 1437-1440.
- Montillet, J.-L., Chamngopol, S., Rustérucci, C., Dat, J., Van DE Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inzé, D., Van Breusegem, F. & Triantaphylidis, C. 2005. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 138, 1516-1526.
- Moreno-Sanchez, R., Hernandez-Esquivel, L., Rivero-Segura, N. A., Marin-Hernandez, A., Neuzil, J., Ralph, S. J. & Rodriguez-Enriguez, S. 2013. Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II—evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. *FEBS Journal*, 280, 927-938.
- Mossa, J. S., El-Feraly, F. S. & Muhammad, I. 2004. Antimycobacterial constituents from *Juniperus procera*, *Ferula communis* and *Plumbago zeylanica* and their in vitro synergistic activity with isonicotinic acid hydrazide. *Phytotherapy Research*, 18, 934-937.
- Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417, 1-13.
- Nathan, D. F. & Lindquist, S. 1995. Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 15, 3917-3925.
- Nazari, Z. E. & Iranshahi, M. 2011. Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phytotherapy Research*, 25, 315-323.
- Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y. & Dalton, T. P. 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochemical pharmacology*, 59, 65-85.
- Neckers, L. 2007. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *Heat Shock Proteins in Cancer*. Springer.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95, 351-358.
- Ozenda, P. 1983. Flore du Sahara, second ed, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Paris. 622pp.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. & Donner, D. B. 1999. NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401, 82-85.
- Packham, G. 1998. Mutation of BCL-2 family proteins in cancer. *Apoptosis*, 3, 75-82.
- Palermo, C. M., Westlake, C. A. & Gasiewicz, T. A. 2005. Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 kDa heat shock protein. *Biochemistry*, 44, 5041-5052.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S. & Kufe, D. 2000. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO journal*, 19, 4310-4322.
- Panwar, M., Samarth, R., Kumar, M., Yoon, W. J. & Kumar, A. 2005. Inhibition of benzo (a) pyrene induced lung adenoma by *Panax ginseng* extract, EFLA400, in Swiss albino mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 2063-2067.

- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E. & Garrido, C. 2003. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 304, 505-512.
- Pastorelli, R., Guanci, M., Cerri, A., Negri, E., La Vecchia, C., Fumagalli, F., Mezzetti, M., Cappelli, R., Panigalli, T. & Fanelli, R. 1998. Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA, and blood protein adducts of benzo (a) pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 7, 703-709.
- Peng, J., Jones, G. L. & Watson, K. 2000. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1598-1606.
- Penning, T. M. 2004. Aldo-keto reductases and formation of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones. *Methods in enzymology*, 378, 31-67.
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Hung, C.-F., Mccoull, K. D., Palackal, N. T. & Tsuruda, L. S. 1999. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chemical research in toxicology*, 12, 1-18.
- Petruelis, J. R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B. & Perdew, G. H. 2003. The hsp90 co-chaperone XAP2 alters importin β recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 2677-2685.
- Pezzella, F., Gatter, K., Mason, D., Bastard, C., Duval, C., Krajewski, A., Turner, G., Ross, F., Clark, H. & Jones, D. 1990. Bcl-2 protein expression in follicular lymphomas in absence of 14; 18 translocation. *The Lancet*, 336, 1510-1511.
- Phillips, D. H. 2002. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*, 23, 1979-2004.
- Pratt, W. B. 1997. The role of Thehsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via map kinase. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 37, 297-326.
- Rahman, I. & Macnee, W. 1999. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 277, L1067-L1088.
- Rajendran, P., Ekambaram, G. & sakthisekaran, D. 2008. Effect of mangiferin on benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in experimental Swiss albino mice. *Natural product research*, 22, 672-680.
- Ramet, M., Castren, K., Jarvinen, K., Pekkala, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Soini, Y., Paakko, P. & Vahakangas, K. 1995. p53Protein expression is correlated with benzo [a] pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, 16, 2117-2124.
- Ravichandran, N., Suresh, G., Ramesh, B. & Siva, G. V. 2011. Fisetin, a novel flavonol attenuates benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1141-1147.
- Reed, J. C., Tsujimoto, Y., Alpers, J. D., Croce, C. M. & Nowell, P. C. 1987. Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science*, 236, 1295-1299.
- Ren, D., Tu, H.-C., Kim, H., Wang, G. X., Bean, G. R., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J.-D. & Cheng, E. H.-Y. 2010. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX-and BAK-dependent cell death program. *Science*, 330, 1390-1393.

- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. & Hankinson, O. 1992. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science*, 256, 1193.
- Rojas, M., Marie, B., Vignaud, J. M., Martinet, N., Siat, J., Grosdidier, G., Cascorbi, I. & Alexandrov, K. 2004. High DNA damage by benzo [a] pyrene 7, 8-diol-9, 10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma. *Cancer letters*, 207, 157-163.
- Ross, J. A., Nelson, G. B., Wilson, K. H., Rabinowitz, J. R., Galati, A., Stoner, G. D., Nesnow, S. & Mass, M. J. 1995. Adenomas induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mouse lung correlate with time-integrated DNA adduct levels. *Cancer research*, 55, 1039-1044.
- Rushmore, T. H. & Pickett, C. 1993. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 11475-11475.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. & Munnich, A. 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica chimica acta*, 228, 35-51.
- Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X. & Choi, A. M. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 9, 49-89.
- Saleem, M., Alam, A. & Sultana, S. 2001. Asafoetida inhibits early events of carcinogenesis: a chemopreventive study. *Life sciences*, 68, 1913-1921.
- Sato, S., Fujita, N. & Tsuruo, T. 2000. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 10832-10837.
- Schiff, P. & Horwitz, S. B. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 1561-1565.
- Schiff, P. B., Fant, J. & Horwitz, S. B. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277, 665-667.
- Scholzen, T. & Gerdes, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182, 311-322.
- Selvendiran, K., Senthilnathan, P., Magesh, V. & Sakthisekaran, D. 2004. Modulatory effect of Piperine on mitochondrial antioxidant system in Benzo (a) pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Phytomedicine*, 11, 85-89.
- Sener, S., Braun, J., Rico, A., Benard, P. & Burgat-Sacaze, V. 1979. Urine gamma-glutamyl transferase in rat kidney toxicology: nephropathy by repeated injections of mercuric chloride. Effects of sodium selenite. *Toxicology*, 12, 299-305.
- Shaknovich, R., Shue, G. & Kohtz, D. S. 1992. Conformational activation of a basic helix-loop-helix protein (MyoD1) by the C-terminal region of murine HSP90 (HSP84). *Molecular and cellular biology*, 12, 5059-5068.
- Shetty, P. V., Bhagwat, B. Y. & Chan, W. K. 2003. P23 enhances the formation of the aryl hydrocarbon receptor-DNA complex. *Biochemical pharmacology*, 65, 941-948.
- Shimeda, Y., Hirotsu, Y., Akimoto, Y., Shindou, K., Ijiri, Y., Nishihori, T. & Tanaka, K. 2005. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1635-1638.
- Sinha, R., Kulldorff, M., Gunter, M. J., Strickland, P. & Rothman, N. 2005. Dietary benzo [a] pyrene intake and risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14, 2030-2034.
- Slaga, T. J. 1995. Inhibition of the induction of cancer by antioxidants. *Nutrition and Biotechnology in Heart Disease and Cancer*. Springer.

- Smith, L. E., Denissenko, M. F., Bennett, W. P., Li H., Amin, S., Tang, M.-S. & Pfeifer, G. P. 2000. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 803-811.
- Solaini, G., Sgarbi, G. & Baracca, A. 2011. Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807, 534-542.
- Solit, D. B. & Chiosis, G. 2008. Development and application of Hsp90 inhibitors. *Drug discovery today*, 13, 38-43.
- Srivastava, S. K., Hu, X., Xia, H., Awasthi, S., Amin, S. & Singh, S. V. 1999. Metabolic fate of glutathione conjugate of benzo [a] pyrene-(7R, 8S)-diol (9S, 10R)-epoxide in human liver. *Archives of biochemistry and biophysics*, 371, 340-344.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J. & Yang, W. 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127, 397-408.
- Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U. & Pavletich, N. P. 1997. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, 89, 239-250.
- Subbarao Sreedhar, A., Kalmar, É., Csermely, P. & Shen, Y.-F. 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters*, 562, 11-15.
- Sugihara, N., Toyama, K., Michihara, A., Akasaki, K., Tsiji, H. & Furuno, K. 2006. Effect of benzo [a] pyrene on P-glycoprotein-mediated transport in Caco-2 cell monolayer. *Toxicology*, 223, 156-165.
- Sun, Y. 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 8, 583-599.
- Supko, J. G., Hickman, R. L., Grever, M. R. & Malspeis, L. 1995. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 36, 305-315.
- Takaishi, M., Sawada, M., Shimada, A., Suzuki, J. S., Satoh, M. & Nagase, H. 2009. Protective role of metallothionein in benzo [a] pyrene-induced DNA damage. *The Journal of toxicological sciences*, 34, 449-458.
- Takayama, S., Reed, J. C. & Homma, S. 2003. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 22, 9041-9047.
- Tampio, M., Loikkanen, J., Myllynen, P., Mertanen, A. & Vahakangas, K. 2008. Benzo (a) pyrene increases phosphorylation of p53 at serine 392 in relation to p53 induction and cell death in MCF-7 cells. *Toxicology letters*, 178, 152-159.
- Tligui, N., Ruth, G. & Felice, L. 1994. Plasma ferulenol concentration and activity of clotting factors in sheep with *Ferula communis* variety *brevifolia* intoxication. *American journal of veterinary research*, 55, 1564-1569.
- Todorova, T., Vuilleumier, S. & Kujumdzieva, A. 2007. Role of glutathione s-transferases and glutathione in arsenic and peroxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: a reverse genetic analysis approach. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21, 348-352.
- Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P. & Bukau, B. 2001. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Molecular microbiology*, 40, 397-413.
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. 2000. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death & Differentiation*, 7, 1174-1181.
- Turens, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552, 335-344.
- Ulasli, S. S., Celik, S., Gunay, E., Ozdemir, M., Hazman, O., Ozyurek, A., Koyuncu, T. & Unlu, M. 2013. Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and

- resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo (a) pyrene. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14, 6159-64.
- Uppstad, H., Øvrebo, S., Haugen, A. & Mollerup, S. 2010. Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo [a] pyrene in human lung cell lines. *Toxicology letters*, 192, 221-228.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160, 1-40.
- Vaux, D., Cory, S. & Adams, J. 1988. Bcl-2 and cell survival. *Nature*, 335, 440-2.
- Vijayalakshmi, T., Muthulakshmi, V. & Sachdanandam, P. 1997. Salubrious effect of *Semecarpus anacardium* against lipid peroxidative changes in adjuvant arthritis studied in rats. *Molecular and cellular Biochemistry*, 175, 65-69.
- Wang, L., Chanvorachote, P., Toledo, D., Stehlik, C., Mercer, R. R., Castranova, V. & Rojanasakul, Y. 2008. Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Molecular pharmacology*, 73, 119-127.
- Warburg, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-270.
- Wartmann, M. & Davis, R. J. 1994. The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 6695-6701.
- Whitesell, L. & Lindquist, S. L. 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5, 761-772.
- Whitsell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. & Neckers, L. M. 1994. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 8324-8328.
- Willet, K., Detry, O. & Sluse, F. E. 2000. Resistance of isolated pulmonary mitochondria during in vitro anoxia/reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1460, 346-352.
- Willimott, S. & Wagner, S. D. 2010. Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochemical Society transactions*, 38, 1571-1575.
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., Van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D. & Bouillet, P. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315, 856-859.
- Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. & Rosen, N. 2007. Drugging the cancer chaperone HSP90. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113, 202-216.
- Xue, W. & Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and applied pharmacology*, 206, 73-93.
- Yan, Y., Wang, Y., Tan, Q., Lubet, R. A. & You, M. 2005. Efficacy of deguelin and silibinin on benzo (a) pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Neoplasia*, 7, 1053-1057.
- Yang, H., Lundback, P., Ottosson, L., Erlandsson-Harris, H., Venereau, E., Bianchi, M. E., Al-Abed, Y., Andersson, U., Trecey, K. J. & Antoine, D. J. 2012. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Molecular medicine*, 18, 250.
- Youle, R. J. & Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9, 47-59.
- Young, J. C., Moarfi, I. & Hartl, F. U. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology*, 154, 267-274.

Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A. & Tillement, J. 1998. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research*, 25, 87-97.

RESEARCH ARTICLE

Ferulenol, a Sesquiterpene Coumarin, Induce Apoptosis via Mitochondrial Dysregulation in Lung Cancer Induced by Benzo[a]pyrene: Involvement of Bcl2 Protein

Nesrine Lariche^a, Mesbah Lahouel^{a,b,*}, Lamia Benguedouar^a and Ammar Zellagui^c

^aLaboratory of Molecular Toxicology, Faculty of Sciences SNV, University of Mohammed Seddik Benyahia, Jijel, 18000, Algeria; ^bGREd Laboratory, UMR CNRS 6293-INSERM U1103, Blaise Pascal University, 63000, Clermont Ferrand, France; ^cLaboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Faculty of Sciences SNV, University of Larbi Ben Mhidi, Oum El Bouaghi, 04000, Algeria

Abstract: Background: Ferulenol, a sesquiterpene coumarin, was extracted from “*Ferula vesceritensis*” and possesses pro-oxidative and anticancer effects in different types of cancer.

Objective: The objective of this study is to determine whether ferulenol has an anticancer effect by regulation the Bcl2 protein expression in lung cancer induced by benzo[a]pyrene in Wistar rats.

Methods: Rats in group 1 have received, intraperitoneally, olive oil and considered as controls, animals of group 2 were treated with 100 mg/kg of benzo[a]pyrene intraperitoneally in order to induce lung cancer for 24 weeks, the 3rd groups of rats received the ferulenol 50 mg/kg intraperitoneally after 24 weeks of administration of benzo[a]pyrene and the last group, the rats were treated with ferulenol alone 50 mg/kg.

Results: Treatment with ferulenol significantly increased the rate of lipid peroxidation and decrease enzymatic (CAT and GST) and non-enzymatic (GSH) anti-oxidants in benzo[a]pyrene induced lung cancer. Anticancer efficacy of ferulenol was evaluated by down-regulation of Bcl2 protein and up-regulation of Bax protein. Therefore, ferulenol can alter the functionality of lung mitochondria by increasing the production of superoxide anion and mitochondrial swelling.

Conclusion: Together, our results depict that ferulenol can be used as pro-oxidant and chemotherapeutic agent against lung cancer.

Keywords: Benzo[a]pyrene, ferulenol, lung cancer, bcl2 protein, chemotherapeutic, pro-oxidant.

ARTICLE HISTORY

Received: July 28, 2016
Revised: November 12, 2016
Accepted: February 02, 2017

DOI:
10.2174/18715206176661702131434
44

INTRODUCTION

Lung cancer is the most important cause of cancer-related deaths in the developing countries and expected 1.2 million deaths every year [1]. The statistics on lung cancer is estimated to cause 10 million deaths per year by the year 2030 [2]. Benzo[a]pyrene (B[a]P) is one of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), recognized in epidemiological and experimental studies to be carcinogenic in humans and animals [3]. It is the only one classified as known carcinogen by IARC [4]. B[a]P is the most studied and the most carcinogenic for lung found in cigarette smoke and also in environmental contamination [5]. The carcinogenicity of B[a]P is due to its metabolic activation by various enzymatic pathways, primarily by cytochrome P450 [6]. The main metabolite of B[a]P is BP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) which is able to bind to DNA and causes damage. Reactive oxygen species (ROS) formed during metabolic reactions are responsible for the carcinogenicity of B[a]P [7]. These free radicals attack membrane lipids, allowing the release of lipid peroxides [8].

Currently, cancer therapeutics is targeting various aspects of the apoptotic pathway. Anti-apoptotic modulating therapy is a promising strategy for cancer drug delivery and many groups are investigating the effects of Bcl2 family inhibition [9]. In lung cancer, anti-apoptotic proteins were amplified, suggesting that

malignant cells could evade apoptosis via Bcl2 protein overactivation, signaling the cell to avoid cell death [10]. The role of Bcl2 family members in lung cancer has been the subject of several studies. Carcinogenicity of B[a]P made researchers focus on new drug candidates from dietary bioactive agents, targeting apoptosis.

The genus *Ferula* belongs to the family of Apiaceae distributed throughout the Mediterranean to Central Asia [11]. Medicinal plants containing *Ferula* genus have been used in traditional medicine [12]. Many studies carried on *Ferula communis* L. plant indicated the presence of sesquiterpene coumarin [13]. Thus, the toxicity of these plants is due to the presence of ferulenol, a sesquiterpene coumarin, which induces lethal hemorrhage, a disease usually associated with hemorrhages or bleeding in animals [14]. Several studies indicate that ferulenol cause other biological properties such as anticoagulant [15], antitumor activity [16] and antimicrobial effects [17]. Ferulenol also is capable of inducing mitochondrial dysfunction by altering the membrane potential and to an interaction with the mitochondrial respiratory chain at the ubiquinone oxido-reductase [18].

Previously, we have found that ferulenol induced a significant cytotoxicity against tumor cell lines. It is necessary to understand the use of herbal preparations and natural substances in the treatment of lung cancer. No study has been the subject of mechanism of action of ferulenol as an anticancer agent, such as, this study aims to determine the cytotoxic effect of ferulenol on lung cancer induced by B[a]P by targeting Bcl2 family protein and using mitochondria in the death process and lipid peroxidation and antioxidants, such as biochemical parameters of chemotherapy.

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Molecular Toxicology, Faculty of Sciences, University Mohammed Seddik Benyahia of Jijel, 18000, Algeria; Tel/Fax 00 (213) 34 50 26 87; E-mail: lahoulmesbah@univ-jijel.dz

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Benzo[a]pyrene, sucrose, rotenone, succinate, Tris base, GSH, cyclosporine, Nitrobleuetetrazolium (NBT), Dithiobisnitro-Benzoic acid (DTNB) and 1-Chloro-2,4-Dinitro Benzene (CDNB) were purchased from Sigma Chemical Co. Ferulenol was extracted from *Ferula vesceritensis* and solubilized in DMSO.

Animals

Thirty two male Wistar Albino rats (10- 12 weeks old) weighing 220- 240 g at the start of experiments were used. The rats were purchased from Pasteur Institute of Algiers, Algeria and maintained on a standard diet and given free access to food and water and were kept at a room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($60 \pm 10\%$), under a 12 h light/dark cycle.

Tissue Analysis

All animals will be sacrificed after anesthesia with ether, a week after the administration of bioactive ferulenol corresponding to a total duration of study (induction of cancer and treatment) of 25 weeks. Each lung of different groups was rapidly removed from the sacrificed rat, weighed and placed in an ice-cold NaCl 0.9% solution.

Each tumoral portion of lung tissues was divided into three portions. One was used for isolation of lung mitochondria, the second for preparation of cytosolic fraction for the evaluation of cellular oxidative stress parameters and the third was used for extraction of total protein for Western blotting.

Cytosolic Fraction

The cytosolic fraction of lung tissue was prepared according to the protocol of Iqbal *et al.* 2003 [19] and protein concentration was assayed by Bradford method [20].

Biochemical Assay

A Malondialdehyde "MDA" or TBARS test level was determined using the Okhawa method 1979 [21]. Determination of tissue GSH was performed by a modified method [22] based on the method of Ellman. Tissue CAT activity was determined according to Claiborne method 1985 [23] and tissue GST activity was determined the spectrophotometric method at 340 nm as described by Habig *et al.* 1974 [24].

Isolation of Lung Mitochondria

Mitochondria were extracted from a homogenate of rat lung by differential centrifugations. Briefly, samples of freshly excised lungs (approximately 1g) were homogenized in ice-cold lung isolation medium (Sucrose 250 mM, Tris base 20 mM, and EGTA 10 mM pH= 7.4) using a Potter Homogenizer. The homogenates were centrifuged at 800 g for 10 minutes at 4°C to remove cell debris and nuclei and supernatants were collected. Mitochondria were separated from the supernatant by centrifugation at 9600 g for 10 minutes. The pellet (mitochondria) was washed in isolation medium and centrifuged again at 8000 g for 10 minutes. The pellet was finally resuspended in isolation medium. Protein concentration of the mitochondrial suspension was assayed by Bradford method.

Mitochondrial Superoxide Anion (O₂⁻) Assay

Generation of O₂⁻ was achieved using rat lung mitochondria. Reaction mixture contained mitochondria (1mg /ml), 1 μM Cyclosporine and NBT (100 μM) in 1,2 ml of respiration buffer with rotenone. The reaction was started by adding succinate 6 μM

in the assay cuvette and the rate of NBT reduction was measured at 560 nm.

Mitochondrial Swelling Measurement

Mitochondrial swelling was assessed by measuring the change in absorbance of the suspension at 540 nm (A540). Mitochondria (0,2 mg/ml) were incubated in a total volume of 1,8 ml of respiration buffer in the presence of succinate 6mM. After 1 minute of incubation, 100 μM of CaCl₂ was added to induce swelling.

Western Blot Analysis

Lung tissue lysates were prepared by treating the tissue with lysis buffer [150 mM NaCl, 1% NP-40 or 0.1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH= 8, Protease inhibitors]. Lysates were sonicated for 3x 2 seconds on ice and centrifuged at 13000 g for 15 min at 4°C . The protein concentration of the supernatant was measured by the method of Bradford. SDS-PAGE was prepared on polyacrylamide gels. The resolved proteins were transferred onto nitrocellulose membrane and then incubated with primary antibody to Bcl2 (mouse, 1:200, cat n°. M0887, Dako), Bax (rabbit, 1:100, cat n°. A3533, Dako) and β -actin (mouse, 1:3000, cat n°. ab11003, Abcam). Secondary antibody to IgG conjugated to horseradish peroxidase (rabbit anti-mouse, ab 97046 or goat anti-rabbit, ab 97051, Abcam) was used. The blots were then reacted with the ECL western Blot detection system (BioRAD), according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

The data are processed statistically by Student's test (paired observation) using Excel 2007 software to establish if there were significant differences between the values of the various groups. All analyzes were performed at a significance level of 5%. For the P value and asterisk are used to indicate the importance of significance (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

EXPERIMENTAL

We separated the rats into three groups, each group has eight animals: Group 1 (Control) rats were given a single injection of olive oil (vehicle) intraperitoneally; group 2 (B) animals were given a single injection of benzo[a]pyrene (100mg /kg/body weight dissolved in olive oil, intraperitoneally) in order to induce lung cancer for 24 weeks; group3 (BF50) rats were treated with ferulenol intraperitoneally (50 mg/kg body weight dissolved in DMSO) after 24 weeks of administration of benzo[a]pyrene (as in group 2) and group 4 (F50) rats were treated with ferulenol alone 50 mg/kg intraperitoneally.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 demonstrates the effect of ferulenol on the body weight in different groups of rats. Induction of lung cancer in rats by B[a]P (group 2) resulted in loss of body weight when compared to control rats (p <0.001). On the contrary, administration of ferulenol to B[a]P induced lung cancer showed significant (p <0.001) increase in the body weight. No visible changes were observed between the control and ferulenol alone treated group which is indicative of non-toxic nature of ferulenol.

Reactive oxygen species are regularly formed in animals treated with carcinogens and increasing data suggests that these free radicals play a central role in all stages of chemical carcinogenesis. Table 2 shows the levels of lipid peroxidation (MDA) in lung homogenate of rats in the control and experimental group of animals. There is a highly significant (p <0.001) increase in the extent of malondialdehyde (MDA) content in lung cancer bearing rats (group 2) when compared with control animals (group 1).

Table 1. Effect of ferulenol on the body weight in control and experimental groups of rats.

Groups	Body Weight (g)
C	247.66 ± 18.22
B	178.77 ± 6.04 ***
BF50	222.9 ± 10.53 ***
F50	245.23 ± 7.61

Each value is expressed as means ±SD (n=8), Student's test. C: control, B: treated with B[a]P 100 mg /kg intraperitoneally, BF50: treated with B[a]P + ferulenol 50 mg/ kg/ intraperitoneally and F50: treated with ferulenol alone p <0.05: (*), p <0.01: (**), p <0.001: (***)

Table 2. Effect of ferulenol on lipid peroxidation.

Groups	[MDA] nM/ mg of Protein
C	8.08 ± 0.48
B	15.22 ± 2.65 ***
BF50	17.42 ± 0.498 *
F50	12.37 ± 1.59 *

Each value is expressed as means ±SD (n=8), Student's test. C: control, B: treated with B[a]P 100 mg /kg intraperitoneally, BF50: treated with B[a]P + ferulenol 50 mg/ kg intraperitoneally and F50: treated with ferulenol alone p <0.05: (*), p <0.01: (**), p <0.001: (***)

Treatment with ferulenol (50mg/kg/i.p) caused a significant increase (p <0.05) of MDA when compared with carcinogen-induced lung cancer (group 2). Our results are in accord with the study of Das *et al.*, 2007 [25] showed that an increase of the lipid peroxidation in the lung cancer induced by B[a]P in mice. This peroxidation is induced by ROS generated, then the metabolism of B[a]P through the cytochrome pathway or by Quinones pathway. We showed that ferulenol increase the levels of MDA compared with the B[a]P group, this suggests that mitochondrial ROS generated after treatment by ferulenol caused serious damage to cancerous cells in the lung tissue. This peroxidation of polyunsaturated fatty acids affects the function of membrane, inactive membrane bound receptors and increases the permeability of the tissue. In comparison with the control group, treatment with ferulenol alone resulted in a slight significant increase in MDA levels (p <0.05) this means that a slight peroxidation of lung cell membranes can take place by the ferulenol on healthy cells.

Glutathione (GSH) is an essential ubiquitous tripeptide (L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) -containing moiety sulfhydryle. It is a powerful nucleophilic and electrophilic reagent inactive compound by non-enzymatic conjugation or directly by an enzymatic reaction catalyzed by glutathione S-transferase (GST) [26]. Our results (Table 3) show that there was a very significant increase (p <0.01) of GSH in lung cells of rats treated with B[a]P (group 2) compared to the control contrary to the literature, where the level of glutathione was reduced because of its use during the conjugation reaction with metabolites of B[a]P, with the products of lipid peroxidation and hydrogen peroxide [27]. Our results can be explained by a mutation in the epoxide hydrolase (EH). The mutation (TC) at exon 3 is linked to a decrease in the enzyme activity by almost 50% and a decrease in the amount of DNA-BPDE adducts [28]. Since the way of GSH is very important for the detoxification of BPDE [29], thus reducing of the formation of BPDE leads to decrease in the consumption of GSH. On treatment with ferulenol (50mg/kg/i.p) (group 3), there was found to be a significant (p <0.05) decrease in the levels of GSH in lung when compared with cancer induced animals (group 2). Ferulenol treatment alone has no influence on reserve GSH in lung cells; this effect is marked by a rate similar to that of control rats, indicating that the ferulenol has no effect on the non-enzymatic antioxidants lung cells.

Table 3. Effect of ferulenol on glutathione (GSH) reserves.

Groups	[GSH] mM/ g of Tissue
C	2.19 ± 0.48
B	3.37 ± 0.76 **
BF50	2.18 ± 0.99 *
F50	2.04 ± 0.15

Each value is expressed as means ±SD (n=8), Student's test. C: control, B: treated with B[a]P 100 mg /kg intraperitoneally, BF50: treated with B[a]P + ferulenol 50 mg/ kg intraperitoneally and F50: treated with ferulenol alone p <0.05: (*), p <0.01: (**), p <0.001: (***)

The effect of ferulenol (50mg/kg/i.p) on the activities of enzymatic antioxidant in lungs of control and experimental groups of animals is depicted in Table 4. The enzymatic antioxidants such as catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) were found to be reduced in B[a]P treated group (p <0.001). Treatment with ferulenol in rats with cancer significantly reduced the enzymatic antioxidants: significant for CAT (p <0.05) and very significant for GST (p <0.01). Compared to control group, the CAT (p <0.05) and GST (p <0.001) enzyme levels in healthy cells shows significant decrease after treatment with ferulenol. The decrease in catalase activity is in accordance with other studies where repeated lung exposure to B[a]P leads to decreased levels of catalase in the cells [30] which may be attributed to the consumption of this enzyme following the excessive production of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the cancer cells [31]. After treatment by ferulenol, we obtained a decrease in levels of catalase compared with the B[a]P group. This is explained by the hypothesis that decreased levels of the catalase are due to an increase in lipid peroxidation [32]. It is more likely that this decline is due to the combination of all these factors. The glutathione S-transferases (GSTs) are a family of enzymes which catalyze the conjugation of reduced glutathione with a variety of electrophilic compounds. A significant decrease in the level of GST was observed in the group of rats treated with B[a]P compared to the control group, these results are in agreement with those of Ravichandran *et al.*, 2011 [1]. The effect of ferulenol on the ratio of antioxidant enzymes in healthy lung cells can be explained by the pro-oxidant effect of ferulenol assigned by the synthesis of ROS that can act on the expression of these enzymes.

The damage to mitochondria leads to the reduction of energy production and cell death. It has been demonstrated that ferulenol interact with ANT and the ubiquinone oxido-reductase (complex II) of the mitochondrial respiratory chain result in the inhibition of the phosphorylation oxidative. It offers the mechanisms of mitochondrial dysfunction caused by ferulenol and maintain the suggestion that mitochondrial alteration is a significant determinant in Ferula plant toxicity [18].

Treatment with a single dose of 50 mg/kg/ i.p of ferulenol in rats attained lung cancer induced by B[a]P showed on increases of superoxide anion (O₂⁻) production (p <0.05) (Table 5), No observable changes in production of O₂⁻ were shown between the control and ferulenol alone treated group. A dose-dependent superoxide anion production was observed after incubation of lung mitochondria with increased concentrations of ferulenol (Table 6). In comparison with the control (without ferulenol), the ferulenol at concentration 10⁻²M, 10⁻³M, 10⁻⁴M and 10⁻⁶ M results in a significant production of superoxide anion by pulmonary mitochondria.

In fact, many evidences suggest that clinical disorders are a consequence of the complex II dysfunction [33]. The results suggest that production of superoxide anion after treatment by ferulenol can be explained by a reverse electron transfer occurs when electrons donors from succinate to complex II are reversely transferred to complex I or superoxide anion production can be due that electrons donates by succinate traveling from complex I to

Table 4. Enzymatic antioxidant status of ferulenol.

Groups	[CAT] $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ of Protein	[GST] $\text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ of Protein
C	6.41 \pm 0.846	36.80 \pm 1.96
B	1.14 \pm 0.844 ***	4.84 \pm 0.57 ***
BF50	0.377 \pm 0.05 *	3.43 \pm 0.89 **
F50	2.94 \pm 1.89 *	12.68 \pm 2.28 ***

Each value is expressed as means \pm SD (n=8), Student's test. C: control, B: treated with B[a]P 100 mg/kg intraperitoneally, BF50: treated with B[a]P + ferulenol 50 mg/kg intraperitoneally and F50: treated with ferulenol alone p <0.05: (*), p <0.01: (**), p <0.001: (***)

complex III, this letter become a generator of superoxide anion. The source of O₂⁻ in the complex III may be cytochrome b566, the radical semi-ubiquinone or the Fe-S cluster: One of two electrons transferred by the Ubiquinol to complex III is captured by the Fe-S cluster and assigned to cytochrome c1 then to cytochrome c, the other electron engages the Q cycle; it achieved *via* cytochrome b566 and b562 the matrix face of the complex III; where it is picked by a coenzyme Q (COQ) molecule to give the ionized radical COQ⁻ which may transfer the electron to molecular oxygen to form the superoxide anion.

Table 5. Effect of ferulenol on superoxide anion production by lung mitochondria *in vivo*.

Groups	% of Production
C	100
B	285.36 \pm 12.07
BF50	360.36 \pm 9.48 *
F50	234.14 \pm 27.59 *

Each value is expressed as means \pm SD (n=2), Student's test. C: control, B: treated with B[a]P 100 mg/kg intraperitoneally, BF50: treated with B[a]P + ferulenol 50 mg/kg intraperitoneally and F50: treated with ferulenol alone p <0.05: (*), p <0.01: (**), p <0.001: (***)

Mitochondrial swelling caused by ferulenol is shown after treatment of rats attained lung cancer in Table 7 and the same

effects are observed *in vitro* on lung mitochondria in Table 8, this confirms that the increase of mitochondrial swelling by ferulenol leads to disruption of the mitochondrial membrane and initiation of apoptosis.

Lung tissue lysate of treated and untreated animals were probed with the appropriate antibody to identify Bcl2/Bax protein levels by western blot. Fig. 1 shows a Bcl2/Bax protein level, Bcl2 protein was found to be decreased after treatment by ferulenol in lung cancer induced by B[a]P and Bax, a pro-apoptotic protein, accumulates in lung cells after treatment by ferulenol. β -actin was used as a loading control, which observed equal intensity bands, confirming identical protein concentration in all samples.

Previous studies indicate that over-expression of Bcl2 protein prevents the efflux of cytochrome C from the mitochondria and triggering apoptotic cell death. Analysis of the expression of Bcl2 family proteins in lung cancer induced by B[a]P and treatment by ferulenol was performed by Western blot. In this study, the Bcl2 labeling index increased cancer induced in animals (group 2) which indicate Bcl2 as a veritable gene for induction of lung cancer [34].

The progressive loss of mitochondrial membrane potential was accompanied by an increased production of ROS, which treatment with ferulenol saturates antioxidant defense systems, and induced functional impairment of mitochondria, delaying oxidative phosphorylation [18]. Thus, the ROS generation in mitochondria was characterized as an early pro-apoptotic event that occurs before the cells undergo apoptosis [35]. Excessive O₂⁻ generation resulting

Table 6. Effect of different concentrations of ferulenol on the lung mitochondrial production of superoxide anion *in vitro*.

Concentrations of Ferulenol	T0= 0 Sec	T1= 30 Sec	T2= 60 Sec	T3= 90 Sec	T4= 120 Sec	T5= 150 Sec	T6= 180 Sec
Control	0	0.031 \pm 0.002	0.082 \pm 0.003	0.123 \pm 0.002	0.149 \pm 0.001	0.154 \pm 0.005	0.154 \pm 0.006
10 ⁻² M	0	0.152 \pm 0.007	0.291 \pm 0.0014	0.315 \pm 0.0007	0.462 \pm 0.002	0.622 \pm 0.0014	0.827 \pm 0.003 ***
10 ⁻³ M	0	0.131 \pm 0.0014	0.1725 \pm 0.002	0.193 \pm 0.004	0.319 \pm 0.0014	0.409 \pm 0.013	0.496 \pm 0.008 ***
10 ⁻⁴ M	0	0.106 \pm 0.009	0.1675 \pm 0.003	0.161 \pm 0.0014	0.2565 \pm 0.061	0.278 \pm 0.044	0.192 \pm 0.011 *
10 ⁻⁶ M	0	0.085 \pm 0.007	0.104 \pm 0.005	0.134 \pm 0.005	0.153 \pm 0.004	0.200 \pm 0.0007	0.155 \pm 0.007

Each value is expressed as means \pm SD (n= 2), Student's test. p <0.05: (*), p <0.01: (**), p <0.001: (***). Values are expressed as production of superoxide anion per second (Sec).

Table 7. Effect of ferulenol on mitochondrial swelling on lung mitochondria *in vivo*.

Groups	T0= 0 min	T1= 1 min	T2= 2 min	T3= 3 min
C	0	-0.0515 \pm 0.002	-0.061 \pm 0.001	-0.045 \pm 0.002
B	0	-0.0825 \pm 0.003	-0.089 \pm 0.001	-0.0795 \pm 0.0007 **
BF50	0	-0.092 \pm 0.002	-0.141 \pm 0.001	-0.155 \pm 0.007 **
F50	0	-0.00925 \pm 0.0003	-0.0305 \pm 0.0007	-0.031 \pm 0.001 *

Each value is expressed as means \pm SD (n= 2), Student's test. p <0.05: (*), p <0.01: (**), p <0.001: (***). Values are expressed as induction of the mitochondrial swelling by ferulenol per minute (min).

Table 8. Effect of different concentrations of ferulenol on mitochondrial swelling of lung mitochondria *in vitro*.

Concentrations of Ferulenol	T0= 0 Sec	T1= 30 Sec	T2= 60 Sec	T3= 90 Sec	T4= 120 Sec	T5= 150 Sec	T6= 180 Sec
Control	0	0	-0.001	-0.002	-0.003	-0.004	-0.005
10 ⁻² M	0	-0.022± 0.0007	-0.0395± 0.0007	-0.0455± 0.0007	-0.0635± 0.002	-0.07± 0.0014	-0.084± 0.0014 ***
10 ⁻³ M	0	-0.013± 0.0014	-0.021± 0.002	-0.0295± 0.0007	-0.047± 0.0014	-0.055± 0.0014	-0.079± 0.0014 ***
10 ⁻⁴ M	0	-0.0025± 0.0007	-0.01± 0.0014	-0.013± 0.0014	-0.03± 0.0014	-0.0245± 0.002	-0.0315± 0.002 **
10 ⁻⁶ M	0	-0.0012± 0.0003	-0.0042± 0.0002	-0.011± 0.0014	-0.014± 0.0014	-0.019± 0.0014	-0.02± 0.0014 **

Each value is expressed as means ±SD (n= 2), Student's test. p <0.05: (*), p <0.01: (**), p <0.001: (***). Values are expressed as induction of the mitochondrial swelling by ferulenol per second (Sec).

in a consumption of superoxide dismutase leads to an accumulation of H₂O₂ in lung cells. H₂O₂ is a signaling molecule generated during oxidative stress and in response to various stimuli of apoptosis [36], seems to be a key player in oxidative stress induces cancer cell death. Using lung cancer cells, we recently establish that specific concentrations of H₂O₂ induced selective destruction of cancer cells [37]. Bcl-2 overexpression in lung epithelium cell enables inhibition of apoptosis, which indicates the anti-apoptotic role of Bcl-2 in accordance with the known function of this protein. The oxidation of the cysteine of bcl2 was observed at high levels of H₂O₂-induced apoptosis, suggesting that the oxidation potential role of cysteine in the signaling process of death. Inhibition of Bcl2 cysteine oxidation by site specific mutation of the cysteine residues (Cyt-158 and Cyt-229) strongly inhibits the apoptotic effect of H₂O₂ [38]. Different mutations of Bcl2 have been reported in cancers, although direct function of the mutated proteins is limited [39]. Our study demonstrated the contribution of cysteine residues in Bcl2 promoted for its anti-apoptotic effect, which may contribute to the development of lung cancer induced by B[a]P, and such a change in Bcl2 *via* Cys-SOH training establishing a role in regulating apoptosis induced by H₂O₂.

Therefore, the down regulation of pro-apoptotic proteins, such as Bax protein allows cancer cells to escape apoptosis in lung cancer induced by Benzo[a]pyrene. Altogether, a decrease in the Bcl2 protein accumulation and increase in the expression of Bax protein is provided by treatment with ferulenol in lung cancer that results in an initiative response of lung cells to intracellular damage and signals, allowing cancer cells entering the apoptotic death and typically governed by opposing factions of the Bcl2 family of cytoplasmic proteins. Therefore, overexpression of the proapoptotic protein Bax after treatment with ferulenol can be explained that this protein undergoes post-translational modification (for dephosphorylation and cleavage), resulting in its activation and its translocation to mitochondria, thereby leading to apoptosis.

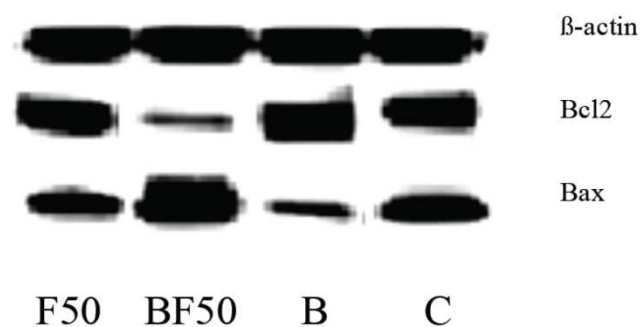


Fig. (1). Effect of ferulenol on Bcl2 and Bax protein accumulation in lung tissue of rats. C: control, B: treated with B[a]P 100 mg/kg intraperitoneally, BF50: treated with B[a]P + ferulenol 50 mg/kg intraperitoneally and F50: treated with ferulenol alone.

CONCLUSION

The present studies confirm the pro-oxidant effect of ferulenol having the capacity to produce and generate free radicals. The results of our study established the anti-cancer property of ferulenol, it is proved by regulation on the Bcl2 family protein accumulation which is a key regulator of cell death, and also damage to mitochondria by ferulenol is considered central and can lead to toxicity. This preliminary study demonstrates that ferulenol effect is more prominent when used as a chemotherapeutic agent against B[a]P induced lung cancer.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- Ravichandran, N.; Suresh, G.; Ramesh, B.; Siva, G.V. Fisetin, a novel flavonol attenuates benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Food. Chem. Toxicol.*, **2011**, *49*, 1141-1147.
- Proctor, R.N. Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nat. Rev. Cancer.*, **2001**, *1*, 82-86.
- Duan, H.; Jiang, Y.; Zhang, H.; Wu, Y. MiR-320 and MiR-494 affect cell cycles of primary murine bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol. In Vitro*, **2010**, *24*, 928-935.
- IARC, Some non heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*. International Agency of Research on Cancer, Lyon, **2010**.
- Jiao, S.; Liu, B.; Gao, A.; Ye, M.; Jia, X.; Zhang, F.; Liu, H.; Shi, X.; Huang, C. Benzo(a)pyrene-caused increased G1-S transition requires the activation of c-Jun through p53-dependant PI3K/AKT/ERK pathway in human embryo lung fibroblasts. *Toxicol. Lett.*, **2008**, *178*, 167-175.
- Guengerich, F.P. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, **2000**, *21*, 345-351.
- Xue, W.; Warshwasky, D. Metabolism activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**, *206*, 73-93.
- Anandakumar, P.; Kamaraj, S.; Jagan, S.; Ramakishnan, G.; Vinodhkumar, R.; Devaki, T. Stabilization of pulmonary mitochondrial enzyme system by capsaicin during benzo(a)pyrene induced experimental lung cancer. *Biomed. Pharmacother.*, **2008**, *62*, 390-394.
- Roberts, E.R.; Thomas, K.J. The role of mitochondria in the development and progression of lung cancer. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **2013**, *6*, 1-7.
- Beroukhim, R.; Mermel, C.H.; Porter, D.; Guo Wei, G.; Raychaudhuri, S.; Donovan, J.; Barretina, J.; Boehm, J.S.; Dobson, J.; Urashima, M.; Henry, K.T.M.; Pinchback, R.M.; Ligon, A.H.; Cho, Y.J.; Haery, L.; Greulich, H.; Reich, M.; Winckler, W.; Lawrence, M.S.; Weir, B.A.; Tanaka, K.E.; Chiang, D.Y.; Bass, A.J.; Loo, A.;

- Hoffman, C.; Prensner, J.; Liefeld, T.; Gao, Q.; Yecies, D.; Signoretti, S.; Maher, E.; Kaye, F.J.; Sasaki, H.; Tepper, J.E.; Fletcher, J.A.; Tabernero, J.; Baselga, J.; Tsao, M.S.; Demichelis, F.; Rubin, M.A.; Janne, P.A.; Daly, M.J.; Nucera, C.; Levine, R.L.; Ebert, B.L.; Gabriel, S.; Rustgi, A.K.; Antonescu, C.R.; Ladanyi, M.; Letai, A.; Garraway, L.A.; Loda, M.; Beer, D.G.; Lawrence D. True, L.D.; Okamoto, A.; Pomeroy, S.L.; Singer, S.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; Getz, G.; William R. Sellers, W.R.; Meyerson, M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, **2010**, *463*, 899-905.
- [11] Mamoci, E.; Cavoski, I.; Andres, M.F.; Diaz, C.E.; Azucena, G.C. Chemical characterization of the aphid antifeedant extracts from *Dittrichia Viscosa* and *Ferula Communis*. *Biochem. Sys. Ecd.*, **2012**, *43*, 101-107.
- [12] Singh, M.M.; Agnihotri, A.; Garg, S.N.; Agarwal, S.K.; Gupta, D.N.; Keshri, G.; Kamboj, V.P. Antifertility and hormonal of certain carotene sesquiterpenes of *Ferula jaeschkeana*. *Planta Med.*, **1988**, *54*, 492-494.
- [13] Appendino, G.; Tagliapietra, S.; Gariboldi, P.; Nano, G.M.; Picci, V. Ferprenin a prenylated coumarin from *Ferula communis*. *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 944-946.
- [14] Fraigui, O.; Lamnaouer, D.; Faouzi, M.Y. Acute toxicity of ferulenol, a 4-hydroxycoumarin isolated from *Ferula communis* L. *Vet. Hum. Toxicol.*, **2002**, *44*, 5-7.
- [15] Monti, M.; Pinotti, M.; Appendino, G.; Dallochio, F.; Bellini, T.; Antognoni, F.; Poli, F.; Bernardi, F. Characterization of anti-coagulant properties of prenylated coumarin ferulenol. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1770*, 1437-1440.
- [16] Bocca, C.; Gabriel, L.; Bozzo, F.; Miglietta, A. Microtubule-interacting activity and cytotoxicity of the prenylated coumarin ferulenol. *Planta Med.*, **2002**, *68*, 1135-1137.
- [17] Al-Yahya, M.A.; Muhammad, I.; Mirza, H.H.; El-Ferally, S.F. Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phytother. Res.*, **1998**, *12*, 335-339.
- [18] Lahouel, M.; Zini, R.; Zellagui, A.; Rhouati, S.; Carrupt, P.A.; Morin, D. Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, *355*, 252-257.
- [19] Iqbal, M.; Som, D.S.; Yasumasa, O.; Masayoshi, F.; Shigero, O. 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.*, **2003**, *92*, 33-38.
- [20] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-Dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*, 248-254.
- [21] Okhawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem.*, **1979**, *95*, 351-358.
- [22] Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, *82*, 70-77.
- [23] Claiborne A. Catalase activity. In: *CRC handbook of methods for oxygen radical research*; Greenwald RA, Ed.; CRC Press: Boca Raton, **1985**, pp. 283-284.
- [24] Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione -S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **1974**, *249*, 7130-7139.
- [25] Das, R.K.; Banerjee, S.; Bhattacharya, S. Amelioration of benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenesis in strain A mice by diphenylmethyl selenocyanate. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **2007**, *58*, 351-360.
- [26] Weng, M.W.; Hsiao, Y.M.; Chiou, H.L.; Yang, Sh.F.; Hsieh, Y.Sh.; Cheng, Y.W.; Yang, Ch.H.; Ko, J.L. Alleviation of benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA damage in human lung carcinoma by glutathione S-transferase M2. *DNA Repair*, **2005**, *4*, 493-502.
- [27] Rahman, I.; MacNee, W. Lung glutathione and oxidatif stress: implication in cigarette smoke-induced airway disease. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **1999**, *277*, 1067-1088.
- [28] Pastorelli, R.; Guanci, M.; Cerri, A.; Negri, E.; La Vecchia, C.; Fumagalli, F.; Mezzetti, M.; Cappelli, R.; Panigalli, T.; Airoidi, L. Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA, and blood protein adducts of benzo[a]pyrene-diolepoxide. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, **1998**, *7*, 703-709.
- [29] Srivastava, S.K.; Hu, X.; Xia, H.; Awasthi, S.; Amin, S.; Singh, S.V. Metabolic fate of glutathione conjugate of benzo[a]pyrene-(7R, 8S)-diol (9S, 10R)-epoxide in human liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, *371*, 340-344.
- [30] Kim, K.B.; Lee, B.M. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.*, **1997**, *113*, 205-212.
- [31] Palackal, N.T.; Lee, S.H.; Harvey, R.G.; Blair, I.A.; Penning, T.M. Activation of polycyclic Aromatic Hydrocarbon *trans*-Dihydrodiol Proximate Carcinogens by Human Aldo-Keto Reductase (AKR1C) Enzyme and Their Functional Overexpression in Human Lung Carcinoma (A549) Cells. *J. Bio. Chem.*, **2002**, *277*, 24799-24808.
- [32] Ramakrishnan, G.; Raghavendran, H.R.B.; Vinodhkumar, R.; Devaki, T. Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, *161*, 104-114.
- [33] Rustin, P.; Rotig, A. Inborn errors of complex II—unusual human mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2002**, *1553*, 117-122.
- [34] Priya, D.K.D.; Gayathri, R.; Gunassekaran, G.R.; Sakthisekaran, D. Protective role of sulfuraphane against oxidative stress mediated mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in female swiss albino mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **2011**, *24*, 110-117.
- [35] Forbes-Hernandez, T.Y.; Giampieri, F.; Gasparrini, M.; Luca Mazzoni, L.; Quiles, J.L.; Alvarez-Suarez, J.M.; Battino M. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food. Chem. Toxicol.*, **2014**, *68*, 154-182.
- [36] Wang, L.; Chanvorachote, P.; Toledo, D.; Stehlik, C.; Mercer, R.R.; Castranova, V.; Rojanasakul, Y. Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol. Pharmacol.*, **2008**, *73*, 119-127.
- [37] Lopez-Lazaro, M.; Calderon-Montano, J.M.; Burgos-Moron, E.; Austin, C.A. Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, **2011**, *26*, 489-498.
- [38] Luanpitponga, S.; Chanvorachote, P.; Stehlik, C.; Tsed, W.; Callery, P.S.; Wange, L.; Rojanasakul, Y. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.*, **2013**, *24*, 858-869.
- [39] Packham, G. Mutation of Bcl-2 family proteins in cancer. *Apoptosis*, **1998**, *3*, 75-82.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

ANNEXES

❖ **Tampon respirant**

Sucrose (200 mM).....	6.84g
KH ₂ PO ₄ (10 mM).....	0.136g
Tris (20 mM).....	0.242g
QSP.....	100 ml
pH 7.4	

❖ **Tampon phosphate contenant KCl (1,15 M) pour la préparation de la fraction cytosolique**

KH ₂ PO ₄ (0.1M).....	1.35g
Eau distillée.....	100ml
KCl.....	8.51g
pH 7.4	

❖ **Préparation du milieu réactionnel pour le dosage de la SOD**

Cyanide de sodium (10 ⁻²).....	1ml
Solution du NBT (1,76 ×10 ⁻² M).....	0.1ml
EDTA (66 ×10 ⁻³ M).....	1ml
Riboflavine (2 ×10 ⁻⁶ M).....	0.1ml
Tampon phosphate Na ₂ HPO ₄ (0.1M).....	QSP 10 ml
pH 7.8	

❖ **Colorant Eosine y (alcoolique) :1,5 l**

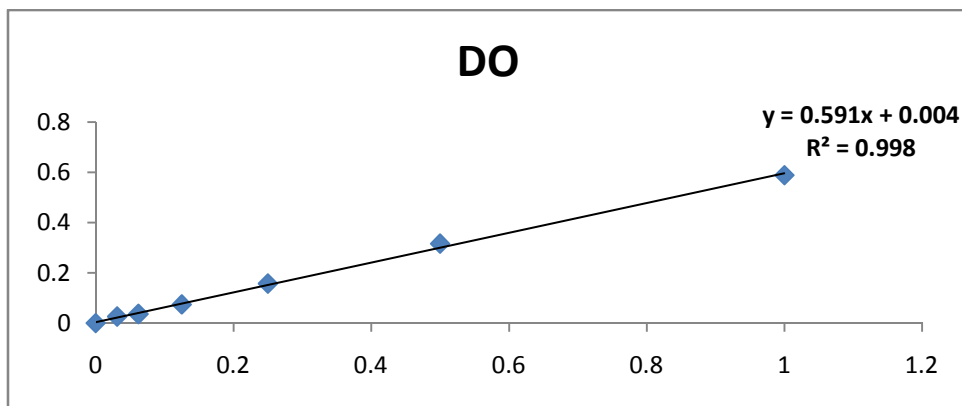
Eosine y, solution aqueuse à 3% (3g/l).....	1000ml
Alcool éthylique à 95% (+ 5ml d'eau distillée).....	125ml
Eau distillée	375ml
Acide acétique glacial.....	2 gouttes

❖ **Dosage des protéines par la méthode de Bradford :**

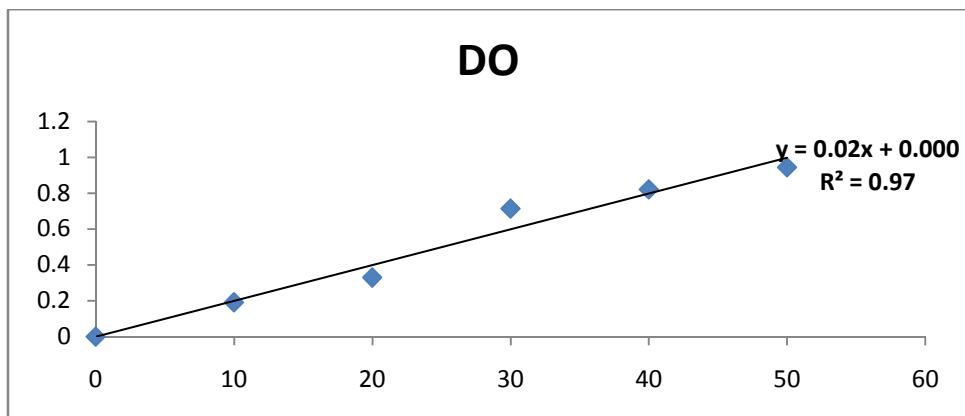
- Solution BSA (1 mg/ml) : Dissoudre 1 mg BSA dans 1 ml d'eau distillée.
- Réactif de Bradford : Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95 %). Agiter pendant 4 heures, puis ajouter 100 ml d'acide phosphorique (85 %) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 l de solution).

Ce réactif doit être filtré puis conservé pendant 1 mois au maximum à 4 °C et à l'abri de la lumière.

❖ **Gamme étalon de protéines**



❖ **Gamme étalon du MDA**



❖ Gamme étalon de glutathion

