

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

جامعة باجي مختار- عنابة

Faculté des sciences

Département de biologie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MAGISTER

Option

Physiologie des adaptations chez les vertébrés

THEME

**Etude de l'effet de la glisodine sur les réponses de
détoxifications enzymatiques au cours d'un stress
oxydatif cancérigène induit par l'azoxymethane chez le
rat wistar.**

Présenté par : Guedri kamilia

DEVANT LE JURY

Président	Bensouilah Mourad	Pr.	Université Badji-Mokhtar-Annaba
Examineurs	Tahraoui Abdelkrim	Pr.	Université Badji-Mokhtar- Annaba
	Bairi A.Madjid	M.C	Université Badji-Mokhtar- Annaba
Directeur de Mémoire	Ouali kheireddine	M.C.	Université Badji-Mokhtar- Annaba

2009/2010

RESUME

Cette étude a été réalisée pour évaluer l'efficacité de la supplémentation d' un antioxydant la glisodine (SOD végétal) sur le nombre des lésions précancéreuses des foyers de cryptes aberrantes (ACF) et sur le statut oxydatif (la peroxydation de lipide, le système de défense antioxydant) chez un model animal présentant un cancer colique induit chimiquement par l'azoxymethane (AOM).

En effet, l'administration de l'azoxymethane a provoqué un cancer du colon qui est révélé d'une part, par le formation des foyers de cryptes aberrantes (ACF) qui sont des lésions pré-néoplasiques et d'autre part par l'augmentation de la peroxydation de lipide (LPO) et une diminution considérable des taux de glutathion réduit (GSH), glutathion - S - transférase (GST), super oxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) qui sont des biomarqueurs de stress oxydatif.

Le traitement des rats AOM par la glisodine a diminué significativement l'incidence de tumeurs, le nombre des foyers de cryptes aberrantes (ACF), la multiplicité des cryptes avec une amélioration de l'activité de LPO et du statut de défense antioxydant GSH, GST, SOD et CAT.

Ceci suggère que le glisodine peut agir en tant qu'agent chemo-préventif efficace contre le cancer du colon via la diminution des attaques radicalaires au niveau colique.

Mots clés : Glisodine, Azoxymethane (AOM), ACF, Rat, Stress oxydant, Cancer du colon, LPO.

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effective role of the supplementation of an antioxidant the glisodine on the number of aberrant crypt foci (ACF) and oxidant status (lipid peroxidation (LPO), enzymic antioxidants system) in azoxymethane-induced colon cancer in animal model.

Indeed, the administration of the azoxymethane caused colon carcinogenesis who is revealed on the one hand, by the formation of aberrant crypt foci (ACF) that are lesions preneoplastic and on the other hand by enhanced levels of lipid peroxidative products (LPO) and a reduction of the glutathione (GSH), glutathione - S- transférase (GST), superoxide dismutase (SOD) and the catalase (CAT) which are the biomarker of oxidative stress.

Glisodine treatment to AOM-induced rat significantly decreased incidence of the tumor, number of aberrant crypts foci (ACF), the multiplicity of the crypts and the lipid peroxidation with amelioration of the activities of the antioxidant enzymes system GSH, GST, SOD and CAT.

This suggests that the glisodine can act as an effective chemo-preventive agent against the colon cancer stress.

Key words: Glisodine, Azoxymethane, ACF, Rat, Oxydative stress, Colon cancer, LPO.

ملخص :

الغاية من هذه الدراسة هو توضيح تأثير الغليزودين الذي هو عبارة عن مضاد اكسدة على عدد بؤر الاقبية المشوهة و على حالة الاكسدة (اكسدة الليبيدات، على انظمة الدفاع المضادة للاكسدة) في حالة سرطان القولون الذي يسببه حقن الازوكسيميثان عند نموذج حيوان.

حقن الفئران بالازوكسيميثان يؤدي الى حدوث سرطان القولون الذي يظهر من جهة بتكون بؤر الاقبية المشوهة ACF التي هي عبارة عن جروح في غشاء القولون (مخاطية) ، و من جهة اخرى بارتفاع عالي في اكسدة الليبيدات LPO و ايضا انخفاض في مستوى مضادات الاكسدة الانزيمية GSH, GST, SOD, CAT التي تعتبر كواشف حيوية للضغط المؤكسد.

معالجة الفئران المصابة بسرطان القولون بالغليزودين يخفض احتمالات حدوث الاورام و عدد بؤر الاقبية المشوهة و تضاعف الاقبية في البؤر كما يحسن من نشاط LPO و فاعلية انظمة الدفاع المضادة للاكسدة GSH, GST, SOD et CAT .

اذن هذه النتائج تشير الى ان الغليزودين يستطيع ان يؤدي دور معالج كيميائي فعال ضد سرطان القولون .

الكلمات المفتاحية : الغليزودين، الازوكسيميثان، سرطان القولون، بؤر الاقبية المشوهة، فار، LPO،

Remerciement

*Je remercie d'abord dieu qui m'a donné la force et la volonté
pour élaborer ce travail.*

*A cet effet je tiens à remercier vivement Mr.
Bensouillah Mourad Professeur à l'université d'Annaba
qui m'a honoré en acceptant de présider ce jury et qui nous a
accueilli et permis de finaliser notre travail à son laboratoire.*

*Ainsi je passe tout mes remerciements à mon encadreur
Mr Quali Kheireddine maitre de conférence à l'université
d'Annaba qui m'a aidé dans la réalisation de ce travail
par leurs précieux conseils, son soutien moral et ses qualités
humaines qui m'a fait bénéficier de ses vastes connaissances, ses
encouragements et ses efforts immenses qui ont contribué dans la
bonne marche de ce travail.*

*Je souhaite également remercier Mr Tahraoui
Abdelkarim, professeur à l'université d'Annaba, qui m'a
honoré par son examination de ce travail, et pour sa précieuse
aide, ces encouragements, ces conseils. Qu'il trouve ici
l'expression de ma considération distinguée.*

*J'adresse mes sincères remerciements envers Mr Bairi
Abdelmadjide Maitre de conférence à l'université d'
Annaba pour avoir accepté de critiquer et d'analyser ce travail.*

J'exprime ma haute gratitude et ma profonde reconnaissance à:

Mr Frih Hacène, Maître de conférence à l'université d'Annaba pour son soutien, son gentillesse et sa aide précieuse.

M^{me}. Baba Ahmed Fadia pour sa disponibilité, ses conseils, sa aide et ses orientations apportées au profit du travail réaliser. Sans oublier que je lui souhaite tout le succès dans sa thèse du doctorat.

En fin, je veux aussi remercier tous le personnel de laboratoire de Neuro endocrinologie appliquée et de la biomarine.

LISTE DES TABLEAUX

N°	Tableau	Page
01	La structure chimique et propriétés de l'azoxymethane.	06
02	Protocole experimental.	11
03	Protocole utilisé pour le dosage de l'activité CAT.	12
04	Réalisation de la gamme d'étalonnage.	13
05	Protocole utilisé pour le dosage de l'activité GST.	16
06	Protocole utilisé pour le dosage du SOD.	17
07	Courbe des volumes standard de dilution.	20
08	Variation des poids corporels en grammes chez les rats témoins et traités.	22
09	Variation des poids absolus et relatifs du foie en gramme chez les rats témoins et traités.	23
10	Variation des poids de la ratte en gramme chez les rats témoins et traités.	24
11	Effet de la glisodine sur l'induction des ACF (aberrant crypt foci) par l'AOM chez les rats..	25
12	Effet de la glisodine sur la mutiplicité des ACF induit par l'AOM chez les rats.	26
13	Variation de la concentration plasmatique des LPO en nmol/ml chez les rattes témoins et traitées.	27
14	Variation de l'activité de la superoxyde dismutase en Unité/mg = 50% xantine oxydée/min/mg protéine chez les rats témoin et traités.	29
15	Variation de l'activité de la catalase en nmol H ₂ O ₂ oxydé/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.	30
16	Variation de l'activité de la GST en nmol CDNB/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.	31
17	Variation de l'activité du glutathion réduit GSH en nmol/mg protéine chez les rats témoins et traités.	32

LISTE DES FIGURES

N°	Figure	Page
01	Molecular pathways associated with colorectal cancer. Two major pathways, WNT and TGF β , converge in the nucleus to effect Myc expression. Murine models for human CRC have been developed by genetically altering many components of these two pathways. * = modifiers of cancer initiation and progression (Joshua. M. Uronis and David. W. Threadgill, 2009).	06
02	La Glisodine (Super oxyde dismutase + Gliadine), une formule végétale originale	07
03	Représentation schématique du transit et de l'absorption intestinale de la SOD couplée à la gliadine.	08
04	Mise en évidence du côlon après dissection du rat.	09
05	Exemple de MDA standard courbe.	20
06	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	21
07	Variation des poids corporels en grammes chez les rats témoins et traités.	22
08	Variation des poids hépatiques absolus et relatifs en gramme chez les rats témoins et traités..	23
09	Variation des poids de la ratte en grammes chez les rats témoins et traités	24
10	Effet de la glisodine sur l'induction des ACF (aberrant crypt foci) par l'AOM chez les rats.	26
11	Effet de la glisodine sur la mutiplicité des ACF induit par l'AOM chez les rats.	27
12	Variation de la Concentration plasmatique des LPO en nmol/ml chez les rats témoin et traités	28
13	Variation de l'activité de la superoxyde dismutase en Unité/mg = 50% xantine oxydée/min/mg protéine chez les rats témoin et traités.	29
14	Variation de l'activité de la catalase en nmol H ₂ O ₂ oxydé/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.	30

15	Variation de l'activité de la GST en nmol CDNB/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.	31
16	Variation de l'activité du glutathion réduit GSH en nmol/mg protéine chez les rats témoins et traités.	32
17	Vue macroscopique des colons de rats traités par l'AOM (C, D, E, F) montrant une présence de tumeurs (indiquées par *) en comparaison avec le colon de rat témoin (A) et de rat témoin traité par la glisodine (B). F : partie distale d'un colon traité par l'AOM révélant des adénomes (*).	33
18	Vue microscopique de colons colorés au bleu de méthylène selon Bird, de rats traités par l'AOM. (C, D, E, F) montrant des foyers de cryptes aberrantes ACF (flèche) en comparaison aux colons témoins et ceux traités par la glisodine (A, B). En C : ACF à 2, 3 et 4 cryptes (flèche) ; D : ACF multiples > 4 cryptes ; E : adénome précoce (étoile) ; F: ACF multicryptique du colon traité par AOM + SOD. Grossissement $\times 75$ et $\times 150$.	34
19	Mutations génétiques associées à la cancérogenèse colorectale (Kinzler <i>et al.</i> , 1996).	35

LISTE DES SYMBOLES :

ACF:	Foyer crypte aberrante
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ANOVA:	Analyse de la variance à un critère de classification
AOM:	Azoxymethane
BSA :	Albumine bovine sérique (bovin serum albumin)
CAT :	Catalase
CDNB:	Chlorodinitrobenzène
COX-2:	Cyclooxygénase-2
DO:	Densité optique
DTNB:	5,5 -dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDTA :	Ethylène diamine tétraacétate
GR:	Glutathion réductase
GSH:	Glutathion réduit
GST:	Glutathion-S-transférases
H₂O₂ :	Eau oxygénée
Inj.ip:	Injection intrapéritonéale
LPO :	Lipide peroxydation
NFKB:	Nuclear factor of kappa light-chain gene enhancer in B cells
PA:	Poids absolu
PR:	Poids relatif
ROS:	Espèces réactives de l'oxygène
RNS:	Espèces réactives d'azote
SOD:	Super oxyde dismutase
SSA:	Acide sulfosalicylique

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	01
2. MATERIEL ET METHODES	04
2.1. Matériel biologique	04
2.1.1. Présentation	04
2.1.2. Lieu d'élevage	04
2.1.3. Conditions d'expérimentation	04
2.2. Méthodes	05
2.2.1. Application des traitements	05
2.2.1.1. Induction du cancer du côlon	05
2.2.1.2. Traitement antioxydant par la SOD végétale (Glisodine)	06
2.2.2. Prélèvement sanguin	08
2.2.3. . Dissection et prélèvement d'organe	08
2.2.4. coloration et comptage des ACF (aberrant crypt foci) :	09
2.2.4.1. Mode opératoire	09
2.2.5. Protocole expérimental	10
2.3. Exploration du statut antioxydant	11
2.3.1. Dosage de l'activité de la catalase	11
A. Principe	11
B. Mode opératoire	12
2.3.2. Dosage des protéines tissulaires	13
A. Principe	13
B. Mode opératoire	13
2.3.3. Dosage de l'activité du glutathion	13
A. Principe	14
B. Mode opératoire	14
2.3.4. Dosage de l'activité de glutathion-S-transférase	15
A. Principe	15
B. Mode opératoire	16
2.3.5. Dosage de l'activité de super oxyde dismutase	17
2.4. Dosage plasmatique	17

2.4.1. Dosage de lipoperoxydes LPO	17
A. Principe	18
B. Mode opératoire	18
C. Calcul de la concentration	19
2.5. Analyse statistique	20
3. RÉSULTATS	22
3.1. Etude pondérale	22
3.1.1. Variation du poids corporel	22
3.1.2. Variation du poids hépatique	23
3.1.3. Variation du poids de la ratte	24
3.2. Etude morphométrique	25
3.2.1. Effet de la glisodine sur l'induction et la multiplicité des lésions Précancéreuses ACF induites par l'AOM chez le rat	
3.3. Analyse du stress oxydant	27
3.3.1. Concentration de LPO plasmatique	27
3.3.2. Activité de la super oxyde dismutase colique	28
3.3.3. Activité de la catalase colique	29
3.3.4. Activité de glutathion-S-transférerase colique	30
3.3.5. Teneur en glutathion colique	31
4. DISCUSSION	35
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
RÉFÉRENCÉS BIBLIOGRAPHIQUES	

1. INTRODUCTION

En Algérie, les cancers sont une des majeures causes de mortalité depuis 1996, et sont responsables d'un tiers des décès en Europe. Le mode de vie semble avoir une grande influence sur l'origine et le développement des cancers, mais aucune théorie ne permet, à elle seule, d'expliquer l'étiologie des cancers. De nombreux arguments suggèrent que l'alimentation influe sur le développement des cancers, et que cette influence s'ajoute d'autres causes bien démontrées comme : la fumée du tabac (poumon, larynx), les rayons ultra-violet (peau), et des produits chimiques tels que le chlorure de vinyle (foie), les amines aromatiques (vessie), et le diéthylstilbestrol (col de l'utérus). S'il est démontré que certaines tumeurs se produisent plus souvent chez des sujets prédisposés génétiquement, et que si chez certains l'environnement n'influence probablement pas le développement du cancer (tumeur de l'enfant), il est probable aussi, que pour une majorité de personnes le cancer est la conséquence d'une interaction entre génétique et environnement (Corpet, 1996). Pour établir le lien entre environnement et cancer, et notamment entre alimentation et cancer, l'épidémiologie ne suffit pas, aussi l'expérimentation animale est-elle nécessaire pour préciser ce lien.

De nombreuses études confortent l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif est impliqué dans les mécanismes et les processus pathologiques tel que le cancer (Melvin et Suresh, 2002 ; Baynes et Thorpe, 1999 ; Williamson et Kilo, 1989). Le stress oxydatif entraîne une augmentation des marqueurs de la présence de radicaux libres les quels réagissent avec les substrats oxydables (glucose, protéines, acides gras) et génèrent des réactifs carbonyles, dont les effets cellulaires sont multiples : oxydation de protéines, peroxydation de lipides, modification de l'expression de gènes, et modifications de l'ADN (Lee *et al.*, 1994-1997 ; Sinclair *et al.*, 1992 ; Arai *et al.*, 1987).

La réalité de ces phénomènes qui est attestée par l'affaiblissement des défenses antiradicalaires : diminution des teneurs tissulaires en composés piègeurs de radicaux libres (ubiquinol, glutathion, vitamine C, caroténoïdes, vitamine A, vitamine E) et diminution des capacités de détoxification en l'occurrence l'activité des enzymes antioxydantes (Superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, glutathion réductase) ou encore par les effets typiques de l'attaque radicalaire (peroxydation des lipides et des protéines, en particulier), (Hiroyuki *et al.*, 1999 ; Ishibashi *et al.*, 1997).

La riposte de l'organisme qui devra développer des stratégies adaptatives et anticipatrices ou réactionnelles aux différents états nociceptifs.

Le Cancer du grand intestin et de l'intestin grêle sont les principaux cancers impliqués dans la morbidité et la mortalité à l'échelle mondiale (Greenlee *et al.*, 2000). Bien que le cancer du côlon a été bien étudié, les progrès accomplis dans la prévention ou de guérison de cette maladie n'a pas été significative. La cancérogenèse du colon est un processus que se développe en plusieurs étapes comprenant trois phases distinctes, l'initiation à modifier le message moléculaire d'une cellule normale, suivie par la promotion et la progression qui se termine en fin de compte par un phénotype transformé modifiant les mécanismes cellulaires (Pitot, 1986). Les études épidémiologiques et expérimentales suggèrent que le cancer du colon est fortement influencée par la nutrition et surtout par la composition des graisses alimentaires (Willet *et al.*, 1990).

De plus, l'implication pathologique de la persistance de stress oxydatif, conduisant à un dommage de l'ADN lié à la surproduction cellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives d'azote (RNS) qui sont également impliquées au cours du développement du cancer. Cette thématique s'emploie à intégrer ces interactions dans le domaine de la cancérologie où de nombreuses études s'intéressent à établir les relations entre le cancer et les variations de l'environnement et d'en expliquer les mécanismes (Bartsch et Nair, 2002).

Les agents chemo-preventifs sont appelés à exercer leur action anti-cancérigène en modulant la peroxydation des lipides (LPO) et le statut antioxydant dans le foie. (Stadler *et al.*, 1994 ; Van Leishout *et al.*, 1996). Plusieurs rapports suggèrent que des composés phénoliques peuvent également agir en tant que adjuvant chemo-preventif par le piégeage des agents cancérogènes induits par le stress oxydatif (Tanaka *et al.*, 1998 ; Thresiamma *et al.*, 1998). Les flavonoïdes qui sont des composés polyphénoliques naturels, possèdent un large éventail de propriétés pharmacologiques, notamment anti-cancérigènes et anti-inflammatoire (Ross et Kasum, 2002). L'héspéridine et la luteoline et les polyphénols sont connues pour leur action chemo-preventive contre les tumeurs malignes *in vivo* sans effets secondaires ou toxiques. Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires en inhibant la production de monoxyde d'azote (Kim *et al.*, 1999 ; Shimoi *et al.*, 1994).

L'azoxymethane (AOM) est un inducteur des tumeurs expérimentales chez les souris et les rats (Ohishia *et al.*, 2002). L'AOM est métabolisé dans le foie en méthyl-

azoxymethanol (MAM), cette réaction est catalysé par le cytochrome P450E1 (Sohn *et al.*, 1991).

La conjugaison du MAM à un électrophile fortement réactif le diazoniumion méthylique se produit dans le foie, provoquant un stress oxydatif intense. Ce nucléophile cellulaire de méthylate, endommage l'ADN (Tanaka, 1997 ; *Fiala et al.*, 1987). Les mutations acquises à l'ADN, ont ce fait comme conséquence la prolifération de cellules, menant à la carcinogenèse cellulaire (Yang *et al.*, 1996). On a également rapporté que l'AOM cause aussi un stress oxydant au niveau de la muqueuse du côlon (Tanaka *et al.*, 1997).

On sait que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) augmentent dans les maladies chroniques de l'appareil gastro-intestinal (Girgin *et al.*, 2000), mais les mécanismes précis associant le stress oxydant comme étant inducteur de cellules cancéreuses colorectal demeure peu clair. Des changements au niveau de quelques paramètres de système antioxydant dans le cancer colique ont été rapportés (Skrzydowska *et al.*, 2003). De plus l'amélioration des atteintes oxydatives en piégeant les radicaux libres formés pendant le stress oxydant (OSS) pourrait protéger les cellules contre la cancérogénicité (Ketterer *et al.*, 1990).

Au cours de la carcinogenèse deux points essentiels ont été rapportés, des niveaux élevés de la peroxydation de lipides (LPO) et un épuisement des antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (Manju et Nalini, 2005).

Dans le présent travail, nous avons voulu étudier l'effet initiateur et promoteur de l'AOM sur des rats wistar auxquels nous avons associé un traitement chemo-préventif à base d'antioxydant végétal la glisodine, une SOD extraite du melon, conjuguée à une protéine du blé la gliadine. Le premier objectif de cette étude expérimentale est de déterminer quel serait le degré de l'implication des radicaux libres dans l'évolution de la cancérogenèse colique chez ce modèle animal dont l'écologie intestinale est proche du côlon humain. Ces effets ont été observés dans notre étude à partir de lésions pré-néoplasiques : les microadénomes (Bird, 1987). Le second objectif, est ce que la glisodine utilisée dans notre protocole en tant que piègeur radicalaire afin d'atténuer l'intensité du stress oxydant, pourrait avoir indirectement une action prophylactique sur la cancérogenèse colique.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Présentation

L'ensemble des traitements et des protocoles expérimentaux ont été réalisés en conformité avec les principes et recommandations de santé animale (NIH publication No.85-23 révisée 1985). Le matériel biologique que nous avons choisi est le rat femelle albinos *Rattus rattus* de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Ces rats sont des mammifères nocturnes de l'ordre des rongeurs.

La puberté survient entre 50 et 60 jours après la naissance chez les deux sexes. un rat peut vivre de 2 ½ à 3 ans dépendant de la souche, du sexe, des conditions environnementales et d'autres variables (Baker *et al.*, 1980).

A leur arrivée ces rats pesaient entre 100 et 120 grammes, et au moment de l'expérimentation, elles pesaient en moyenne 200 ± 20 grammes.

Chaque rat était logée individuellement et une période d'acclimation de 10 jours a été allouée aux rats avant le début des manipulations.

2.1.2. Lieu d'élevage

Les animaux sont élevés dans des cages translucides en polyéthylène qui sont nettoyés régulièrement et la litière, composée de copeau de bois, est changée tous les deux jours. Ces animaux sont dociles et faciles à manipuler, ils sont répartis en quatre lots expérimentaux de cinq rats chacun.

01 lot témoin	T
01 lot témoin de la Glisodine	SOD
01 lot Azoxyméthane	AOM
01 lot Azoxyméthane + Glisodine	AOM + SOD

2.1.3. Conditions d'expérimentation

Les conditions sont caractérisées par une hygrométrie de 50%, une température de 22 à 24°C, les animaux sont manipulés par les mêmes expérimentateurs afin d'éviter tout stress.

L'alimentation fournie aux rats est composée de maïs, d'orge et de lait (GAE: Groupe Agricole de l'Est, El Harrouch). L'eau est servie dans des biberons, *ad libitum*.

2.2. Méthodes

2.2.1. Application des traitements

2.2.1.1. Induction du cancer du côlon

Le cancer du côlon a été induit par l' Azoxyméthane (AOM) qui est un composé chimique cancérigène et neurotoxic. Il est oxyde de azomethane. Il est particulièrement efficace en induisant des carcinomas du côlon chez les rats et les souris. Il a été employé dans les études évaluant l'efficacité du traitement préventif pour la carcinogenèse.

Tableau 01: La structure chimique et propriétés de l'Azoxyméthane

Azoxymethane	
Nom d'IUPAC	
Methyl-methylimino-oxidoazanium	
d'autres noms	
Dimethyldiazene-1-oxide	
Propriétés	
<u>Formule moléculaire</u>	C ₂ H ₆ N ₂ O
<u>La masse molaire</u>	74.08 g mol ⁻¹

Densité 0.991 g/mL

Point d'ébullition 97-99 °C

Des changements ou les anomalies signalisation de transformation de facteur de croissance bêta (TGF- β) sont détectés dans les tumeurs développées par des rats traitées avec AOM.

L'Azoxymethane active la kinase intrinsèque de tyrosine du récepteur d'EGF tout en stimulant la synthèse de TGF- α .

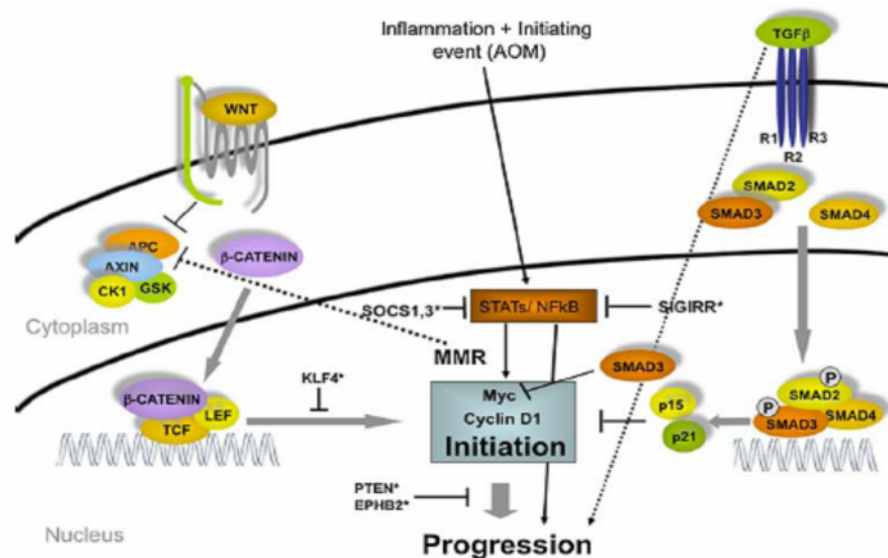


Figure 01: Molecular pathways associated with colorectal cancer. Two major pathways, WNT and TGF β , converge in the nucleus to effect Myc expression. Murine models for human CRC have been developed by genetically altering many components of these two pathways. * = modifiers of cancer initiation and progression (Joshua. M. Uronis and David. W. Threadgill, 2009).

L'AOM (MO Sigma Chemical) a été injectée par voie intra péritonéale a raison de 15 mg/Kg du poids vif à raison d'une injection par semaine pendant deux semaines.

2.2.1.2. Traitement antioxydant par la SOD végétale (Glisodine)

Puissante enzyme antioxydante naturelle, la SOD agit à la source même de la réaction en chaîne induite par les espèces réactives de l'oxygène et constitue donc le

premier et l'un des principaux maillons du processus de défense contre les radicaux libres. Malheureusement, en raison de la fragilité de sa structure moléculaire, la SOD non protégée est inactivée dans le tube digestif. Grâce à un procédé de couplage à la gliadine, protéine extraite du blé, on dispose désormais d'une SOD d'origine végétale (extrait de melon riche en SOD) bioactive par voie orale. Plusieurs études *in vivo* chez l'animal ainsi qu'une étude clinique chez des volontaires sains ont effectivement confirmé le maintien de l'activité antioxydante de l'enzyme SOD après absorption par voie orale, action par ailleurs combinée à des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices.

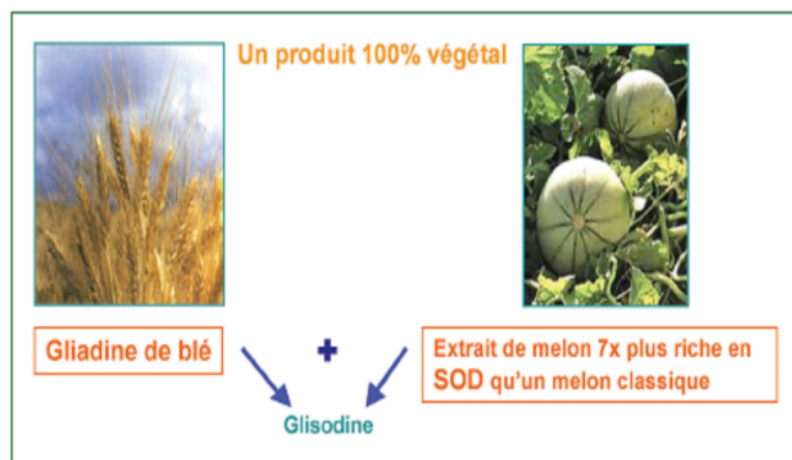


Figure 02: La Glisodine (Super oxyde dismutase + Gliadine), une formule végétale originale

Nous avons utilisés la Glisodine, une formule végétale, constituée d'un extrait de melon (*Cucumis melo* LC) riche en SOD, couplé à une molécule de gliadine, protéine extraite du blé. La gliadine est une prolamine végétale (biopolymère) qui empêche non seulement la digestion de la SOD dans l'estomac mais favorisent également la livraison de la molécule bio active dans la muqueuse intestinale.

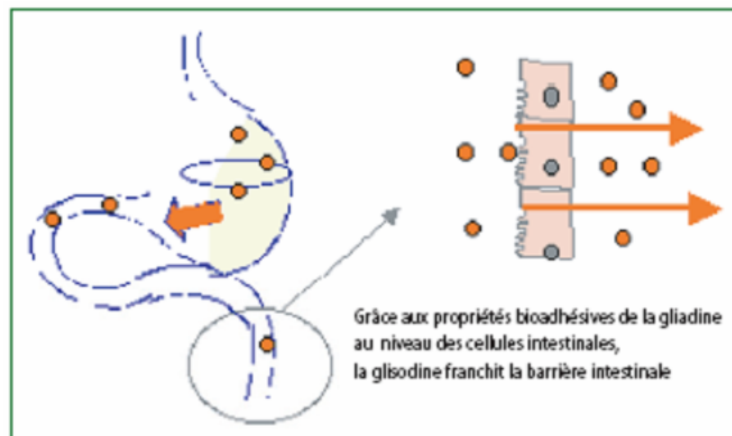


Figure 03: Représentation schématique du transit et de l'absorption intestinale de la SOD couplée à la gliadine.

La Glisodine est administré *per os* à raison de 300 mg/Kg/j pendant toute la période expérimentale (12 semaines). La solution mère étant préparée extemporanément dans du NaCl 9%.

2.2.2. Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins sont effectués par décapitation après 12 semaines de traitement, ils doivent s'effectuer rapidement et proprement, car divers facteurs sont susceptibles d'altérer ou de modifier la qualité du plasma, le sang est recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA, puis centrifugé à 4000tr/min pendant 15 minutes; le plasma obtenu est aliquoté et conservé à une température de -20°C pour les dosages biochimiques (LPO).

2.2.3. Dissection et prélèvement d'organes

L'animal est pesé ensuite sacrifier, puis fixé en décubitus dorsal sur une plaque en liège; une incision est pratiquée de l'orifice uro-génital jusqu'au cou, le foie et la ratte sont prélevés à l'aide d'une pince fine sous glace et pesés à l'aide d'une balance de précision.

Le foie est broyé dans du tampon phosphate saccharosé (pH= 7.5) et centrifugé à 1500 tr/min pendant 20 min, le surnageant est récupéré puis conservé à - 80°C pour les dosages du glutathion réduit (GSH), de la glutathion-S-transférèse (GST), de la catalase (CAT) et du super oxyde dismutase (SOD).

Les côlons sont enlevés et mesurés sur une papier millimétrique puis ils sont rincés avec salin, et ouverts longitudinalement de l'anus au caecum. les côlons ouverts sont fixés en formaline protégée par 10% pendant 24h pour l'observation microscopique et dosage des bio marqueurs.

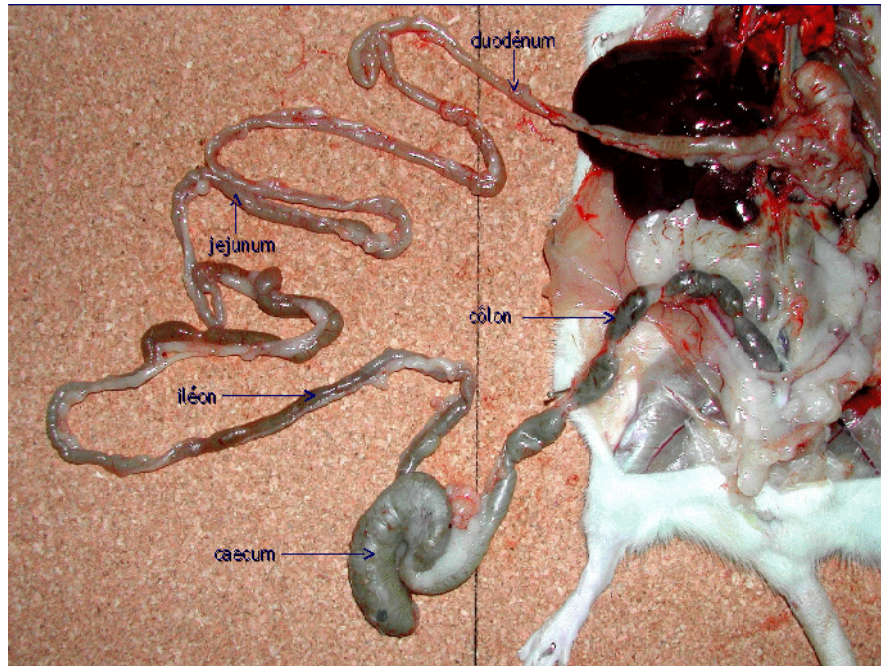


Figure 04 : Mise en évidence du côlon après dissection du rat

2.2.4. coloration et comptage des ACF (aberrant crypt foci) :

Mise en évidence de foyers de cryptes aberrantes (ou aberrant crypt foci : **ACF**) sur des colons (rat ou souris) entiers fixés à plat dans la formaline 10% Sigma. Coloration du colon avec du Bleu de Méthylène. Observation microscopique (x40) de la totalité de la surface de la muqueuse colique. Comptage des ACF et du nombre de cryptes qui les constituent.

Qu'est ce qu'un ACF ? Découverts par Bird (1987) qui considère les ACF comme des lésions preneoplasiques du cancer du colon (prédictrices de tumeurs). Depuis, les ACF ont été largement utilisés, à finalité biologique, pour évaluer l'induction ou la modulation de la carcinogenèse colique chez le rat ou la souris.

2.2.4.1. Mode opératoire

❖ Préparation des solutions de Bleu de Méthylène (BM) :

- Solution mère à 2% dans de l'eau distillée : peser 4 g de BM dans un flacon opaque, ajouter 20 ml d'eau distillée, agitation magnétique
- Solution pour la coloration des colons : BM 0.05% : 1ml de la solution mère à 2% dans 39 ml d'eau (utilisée pour colorer environ 4-5 colons)

❖ **Coloration** : les colons ont été coupés en 2 parties (distal coté rectum et proximal (côté cecum), on colore simultanément les 2 morceaux.

- Rinçage par passage dans eau distillée (car les colons sont stockés dans du formol)
- Coloration dans bain de BM 0.05%, muqueuse vers le haut (dans 2 boîtes rectangulaires 6*3cm)

❖ **Précautions :**

- Utilisation d'un plateau agitant
- Vérifier que le colon trempe entièrement dans la solution (attention à la zone centrale).
- Durée de coloration : 6-7 min pour les 2 premiers colons , ensuite 10 min (en effet le BM se dilue au contact des colons
- Surveiller la coloration : le BM commence par colorer les noyaux puis l'ensemble des tissus. s'assurer que tous les ACF sont colorés . (aspect global du colon : bleu sombre).

Lecture : si 2 lecteurs : lire toujours la même partie du colon en premier.

L'ordre des colons est aléatoire et la lecture est dite « en aveugle » car les colons sont codés (2 lettres).

Lame de verre graver sur l'envers des traits distants de 4mm (correspond au diamètre du champ au grossissement 10 x4) . Cela permet de balayer toute la surface du colon. Mettre le colon sur la lame (muqueuse (côté bombé) en haut . Quand on Jouer sur l'éclairage.

❖ **Critères de différenciation par rapport aux cryptes normales :**

- Coloration : plus intense
- Forme : allongée (lumière des cryptes dilatée parfois tortueuse)
- Paroi : épaisse
- Taille : 2-3 fois supérieure
- Structure surélevée
- Regroupement net en foyer.

2.2.5. Protocole expérimental

Les différentes étapes du protocole sont présentées dans le tableau récapitulatif suivant:

Tableau 02: Protocole expérimental

Lots	Traitements
T	Injection d'une solution saline NaCl 9%
SOD	Administration de la Glisodine par voie orale à raison de 300 mg/Kg/ poids vif pendant 12 semaines.
AOM	Injection intra péritonéale de l'azoxyméthane à raison de 15 mg/kg de poids vif à raison d'une injection par semaine pendant deux semaines.
AOM+SOD	Injection de l'AOM + administration de la Glisodine.

2.3. Exploration du statut antioxydant

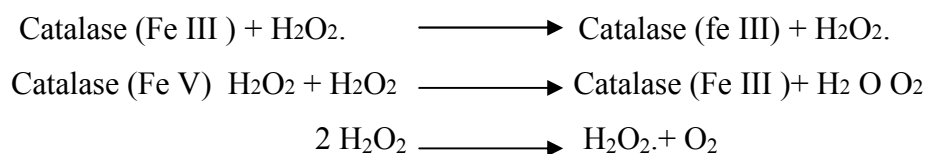
2.3.1. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

🧪 Préparation de l'homogénat

- Mettre 500 mg du côlon en présence de 4 ml d'une solution de Tampon Phosphate à 0.1 M.
- Broyer le mélange aux ultrasons pendant 35 secondes à une température de 4°C.
- Centrifuger à 500 tours/ min pendant 15 minutes.

A. Principe

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramétriques, chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces oxygénées, en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule, en eau et en oxygène (regoli et Principato,1995).



B. Mode opératoire:

L'activité catalase (CAT) est mesurée selon Luck (1963) et Aebi (1983) à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 mn à pH 7.5, 100 μ l de H_2O_2 5500 mM sur 20 μ l du sang hémolysé, à une température d'incubation de 25°C. Les réactifs ont pour origine Sigma Aldrich. Les résultats ont été exprimés en μ mole d' H_2O_2 par minute et par mg protéine.

Tableau 03: Protocole utilisé pour le dosage de l'activité du CAT

Réactifs	ESSAI	BLANC μ l
T. phosphate 100 Mm; pH= 7.5	780	800
H_2O_2 500 mM	200	200
Homogénat	20	0

On note que la quantité d'homogénat doit être déterminée en fonction de la quantité des protéines qui est comprise entre 8 et 12 g/dl soit une quantité de 10 à 20 μ l d'homogénat. L'activité décroissant rapidement, il est important de mettre toujours le même temps entre le pipetage et le moment où l'on place la cuve dans le durant 60 secondes de mesure; le coefficient d'extinction étant de 0.040Mm.cm, l'activité CAT peut être calculée selon l'équation suivante:

$$CAT (\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg Hb}) = \frac{(\Delta DO \times 10)}{\epsilon \times L \times X}$$

ϵ : coefficient d'extinction ,

L = 1

X : protéine en mg

2.3.2. Dosage des protéines tissulaires

A.Principe

Les ions cuivriques dans un milieu alcalin interagissent avec les ions peptidiques des protéines formant un complexe coloré (Weichselbaum, 1946 ; Gornall *et al.*, 1949).

B. Mode opératoire

La quantification des protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976), nous avons utilisé 100 µl du surnageant de chaque organe homogénéisé avec 4 ml de bleu brillant de comassie (BBC) (G250), Merck) comme réactif. Le mélange est agité et laissé à T° ambiante pendant 5 mn pour la stabilisation de la couleur (pour le blanc à la place du surnageant on met l'eau distillée). La lecture s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm.

Pour la gamme d'étalonnage nous avons utilisé le sérum albumine de bœuf (Sigma, France) comme standard selon les indications ci-dessous :

Tableau 04 : Réalisation de la gamme d'étalonnage

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution d'Albumine (BSA µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

2.3.3. Dosage de l'activité du glutathion (GSH)

Le glutathion (8-glutamyl-cystéinyl-glycine) est un tripeptide constitué d'acide glutamique, cystéine et de glutamine. Le GSH est requis pour l'activité de plusieurs enzymes, dont il participe avec la glutathion réductase à l'établissement de ponts disulfures dans de nombreuses protéines et dans des hormones polypeptidiques et prend part au métabolisme des xénobiotiques. Présent dans la majorité des tissus, le glutathion joue un rôle principal dans la réduction de tout peroxyde organique et non organique, en présence de la glutathion peroxydase (GPx). ainsi, il intervient dans les réactions de neutralisation des maladies intermédiaires toxiques produits par la méthylation de quelques médicaments, hormones, électrolytes et des matières étrangères du corps en présence de la glutathion S-transférase (GST), et par conséquent dans l'élimination de leur toxicité.

A. Principe

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman) par les groupement (-SH) du glutathion. Le glutathion hépatique est dosé selon la méthode de Weckbecker et Cory, (1988) en utilisant le spectrophotomètre.

B. Mode opératoire

La procédure expérimentale du dosage du GSH est la suivante:

- Prélever 0.8 ml de l'homogénat.
- Ajouter 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalicytique (SSA) 0.25%.
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 minutes.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA, contenant 0.02 M d'EDTA; pH = 9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque à 0.01 M (dissous dans le méthanol absolu 99%).
- Laisser pendant 5 minutes dans la température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer l'absorbance optique à 412 nm.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante:

$$[\text{GSH}] \text{ nmol GSH/mg de protéines} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times [\text{protéines}]}$$

DO : densité optique.

1 : le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml SSA).

1.525 : le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1ml Tris EDTA + 0.025 ml DTNB).

13100 : coefficient d'absorbance (concernant le groupement –SH à 412nm).

0.8 : le volume de l'homogénat trouvé dans 1 ml.

0.5 : le volume du surnageant trouvé dans 1.525 ml.

On peut remarquer que la concentration du GSH est mesurée toujours par rapport à 1 mg de protéines. C'est pour cela que ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

2.3.4. Dosage de l'activité des GSTs

Les glutathion-S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliquées dans diverses opérations de transports de biosynthèses intracellulaires (Poonkuzhali *et al.*, 2001). Les GSTs représentent une importante famille enzymatiques dont la fonction est de conjuguer le glutathion réduit (GSH) à des composés électrophiles par formation d'un pont thioéther. Les produits sont ensuite métabolisés en acides mercapturiques puis excrétés dans les déchets liquides (bile, urine). La fonction des GSTs, la plus étudiée en ce qui concerne la prévention de la pollution dans l'environnement, demeure leur propriété de catalyser des réactions de conjugaison entre un peptide, le glutathion, et des macromolécules comme les acides nucléiques (ARN, ADN) .De ce fait, la conjugaison du glutathion avec certains substrats représente une étapes dans la formation de composés moins toxique et plus hydrosoluble que les molécules de départ (Chatterjee *et al.*, 1984).

A. Principe

La mesure de l'activité des GSTs consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde.

Il est possible quantifier cette absorption au moyen d'un spectrophotomètre et la valeur de la densité optique mesurée à 340nm est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST (Habig *et al.*, 1984). Les mesures de l'activité GST globale ont été réalisées en utilisant le CDNB (1-Chloro,2,4-Dinitro Benzène) qui est un substrat des différentes iso enzymes de la GST, ce qui permet la mesure globale des activités GSTs (Stein *et al.* 1998).

B. Mode opératoire

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est de Habig *et al.*(1984); celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans le cytosol sur un mélange GSH + CDNB à 37°C et à pH = 6.5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1min à 340 nm.

Tableau 05 : Protocole utilisé pour le dosage de l'activité GST

Réactifs	Blanc(μL)	Essai (μL)
Tampon phosphate pH=6.5	850	830
CDNB (20mM)	50	50
GSH (100mM)	100	100
Homogénat	–	20

Le protocole du dosage se réalise dans des cuves en quartz. Ces cuves ont été incubées à 37°C durant la manipulation. La valeur de la densité optique correspondant au blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme. Sachant que le coefficient d'extinction du GSH-CDNB, est de 9.6 Mm⁻¹. L'activité de la GSH a été mesurée par la formule suivante:

$$\text{Activité GST } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta\text{DO essai} - \Delta\text{DO blanc}}{9.6 \times [\text{protéines}]}$$

La concentration des protéines dans chaque échantillon était déterminée par la méthode de Bradford (1976) en recourant à une courbe d'étalonnage préalablement réalisée au moyen de l'albumine bovine sérique (BSA).

2.3.5. Dosage de l'activité de super oxyde dismutase (SOD)

L'activité de la super oxyde dismutase (SOD) est mesurée par la méthode de Beauchamps et Fridovich (1971) utilisant comme substrat la xanthine sigma 18 mM et la xanthine oxydase diluée à 0.25U/ml dans du nitrobleu de tétrazolium, la réaction commence après avoir rajouté 10 μl de l'échantillon. L'absorbance due à la conversion de la xanthine par la xanthine oxydase en acide urique et anion super

oxyde est lue sur un spectrophotomètre à 525 nm pendant 6 min. L'activité de la SOD est exprimée en Unité de xanthine oxydée par min/mg protéine.



Tableau 06 : Protocole utilisé pour le dosage du SOD

Réactifs	Blanc (µL)	Essai (µL)
Tampon phosphate INT pH=6.5	850	840
Xanthine	100	100
Xanthine oxydase	50	50
Homogéna	0	10

$$(\text{xantine oxydée } 50\% \text{ U /min/mg prot.}) = \frac{\text{DO/min} \times 3 \times 60}{-6.22 \times 0.2 \times \text{mg prot}}$$

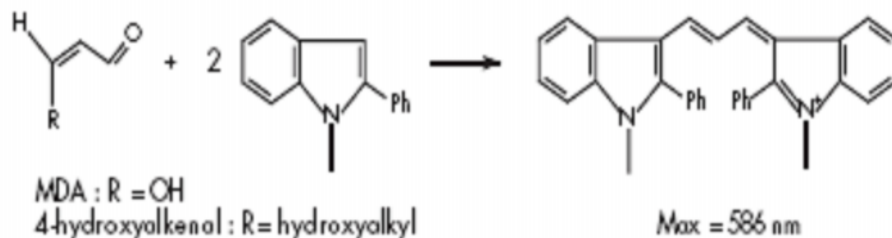
2.4. Dosages plasmatique

2.4.1. Dosage des lipoperoxides LPO

La peroxydation de lipide est un mécanisme bien établi des dommages cellulaires chez les deux plantes et animaux et est employée comme indicateur de l'effort oxydant dans les cellules et les tissus. Les peroxydes de lipide sont instables et se décomposent pour former une série complexe de composés y compris les composés carbonyles réactifs. Les peroxydes polyinsaturés d'acide gras produisent du malondialdéhyde (MDA) et de 4 hydroxyalkenals (HAE) sur la décomposition. Ces substances l'en tandem fournissent un biomarker simple pour la mesure de peroxydation générale de lipide (Esterbauer *et al.*, 1991). La méthode LPO-586 est plus adaptée pour mesurer MDA en combinaison avec 4 hydroxyalkenals

A. Principe

L'analyse LPO-586 est basée sur la réaction d'un réactif chromogène, N-méthyl-2-phénylindole (R1), avec MDA et 4 hydroxyalkenals à 45°C. Une molécule de hydroxyalkenal de MDA ou de 4 réagit avec 2 molécules de réactif R1 pour rapporter a chromophore stable avec l'absorbance maximale à 586 nanomètre.



Réactifs

- Réactif R1 N-méthyl-2-phénylindole in acetonitrile, 3 × 18 mL
- Réactif R2 Methanesulfonic (MSA), 1 × 16.5 mL
- MDA standard 1,1,3,3- Tetramethoxypropane (TMOP) in Tris- HCL, 1×1 mL
- Diluant Fer ferrique en méthanol, 1 × 30 mL.

B. Mode opératoire

La procédure expérimentale du dosage du MDA est la suivante:

- Préparer les standards selon le tableau 06 dans les tubes à essai de verre clairs ou des tubes de microcentrifuge de polypropylène.
- Ajouter 200 µl de l'échantillon à un tube à essai de verre .
- Ajouter 650 µl du réactif R1 dilué.
- Mixer le mélange doucement par le vortex.
- Ajouter 150 µl du HCl concentré (12 N).
- Mixer bien le mélange.
- Incuber à 45°C pour 60 minutes.
- Centrifuger les échantillons troubles (e.g., 15,000 × g pendant 10 minutes) pour obtenu d'un surnageant claire.
- Transférer le surnageant clair dans une cuvette.
- Mesurer l'absorbance à 586 nm.

Pour le dosage du LPO en fait les même étapes du MDA mais a la place du HCl en ajoute 150 µl de R2.

C. Calcule de la concentration

1. En utilise les données standard, calculent le A_{586} nette pour chacun standard en soustrayant (A_0) la valeur blanche de chacune des valeurs de A_{586} standard. Tracer le A_{586} nette contre [MDA], et exécuter une analyse de régression linéaire de A_{586} sur [MDA] :

$$[A_{586}] = \alpha [MDA] + b$$

2. Calculate la concentration de l'analyte dans chacun inconnu du A_{586} nette de l'échantillon (si un blanc témoin était exigé, soustrait le A_{Sb} de de l'absorbance nette d'échantillon.) :

$$[MDA] = \frac{A_{586}-b}{a} \cdot df$$

[MDA]: Concentration en μM de MDA dans l'échantillon.

A_{586} : Absorbance net à 586 nm de l'échantillon.

df : Facteur de dilution.

a : Coefficient de régression (pente).

b : Interception.

Table 07: Courbe des volumes standard de dilution

Target concentration of standard in reaction mixture, μM	0	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00
Volume of 20 μM standard to add (mL)	0	25	50	100	150	200
Volume of diH₂O or buffer used for diluting or mixing sample to add (mL)	200	175	150	100	50	0

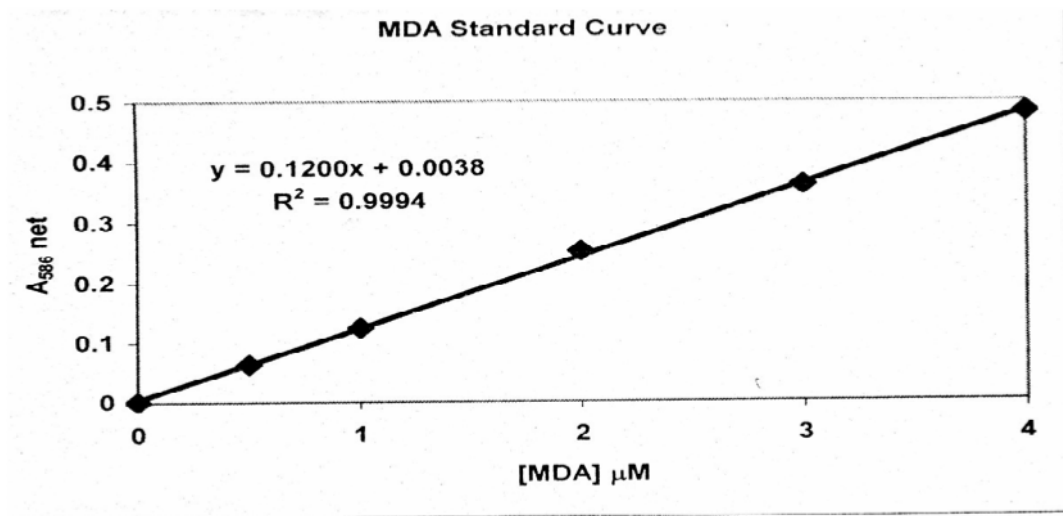


Figure 05: Example de MDA standard courbe

2.5. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes et écart-type. Nous avons utilisés le test d'analyse de la variance à deux critères de classification ANOVA et le test de Tukey pour comparer les moyennes entre elles d'une part et entre celles des témoins d'autre part.

3. RESULTATS

3.1. Etude pondérale:

Le suivi des paramètres métriques en l'occurrence, le poids corporel, le poids absolu et relatif du foie et de la rate exprimés en gramme chez les quatre lots (T, SOD, AOM, AOM+SOD) sont rassemblés dans les tableaux 8 , 9 ,10 et illustrés au niveau des figures 7, 8, 9.

3.1.1. Variation du poids corporel

Nos résultats montrent une augmentation significative du poids corporels chez les rats traités des lots AOM et AOM+SOD en comparaison aux rats témoins. (AOM: 259.2 ± 29.58 et AOM+SOD: 238.2 ± 46.39 vs T: 201 ± 13.89 , $P < 0.05$). (**Tableau 08, figure 07**). De plus le traitement *per os* des rats par la glisodine semble atténuer cette augmentation.

Tableau 08. Variation du poids corporel en grammes chez les rats témoins et traités

Lots	T	SOD	AOM	AOM+SOD
Poids corporel en (g)	201 ± 13.89	217.5 ± 15.02	$259.2 \pm 29.58^*$	$238.2 \pm 46.39^*$

- : * $p < 0.05$ vs T.

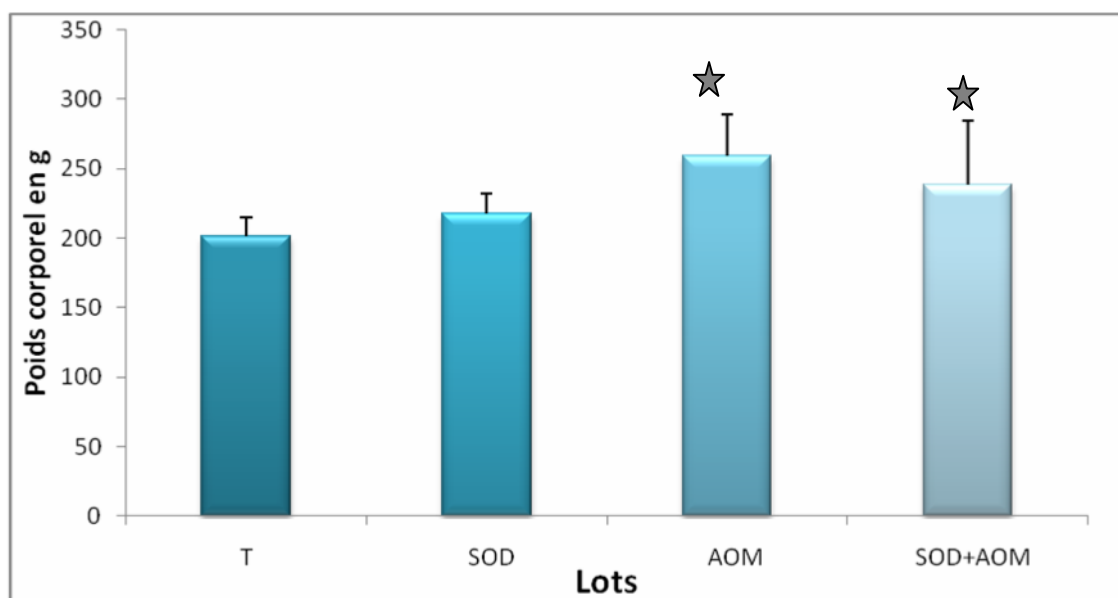


Figure 07. Variation du poids corporel en grammes chez les rats témoins et traités.

3.1.2. Variation du poids hépatique

Concernant la variation du poids absolu du foie de la même manière, les valeurs indiquent une augmentation significative du poids absolu du foie chez les rats des lots

AOM et AOM+SOD par rapport aux lots témoin (AOM: 8.18 ± 1.18 ; AOM+SOD: 7.504 ± 1.10 vs T: 6.058 ± 0.47 . $P < 0.05$). En revanche, aucune différences significative n'était enregistrée concernant le poids relatif chez les différents lots. (**Tableau 09** , **Figure 08**).

Tableau 09. Variation du poids absolu et relatif du foie en gramme chez les rats témoins et traités.

Lots	T	SOD	AOM	AOM + SOD
Poids absolus du foie (g)	6.058 ± 0.47	7.225 ± 2.38	$8.18 \pm 1.18^*$	$7.504 \pm 1.10^*$
Poids relatifs du foie (g/100g)	3.024 ± 0.30	3.345 ± 1.24	3.146 ± 0.18	3.166 ± 0.21

- :* $p < 0.05$ vs T.

- Poids relatif = (poids absolu individuel / poids corporel individuel) $\times 100$

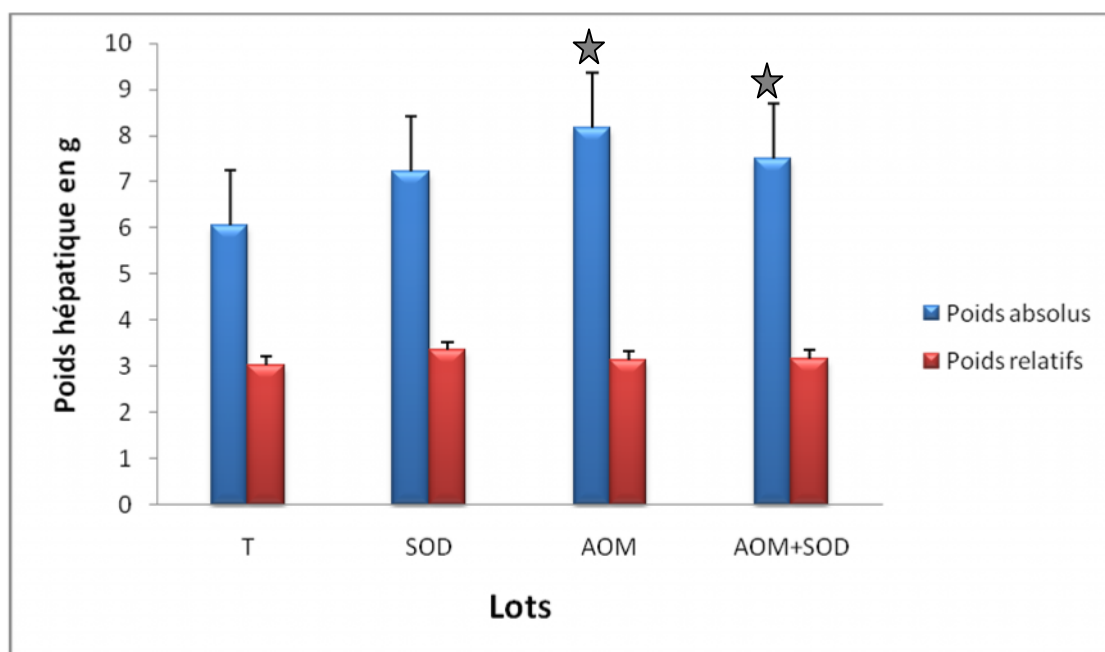


Figure 08: Variation du poids absolu et relatif du foie en gramme chez les rats témoins et traités.

3.1.3. Variation du poids de la ratte

Après 12 semaines de l'administration d'AOM à 15 mg/kg, le poids de la ratte a augmenté d'une manière significative en comparaison aux rats non traitées en l'occuences les rats témoins et ceux du lots SOD (AOM: 0.924 ± 0.18 vs T : $0.804 \pm$

0.12 et SOD : 0.767 ± 0.15 . $P < 0.05$). Cependant, la supplémentation orale de la glisodine à 300 mg/kg a diminué significativement le poids de la ratte chez le lot SOD comparativement au lot témoin T (SOD: 0.707 ± 0.15 vs T: 0.804 ± 0.12). Le traitement des rats AOM par la glisodine semble rétablir cette variation. (AOM + SOD : 0.82 ± 0.17 vs T : 0.804 ± 0.12 : non significatif) (**Tableau 10 et Figure 09**).

Tableau 10: Variation du poids de la ratte en gramme chez les rats témoins et traités

Lots	T	SOD	AOM	AOM + SOD
Poids de la ratte (g)	0.804 ± 0.12	$0.767 \pm 0.15^{*a}$	$0.924 \pm 0.18^{*}$	0.820 ± 0.17^{NS}

* $p < 0.05$ vs T et SOD, a $p < 0.05$ vs T

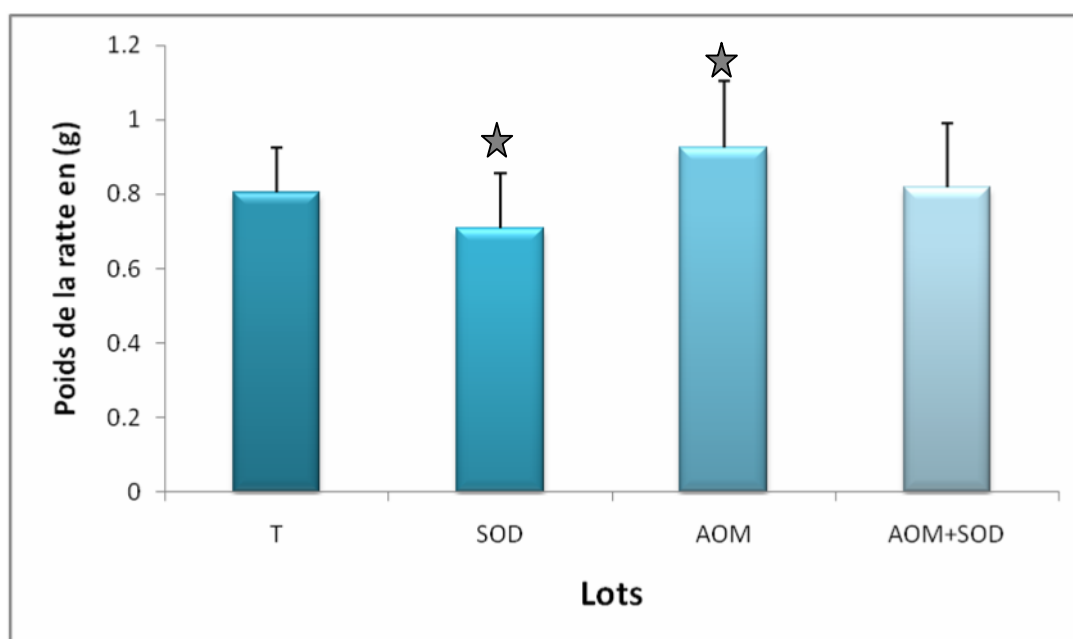


Figure 09: Variation du poids de la ratte en grammes chez les rats témoins et traités.

3.2. Etude morphométrique

Cette étude a été menée afin de mettre en évidence l'effet de l'adjuvant choisi, la glisodine sur l'évolution du processus cancérigène relatif à l'apparition des altérations précancéreuses suite à l'injection de l'AOM. Cette étude repose sur la quantification des foyers de cryptes abérents (ACF) au niveau du colon selon la méthode utilisée par Bird (1987).

L'observation en microscope optique des colons colorés au bleu de méthylène, se fait en aveugle (colon codés). Nous avons procédé au comptage du nombre d'ACF par colon et le nombre des cryptes par ACF. Les résultats sont présentés dans les tableaux 11 et 12 et illustrés par les figures 10, 11 et 17, 18.

3.2.1. Effet de la glisodine sur l'induction et la multiplicité des lésions précancéreuses ACF (foyer de cryptes aberrantes) induites par l'AOM chez le rat.

Nos résultats révèlent, que l' incidence des lésions précancéreuses présentent un pourcentage qui varie de 80 à 100 % chez les lots prétraités par L'AOM par rapport a aux lots non traités T et SOD. De plus la dministration de la glisodine a atténué cette fréquence (AOM : 100 % vs AOM+ SOD : 80 %).

En outre, le nombre total d'ACF par colon chez le lot AOM+SOD est significativement diminué par rapport au lot AOM seul (AOM+SOD: 108.6 ± 22.7 vs AOM: 156.4 ± 19.8 , $P < 0.05$). Cependant , nos résultats montrent clairement que la glisodine diminue la multiplicité des lésions néoplasiques, ceci apparait dans la dimunition significative des ACF multiples > 4 cryptes (AOM+SOD: 39.6 ± 11.3 vs AOM: 76.8 ± 9.5). (**Tableau 11 et 12, Figure 10 et 11**).

Tableau 11: Effet de la glisodine sur l'induction des ACF (aberrant crypt foci) par l'AOM chez les rats.

Lots	Incidence	Nb total ACF/colon
T	0/5 (0%)	0
SOD	0/5 (0%)	0
AOM	5/5 (100)	156.4 ± 19.8
AOM+SOD	4/5 (80)	108.6 ± 22.7 *

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n= 5) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- *p< 0.05 vs AOM

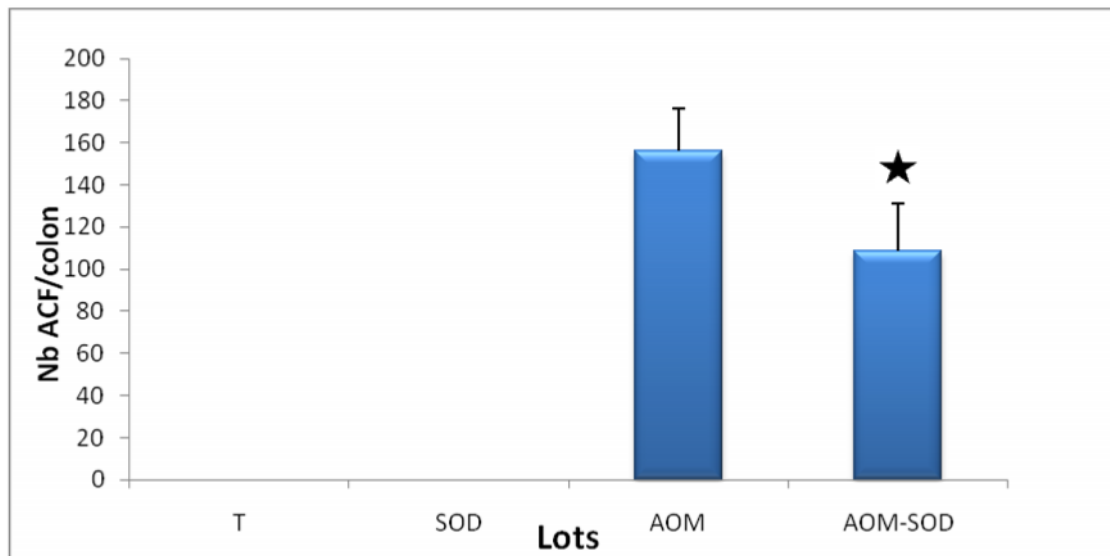


Figure 10: Effet de la glisodine sur l'induction des ACF (aberrant crypt foci) par l'AOM chez les rats.

Tableau 12. Effet de la glisodine sur la mutiplicité des ACF induit par l'AOM chez les rats.

Lots	ACF 2 cryptes	ACF 3 cryptes	ACF ≤ 4
T	0/5 (0%)	0	0
SOD	0/5 (0%)	0	0
AOM	43.5 ± 6.3 (27.81 %)	36.1 ± 4.7 (23.08 %)	76.8 ± 9.5 (49.10%)
AOM+SOD	38.7 ± 3.7 ^{NS} (35.63%)	30.3 ± 4.2 ^{NS} 27.90%	39.6 ± 11.3 * 36.46%

Multiplicité = Nb des crypte aberants/ACF/colon

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n= 5) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- *p< 0.05 vs AOM
- NS: non significatif

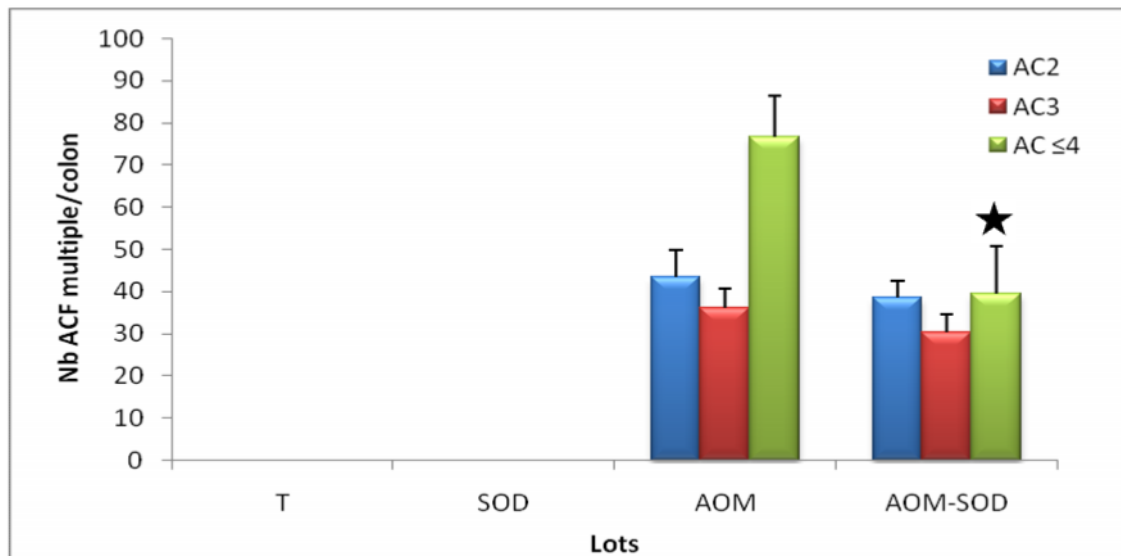


Figure 11: Effet de la glisodine sur la mutiplicité des ACF induit par l’AOM chez les rats.

3.3. Analyse du stress oxydant

Après notre expérimentation, les paramètres enzymatiques et non enzymatiques relatifs à l’état du stress oxydatif (OSS) ont été quantifiés au niveau plasmatique et colique.

3.3.1. Concentration de LPO plasmatique

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative de la concentration des lipoperoxides LPO chez les rats traités par l'azoxymethane par rapport aux lots Témoin et SOD (AOM: 21.8 ± 2.3 vs T: 12.70 ± 1.9 ; SOD: 10.78 ± 2.7 , $P < 0.01$). En effet, la supplementation *per os* de la glisodine aux rats AOM a diminué significativement la concentration du LPO plasmatique comparativement au lot no traité. (AOM+SOD: 16.53 ± 2.8 vs AOM: 21.8 ± 2.3 , $P < 0.05$) (**Tableau 13**, **Figuer 12**). Ce qui suggère un effet lipo-oxydatif de l’AOM et prophylactique antioxydant de la glisodine.

Tableau 13: Variation de la concentration plasmatique de LPO en nmol/ml chez les rats témoins et traités.

Lots	T	SOD	AOM	AOM + SOD
LPO nmol/ml	12.70 ± 1.9	10.78 ± 2.7^{NS}	$21.8 \pm 2.3^{**}$	$16.53 \pm 2.8^{*a}$

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n = 5) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey’s pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- * $p < 0.05$ vs T et SOD ;** $p < 0.01$ vs T et SOD ; a : $p < 0.05$ vs AOM
- NS : non significatif

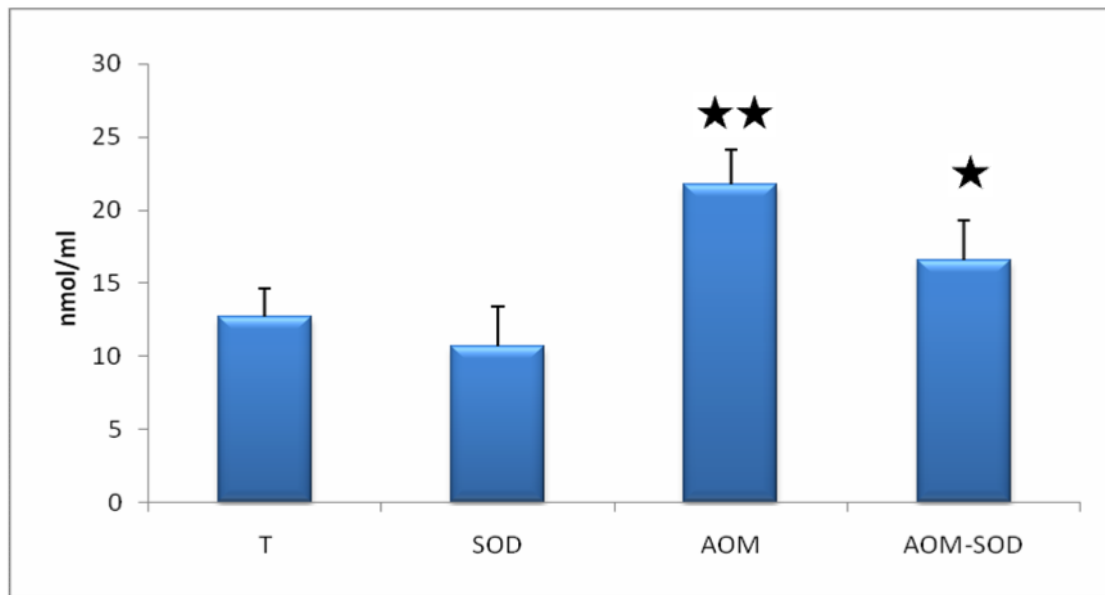


Figure 12. Variation de la Concentration plasmatique de LPO en nmol/ml chez les rats témoin et traités.

3.3.2. Activité de la super oxyde dismutase colique

Nos résultats révèlent d'une part, un accroissement significatif de l'activité de super oxyde dismutase chez les rats traités par la glisodine par rapport aux rats du lot témoin (SOD: 12.08 ± 1.9 vs T: 8.53 ± 1.6 , $p < 0.05$). d'autre part l'induction des altérations néoplasiques précancéreuse par l'AOM provoque une diminution hautement significative de l'activité du super oxyde dismutase comparativement au lot témoin et SOD (AOM : 3.82 ± 0.87 vs T : 8.53 ± 1.6 et SOD: 12.08 ± 1.9 , $P < 0.01$). De plus, le traitement des rats du lot AOM par la glisodine a augmenté significativement l'activité de super oxyde dismutase (AOM+SOD: 6.72 ± 1.07 vs AOM: 3.82 ± 0.87 . $P < 0.05$) (**Tableau 14, Figure 13**).

Tableau 14 : Variation de l'activité de la superoxyde dismutase en Unité/mg = 50% xantine oxydée/min/mg protéine chez les rats témoin et traités.

Lots	T	SOD	AOM	AOM+SOD
SOD50% U/min/mg	8.53 ± 1.6	$12.08 \pm 1.9^*$	$3.82 \pm 0.87^{**}$	$6.72 \pm 1.07^{*a}$

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n= 5) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- * $p < 0.05$ vs T; ** $P < 0.01$ vs T et SOD et a : $P < 0.05$ vs AOM

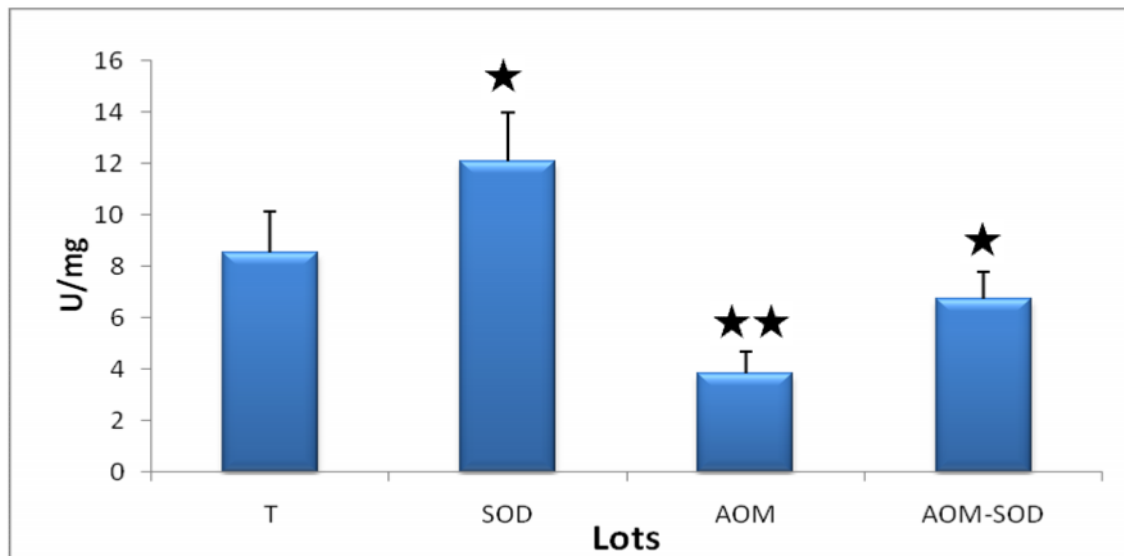


Figure 13. Variation de l'activité de la superoxyde dismutase en Unité/mg = 50% xantine oxydée/min/mg protéine chez les rats témoin et traités.

3.3.3. Aactivité de la catalase colique

De même, l'activité de la catalase s'exprime avec un profil comparable à celui de la SOD. Une diminution hautement significative chez les animaux présentant des néoplasies précancéreuses par rapport aux témoins et ceux traités par la SOD (AOM: 20.12 ± 1.3 vs T: 39.2 ± 2.4 ; SOD: 42.92 ± 4.1 , $P < 0.01$). Cependant, l'administration de la glisodine à ces rats améliore d'une façon significative l'activité de cette enzyme antioxydante (AOM+SOD: 30.65 ± 1.8 vs AOM: 20.12 ± 1.3 . $P < 0.05$) (**Tableau 15, Figure 14**).

Tableau 15. Variation de l'activité de la catalase en nmol H₂O₂ oxydé/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.

Lots	Témoin	SOD	AOM	AOM+SOD
CAT nmol/min/mg	39.2 ± 2.4	42.92 ± 4.1^{NS}	$20.12 \pm 1.3^{**}$	$30.65 \pm 1.8^{*a}$

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n= 5) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- * $p < 0.05$ vs T et SOD ; ** $P < 0.01$ vs T et SOD.
- a : $P < 0.05$ vs AOM
- NS : Non significatif

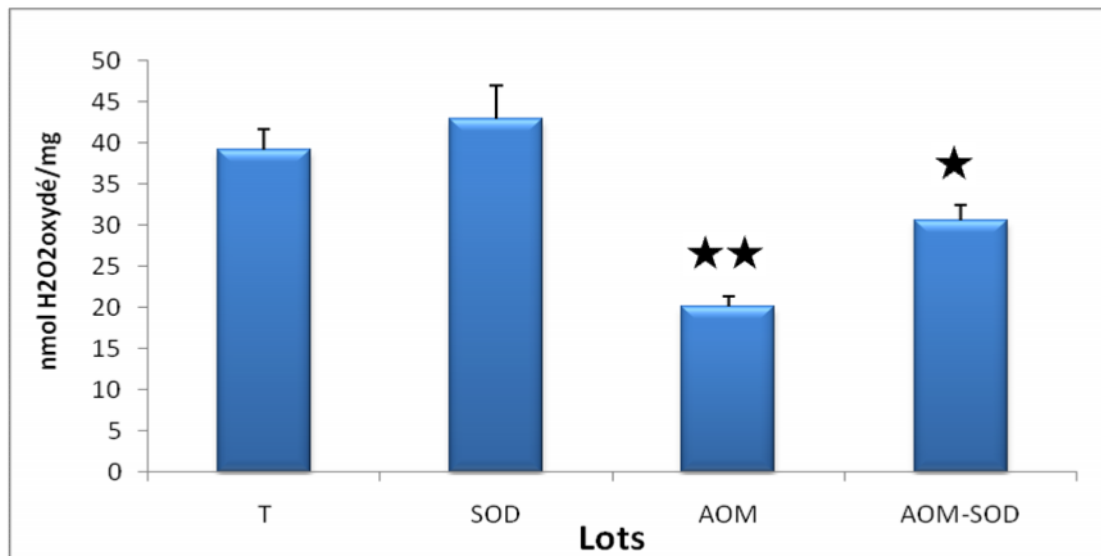


Figure 14. Variation de l'activité de la catalase en nmol H₂O₂ oxydé/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.

3.3.4. Activité de la glutathion-S-transférase colique

D'après nos résultats, l'activité de la GST colique chez les rats traités par l'azoxymethane montre une diminution hautement significative par rapport aux lots témoin et SOD (AOM: 76.8 ± 5.3 vs T: 122.5 ± 4.9 ; SOD: 127.05 ± 4.6 $P < 0.01$). Par contre, la supplémentation de la glisodine chez les rats traités par AOM a augmenté significativement l'activité de GST colique en comparaison avec le lot non traité (AOM+SOD: 91.2 ± 3.9 vs AOM: 76.8 ± 5.3 , $P < 0.05$). (**Tableau 16**, **Figure 15**).

Tableau 16. Variation de l'activité de la GST en nmol CDNB/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.

Lots	Témoin	SOD	AOM	AOM+SOD
GST nmol CDNB/min/mg	122.5 ± 4.9	127.05 ± 4.6^{NS}	$76.8 \pm 5.3^{**}$	$91.2 \pm 3.9^{*a}$

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ ($n = 5$) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- * $p < 0.05$ vs SOD ; ** $P < 0.01$ vs T et SOD
- a: $p < 0.05$ vs AOM
- NS : non significatif

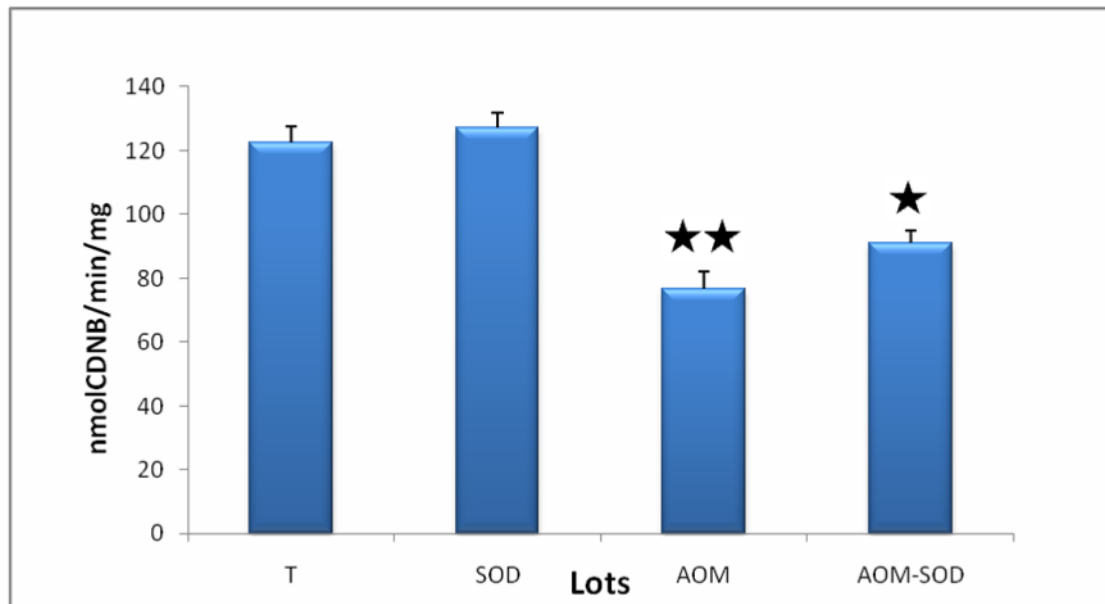


Figure 15. Variation de l'activité de la GST en nmol CDNB/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.

3.3.5. Teneur en glutathion colique

Les résultats illustrent une diminution hautement significative de l'activité du GSH chez les rats du lot AOM comparativement aux lots témoin et SOD (AOM: 19.88 ± 2.3 vs T: 41.70 ± 3.2 ; SOD: 43.21 ± 2.7 . $P < 0.01$). En revanche, l'administration de la glisodine chez les rats AOM augmente significativement l'activité du GSH (AOM+SOD: 28.53 ± 2.8 vs AOM: 19.88 ± 2.3 , $P < 0.05$).(**Tableau 17, Figure 16**).

Tableau 17. Variation de l'activité du glutathion réduit GSH en nmol/mg protéine chez les rats témoins et traités.

Lots	Témoin	SOD	AOM	AOM+SOD
GSH nmol /mg	41.70 ± 3.2	43.21 ± 2.7^{NS}	$19.88 \pm 2.3^{**}$	$28.53 \pm 2.8^{*a}$

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ ($n = 5$) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- ** $P < 0.01$ vs T et SOD ; a : $P < 0.05$ vs AOM
- NS : non significatif

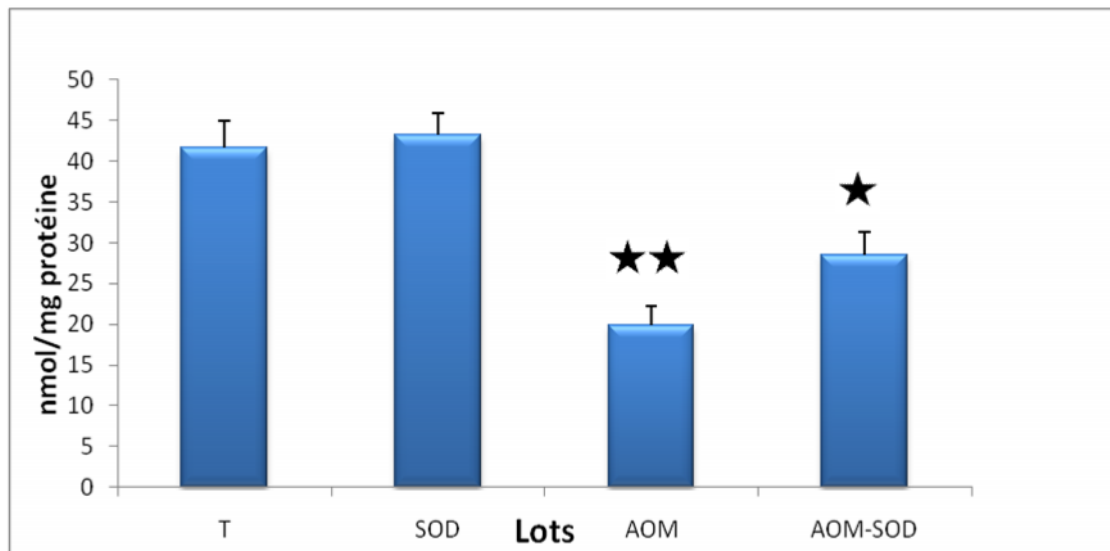


Figure 16. Variation de l'activité du glutathion réduit GSH en nmol/mg protéine chez les rats témoins et traités.

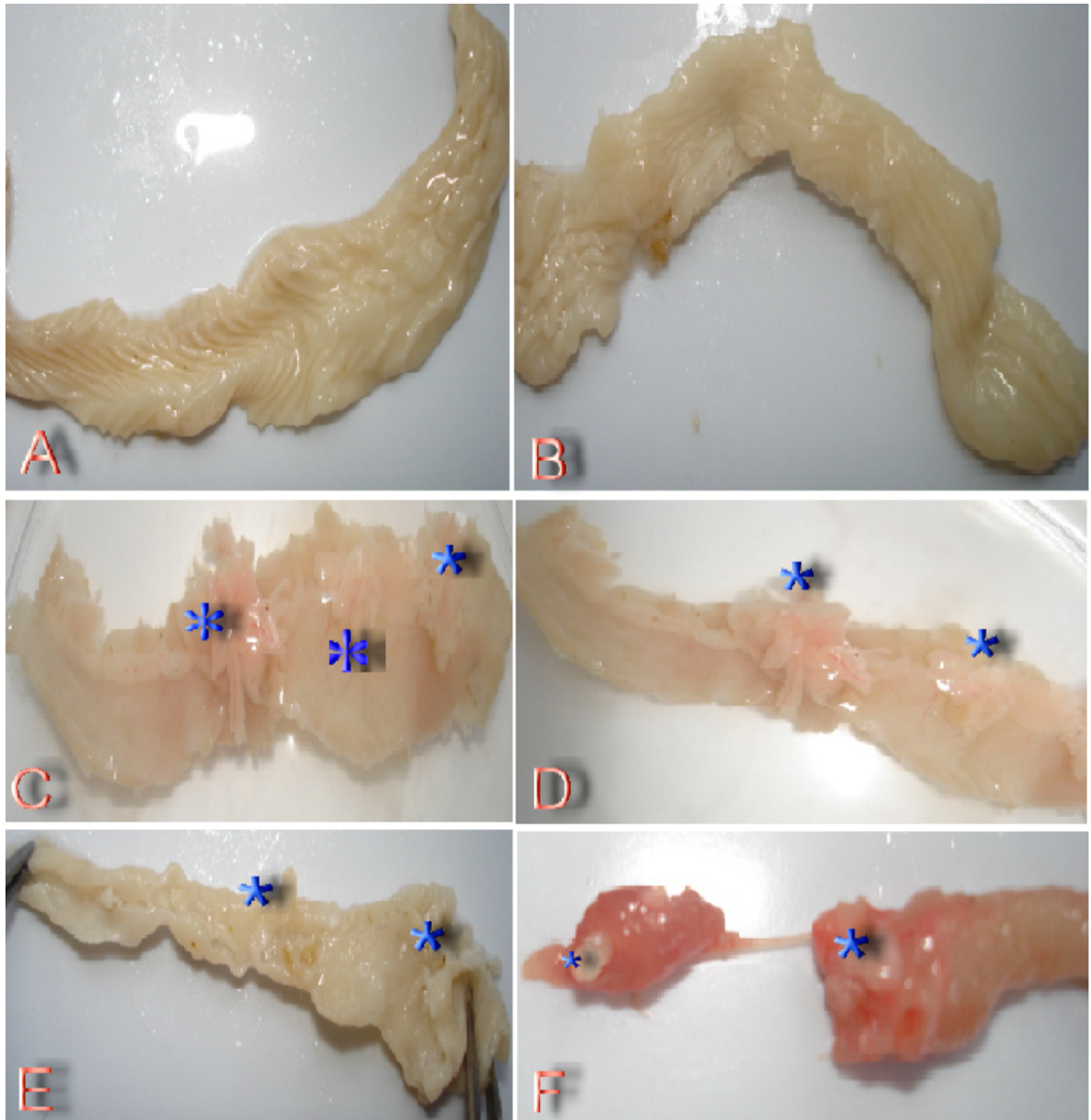


Figure 17: Vue macroscopique des colons de rats traités par l'AOM (C, D, E, F) montrant une présence de tumeurs (indiquées par *) en comparaison avec le colon de rat témoin (A) et de rat témoin traité par la gliosidine (B). F : partie distale d'un colon traité par l'AOM révélant des adénomes (*).

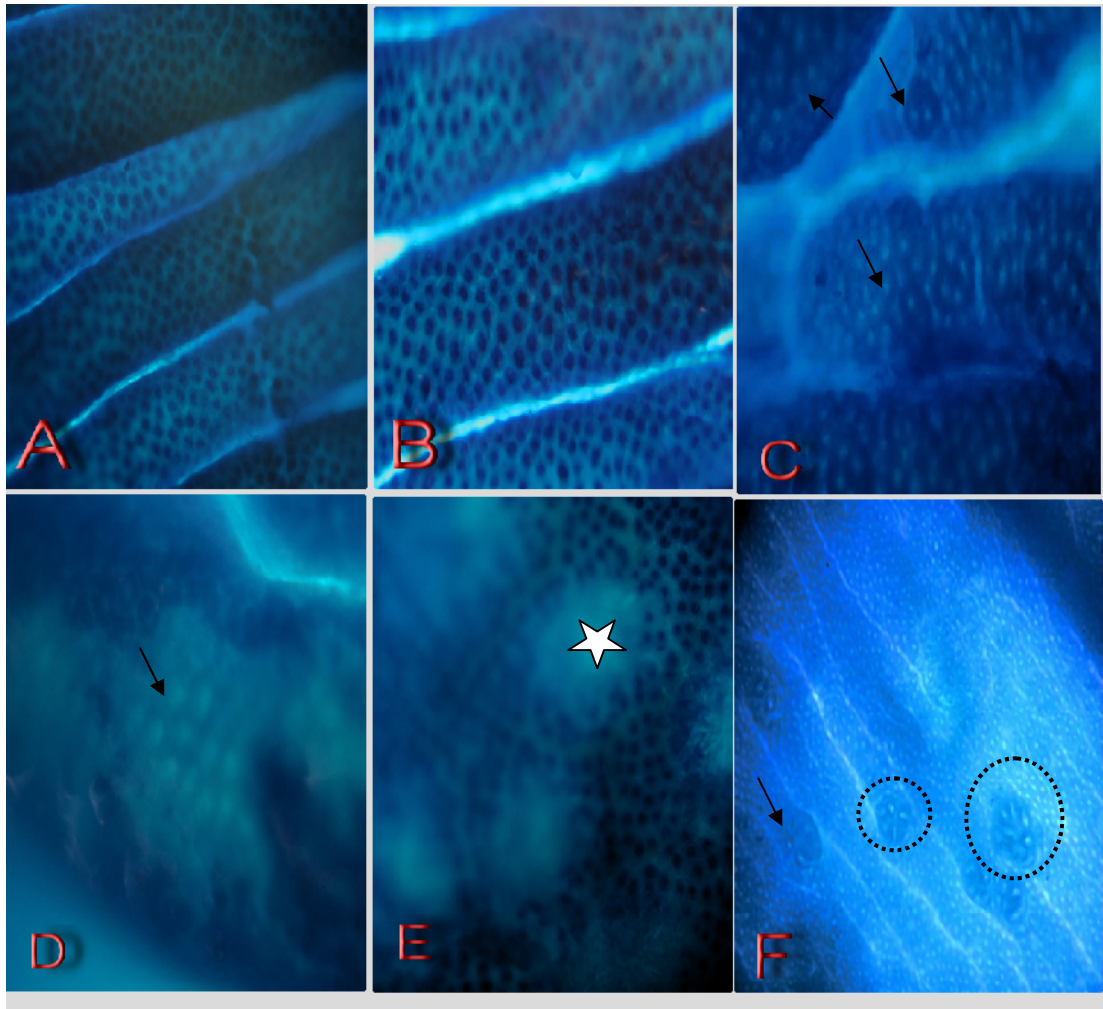


Figure 18 : Vue microscopique de colons colorés au bleu de méthylène selon Bird, de rats traités par l'AOM. (C, D, E, F) montrant des foyers de cryptes aberrantes ACF (flèche) en comparaison aux colons témoins et ceux traités par la glisodine (A, B). En C : ACF à 2, 3 et 4 cryptes (flèche) ; D : ACF multiples > 4 cryptes ; E : adénome précoce (étoile) ; F: ACF multicryptique du colon traité par AOM + SOD. Grossissement $\times 75$ et $\times 150$.

4. DISCUSSION

Beaucoup d'études épidémiologiques et expérimentales ont démontré que les antioxydants non-enzymatiques ont un effet chemo-preventif sur le cancer du colon (Sengottuvelan *et al.*, 2006 ; Devacena *et al.*, 2006). La plupart des études ont indiqué que la super oxyde dismutase est un biomarqueur important de l'états du stress oxydant, se présente comme une enzyme clé pour défendre l'organisme contre un radical libre très puissant l'anion super oxyde. Mais peu d'études ont apprécié l'effet des antioxydants enzymatiques tels que la SOD sur la carcinogénèse, par le fait que cette enzyme est rapidement détruite par le suc intestinal. En conséquence, la présente étude est consacrée à évaluer l'effet chemo-preventif de la glisodine une SOD végétale conjuguée à la gliadine une protéine de blé qui sert à protéger l'enzyme contre l'effet délétère du suc intestinal, sur un modèle expérimental de rat cancéreux.

La carcinogénèse colique est un processus multiple qui implique trois étapes : initiation qui modifie le message moléculaire d'une cellule normale, suivi de la phase de promotion et de la progression qui mène finalement à phénotypique de cellule transformée (Kinzler *et al.*, 1996 ; Pitot, 2002).

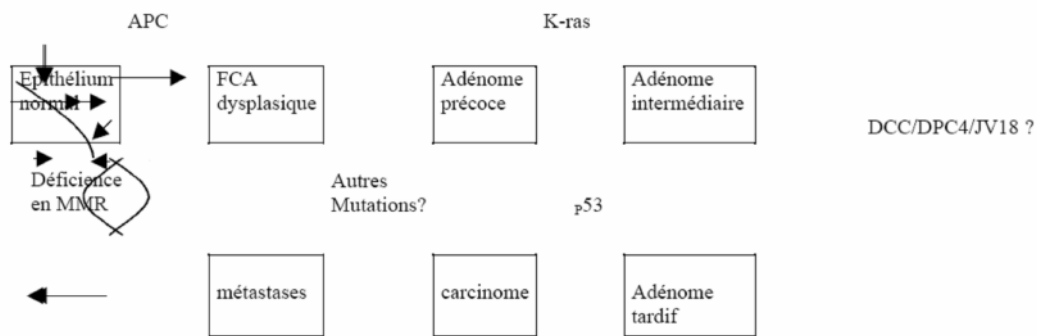


Figure 19 : Mutations génétiques associées à la cancérogenèse colorectale (Kinzler *et al.*, 1996).

Dans la présente étude, la glisodine n'a pas pu supprimer le développement des tumeurs chez les rats AOM. Toutes les rats traités par l'AOM, avec ou sans la SOD développent des foyers de cryptes aberrants (ACF) après 12 semaines de traitement, bien que le nombre de tumeurs chez chaque rat a diminué après la consommation *per os* de la glisodine. Concernant la formation des ACF à 12 semaines après l'injection

de l'AOM, la supplémentation chronique en SOD des rats a atténué de manière significative le nombre d'ACF et la multiplicité de foyers, en comparaison à ceux non traités. Cet effet d'atténuation de la glisodine sur la formation d'ACF est soutenu par les études précédentes qui ont prouvé que l'ingestion diététique des antioxydants diminue de manière significative la formation d'ACF (Ashokkumar et Sudhandiran, 2008 ; Sengottuvelan *et al.*, 2006).

Ces résultats suggèrent que l'ingestion de la SOD végétale atténue la carcinogenèse colique chez les rats, principalement à la phase d'initiation et pas suffisamment à la phase de promotion. L'effet suppressif de la SOD sur la carcinogenèse pourrait être provoqué par sa propriété antioxydante. Dans ce sens nos résultats indiquent une augmentation des malondialdéhyde plasmatiques (LPO), associée à une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes en l'occurrence l'activité de la SOD, de la catalase et de la GST, ce qui suggère l'installation d'un état de stress oxydant au cours de cette phase. L'administration *per os* de la glisodine chez les rats préalablement traités par AOM non seulement a atténué la formation des LPO mais aussi a amélioré le niveau de GSH et les activités de la GST, de la catalase et principalement de la superoxydes dismutase. Ces enzymes antioxydantes appartenant au système de détoxification jouent un rôle important défensif contre l'oxygène toxique, les radicaux libres et la peroxydation de lipide .Spécifiquement, ces enzymes sont impliquées dans l'élimination directe des métabolites réactifs de l'oxygène, responsables de l'apparition de diverses maladies comprenant le cancer du colon (Arthur 2000 ; Cerutti *et al.*, 1994).

Dans la présente étude, ces enzymes antioxydantes ont été activées chez les rats traités par la glisodine. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Ryosuke (2009) , Chandragiri *et al.*, (2008), Pandurangan et Ganapasam, (2008), Selvaraj *et al.*, (2008) , Vennila *et al.*, (2009) et Sattu *et al.*, (2009) montrant que les antioxydants tels que Berberine, Lutéoline, GSH, Hespertin, Morine, Hesperidin diminuent le nombre et la multiplicité des ACF en améliorant l'activité des enzymes antioxydantes. Ce ci suggère aussi que la glisodine pourrait moduler l'activité proliférative des cryptes de ce fait diminuer leur nombres.

En effet, plusieurs études ont montré que les extraits de plantes peuvent exercer des effets significatifs on diminuer l'incidence des ACF dans le colon et ont la capacité de contrôler les cellules cancéreuses *in vivo* et *in vitro* (Sriram *et al.*, 2008). Parmi ces extraits de plantes on pourrait citer, les haricots secs (*Phaseolus spp L*)

(Judith *et al*, 2007) ; les fruits (Boateng *et al*, 2006) ; oignon diététique (Sylviane *et al*, 2006) ; Red palm oil (Boateng *et al*, 2006) ; vin rouge polyphénole (Piero *et al*, 2005) ; Polyethylene glycol (Pernilla *et al.*, 2004) ; extrait des feuilles du ginkgo (Ginkgo biloba) (Rikako *et al*, 2004) ; polyphénols de thé (Yukiaki et Yukihiko, 1998).

Récemment, il est devenu admis que les inhibiteurs sélectif de la COX-2 ont un effet suppressif sur le cancer côlorectal (Rahme *et al.*, 2003 ; Harris *et al.*, 2008). En outre on a signalé qu'une dose élevée des inhibiteurs de COX-2 a eu un effet suppressif sur l'adénome côlorectal, bien que d'une part une dose clinique modérée n'ait pas montré la suppression efficace (Iwama, 2009). Concernant le rapport entre la COX-2 et le stress oxydant, le stress oxydant pourrait activer le facteur nucléaire NFkB (Gilmore, 1999). L'activation du NFkB nucléaire pourrait stimuler l'activité COX-2 (Panwalkar *et al.*, 2004 ; Rossi *et al.*, 2000). Dans la présente étude, la réduction du stress oxydant par l'ingestion à long terme de la SOD végétale pourrait moduler l'activation du facteur nucléaire NFkB menant à la suppression de la COX-2 (figure 01).

En conclusion, la présente étude indique que l'administration à long terme de la glisodine diminue le nombre d'ACF induit par AOM. Ces résultats suggèrent que l'administration chronique de SOD ait un effet protecteur sur la carcinogenèse colique chez les rats et que cet effet est médié en partie par la suppression de la cascade d'événements conduisant à un état de stress oxydant.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette présente étude a été accomplie dans le but d'évaluer les effets chimo-preventives de la glisodine, l'un des molécules naturelles de la classe des antioxydantes, chez les rats albinos femelles présentant un cancer du côlon provoqué par l'azoxymethane.

Cette problématique cruciale, à laquelle nous nous sommes intéressés, se résume dans le fait que l'induction du cancer colique par l'administration intrapéritonéale de l'azoxymethane à raison de 15 mg/kg de poids corporel chez les rats wistar provoque une perturbation du métabolisme et entraîne un état de stress oxydatif qui se révèle d'une part, par une augmentation hautement significative de la concentration plasmatique de LPO et une diminution significative du taux des enzymes antioxydant GST, CAT, SOD, GSH et d'autre part par la formation des ACF .

La supplémentation *per os* de la glisodine à raison de 300 mg/kg de poids corporel semble diminuer le nombre des ACF, la multiplicité des cryptes par ACF , la peroxydation des lipides et augmenter l'activité des enzymes antioxydants GSH, GST, CAT, SOD .

En conclusion, la glisodine peut agir comme un agent chimo-preventif contre le stress oxydatif cancérogène induit par l'azoxymethane .

A partir de ces résultats, il serait souhaitable de suivre nos recherche dans le cadre des théorèmes suivants:

- Suivre l'expression par immunohistochimie de quelques biomarqueurs précoces du cancer colorectal tels que l'AFP , COX-2 et la β -cathénine.
- Evaluer les profils des antioxydants non enzymatique piègeurs de radicaux libres principalement la vitamine E et vitamine D.
- Prolonger la durée du traitement à 44 semaines afin d'évaluer l'effet du traitement prophylactique sur l'apparition des adénocarcinomes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aebi, H.E.**, 1983. Catalase in HU bergmeyer (ED) methods in enzymatique analysis weintiem, Germany: *verlag chemie*. **3**: 278-282.
- Arai, K., Lizuka, S., Tada, Y., Oikawa, K., Taniguschi, N.**, 1987. Increase in the glycostylated form of erythrocyte CuZnDSOD in diabetes and close association of non enzymatic glycosylation with enzyme activity. *Biochom.Biophys.Acta*. **924**: 292-6.
- Arthur, J.R.**, 2000. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life. Sci*. **57**: 1825-35.
- Ashokkumar, P., Sudhandiran, G.**, 2008. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1-8.
- Baker, H.J., Lindsey, J.R., Weisbroth, S.H. (eds).**, 1980. The laboratory rat, Vol. II, *Researceh Application. Academic Press*. New York, NY.
- Bartsch, H., Nair, J.**, 2002. Potential role of lipid peroxidation derived DNA damage in human colon carcinogenesis: studies on exocyclic base adduct as stable oxidative stress markers. *Cancer Detect Prevent*. **26**: 308e12.
- Baynes, J.W., Thorpe, Sr.**, 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications; a new prespective on an old paradigm, *diabetes*. **48**: 1-9.
- Beachamps, C., Fridovich, L.**, 1971. Superoxide dismutase : improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem*. **44**: 276-287.
- Bird, R.P.**, 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen : preliminary findings. *Cancer letter*. **37**: 147-151.
- Bird, R.P., Good, C.K.**, 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol .Lett*. **112–113**: 395–402.
- Boateng, J., Verghese, M., Chawan, C.B., Shackelford, L., Walker, L.T., Khatiwada, J., Williams, D.S.**, 2006. Red palm oil suppresses the formation of azoxymethane (AOM) induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. *Food and Chemical Toxicology*. **44**: 1667–1673.
- Boateng, J., Verghese, M., Shackelford, L., Walker, L.T., Khatiwada, J., Ogutu, S., Williams, D.S., Jones, J., Guyton, M., Asiamah, D., Henderson, F., Grant, L., Debruce, M., Johnson, A., Washington, S., Chawan, C.B.**, 2007. Selected fruits

reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. *Food and Chemical Toxicology*. **45**: 725–732.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal biochem*. **72**: 248-254.

Cerutti, P., Ghosh, R., Oya, Y., Amstad, P., 1994. The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. **102**: 123-9.

Chandragiri, J.T., Ramakrishnan, P., Sivasithambaram, N.D., 2008. Effect of Berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Chemico-Biological Interactions*. **10**. 1016/j.cbi.

Chatterjee, S.K., Bhattacharya, M., Barlow, J.J., 1984. Murine monoclonal antibodies against galactosyltransferase from the ascites of ovarian cancer patients model. *Cancer Res*. **12**: 5725- 32.

Corpet, D.E., 1996. Introduction aux modèles utilisés en expérimentation animale.- *Alimentation et cancer, Paris Tec Doc*. **14**: 243-254.

Corpet, D.E., Tache, S., 2002. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr .Cancer*. **43**: 1–21

Devasena, T., Menon, V.P., Rajasekharan, K.N., 2006. Prevention of 1, 2-dimethylhydrazine -induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)- hepta -1, 6-diene-3, 5-dione during colon carcinogenesis. *Pharmacol Rep*. **58**: 229–35.

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. **82**: 72–77.

Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of ¹-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med*. **11**: 81-128.

Fiala, E.S., Sohn, O.S., 1987. Hamilton SR. Effects of chronic dietary ethanol on the in vivo and in vitro metabolism of methylazoxymethanol and methylazoxymethanol-induced DNA methylation in the rat colon and liver. *Cancer Res*. **47**: 5939e43.

Gilmore, T.D., 1999. The Rel/NF-KappaB signal transduction pathway: *introduction*. *Oncogene*. **18**: 6842-4.

- Girgin, F., Karaoglu, O., Erkus, M., Tuzun, S., Ozutemiz, O., Dincer, C., et al.,** 2000. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health.* **59**: 641e52.
- Gornall, A. C., Bradawill, C.J., David, M.M., 1949.** *J. Biol. Chem.* 177-751.
- Greenlee, R., Murray, R., Bolden, S., Wingo, P.A.,** 2000. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin.* **50**: 7-33.
- Habig, H.W., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.,** 1984. Glutathion S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J.Biol.Chem.* **249**: 7130-7139.
- Hiroiyuki, S., Shoishi, A., Miwa, I., Kiyohiro, I., Hiro Fumi, T., Hironori, Y., Yoshiko, Y., Shinjig Yoshishig, U., Takahito, K., Shigenobu, N.,** 1999. Significance of Gluthathine-Dependent antioxidant system in diabetes- Induced Embrunonic Malformations. *Diabetes.* **48**: 1138-1144.
- Ishibashi, M., Akazawa, S., Sakamaki, H., Matsimoto, k., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., Goto, S., Urata, Y., Kondo, K., Nagataki, S.,** 1997. Oxygen-induced embryopathy and the significance of glutathione- dependent antioxidant system in the rat embryo during early organogemess; *Free radic boil Med.* **22**: 447-454.
- Iwama, T.,** 2009. NSAIDs and colorectal cancer prevention. *J. Gastro-enterol.* **44**: 72-6.
- Joshua. M. Uronis., D. avid., W. Threadgill.,** 2009. Murine models of colorectal cancer. *Mamm Genome.* **20**: 261–268.
- Judith, A.B., Martha, V., Lloyd, T.W., Louis, A.S., Chandramohan, B.C.,** 2007. Inhibitory effects of selected dry beans (*Phaseolus spp L*) on azoxymethane-induced formation of aberrant crypt foci in Fisher 344 male rats. *Nutrition Research.* **27**: 640–646.
- Ketterer, B., Meyer, D.J., Taylor, J.B., Pemble, S., Coles, B., Fraser, G.,** 1990. GSTs and protection against oxidative stress. In: Hayes JD, Pickett CB, Mantle TJ, editors. Glutathione S-transferase and drug resistance. London: *Taylor and Francis Press*; p. 97e109.
- Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H, Kim, S.Y, Kim, H.P.,** 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* **58**: 759e65.

- Kinzler, K.W., Vogelstein, B.,** 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer.-, *Cell.* **87**: 159-170.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Jhonson, J.H., M.C., Garry, J.D., Unger, R.H.,** 1994. B-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte B-cell relationship. *Proc Nat Acad Sci USA.* **91**: 10878-82.
- Luck, H.,** 1963. Catalase in Bergmeyer, H.V. (ed), *Methods of enzymatic Analysis.* Academic press, New York, pp. 885-888.
- Manju, V., Nalini, N.,**2005. Chemopreventive effect of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clin Chim Act.* **358**: 60e7.
- Melvin, R., Suersh, C.,** 2002. Islet redox stress: the manifold toxicities of Insulin Resistance, Metabolic syndrome and amylin Derived Islet Amyloid in type 2 diabetes Mellitus; *Jop. J Pancreas.* **3 (4)**: 86-108.
- Ohishia, T., Kishimoto, Y., Miurab, N., Shiotac, G., Kohrid, T., Harae, Y., et al.,** 2002. Synergistic effects of epigallocatechin gallate with sulindac against colon carcinogenesis of rats treated with azoxymethane. *Cancer Lett.* **177**: 49e56.
- Panwalkar, A., Verstovsek S, S., Giles, F.,** 2004. Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer.* **100**: 1578-89.
- Pernilla, C.K., Roisin, H., Joseph, J.R., Robert, B.,** 2005. Polyethylene glycol reduces inflammation and aberrant crypt foci in carcinogen-initiated rats. *Cancer Letters.* **223**: 203–209.
- Piero, D., Cristina, L., Carlotta, D.F., Angelo, P.F., Lisa, G., Giovanna, C., Cinzia, C., Stefania, S., Carla, O., Alberto, C.,** 2005. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research.* **591**: 237–246.
- Pernilla, C.K., Roisin, H., Joseph, J.R., Robert, B.,** 2005. Polyethylene glycol reduces inflammation and aberrant crypt foci in carcinogen-initiated rats. *Cancer Letters.* **223**: 203–209.
- Pitot HC.,** 2002. *Fundamental of oncology.* Newyork: Marcer Dekker, Inc.
- Poonkuzhali, B., Shaji, R.V., Salamun, D.E., George, B., Srivastava, A., Chandy, M.,** 2001. Cytochrome P4501A1 and glutathion S transferase gene polymorphisms in patients with aplastic anemia in India. *Acta Haematol.* **14(3)**: 127-32.

- Rahme, E., Barkun, A.N., Toubouti, Y., Bardou, M.,** 2003. The cyclooxygenase-2-selective inhibitors refecoxib prevent colorectal neoplasia occurrence and recurrence. *Gastroenterology*. **125**: 404-12.
- Regoli , F.M., Principato, G.,** 1995. Glutathion-dependent and antioxydant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis*; exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biomarkers. *Aquatic Toxicology*. **31**: 143-164.
- Rikako, S., Hiroyuki, K., Shigeyuki, S., Keiko, S., Teruki, Y., Keiji, W., Takuji, T.,** 2004. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Letters* . **210**: 159–169.
- Ross, J.A., Kasum, C.M.,** 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annu Rev Nutr*. **22**: 19e34.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M et al .,** 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature (London)*. **403**: 103-8.
- Ryosuke, S., Takehiro, F., Tsukasa, K., Takashi, K., Lujie, M., Yasuhisa, S., Seiji, T., Takahiro, N., Ryuichi, I., Kazuma, F.,** 2009. Long-term ingestion of reduced glutathione suppressed an accelerating effect of beef tallow diet on colon carcinogenesis in rats. *J. Gastroenterol* . **44**: 1026–1035.
- Sattu, K., Gopalakrishnan, R., Pandi, A., Sundaram, J., Thiruvengadam, D.,** 2009. Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice., *Invest New Drugs*. **27**: 214–222.
- Selvaraj, A., Jayabal, P.S., Namasivayam, N.,** 2009. Hesperetin exerts dose dependent chemopreventive effect against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest New Drugs*. **27**: 203–213.
- Sengottuvelan, M., Senthilkumar, R., Nalini, N.,** 2006. Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1, 2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*. **1760**: 1175–83.
- Shimoi, K., Masuda, S., Furugori, M., Esaki, S.,** 1994. Kinase N. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in g-ray irradiated mice. *Carcinogenesis* .**15**: 2669e72.
- Sinclair, A.J., Lunec, J., Girling, A.J., Barnett, A.H.,** 1992. Modulators of free radical activity in diabetes mellitus: role of ascorbic acid; *diabetes*. **62**: 151-4

- Skrzydłewska, E., Kozusko, B., Sulowska, M., Zalewski, B., Kozowski, M., Snarska, J., et al., 2003. Antioxidant potential in esophageal, stomach and colorectal cancers. *Hepatogastroenterology*. **50**: 126e31.
- Sohn, O.S., Ishizaki, H., Yang, C.S., Fiala, E.S., 1991. Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis*. **12**: 127e31.
- Sriram, N., kalayarasan, S., Ashokkumar, P., Sureshkumar, A., Sudhandiran, G., 2008. Diallyl sulfide induces apoptosis in colon 320 DM human colon cancer cells: involvement of caspase-3, NF-kB, and ERK-2. *Mol Cell Biochem*. **311**: 157-65.
- Stadler, R.H., Turesky, R.J, Muller, O., Markovik, J., 1994. Leong Morgenthaler PM. The inhibitory effects of coffee on radical mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat Res*. **308**: 177e90.
- Stein, E.A., 1998. Prevention of heart disease: is LDL reduction the outcome of choice? Absolutely yes. *Value Health*. **1**(2): 120-4.
- Sylviane, T., Aelis, L., Denis, E.C., 2007. Chemoprevention of aberrant crypt foci in the colon of rats by dietary onion. *European Journal Of Cancer* . **43**: 454 –458.
- Tanaka, T., 1997. Effect of diet on human carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. **25**: 73e95.
- Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., 1997. Citrus auraptene exerts dose-dependent chemopreventive activity in rat large bowel tumorigenesis: the inhibition correlates with suppression cell proliferation and lipid peroxidation and with induction of phase II drug metabolizing enzymes. *Cancer Res*. **58**: 2550e6.
- Tanaka, T., Kojima, T., Suzui, M., Mori, H., 1998. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effects on tumor development and biomarkers expression of colon tumorigenesis. *Cancer Res*. **53**: 3908e13.
- Thresiamma, K.C., George, J., Kuttan, R., 1998. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res*. **17**(4): 431e4.
- Uronis, J.M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Bissahoyo, A.C., Hanlon, K., et al., (2007). Flat colorectal cancers are genetically determined and progress to invasion without going through a polypoid stage. *Cancer Res*. **67**: 11594–11600.
- Van Leishout, E.M.M., Peters, W.H.M., Jansen, J.B.M.J., 1996. Effect of oltipraz, a-tocopherol, b-carotene and phenyl isothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic

and hepatic glutathione, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis*. **17**: 1439e45.

Vennila, S., Karthik, K.V., Nalini, N., 2009. Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Invest New Drugs*. **27**: 21–30.

Weckbecker, G., Cory, J.G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells *in vitro*. *Cancer Letter*. **40**: 257-264.

Weichselbaum, T.E., AMER, J., 1946. *Clin. Path.*, **16**:40.

Willet, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, E.F., 1990. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Eng J Med*. **323**: 1664e762.

Williamson, J.R., Kilo, C., 1989. Glucotoxicity and diabetic vascular disease. *Medical dialogue on diabetes*. **8**: 8-10.

Yamaguchi, Y., Goto, S., Urata, Y., Kondo, K., Nagataki, S., 1997. Oxygen-induced embryopathy and the significance of glutathione- dependent antioxidant system in the rat embryo during early organogemess. *Free radic boil Med*. **22**: 447-454.

Yang, J.L., Russell, P.J, Ham, J.M., Crowe, P.J., 1996. Higher expression of oncoproteins c-myc, c-erbB-2, PCNA and p53 in metastasizing colorectal cancer than in non-metastasizing tumors. *Ann Surg Oncol*. **3**: 574e9.

Yukiaki K, Yukihiro H., 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research*. **436**: 69–97.

