



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار- عنابة
UNIVERSITÉ BADJI-MOKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOSURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat des sciences

Option : Biologie animale

THEME

**Étude de l'implication de l'activité des radicaux libres
oxygènes dans le développement du cancer colorectal : Effet
chemo-préventif d'un antioxydant SOD mimétique**

Présentée par : Baba Ahmed Fédia

Membres du jury

Président :	FRIH Hacéne	Prof	Université d'Annaba
Directeur :	OUALI Kheireddine	Prof	Université d'Annaba
Examineur :	SBARTAI Hana	MCA	Université d'Annaba
Examineur :	TADJINE Aicha	Prof	Université d'El Tarf
Examineur :	LAKBAR Chanez	MCA	Université d'El Tarf
Examineur :	GRARA Njoud	MCA	Université de Guelma

Année universitaire : 2017 – 2018

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
GENERALITES SUR LE CANCER.....	4
I. INCIDENCE DU CANCER DU COLON.....	4
I.1. CANCER.....	5
I.1.1. LA PHASE D'INITIATION.....	5
I.1.2. LA PHASE DE PROMOTION.....	5
I.1.3. LA PHASE DE PROGRESSION ET D'INVASION.....	6
I.2. FACTEURS DE LA CANCEROGENESE.....	6
I.2.1. FACTEURS LIES A L'HOTE.....	6
I.2.1.1. HEREDITE.....	6
I.2.1.2. FACTEURS ENDOCRINIENS.....	7
I.2.1.3. FACTEURS IMMUNOLOGIQUES.....	7
I.2.2. FACTEURS EXTERNES.....	7
I.2.2.1. ENVIRONNEMENT.....	7
I.2.2.2. ALIMENTATION.....	8
I.3. CANCER COLORECTAL.....	8
II. STRESS OXYDANT.....	10
II.1. CAUSES DU STRESS OXYDANT.....	11
II.1.1. FACTEURS ENDOGENES.....	11
II.1.1.1. L'AUTOOXYDATION DES PETITES MOLECULES.....	11
II.1.1.2. LA XANTHINE OXYDASE.....	11
II.1.1.2.1. LA NADPH OXYDASE.....	12
II.1.1.2.2. LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	12
II.1.1.2.3. LES PEROXYSOMES.....	12
II.1.2. FACTEURS EXOGENES.....	12
II.1.2.1. LE TABAGISME.....	13
II.1.2.2. L'ALIMENTATION.....	13
II.1.2.3. LES RAYONS SOLAIRES.....	13
II.1.2.4. L'ACTIVITE PHYSIQUE.....	14
II.2. DEFENSES DU STRESS OXYDANT.....	14
II.2.1. DEFENSES ENDOGENES.....	14
II.2.1.1. SUPER OXYDE DISMUTASE (SOD).....	14
II.2.1.2. GLUTATHION PEROXYDASE (GPx) ET REDUCTASE (GR).....	15
II.2.1.3. CATALASE.....	15
II.2.2. DEFENSES EXOGENES.....	16
II.2.2.1. OLIGOELEMENTS.....	16
II.2.2.2. GLUTATHION (GSH).....	16
II.2.2.3. UBIQUINONE ET CYTOCHROME C.....	17
II.2.2.4. VITAMINES E ET C.....	17
III. STRESSES OXYDANT ET CANCER.....	18
MATERIEL ET METHODES.....	19

I.	MATERIEL BIOLOGIQUE.....	19
I.1.	PRESENTATION.....	19
I.2.	LIEU D'ELEVAGE.....	19
II.	CONDITION EXPERIMENTALE.....	20
II.1.	APPLICATION DES TRAITEMENTS.....	20
II.1.1.	INDUCTION DU CANCER DU COLON.....	20
II.1.2.	TRAITEMENT ANTIOXYDANT PAR LA SOD VEGETALE (GLISODINE).....	21
III.	PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	23
III.1.	PRELEVEMENT SANGUIN.....	23
III.2.	DISSECTION ET PRELEVEMENT D'ORGANES.....	23
III.2.1.	COLORATION ET COMPTAGE DES ACF (ABERRANT CRYPT FOCI).....	24
III.2.1.1.	MODE OPERATOIRE.....	24
III.2.1.1.1.	PREPARATION DES SOLUTIONS DE BLEU DE METHYLENE (BM).....	24
III.3.	EXPLORATION DU STATUT ANTIOXYDANT.....	26
III.3.1.1.	DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE (CAT).....	26
III.3.1.1.1.	PREPARATION DE L'HOMOGENAT.....	26
III.3.1.2.	DOSAGE DES PROTEINES TISSULAIRES.....	27
III.3.1.3.	DOSAGE DE L'ACTIVITE DU GLUTATHION (GSH).....	28
III.3.1.4.	DOSAGE DE L'ACTIVITE DES GSTS.....	29
III.3.1.5.	DOSAGE DE L'ACTIVITE DE SUPER OXYDE DISMUTASE.....	31
III.3.1.6.	DOSAGES PLASMATIQUE.....	31
III.3.1.6.1.	DOSAGE DES LIPOPEROXIDES LPO.....	31
IV.	STATUT INFLAMMATOIRE.....	34
IV.1.	DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DU CEA.....	34
V.	TECHNIQUES HISTOLOGIQUES.....	34
V.1.	PRELEVEMENT.....	34
V.2.	LA FIXATION.....	35
V.3.	L'INCLUSION.....	35
V.4.	LA COLORATION.....	35
VI.	ANALYSE STATISTIQUE :.....	36
	RESULTATS.....	37
I.	ETUDE PONDERALE.....	37
I.1.	VARIATION DU POIDS CORPOREL.....	37
I.2.	VARIATION DU POIDS DU FOIE.....	38

I.3.	VARIATION DU POIDS DE LA RATE.....	38
II.	ANALYSE DU STRESS OXYDANT	39
II.1.	VARIATION DE LA CONCENTRATION DES LPO PLASMATIQUE.	39
II.2.	ACTIVITE COLIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE.	40
II.3.	ACTIVITE DE LA CATALASE COLIQUE CHEZ LES RATTES TEMOINS ET TRAITEES. .	41
II.4.	ACTIVITE DE LA GLUTATHION-S-TRANSFERASE COLIQUE CHEZ LES RATS TEMOINS ET TRAITES. 42	42
II.5.	TENEUR EN GLUTATHION COLIQUE CHEZ LES RATTES TEMOINS ET TRAITEES.	43
III.	PROFILE INFLAMMATOIRE	44
IV.	ETUDE MORPHOMETRIQUE.	46
IV.1.	EFFET DE LA GLISODINE SUR LA MULTIPLICITE DES LESIONS PRECANCEREUSES INDUITES PAR L’AOM CHEZ LA RATTE.	47
IV.2.	VARIATION DE L’EXPRESSION DU MARQUEUR EMBRYONNAIRE DU CANCER COLORECTAL.....	49
V.	HISTOPATHOLOGIE DU COLON.....	50
	DISCUSSION.....	53
	CONCLUSION.....	57
	REFERENCES	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Incidence des cancers du côlon et du rectum dans le monde.....	4
Figure 2: Evolution de la cancérogénèse dans un tissu (site internet 4).	6
Figure 3: Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.	18
Figure 4: Relation entre le stress oxydant et le cancer	18
Figure 5: Les voies moléculaires associées au cancer colorectal.....	20
Figure 6: Représentation schématique du transit et de l'absorption intestinale de la SOD couplée à la gliadine.....	22
Figure 7: La Glisodine une super oxyde dismutase conjuguée à la Gliadine.....	22
Figure 8: Mise en évidence du côlon après dissection de la ratte	24
Figure 9: Courbe représentant les densités optiques en fonction des concentrations des standards MDA	33
Figure 10: Variation du poids corporels en grammes chez les rats témoins et traitées.....	37
Figure 11: Variation des poids hépatiques en gramme chez les rats témoins et traité.	38
Figure 12: Variation des poids de la ratte en grammes chez les rats témoins et traitées.	39
Figure 13: Variation de la Concentration plasmatique des LPO chez les rattes.	40
Figure 14: Variation de l'activité de la superoxyde dismutase.....	41
Figure 15: Variation de l'activité de la catalase chez les rattes témoins et traitées.	42
Figure 16: Variation de l'activité de la GST chez les rats témoins et traitées.	43
Figure 17: Variation de l'activité du glutathion réduit GSH chez les rats témoins et traitées..	44
Figure 18: Effet de la glisodine sur la variation des paramètres immunologiques.	45
Figure 19: Vue macroscopique des colons de rattes traitées par l'AOM.	46
Figure 20 : Vue microscopique de colons colorés au bleu de méthylène selon Bird.....	47
Figure 21: Effet de la glisodine sur l'induction des ACF par l'AOM chez les rattes.	48
Figure 22: Effet de la glisodine sur la multiplicité des ACF induit par l'AOM chez la ratte. .	49
Figure 23: Variation de la concentration du carcinoembryonnaire antigène (CEA) chez les rats témoins, cancéreux et traités par la SOD	50
Figure 24: Coupes longitudinales du colon des rattes témoins colorées à l'HE.....	51
Figure 25: Coupes longitudinales du colon chez les rattes AOM colorées à l'HE.).....	51
Figure 26: Coupes longitudinales du colon des rattes AMO-SOD colorées à l'HE.....	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Répartition des rats par lot.....	19
Tableau 2: La structure chimique et propriétés de l'Azoxyméthane	21
Tableau 3: Protocole expérimental.....	23
Tableau 4: Protocole utilisé pour le dosage de l'activité du CAT	26
Tableau 5: Réalisation de la gamme d'étalonnage.....	27
Tableau 6: Protocole utilisé pour le dosage de l'activité GST.....	30
Tableau 7: Protocole utilisé pour le dosage de la SOD.....	31
Tableau 8: protocole utilisé pour le dosage de la LPO :	32
Tableau 9: Courbe des volumes standards de dilution	33
Tableau 10: Les étapes depuis le prélèvement jusqu'au bloc (Richard <i>et all</i> , 2009).....	36
Tableau 11: Variation des poids corporels en grammes chez les rats témoins et traités.....	37
Tableau 12: Variation du poids absolu et relatif du foie en gramme chez les rats témoins et traités.....	38
Tableau 13: Variation des poids de la ratte en gramme chez les rats témoins et traités.	39
Tableau 14: Variation de la concentration plasmatique des LPO en nmol/ml chez les rats témoins et traités	40
Tableau 15: Variation de l'activité de la superoxyde dismutase colique en Unité/mg.....	41
Tableau 16: Variation de l'activité de la catalase en nmol H ₂ O ₂ oxydé/min/mg protéine chez les rats témoins et traités	42
Tableau 17: Variation de l'activité de la GST en nmol CDNB/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.	43
Tableau 18: Variation de l'activité du glutathion réduit GSH en nmol/mg protéine chez les rattes témoins et traités.	44
Tableau 19: Effet de la glisodine sur la variation des paramètres immunologiques.....	45
Tableau 20: Effet de la glisodine sur l'induction des ACF (aberrant crypt foci) par l'AOM chez la ratte.	48
Tableau 21: Effet de la glisodine sur la multiplicité des ACF induit par l'AOM chez la ratte.....	49
Tableau 22: Variation de la concentration du carcinoembryonnaire antigène (CEA) chez les rats témoins, cancéreux et traités par la SOD à raison de 300 mg/kgPV	50

RESUME

Nous avons cherché à évaluer l'efficacité de la supplémentation d'une SOD (superoxyde dismutase) végétale, la glisodine, qui est une association de la super oxyde dismutase du melon *Cicimus mulo* avec une protéine du blé, la gliadine, sur l'atténuation du stress oxydant induit par l'injection d'une molécule cancérigène en puissance, l'azoxyméthane (AOM), chez la ratte Wistar. De même que la répercussion sur le développement des lésions précancéreuses en l'occurrence les foyers des cryptes aberrantes (ACF).

L'administration intrapéritonéale de l'azoxyméthane (AOM) à raison de 15 mg/kg de poids corporel chez les rattes Wistar a provoqué une perturbation du métabolisme et a entraîné un état de stress oxydatif. Une perturbation qui se révèle d'une part par une augmentation hautement significative de la concentration plasmatique des lipoperoxides (LPO), une diminution significative des activités des enzymes antioxydantes glutathion-S-transférase (GST), catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD), de la teneur en glutathion (GSH) ; et d'autre part, par le traitement des rattes par l'AOM qui a induit après 12 semaines l'apparition de lésions précancéreuses au niveau colique révélées par la formation des foyers des cryptes aberrantes (ACF) qui sont des lésions pré néoplasiques à l'origine des adénocarcinomes.

Le traitement des rattes cancéreux par la glisodine à raison de 300 mg/kg de poids corporel pendant 12 semaines a diminué significativement l'incidence des tumeurs et le nombre de foyers de cryptes aberrantes. Cet effet se produit conjointement avec une amélioration du statut antioxydant mis en évidence par une diminution de la peroxydation de lipide, l'augmentation du taux GSH et de l'activité de la GST, la SOD et de la CAT. Ceci suggère que la glisodine pourrait agir en tant adjuvant anti-radicalaire chemo-préventif contre le cancer du côlon.

Mot clés: AOM, cancer colorectal, stress oxydant, ACF, rat.

Abstract

We sought to assess the effectiveness of a vegetal SOD supplementation the glisodin; which is a combination of the superoxide dismutase of melon, (*Cucumis melo*) and a Gliadin; (a protein found within wheat gluten), for alleviating the oxidative stress on Wistar rat induced by injecting a high dose of a potential carcinogenic molecule azoxymethane (AOM) and its impact on the development of precancerous lesions, in this case aberrant crypt foci (ACF).

In fact, the intraperitoneal administration of azoxymethane (AOM) dosing at 15 mg / kg body weight for Wistar rats caused a metabolism disruption and led to a state of oxidative stress which is revealed on the one hand, by a significant increasing of LPO plasma concentrations and a significant decreasing of GST, CAT, SOD antioxidant enzymes activities accompanied by the GSH content. On the other hand, the treatment of rats with AOM induced, after 12 weeks, the appearance of colonic precancerous lesions revealed by the formation of ACFs which are preneoplastic lesions at the origin of adenocarcinomas.

Treatment of cancer rats with glisodin at 300 mg/kg body weight for 12 weeks significantly decreased the incidence of tumors and the number of ACFs. This effect goes hand in hand with an improvement in the antioxidant status highlighted via a decreased lipid peroxidation, an increased GSH level and GST, SOD and CAT activity. This suggests that glisodin could act as a chemo-preventive anti-radical adjuvant against colon cancer.

Keywords: AOM, colorectal cancer, oxidative stress, ACF, rat

ملخص

لقد سعينا لتقييم فعالية إضافة لجليسودين (السوبر أكسيد ديسميوتاز (SOD) النباتية) - والتي هي مزيج من SOD مستخرج من الشمام *Cicimus mulo* و بروتين القمح gliadine - على تخفيف الإجهاد التأكسدي الناجم عن عملية حقن فنران تجارب من نوع Wistar بجزيئة جد مسرطنة آزوكسي ميثان (AOM) , و كذا مدى إنعكاساته على تطور الأعراض ما قبل التسرطن على غرار بؤر الخبيئات الشاذة (ACF) .

ان إضافة AOM؛ بمقدار 15 مغ / كغ من وزن الجسم في فنران ويستار تسبب في عدة اضطرابات تمثلت في اجهاد تأكسدي والذي يكشف عنه من ناحية زيادة هامة ومعتبرة في تركيز البلازما LPO وانخفاض كبير في أنشطة الأنزيمات المضادة للأكسدة SOD CAT GST و محتوى GSH، ومن ناحية أخرى، فإن علاج الفئران لمدة 12 أسبوعا ب AOM نجم عن ظهور أعراض ما قبل التسرطن والذي كشف عنها عن طريق تشكيل بؤر الخبيئات الشاذة (F AC)، والتي تؤدي في الأصل الى ورم غدي خبيث.

ان علاج الفئران السرطانية بمقدار 300 ملغ / كغ من وزن الجسم لمدة 12 أسبوعا أدى الى انخفاض هام في عملية تشكل الأورام وعدد بؤر الخبيئات الشاذة (ACF)، وهذا التأثير يتمشى طردا مع تحسن حالة مضادات الأكسدة من خلال انخفاض في بيروكسيد الدهون، وزيادة معدل GSH و GST، ونشاط SOD و CAT. من هنا نقترح أن الغليسودين قد يعمل بمثابة مساعد للمكافحة الكيميائية المضادة لسرطان القولون.

الكلمات المفتاحية: AOM، سرطان القولون، الإجهاد التأكسدي، ACF، الفئران، SOD .

INTRODUCTION.

Le côlon est un tube musculaire et muqueux de l'intestin qui va du caecum au rectum et mesure environ 1,40 mètre de long. Formant un cadre, appelé cadre colique, il comporte quatre sections : le côlon ascendant, transverse, gauche ou descendant et sigmoïde. Il est le siège d'affections diverses, inflammatoires, mécaniques (volvulus, ou torsion d'une anse intestinale) et surtout tumorales (cas des polypes et adénocarcinomes). Ces dernières feront l'objet de notre étude (Encyclopédie, 2010).

Le cancer du côlon peut être situé à n'importe quel niveau de celui-ci, mais le plus couramment il affecte la partie sigmoïde du côlon et la partie fermée du rectum.

Les cancers du côlon ou cancers colorectaux représentent 15% des tumeurs malignes et sont en passe d'atteindre le premier rang dans les pays occidentaux pour les deux sexes. En Algérie, principalement, ils constituent l'une des causes principales de mortalité. Ils sont classés en troisième position après le cancer du poumon et de la vessie, chez l'homme et le cancer du sein et du col utérin chez la femme (Site internet 1).

Si certaines situations pathologiques peu fréquentes, telles que les inflammations chroniques, sont connues pour favoriser l'apparition de cancers spécifiquement des cancers colorectaux, il existe deux facteurs étiologiques connus, tous deux importants sur le plan de la santé publique mais de nature différente : l'alimentation et l'hérédité (Scotté ; 2002).

Aussi plusieurs expérimentations ont-elles permis de raffermir l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif joue un rôle dans les mécanismes et les processus pathologiques notamment les cancers (Melvin *et al*; 2002). De plus, il représente la cause de l'augmentation des marqueurs de la présence des radicaux libres qui réagissent avec les substrats oxydables (glucose, protéines, acides gras) tout en engendrant des réactifs carbonyles dont les effets cellulaires sont multiples à savoir l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides ainsi que la modification de l'expression de gènes et de l'ADN (Arai *et al* ; 1987).

Par ailleurs l'implication pathologique du stress oxydatif conduit à une détérioration de l'ADN due à une surproduction cellulaire des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS, RNS) intervenant également dans l'évolution du cancer. Cette thématique s'emploie à

intégrer ces interactions dans le domaine de la cancérologie où de nombreuses études s'intéressent à établir une relation entre le cancer et les variations de l'environnement et d'expliquer les mécanismes (Bartsch *et al* ; 2002).

On note une légère évolution des espèces réactives de l'oxygène dans les maladies chroniques de l'appareil gastro-intestinal mais les mécanismes précis associant le stress oxydant comme étant inducteur de cellules cancéreuses colorectales demeurent peu clair (Girgin *et al* ; 2000).

De plus l'amélioration des atteintes oxydatives en piégeant les radicaux libres formés pendant le stress oxydant pourrait protéger les cellules contre la cancérogénicité. Deux phénomènes essentiels ont été mentionnés lors de la carcinogenèse, l'augmentation des niveaux de la peroxydation de lipides et l'épuisement des antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (Manju *et al*, 2005).

Connu pour son pouvoir d'induction des tumeurs, l'azoxyméthane (AOM) est une substance utilisée dans les expériences pour créer les tumeurs chez le rat et la souris. Il est vu comme agent causal d'un stress oxydant au niveau de la muqueuse du côlon (Tanaka 1997). L'azoxyméthane (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-azoxyméthanol (MAM), cette réaction est catalysée 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 de 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, 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 du système antioxydant dans le cancer colorectal ont été rapportés (Skrzydowska *et al*, 2003).

Certains agents chemo-préventifs exercent une action anti-cancérogène en modulant la peroxydation des lipides et le statut antioxydant dans le foie. Plusieurs rapports suggèrent que

des composés phénoliques peuvent agir comme adjuvant chemo-préventif par le piégeage des agents cancérigènes induits par le stress oxydatif (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 al*, 2002).

L'hésperidine et la luteoline et les polyphénols sont connues pour leur action (chemo-préventive) 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).

De ce fait notre étude consistait à induire par l'azoxyméthane un état de nature de stress oxydatif cancérigène chez les rattes Wistar auquel nous avons associé un traitement chemo-préventif grâce à un antioxydant végétale, la glisodine. Ainsi des préoccupations auxquelles nous essaieront de répondre en ressortent à savoir :

- ❖ Dans un premier temps quel serait le degré d'implication des radicaux libres dans l'évolution de la cancérogenèse colique chez ce modèle animal qui présente des similarités dans la morphologie intestinale avec l'être humain ?
- ❖ Dans un second temps la glisodine une association entre une SOD végétale extraite du melon et une protéine de blé, la gliadine est utilisée comme piègeur radicalaire au cours de notre expérience pourrait-elle être considérée comme moyen préventif du cancer colorectal ?

GENERALITES SUR LE CANCER.

I. Incidence du cancer du côlon.

Le cancer du côlon est, selon les chiffres les plus récents, le troisième cancer dans le monde avec une estimation de 1,36 million de nouveaux cas diagnostiqués en 2012 (Site internet 2) et il est en progression constante depuis 1975. En termes d'incidence, il se situe après le cancer de la langue, de l'estomac et de la prostate chez l'homme et après le cancer du sein et du col de l'utérus chez la femme. Alors qu'il affecte de manière quasi-égale les hommes et les femmes avec un sex ratio de 1.2, sa répartition dans le monde démontre une réelle disparité (Figure 1). Si dans les régions développées (Amérique du Nord, Europe occidentale, Australie, Nouvelle Zélande et Japon), le cancer du côlon représente 20,9% de tous les cancers chez l'homme et 16,3% chez la femme, dans le reste du monde, il ne représente que respectivement 7,6% et 7%. Ces cancers sont plus rares en Amérique du sud, en Asie et surtout en Afrique. Ces différences ne semblent pas être liées à un polymorphisme génétique des populations puisque les émigrés perdent totalement le risque associé à leur pays ou région d'origine (McMichael et al, 1980). Ces données soulignent l'importance des facteurs environnementaux dans la cancérogenèse colorectale. Plusieurs auteurs mettent en cause le régime alimentaire, le mode de vie et la surcharge pondérale (Michels et al, 2005).

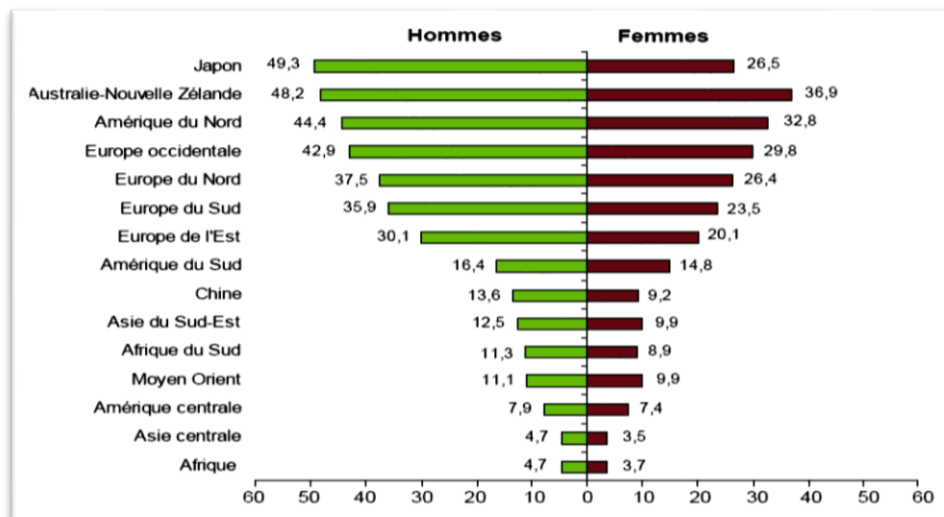


Figure 1: Incidence des cancers du côlon et du rectum dans le monde. Taux pour 100000 habitants ajustés sur l'Age (Pakin *et al*, 2005)

I.1. CANCER.

Le cancer est une des causes majeures de décès dans le monde de nos jours. Il est défini comme une prolifération importante et anarchique de cellules anormales qui ont la capacité d'envahir et de détruire les tissus sains et de se disséminer dans l'organisme. Le cancer peut être mortel soit par action directe et mécanique de la tumeur, détruisant l'organe dans lequel elle se trouve ou dans lequel elle s'est disséminée (poumon, foie, rate, moelle osseuse) soit par sécrétion de substances toxiques pour l'organisme lié aux dysfonctionnements des organes atteints (Scotté, 2002).

Ainsi l'on définit un cancérogène (ou cancérigène) comme étant un agent capable de provoquer le cancer, d'augmenter la fréquence des cancers dans une population exposée, de modifier la répartition de la localisation des cancers observés dans une population (sans augmentation du nombre global de cancers) ou de favoriser une survenue plus précoce de tumeurs cancérogènes dans une population (site internet 3).

Par ailleurs la cancérogenèse est un ensemble de mécanismes consécutifs responsables du développement des cancers. Elle peut être résumée en trois principales phases à savoir les phases d'initiation, de promotion et d'invasion (Figure 2) (Encyclopédie, 2010).

I.1.1. La phase d'initiation.

Elle résulte d'une interaction brève et irréversible entre un agent cancérogène et le matériel génétique du tissu cible. La réaction engendre une lésion moléculaire, ou mutation, qui transforme certaines cellules en cellules quiescentes, indistinctes des autres cellules, mais qui mémorisent une altération génétique qui sera exprimée lors d'une stimulation ultérieure.

Cette mutation est due à une absence de réparation ou une réparation incomplète ou non conforme de l'ADN (Riboli *et al*, 1996).

I.1.2. La phase de promotion.

C'est la prolifération des cellules transformées après l'initiation, qui forment alors des tumeurs, sous l'action d'un agent promoteur qui n'est en lui-même ni mutagène ni cancérigène. (Encyclopédie 2009).

I.1.3. La phase de progression et d'invasion.

Elle concrétise l'acquisition de la malignité tumorale. Mettant en jeu des mécanismes mal connus, elle signe l'irréversibilité tumorale. Elle implique des remaniements génomiques, des translocations, des recombinaisons, des mutations d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs. Enfin, la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme par effraction de l'organe originel va entraîner des métastases, celles-ci se disséminent dans l'organisme par voie sanguine et lymphatique, atteignant alors d'autres organes (Riboli *et al*, 1996).

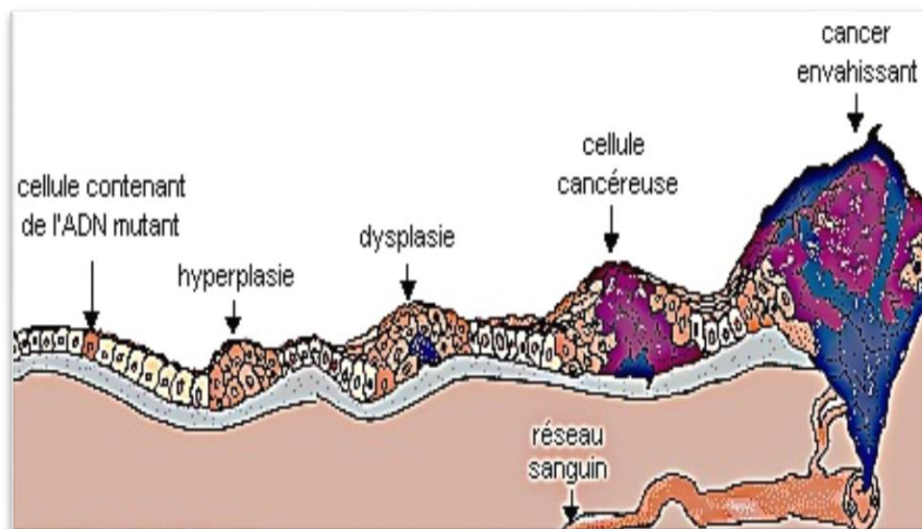


Figure 2: Evolution de la cancérogenèse dans un tissu (site internet 4).

I.2. FACTEURS DE LA CANCEROGENESE.

Les différentes études sur les causes des cancers permettent de proposer un modèle général de la cancérisation qui apparaît comme une succession d'étapes. Les facteurs qui favorisent l'apparition d'un cancer sont liés à l'hôte et/ou à son environnement. Les mécanismes de la carcinogenèse sont d'ordre génétique : apparition d'un clone cellulaire malin provenant de l'accumulation dans une cellule d'évènements rares et non liés entre eux (Encyclopédie 2005).

I.2.1. FACTEURS LIES A L'HOTE

I.2.1.1. Héritéité.

Un facteur héréditaire peut être soupçonné dans une famille où plusieurs sujets ont un cancer. Cette situation ne concerne en fait que les pathologies ayant un mode de transmission

mendélien (dominant ou récessif), qui représentent 5 à 10% des cancers. Les pathologies héréditaires à transmission mendélienne sont rares. Le cancer peut soit être au centre du tableau clinique soit compliquer une maladie héréditaire sous-jacente (Riboli et al, 1996).

Les pathologies héréditaires touchant des localisations communes, coliques ou mammaires sont moins rares. Notamment le syndrome sein ovaire et le syndrome de Li-Fraumeni, où des tumeurs de localisations différentes sont associées chez un même sujet ou d'un membre à l'autre d'une famille (cancer du sein, sarcome, hémopathies malignes, etc.) (Potter *et al*, 1993).

I.2.1.2. Facteurs endocriniens.

Les facteurs endocriniens sont dus à un déséquilibre provoquant une stimulation excessive de la division cellulaire. A titre d'exemple nous avons le cas des œstrogènes induisant le cancer du sein (Girgin *et al*, 2000).

I.2.1.3. Facteurs immunologiques.

Des études ont démontrées que certaines altérations et déficits de la réponse immunitaire ont une répercussion sur le développement du cancer ; il s'agit surtout des lymphomes et leucémies (Scotté, 2002).

I.2.2. FACTEURS EXTERNES.

L'importance pratique des facteurs externes de la cancérogenèse est majeur, parce qu'il est plus facile de les influencer que de modifier la constitution génétique d'un individu. L'environnement joue un rôle important dans la cancérogenèse. Le rôle d'autres facteurs, alimentaires en particulier, est plus difficile à cerner (site internet 5).

I.2.2.1. Environnement.

Il a été démontré que l'environnement de l'homme est parfois une cause de naissance de cellules cancéreuses. Les produits chimiques par exemple ont vu leurs responsabilités démontrées dans l'initiation de cancers, les plus connus étant le benzène (leucémies myéloïdes chroniques) et l'amiante (tumeurs de la plèvre), mais surtout le tabac (tumeurs bronchiques).

Les rayonnements ionisants, qui lèsent le génome, ont provoqué des cancers à la suite de leur usage sans précaution aux débuts de la radiologie et de la radiothérapie, chez des

scientifiques et médecins. De plus l'exposition aux rayonnements ultraviolets par la pratique du bronzage, endommage l'ADN et jusqu'au gène P53 qui devrait contenir ce dommage provoquant ainsi le développement des cancers cutanés (Greenwald *et all*, 2002).

I.2.2.2. Alimentation.

Le rôle de l'alimentation comme facteur de risque est un débat récurrent et passionnel. Selon les études, 10 à 70% des cancers seraient liés aux habitudes alimentaires (Scotté, 2002). Les acides biliaires et certains acides gras libres, dont la concentration fécale augmente lors de l'ingestion de lipides, induiraient une prolifération cellulaire dans la muqueuse colique, et seraient des promoteurs de tumeurs chez des animaux ayant reçus un initiateur (Corpet, 1989). L'épidémiologie montre que des facteurs de l'alimentation tels que la quantité de lipides, de viande et d'alcool, ainsi que l'ingestion d'un excès de calories sont associés à un risque augmenté de cancer colique. D'autres facteurs comme les légumes, les fruits, le calcium et certains glucides, sont associés à un risque diminué. On a noté, par exemple, dans certaines études, que la mortalité par cancer du côlon est inversement proportionnelle à la consommation de blé et de céréales (Riboli, 1996).

Les études expérimentales concordent en général avec les observations épidémiologiques, notamment les études sur les graisses, qui montrent que des régimes à haute teneur en graisse et en acide linoléique sont vus comme précurseurs de tumeur chez le rat, alors que des régimes similaires mais contenant de l'acide oléique n'agissent pas comme tels (Cohen, 1988 ; Corpet, 1989). Ces expériences aident à mieux comprendre certaines observations épidémiologiques, telles que la faible incidence du cancer du sein et du côlon chez les esquimaux du Groenland : ces populations ont une alimentation riche en graisses mais celles-ci proviennent essentiellement de poissons et de mammifères marins (Verhaeghe *et all*, 2002).

I.3. CANCER COLORECTAL.

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus communs dans le monde entier et a des hauts débits de morbidité et de mortalité. L'agence internationale pour la recherche sur le cancer a rapporté que ce cancer suit un modèle sporadique d'occurrence, et seulement 5% des cas sont d'origines héréditaires (Stewart, 2003).

L'influence du cancer colorectal varie dans un rapport de 1 à 25 dans le monde. Elle est la plus élevée en Amérique du Nord et Nouvelle-Zélande et la plus faible en Inde, Asie, Afrique

du Sud. En Europe, elle est plus élevée au Nord qu'au Sud et à l'Ouest qu'à l'Est. (Verhaeghe, 2002). Notamment en France leur incidence pour les deux sexes réunis est pratiquement égale à celle du cancer du sein. Chaque année l'on observe 25000 nouveaux cas de cancers colorectaux et 15000 décès avec 90% de cas observés entre 50 et 70 ans. Le pourcentage des cancers colorectaux chez les personnes âgées est plus élevé dans les pays Arabes par rapport au reste du monde.

En Algérie ils occupent, en termes de fréquence, la seconde place après le cancer du sein chez la femme et la troisième place après le cancer du poumon et celui de la prostate chez l'homme. La fréquence y a considérablement augmentée ; l'on enregistre 3000 nouveaux cas par an et 300 personnes en meurent (Site internet 6).

Plusieurs risques des facteurs pour le cancer colorectal ont été rapportés, incluant l'âge plus de 50 ans, formation des polypes colorectaux, antécédents familiaux de cancer colorectal, et changement de certains gènes tel Apc, Madh4, Smad4, Bmpr1a, et Lkb1 (Bhalla *et al*, 2009).

Les études épidémiologiques ont prouvé d'une façon convaincante qu'un régime riche en calories et graisses animales, et pauvre en fruits, légumes, et la fibre est associé à un plus grand risque de cancer colorectal. D'ailleurs, des études récentes ont prouvé que l'obésité et les anomalies métaboliques connexes, y compris l'hyperglycémie, hyperlipidémie, et hyperleptinemia, sont associées à un plus grand risque de cancer colorectal (Giovannucci *et al*, 2007)

Réciproquement, un régime bas en graisse, riche en légumes, et, probablement, riche en fibre a un effet protecteur. Des personnes avec une plus grande prise de la vitamine D et le calcium ont également un risque réduit de cancer du côlon (Stewart, 2003).

Plusieurs composants fonctionnels de nourriture et d'autres produits chimiques, comme la curcumine, le gallate d'epigallocatechin, et le folate ont été rapportés pour supprimer la carcinogenèse de deux points dans plusieurs modèles d'animal (Greenwald *et al*, 2002).

Les différences géographiques au niveau de l'incidence du cancer du côlon ont dirigé les recherches vers l'étude des facteurs génétiques et environnementaux (Gescher *et al*, 2001). Il existe des dispositions familiales engendrant une extrême susceptibilité au cancer du côlon chez l'homme (5 à 15% des cas de cancer colique) ; on retrouve deux syndromes dominants, la FAP (Polypose Adénomateuse Familiale) et le HNPCC (Cancer Colorectal Héritaire non

Polypeux) qui sont transmis selon un mode autosomal dominant (Burt *et al.*, 1996). La FAP provient d'une mutation du gène APC et le HNPCC serait dû à des mutations des gènes de réparation de l'ADN (Potter *et al.*, 1993).

L'exploration des familles FAP et HNPCC a permis d'élaborer un modèle moléculaire de cancérogenèse, adapté au côlon, décrivant des mutations successives (5 à 7), et dont l'ordre des mutations joue un rôle, qui font qu'une cellule normale du côlon devient une métastase (Kinzler *et al.*, 1996).

Une mutation du gène APC permet d'initier le processus néoplasique, la progression des tumeurs résulte elle des autres mutations. Une déficience en MMR (gène de réparation de l'ADN) semble accélérer le processus.

Les études épidémiologiques montrent que l'incidence de ces cancers varie de 1 à 50 suivant les pays, affectant essentiellement les populations des pays développés, où les aliments sont transformés et contiennent des molécules ajoutées tels que les additifs alimentaires naturels ou chimiques. Cette variation serait avant tout liée aux facteurs de l'environnement (surtout alimentaire), plus qu'aux facteurs génétiques (Verhaeghe *et al.*, 2002).

De plus une expérimentation effectuée sur la feuille du *Perilla Frutescens*, une plante asiatique, a révélé que son huile aurait un effet curatif dans certaines pathologies et préventif dans le cancer colorectal. En effet son huile a été ajoutée dans l'alimentation quotidienne, pendant 35 semaines, d'un modèle de rat. A la fin de l'étude il a été conclu que l'ajout de l'huile de *Perilla* à l'alimentation (jusqu'à 25% de votre absorption quotidienne de graisse), pourrait offrir une protection significative contre le cancer colorectal.

Ainsi on l'a estimé que 70% de ces cancers colorectaux pourraient être empêchés par l'intervention nutritionnelle, parce que le régime est l'exogène le plus important facteur lié au mode de vie en étiologie de cette maladie (Stewart, 2003).

II. STRESS OXYDANT.

L'oxygène est un élément indispensable à la vie qui est produit constamment au niveau de la mitochondrie de l'organisme humain des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par définition une espèce réactive de l'oxygène est un radical oxygéné ou une molécule pouvant produire des radicaux libres, peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dont la production est indispensable en participant à divers processus vitaux tels que : la transduction des signaux cellulaires, la

régulation des gènes et le fonctionnement de certaines enzymes, la défense immunitaire contre les agents pathogènes et la destruction par apoptose de certaines cellules tumorales. Cependant, il existe différents mécanismes physiopathologiques et facteurs environnementaux qui peuvent intensifier la production des ROS provoquant un déséquilibre de la balance pro oxydant/antioxydant : c'est le stress oxydant (Tacchini)

Ainsi le stress oxydant ou stress oxydatif pourrait être défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme en faveur des systèmes oxydants et pouvant causer des dégâts cellulaires irréversibles.

II.1. CAUSES DU STRESS OXYDANT.

Il existe plusieurs sources de radicaux libres dans l'organisme humain tant au niveau exogène qu'au niveau endogène (Tacchini).

II.1.1. FACTEURS ENDOGENES.

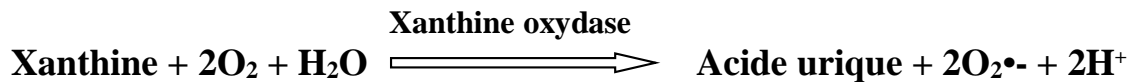
Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi lesquelles l'autooxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes.

II.1.1.1. L'autooxydation des petites molécules.

L'autooxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de ROS (Freeman *et all*, 1981). Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent le radical super oxyde ($O_2^{\bullet-}$). Ainsi, l'autooxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives notamment lors de la maladie de Parkinson (Ji *et all*, 1992).

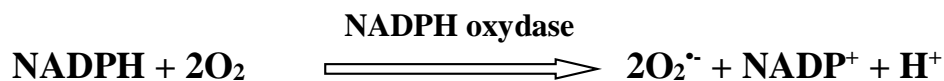
II.1.1.2. La xanthine oxydase.

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi de l' $O_2^{\bullet-}$ (Kinzler *et all*, 1996).



II.1.1.2.1. La NADPH oxydase.

La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Krause *et al*, 1996). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d'O₂^{•-}. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Mates *et al*, 1999).



II.1.1.2.2. Le réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques . La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS. Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum (Mates *et al*, 1999).

II.1.1.2.3. Les peroxysomes.

Les peroxysomes sont une importante source de production de H₂O₂ cellulaire. Toutefois, l'H₂O₂ est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d'H₂O₂ produit au niveau du peroxysome sont une importante source de production d'H₂O₂ cellulaire pourrait échapper à la catalase (Mckelvey *et al*, 1988).

II.1.2. FACTEURS EXOGENES.

L'environnement dans lequel nous vivons mais aussi notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans notre organisme. Nous avons entre autre le tabagisme, la pollution, l'alimentation, les rayons solaires, la pratique trop intense ou mal gérée du sport, le contact avec des agents cancérigènes, la prise répétée de médicaments, l'utilisation

des pilules contraceptives, la consommation excessive d'alcool, le stress intellectuel et thermique et certains agents infectieux (Site internet 7).

II.1.2.1. Le tabagisme.

La fumée de cigarette est associée à une production de radicaux libres oxygénés qui, par leur extrême réactivité, sont susceptibles d'induire des lésions pulmonaires importantes. La présence d'un stress oxydatif principalement marqué par une diminution des défenses antioxydantes a été clairement mise en évidence chez une personne adepte à la cigarette. Cette observation autorise à penser qu'un apport journalier augmenté en antioxydants et en oligoéléments (d'autant que le fumeur a une alimentation moins saine et plus irrégulière que le non-fumeur) puisse engendrer des effets bénéfiques dans les maladies associées à la fumée de cigarette notamment l'athérosclérose, le cancer du poumon (Mourad, 2012).

II.1.2.2. L'alimentation.

Une alimentation avariée et peu riche en vitamines est clairement appauvrie en antioxydants provoquant ainsi un stress oxydatif.

Les antioxydants sont essentiellement apportés par les fruits et légumes qui sont particulièrement riches en vitamines (A, C, E), oligo-éléments et autres polyphénols. Actuellement, il est bien admis que les apports journaliers recommandés (AJR) en ces divers éléments peuvent être couverts par une prise quotidienne de cinq portions de fruits et légumes. Cette situation est toutefois loin de représenter la réalité puisque plusieurs enquêtes épidémiologiques indiquent que plus de 20% de la population des pays industrialisés ne mangent jamais de fruits. Dans une étude menée sur 123 sujets sains habitant la région liégeoise, nous avons confirmé ce chiffre et montré que les taux plasmatiques de vitamine C sont diminués en moyenne de 26,3% chez des sujets ne mangeant aucun fruit en comparaison à des personnes ingérant entre 1 et 4 fruits par jour (Morel, 1999).

II.1.2.3. Les rayons solaires.

Des intensités de rayonnement Ultraviolet élevées tuent la plupart des cellules de la couche superficielle de la peau et celles qui ne sont pas tuées sont endommagées. Dans sa forme la plus bénigne, le coup de soleil consiste en un rougissement de la peau. Il disparaît en quelques jours. Toutefois, un fort coup de soleil peut provoquer l'apparition de cloques ce qui n'est pas

seulement douloureux, mais laisse aussi la nouvelle peau très blanche située dessous sans protection et encore plus sensible aux agressions (Site internet 7).

II.1.2.4. L'activité physique.

Des études ont montré que la pratique d'une activité physique intense est très souvent facteur de déséquilibre entre les espèces réactives d'oxygène et les substances antioxydantes dans l'organisme (Site internet 8).

II.2. DEFENSES DU STRESS OXYDANT.

La formation des radicaux libres se fait de manière spontanée et continuellement dans l'organisme humain. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants (Garait, 2006).

Un antioxydant est donc une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation de certaines substances chimiques. L'oxydation peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants ont la propriété de freiner ces réactions par réduction avec les radicaux libres en vue d'annuler leur action (Encyclopédie, 2009).

Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre directement une augmentation des dommages tissulaires. Il existe deux grandes catégories d'antioxydants, ceux qui sont fabriqués par l'organisme constituant les défenses endogènes et ceux qui nous sont apportés par la nourriture, les défenses exogènes (Droge *et al.*, 2002).

II.2.1. DEFENSES ENDOGENES.

Aussi appelées antioxydants primaires, les défenses endogènes constituent la première ligne de défense contre le stress oxydatif. Elles représentent un ensemble d'enzymes fabriquées naturellement par l'organisme qui ont pour rôle de lutter contre le déséquilibre de la balance pro-oxydant /antioxydant. Il s'agit essentiellement de la super oxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. (Figure 3) (Bhalla *et al.*, 2009).

II.2.1.1. Super oxyde dismutase (SOD).

La super oxyde dismutase (SOD) a la propriété de catalyser la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Elle est qualifiée de "chef d'orchestre" de la chaîne oxydante car elle permet en premier

lieu de supprimer l'ion super oxyde particulièrement virulent et dangereux pour les cellules (Site internet 8).

Elle existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Des études ont montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter membranaire (Okado *et al*, 2001). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries (Huang *et al*, 2001).

II.2.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR).

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD. Son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en molécule d'eau (H_2O) et en dioxygène (O_2). Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Mates *et al*, 1999).

Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Nomura *et al*, 2000).

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le glutathion réduit (GSH) à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction.

Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries (Garait, 2006).

II.2.1.3. Catalase.

La catalase est également responsable de l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en molécule d'eau (H_2O) et en dioxygène (O_2). Contrairement à la GPx, on remarque une hausse de l'affinité de la catalase pour l' H_2O_2 seulement lorsqu'il y a une augmentation des teneurs en peroxyde d'hydrogène (Mates, *et al*, 1999). Cette enzyme est abondante dans le foie et les

globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

II.2.2. DEFENSES EXOGENES.

Contrairement aux défenses endogènes, la plupart de ces composants n'est pas synthétisée par l'organisme et doit être apportée par l'alimentation. Elles constituent la deuxième ligne de défense du stress oxydatif. Dans cette catégorie d'antioxydants secondaires, nous retrouvons les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C (site internet 9).

II.2.2.1. Oligoéléments

Les oligoéléments sont des éléments chimiques, minéraux ou d'origine minérale présents dans tous les organismes à l'état de traces et indispensables au bon déroulement des réactions biochimiques. Non synthétisés par l'organisme, les oligoéléments doivent obligatoirement être apportés par l'alimentation, où ils se trouvent la plupart du temps en quantité suffisante, les quantités nécessaires à l'organisme étant infimes (souvent quelques microgrammes à peine). On distingue le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe), métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant (site internet 10).

En vue de maintenir leur activité catalytique, les enzymes antioxydantes ont besoin d'un cofacteur. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium.

Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (Garait, 2006).

II.2.2.2. Glutathion (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène 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 C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (Packer *et al*, 1997).

Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté. Il permet les échanges d'électrons (donc d'énergie) à l'intérieur de la cellule protégeant ainsi les cellules de plusieurs polluants et poisons (Ji *et al.*, 1992).

II.2.2.3. Ubiquinone et Cytochrome c.

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant (Powers *et al.*, 1999). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxydes.

Connu sous le nom de Coenzyme Q10, l'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Packer *et al.*, 1997).

Le cytochrome c présent dans l'espace inter membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d'O₂^{•-} produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l'H₂O (Skulachev, 1998).

II.2.2.4. Vitamines E et C.

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être les plus importantes dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Thannickal *et al.*, 2000). On la retrouve dans les graines, les noix et l'huile.

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l'O₂^{•-} et l'OH[•]. Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Evans, 2000).

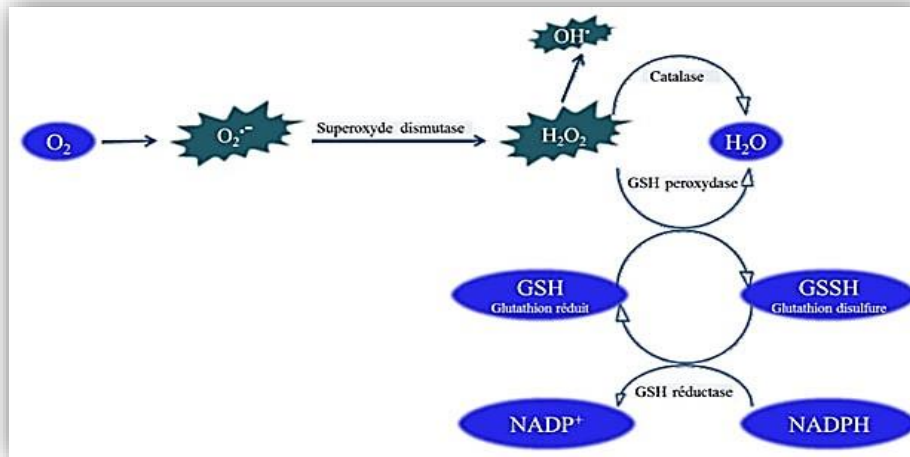


Figure 3: Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (site internet 11).

III. Stresses oxydant et cancer.

Aujourd'hui, il est admis que les formes réactives de l'oxygène, les radicaux libres, interviennent dans la pathogenèse de nombreux cancers. En effet, les radicaux libres en excès, non maîtrisés par des défenses antioxydantes insuffisantes, créent des mutations et des cassures des brins d'ADN en oxydant certaines bases, initiant ainsi la cancérogenèse. Mais leurs effets mettent en jeu des mécanismes plus complexes, en inhibant ou, au contraire, en stimulant l'expression de gènes impliqués dans la régulation, la prolifération ou la différenciation cellulaire ou encore de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, celle qui permet aux toutes premières cellules cancéreuses de s'autodétruire.

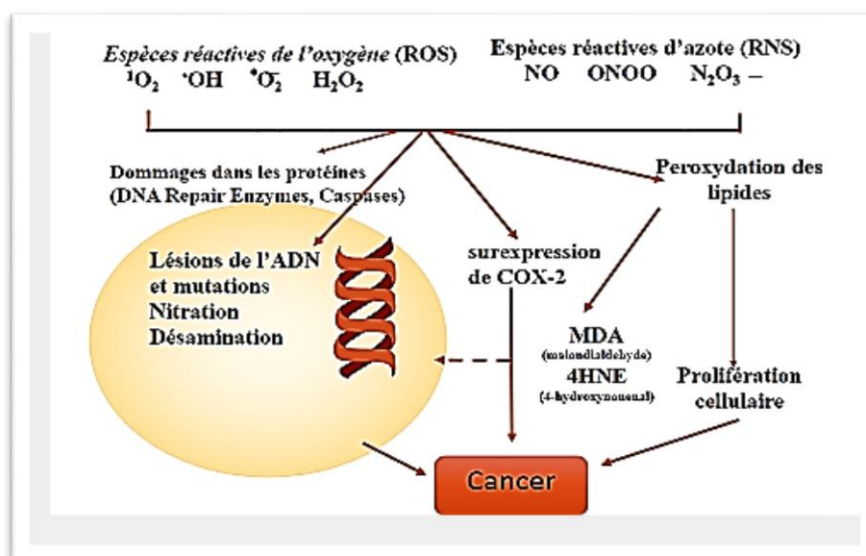


Figure 4: Relation entre le stress oxydant et le cancer

MATERIEL ET METHODES.

I. Matériel biologique.

I.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 la ratte 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 all*, 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 ratte était logée individuellement et une période d'acclimations de 10 jours a été allouée aux rats avant le début des manipulations.

I.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.

Tableau 1: Répartition des rats par lot.

01 lot témoin	T
01 lot traite à la Glisodine	SOD
01 lot traite à l'Azoxyméthane	AOM
01 lot traite à l'Azoxyméthane + Glisodine	AOM + SOD

II. Condition expérimentale.

II.1. Application des traitements.

II.1.1. Induction du cancer du côlon.

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

Azoxyméthane est un composé chimique cancérigène et neurotoxique. C'est l'oxyde d'azométhane. Il est particulièrement efficace en induisant des carcinomes du côlon chez les rats et les souris. Il a été employé dans les études évaluant l'efficacité du traitement préventif contre la carcinogénèse. Des changements et des anomalies de signalisation du facteur de croissance bêta (TGF- β) sont détectés dans les tumeurs développées par des rats traités par l'AOM. Ce dernier active la kinase intrinsèque du récepteur d'EGF tout en stimulant la synthèse de TGF- α .

Deux voies principales, WNT et TGF β , convergent dans le noyau pour affecter l'expression du Myc. Les modèles murins pour le cancer du côlon ont été développés en modifiant génétiquement plusieurs composants de ces deux voies (Joshua, *et al.*, 2009).

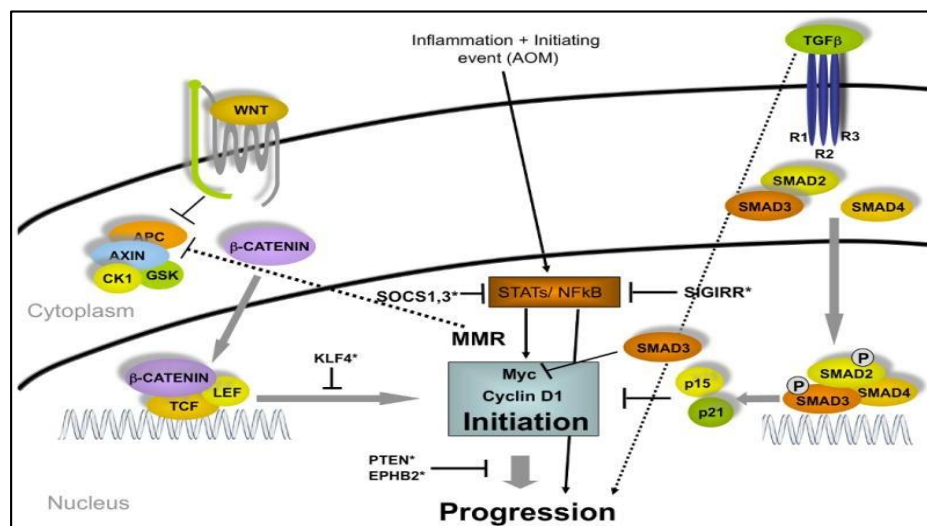


Figure 5: Les voies moléculaires associées au cancer colorectal. (Joshua, *et al.*, 2009).

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

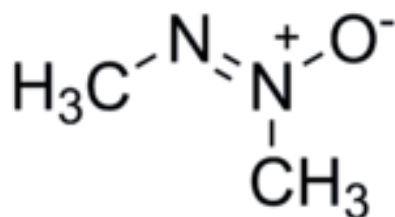


Tableau 2: La structure chimique et propriétés de l'Azoxyméthane

Nom d'IUPAC	Methyl-methylimino-oxidoazanium	
Autres noms	Dimethyldiazene-1-oxide	
Propriétés	Formule moléculaire	C ₂ H ₆ N ₂ O
	La masse molaire	74.08 g mol ⁻¹
	Densité	0.991 g/ml
	Point d'ébullition	97-99 °C

II.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 6), (Menvielle, 2005).

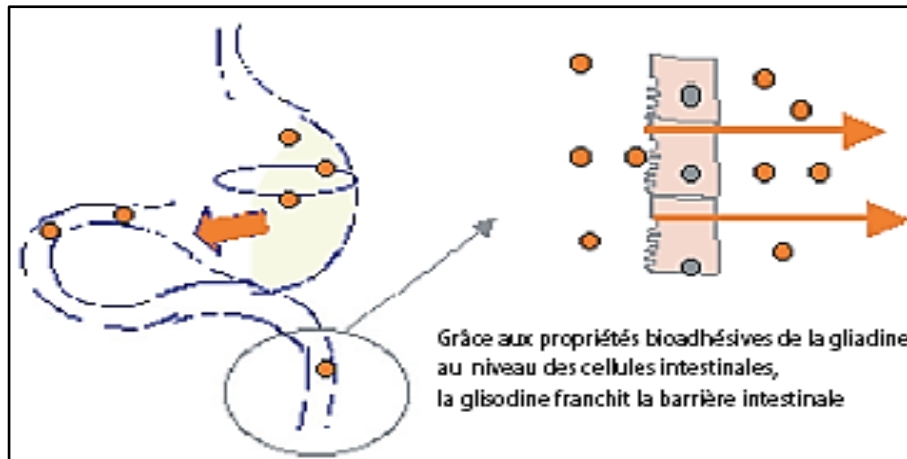


Figure 6: Représentation schématique du transit et de l'absorption intestinale de la SOD couplée à la gliadine (Menvielle, 2005).

Nous avons utilisé la Glisodine, une formule végétale, constituée d'un extrait de melon (*Cucumis melo* LC) riche en SOD, couplée 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 (Fig.7).

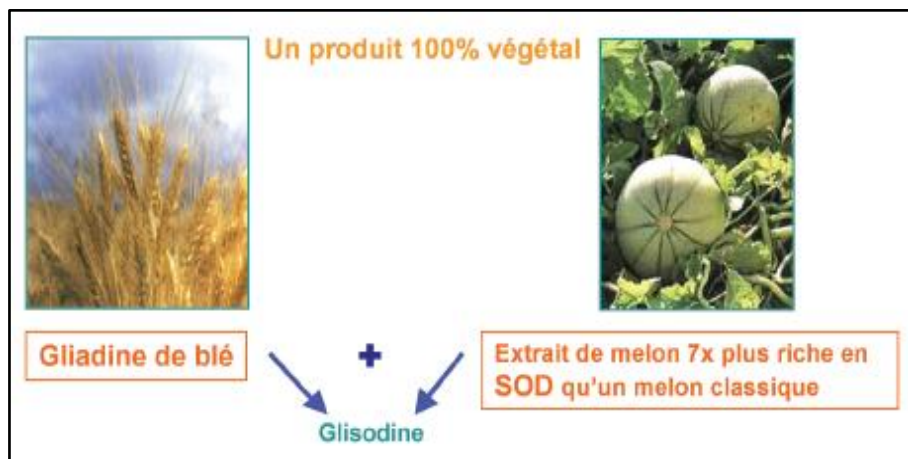


Figure 7: La Glisodine une super oxyde dismutase conjuguée à la Gliadine, formule végétale originale (Menvielle, 2005).

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

III. Protocole expérimental.

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

Tableau 3: Protocole expérimental

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

III.1. Prélèvement sanguin.

Les prélèvements sanguins sont effectués après 12 semaines de traitement, et décapitation. 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 4000 tr/min pendant 15 minutes ; le plasma obtenu est aliquoté et conservé à une température de -20°C pour les dosages biochimiques.

III.2. Dissection et prélèvement d'organes.

L'animal est pesé, sacrifié, 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 rate sont prélevés à l'aide d'une pince fine sous glace et pesés à l'aide d'une balance de précision (Fig. 6).

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 en plusieurs fractions à - 20°C pour le dosage du glutathion réduit (GSH), de la glutathion-S-transférase (GST), de la catalase (CAT) et de la du super oxyde dismutase (SOD).

Les côlons sont soigneusement prélevés et leurs longueurs mesurés à l'aide d'un papier millimétrique. Une incision est pratiquée longitudinalement de la partie rectale jusqu'au

caecum, puis ils sont rincés avec une solution saline et d'ambly fixés à plat dans du formol à 10% pendant 24h pour le comptage des cryptes et des ACF.

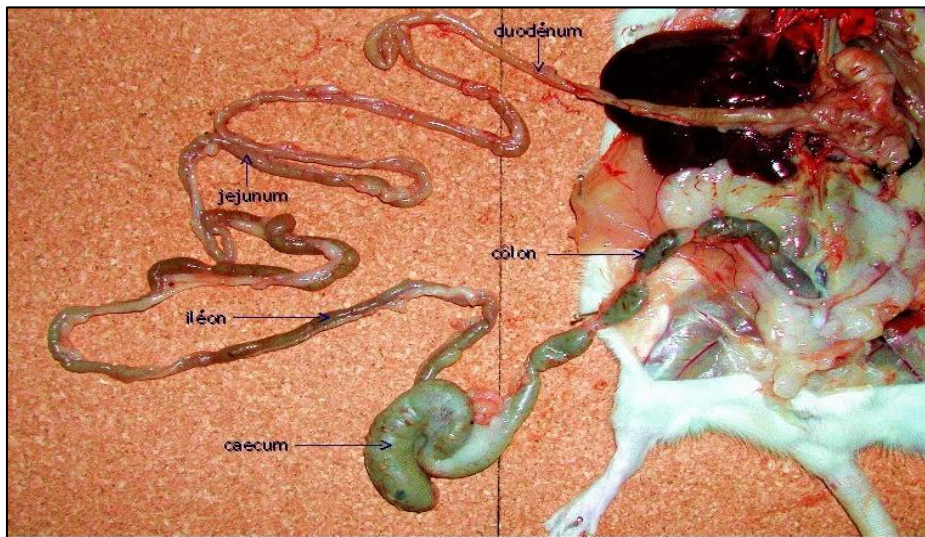


Figure 8: Mise en évidence du côlon après dissection de la ratte (Baba Ahmed; 2008)

III.2.1. Coloration et comptage des ACF (aberrant crypt foci).

La mise en évidence de foyers de cryptes aberrantes (ou aberrant crypt foci : ACF) sur des colons de ratte entiers fixés à plat dans le formol à 10% est effectuée selon la méthode de Bird (1987) (Bird *et al*, 1987), utilisant la coloration au bleu de Méthylène. L'Observation se fait sur la totalité de la surface de la muqueuse colique.

Qu'est-ce qu'un ACF ? Découvert par Bird en 1987, qui considère les ACF comme des lésions préneoplasiques du cancer du côlon prédictives de tumeurs. Depuis, les ACF ont été largement utilisés, à finalité biologique, pour évaluer l'induction ou la modulation de la carcinogénèse colique chez le rat ou la souris.

III.2.1.1. Mode opératoire.

III.2.1.1.1. 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 ceceum), on colore simultanément les 2 morceaux.

- Rinçage par passage dans l'eau distillée (car les colons sont stockés dans du formol)
- Coloration dans le 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 à 7 min pour les 2 premiers colons, ensuite 10min pour les autres colons, en effet le BM se dilue au contact des colons. 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 :**

La lecture se fait par deux expérimentateurs au microscope optique, objectif 5 et 10X grossissement. L'ordre des colons est aléatoire et la lecture est dite en aveugle car les colons sont codés par 2 lettres.

❖ **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 des cryptes normaux
- Structure surélevée
- Regroupement net en foyer « foci ».

III.3. Exploration du statut antioxydant.

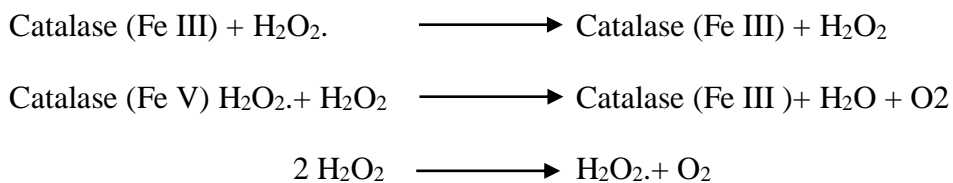
III.3.1.1. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

III.3.1.1.1. Préparation de l'homogénat

Mettre 500 mg du côlon en présence de 4 ml d'une solution de Tampon Phosphate à 0.1 M. Le mélange est broyé aux ultrasons pendant 30 secondes à une température de 4°C, en suite centrifugé à 500 tours/ min pendant 15 minutes.

❖ 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 (Rigoli *et all*, 1995).



❖ 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 (H₂O₂) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 mn à pH 7.5, 200 µl de H₂O₂ ,5500 mM sur 20 µl du de sang hémolysé, à une température d'incubation de 25°C. Les réactifs ont pour origine Sigma Aldrich. Les résultats ont été exprimés en µmole de H₂O₂ par minute et par mg protéine.

Tableau 4: Protocole utilisé pour le dosage de l'activité du CAT

Réactifs	ESSAI	BLANC µl
T. phosphate 100 Mm ; pH= 7.5	780	800
H ₂ O 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 µl 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 :

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

ε : coefficient d'extinction,

$\text{L} = 1$,

X : protéine en mg

III.3.1.2. Dosage des protéines tissulaires.

❖ Principe

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

❖ 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 homogénéiser 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 si dessous :

Tableau 5: 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

III.3.1.3. Dosage de l'activité du glutathion (GSH).

Le glutathion (8-glutamyl-cystéinyl-glycine) est un tripeptide constitué d'acide glutamique, cystéine et de glucine. 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.

❖ 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 le groupement (-SH) du glutathion. Le glutathion hépatique est dosé selon la méthode de Weckbecker et Cory, (1988) en utilisant le spectrophotomètre.

❖ 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.

III.3.1.4. 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 (Poonkuziali *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 étape dans la formation de composés moins toxique et plus hydrosoluble que les molécules de départ (Chatterjee *et al*, 1984).

❖ 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 de 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, 1998).

❖ **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 1 min à 340 nm.

Tableau 6: 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 M (1976) en recourant à une courbe d'étalonnage préalablement réalisée au moyen de l'albumine bovine sérique (BSA).

III.3.1.5. Dosage de l'activité de super oxyde dismutase.

L'activité de la super oxyde dismutase (SOD) est mesurée par la méthode de Deschamps et Fridovich (1971) modifiée par Oberley et Spitz (1985) utilisant comme substrat la xanthine sigma 18 mM et la xanthine oxydase diluée à 0.25 U/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.

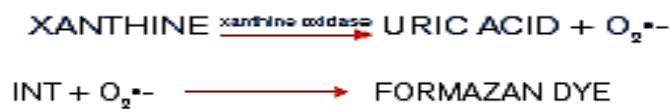


Tableau 7: Protocole utilisé pour le dosage de la SOD

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

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

III.3.1.6. Dosages plasmatique.

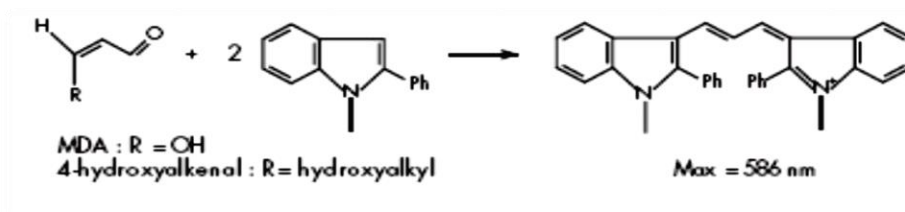
III.3.1.6.1. Dosage des lipoperoxides LPO.

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 en tandem fournissent un biomarqueur simple pour

la mesure de la peroxydation générale des lipides. La méthode LPO-586 est plus adaptée pour mesurer MDA en combinaison avec 4 hydroxyalkenals (Esterbauer *et al.*, 1991).

❖ Principe

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



❖ Réactifs.

Tableau 8: protocole utilisé pour le dosage de la LPO :

Réactif R1	N-méthyl-2-phenylindole 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.

❖ 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 microcentrifugeuse 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 (15,000 × g pendant 10 minutes) pour obtenir un surnageant clair.
- Transférer le surnageant clair dans une cuvette.
- Mesurer l'absorbance à 586 nm.

Pour le dosage du LPO on fait les mêmes étapes du MDA mais à la place HCl on ajoute 150 µl de R2.

❖ **Calcul de la concentration.**

On a utilisé les données de la droite de régression (fig.8) pour calculer la concentration en MDA des différents échantillons. Selon la formule ci-dessous :

$$[A586] = \alpha [MDA] + b$$

$$[MDA] = \frac{A586 - b}{\alpha} \bullet$$

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

A₅₈₆ : Absorbance net à 586 nm de l'échantillon.

df : Facteur de dilution.

a : Coefficient de régression (pente).

b : Interception.

Tableau 9: Courbe des volumes standards 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

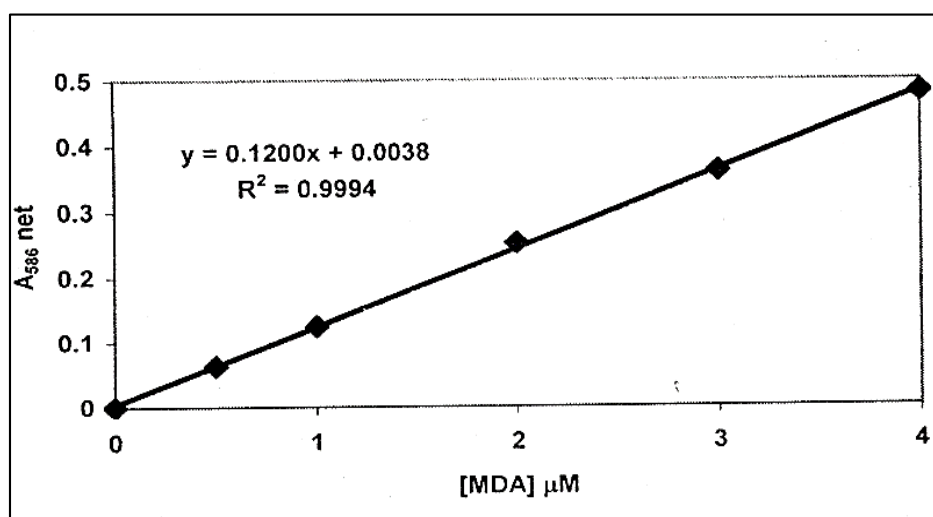


Figure 9: Courbe représentant les densités optiques en fonction des concentrations des standards MDA

IV. Statut inflammatoire

Le dosage de l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et le tumor necrosis factor (TNF- α) sont estimées à l'aide des kits commercial (cayman chemical company). Concernant l'interleukine-2 (IL-2) et l'interleukine-10 (IL-10) sont évaluées à l'aide des kits commercialisés par (Boster Immunoleader, Boster Biological Technology) voir fiche en annexe

IV.1. Dosage immunologique du CEA

Le dosage de l'antigène carcinoembryonnaire CEA a été réalisé par un kit Sigma aldrich (Catalog Number SE120025)

L'Antigène carcinoembryonnaire (CEA), est une protéine de 180 kDa, molécule d'adhésion intercellulaire exprimée en concentrations élevées dans le fœtus mais normalement et absente dans le sérum adulte car la synthèse de cette protéine cesse après la naissance. Cependant, il réapparaît avec des concentrations élevées dans les sérums des patients atteints de cancer colorectal (57%), gastrique (41%), hépatocellulaire (45%), pancréatique (59%) et carcinome biliaire (59%). Dans le sérum la concentration de CEA peut également être élevée pour les maladies bénigne colorectum (maladie inflammatoire de lintestin à 17%), estomac (gastrite chronique et ulcère 14%), le foie (cirrhose et hépatite 17%), et pancréas (21%). Des niveaux élevés de CEA ont également ont été observés chez des patients présentant une maladie inflammation non malignes telles que l'emphysème pulmonaire, cirrhose alcoolique, pancréatite et chez les gros fumeurs. Contrairement au cancer, ces élévations sont transitoires. Les niveaux de sérum retombent dans la plage normale dans quelques semaines. L'utilisation principale du CEA est de surveiller les patients après une chirurgie pour colorectal récurrent carcinome. Le sérum CEA a une sensibilité entre 60 à 95% dans la détection des récives avant la clinique.

V. Techniques histologiques.

V.1. Prélèvement.

Les prélèvements, quels qu'ils soient doivent être effectués avec le plus grand soin, car leur qualité conditionne directement les possibilités d'étude. Après dissection de l'animal le

colon est soigneusement prélevé, trois morceaux sont respectivement coupé, rectal, médian et proximal et d'ambly fixés dans du formol à 10%.

V.2. La fixation.

A pour buts la conservation des structures et le durcissement des tissus, Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion dans un fixateur le formaldéhyde à 10%.

V.3. L'inclusion

A pour but la réalisation de coupe histologique, le milieu d'inclusion le plus souvent utilisé est la paraffine Comme la paraffine est hydrophobe le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation dans des bains d'alcool.

V.4. La Coloration

Afin de distinguer les différents tissus, on peut avoir recours à différents colorants. Parmi les différentes techniques de coloration, l'Hématoxyline-Éosine permet une coloration bleue du noyau et rose du cytoplasme.

- Déparaffinage (toluène / xylène -éthanol)
- Hydratation
- Coloration proprement dite (routine)
- Déshydratation (éthanol)
- Éclaircissement (xylène)

Tableau 10: Les étapes depuis le prélèvement jusqu'au bloc (Richard *et al.*, 2009).

Etape	Réactif	Durée (Min)	Température (c°)
1	Fixateur	200	<40
2	Ethanol 50%	20	45
3	Ethanol	30	45
4	Ethanol	40	45
5	Ethanol	40	45
6	Ethanol	50	45
7	Ethanol 100%	50	45
8	Toluène	45	45
9	Toluène	45	45
10	Toluène	45	60
11	Paraffine	60	60
12	Paraffine	60	60
13	Paraffine	60	60
Etape	Réactif	Durée (Min)	Température (c°)
1	Fixateur	200	<40
2	Ethanol 50%	20	45
3	Ethanol	30	45
4	Ethanol	40	45
5	Ethanol	40	45
6	Ethanol	50	45
7	Ethanol 100%	50	45
8	Toluène	45	45
9	Toluène	45	45
10	Toluène	45	60
11	Paraffine	60	60
12	Paraffine	60	60
13	Paraffine	60	60

VI. Analyse statistique :

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes et écart-type. Nous avons utilisé le test d'analyse de la variance à un critère de classification ANOVA one way suivi du test de Tukey pour comparer les moyennes entre elles d'une part et entre celles des témoins d'autre part. $P < 0.05$ est considéré comme étant le seuil significatif.

RESULTATS.

I. 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, 11 12 et 132 ; et illustrés au niveau des figures 10, 11, et 12.

I.1. Variation du poids corporel.

Nos résultats montrent une augmentation significative du poids corporels chez les rattes traitées à l'AOM en comparaison aux rats témoins des lots AOM plus SOD, (AOM : 259.2 ± 29.58 et AOM+SOD : 238.2 ± 46.39 vs T : 201 ± 13.89 , $P < 0.05$). (Tableau 11, figure 10). De plus le traitement per os des rats par la glisodine semble atténuer cette augmentation.

Tableau 11: Variation des poids corporels en grammes chez les rats témoins et traités

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

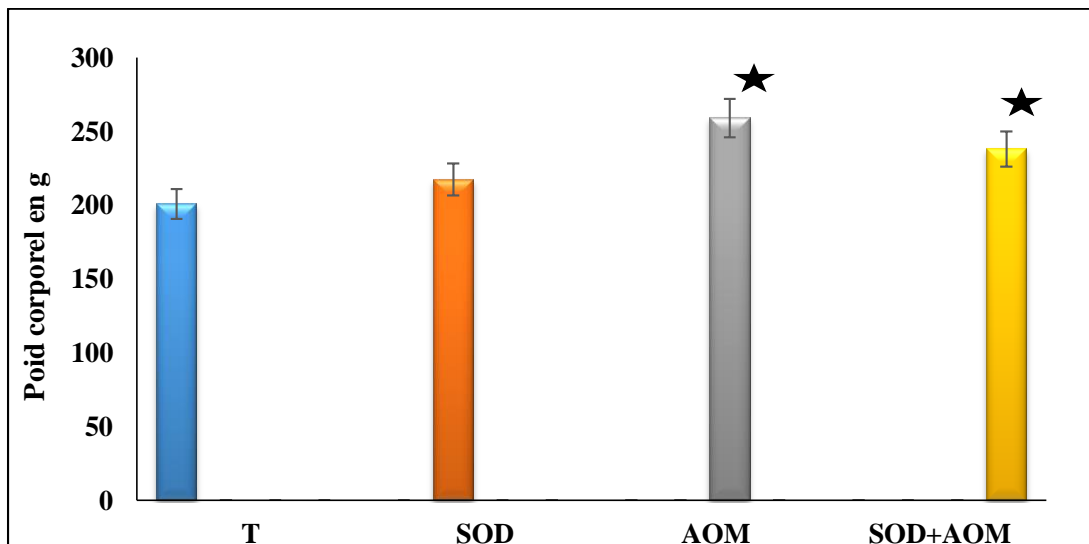


Figure 10: Variation du poids corporels en grammes chez les rats témoins et traitées.

I.2. Variation du poids du foie.

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 rattes traitées à l'AOM par rapport aux lots témoin et SOD (AOM : 8.18 ± 1.18 ; AOM+SOD : 7.504 ± 1.10 vs T : 6.058 ± 0.47 , $P < 0.05$). En revanche, aucune différence significative n'était enregistrée concernant le poids relatif chez les différents lots (Tableau 12, Figure 11).

Tableau 12: 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 ± 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

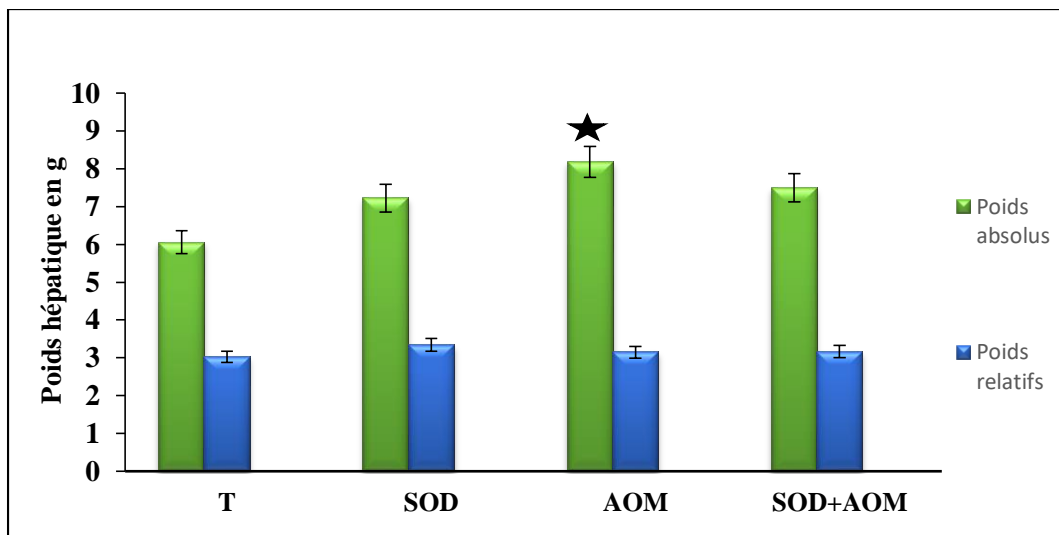


Figure 11: Variation des poids hépatiques absolus et relatifs en gramme chez les rats témoins et traité.

I.3. Variation du poids de la rate.

Après 12 semaines de l'administration d'AOM à 15mg/kg, le poids a augmenté d'une manière significative en comparaison aux rats non traitées en l'occurrence les rats témoins et ceux du lot SOD (AOM : 0.924 ± 0.18 vs T : 0.804 ± 0.12 et SOD : 0.767 ± 0.15 $P < 0.01$). Cependant, la supplémentation orale de la glisodine à 300 mg/kg a diminué significativement le poids de la rate 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 vs T : 0.804 : non significatif) (Tableau 13 et Figure 12).

Tableau 13: Variation des poids de la ratte en gramme chez les rats témoins et traités.

Lots	T	SOD	AOM	AOM + SOD
Poids de la ratte	0.804 ± 0.12	0.767 ± 0.15	0.924 ± .18*	0.820 ± 0.17
Poids relatif	0.4 ± 0.01	0.35 ± 0.008	0.35 ± 0.007	0.34 ± 0.01

* : p < 0.01 vs T et SOD

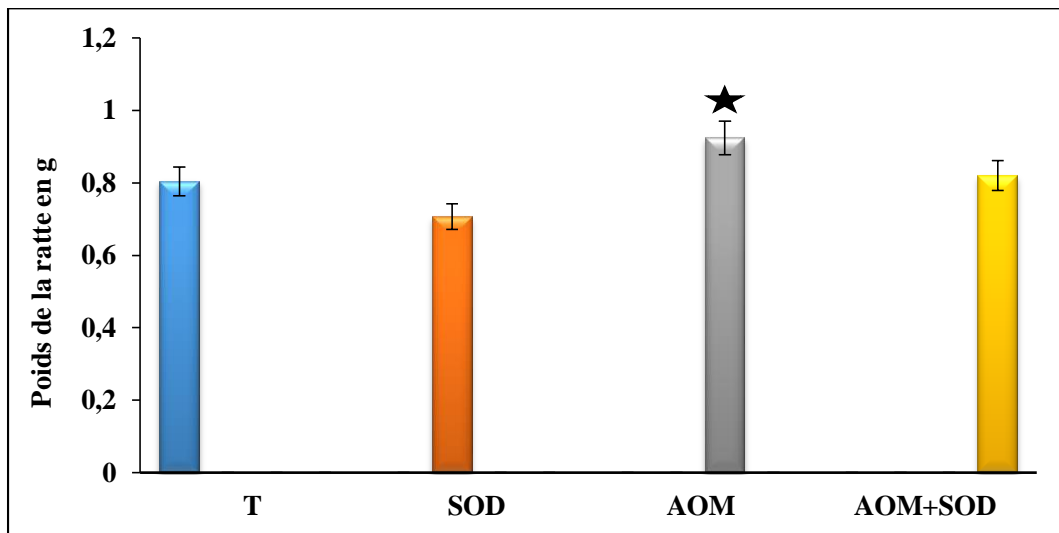


Figure 12: Variation des poids de la ratte en grammes chez les rats témoins et traités.

II. 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.

II.1. Variation de la concentration des LPO plasmatique.

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative de la concentration des lipoperoxides LPO chez les rattes traitées par l'azoxyméthane 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 supplémentation per os de la glisodine aux rats AOM a diminué significativement la concentration du LPO plasmatique comparativement au lot non traité. (AOM+SOD : 16.53 ± 2.8 vs AOM : 21.8 ± 2.3, P < 0.05) (Tableau 14, Figure 13). Ce qui suggère un effet lipooxydatif de l'AOM et prophylactique antioxydant de la glisodine.

Tableau 14: Variation de la concentration plasmatique des 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 ± 2.3 ^{**}	16.53 ± 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

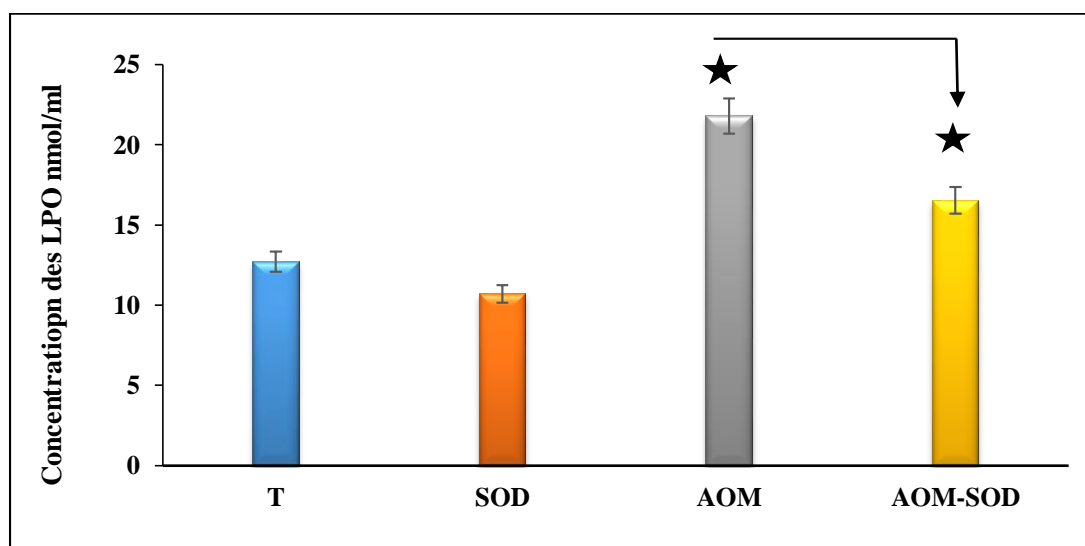


Figure 13: Variation de la Concentration plasmatique des LPO en nmol/ml chez les rattes témoin et traités

II.2. Activité colique de la superoxyde dismutase.

Nos résultats révèlent d'une part, un accroissement significatif de l'activité de la superoxyde 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 de la superoxyde 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 induit significativement l'activité de la superoxyde dismutase (AOM+SOD : 6.72 ± 1.07 vs AOM : 3.82 ± 0.87 ? $P < 0.05$) (Tableau 15, Figure 14).

Tableau 15: Variation de l'activité de la superoxyde dismutase colique en Unité/mg

Lots	T	SOD	AOM	AOM-SOD
SOD 50% U/min/mg	8.53 ± 1.6	12.08 ± 1.9*	3.82 ± 0.87**	6.72 ± 1.07* ^a

U= 50% xantine oxydée/min/mg protéine

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

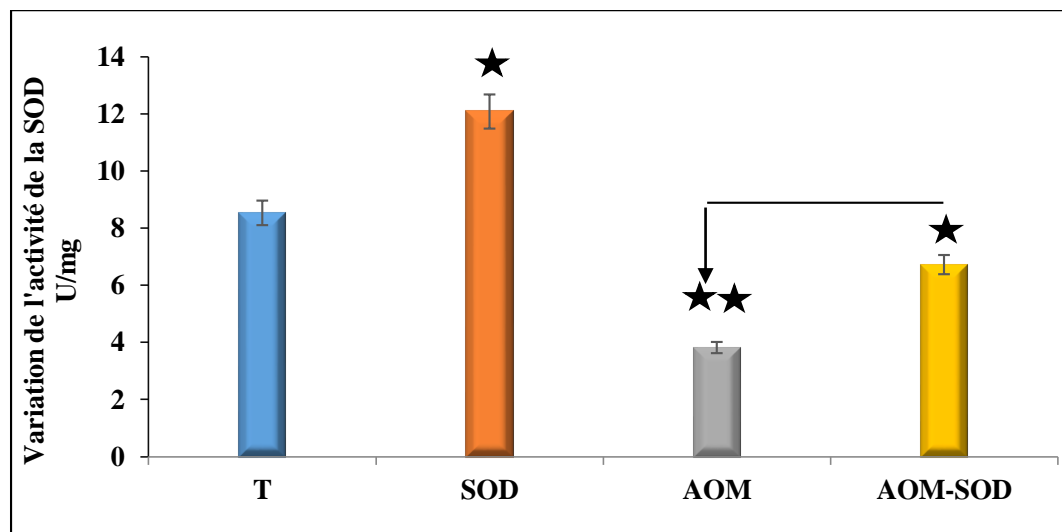


Figure 14: Variation de l'activité de la superoxyde dismutase.

II.3. Activité de la catalase colique chez les rattes témoins et traitées.

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 précancéreux 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 antioxydant (AOM+SOD : 30.65 ± 1.8 vs AOM : 20.12 ± 1.3 P < 0.05) (Tableau 16, Figure 15).

Tableau 16: 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 ± 1.3 ^{**}	30.65 ± 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

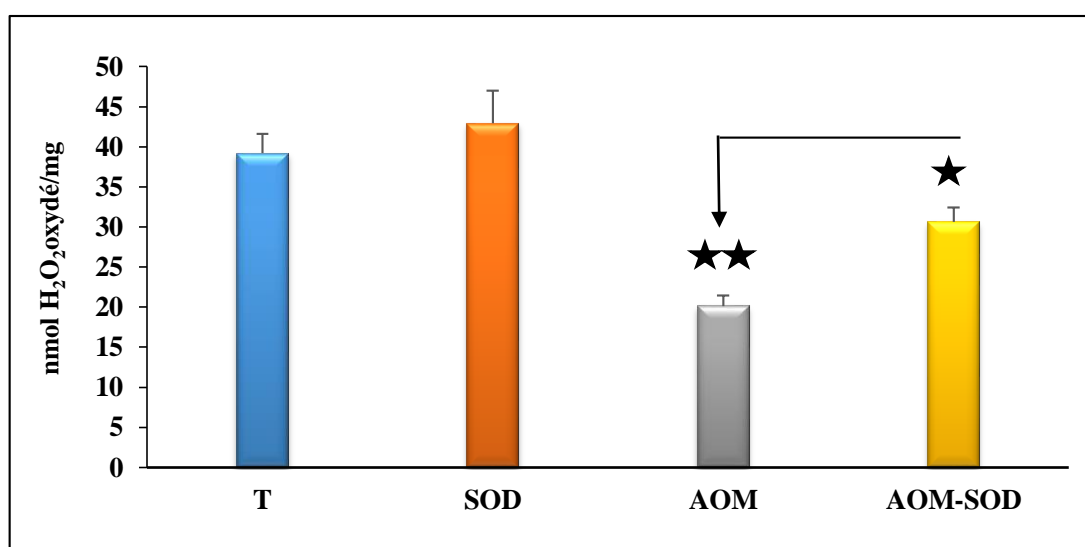


Figure 15: Variation de l'activité de la catalase en nmol H₂O₂ oxydé/min/mg protéine chez les rattes témoins et traitées.

II.4. Activité de la glutathion-S-transférase colique chez les rats témoins et traités.

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 rattes traitées 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 17, Figure 16).

Tableau 17: 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 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	122.5 \pm 4.9	127.05 \pm 4.6 ^{NS}	76.8 \pm 5.3**	91.2 \pm 3.9*

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

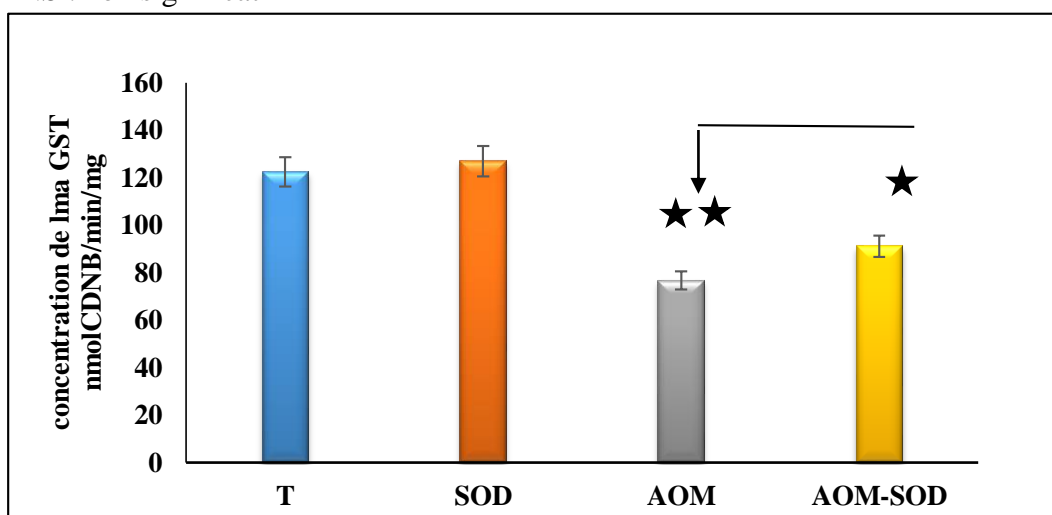


Figure 16: Variation de l'activité de la GST en nmol CDNB/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.

II.5. Teneur en glutathion colique chez les rattes témoins et traitées.

Les résultats illustrent une diminution hautement significative de l'activité du GSH chez les rattes 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 rattes cancéreuses augmente significativement la concentration du GSH (AOM+SOD : 28.53 ± 2.8 vs AOM : 19.88 ± 2.3 , $P < 0.05$). (Tableau 18, Figure 17).

Tableau 18: Variation de l'activité du glutathion réduit GSH en nmol/mg protéine chez les rattes témoins et traitées.

Lots	Témoin	SOD	AOM	AOM-SOD
GSH nmol/mg	41.70 ± 3.2	43.21 ± 2.7 ^{NS}	19.88 ± 2.3 ^{**}	28.53 ± 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

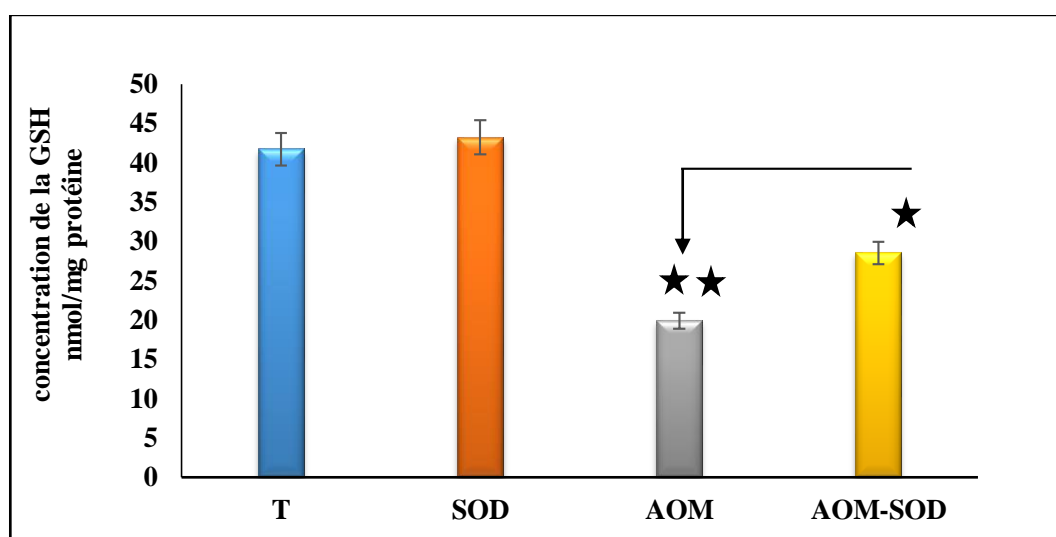


Figure 17: Variation de l'activité du glutathion réduit GSH en nmol/mg protéine chez les rats témoins et traitées

III. Profil inflammatoire

La concentration plasmatique en cytokine est représentée dans le tableau N° : 19 les paramètres pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-10 et TNF- α) et le facteur de croissance de cellules T (IL-2) ont été évalués chez les rats témoins, cancéreux et ceux traité par la SOD Végétale. On note une augmentation significative pour l'IL-1 β , IL-6 et l'IL-10 et hautement significative pour TNF- α , chez les rats cancéreux en comparaison avec les témoins. En revanche le traitement des rats AZM avec la glisodine à dose de 300mg/kg pendant 12 semaines, entraîne une amélioration dans le profil pro inflammatoire avec une diminution significative pour l'IL-1 β et l'IL-6, et non significative pour IL-10 et TNF- α . Concernant le niveau plasmatique d'IL-2 (facteur de croissance des cellules T nécessaire pour la survie et la prolifération des cellules T), a été significativement réduit chez les rats cancéreux par rapport à celles des contrôle. Le

niveau plasmatique de l'IL-2 était significativement restauré chez les rats cancéreux traités par la SOD végétale (figure 18).

Tableau 19: Effet de la glisodine sur la variation des paramètres immunologiques.

Lots expérimentaux	Paramètres Immunologiques				
	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Témoin	98.98 \pm 5.26	198.1 \pm 10.6	80.07 \pm 5.20	63.4 \pm 3.80	23.66 \pm 0.6
AOM	176.09 \pm 9.73*	121.28 \pm 1.6***	195.7 \pm 11.6*	92.17 \pm 5.03*	37.08 \pm 2.27**
SOD	90.59 \pm 3.92 [#]	164.75 \pm 8.10 ^{##}	93.5 \pm 1.54 [#]	59.9 \pm 10 [*]	22.21 \pm 2.05 ^{##}
AOM-SOD	120.34 \pm 7.70 [#]	157.7 \pm 11.6 ^{*#}	126.1 \pm 10.6 ^{*#}	88.14 \pm 3.36 [*]	31.07 \pm 3.22

Les résultats sont exprimés en : (M \pm SEM), # P < 0.05, ## P < 0.01 comparaison avec le groupe cancéreux non traité ; *P < 0.05 ; ***P < 0.001 comparaison avec le groupe témoin.

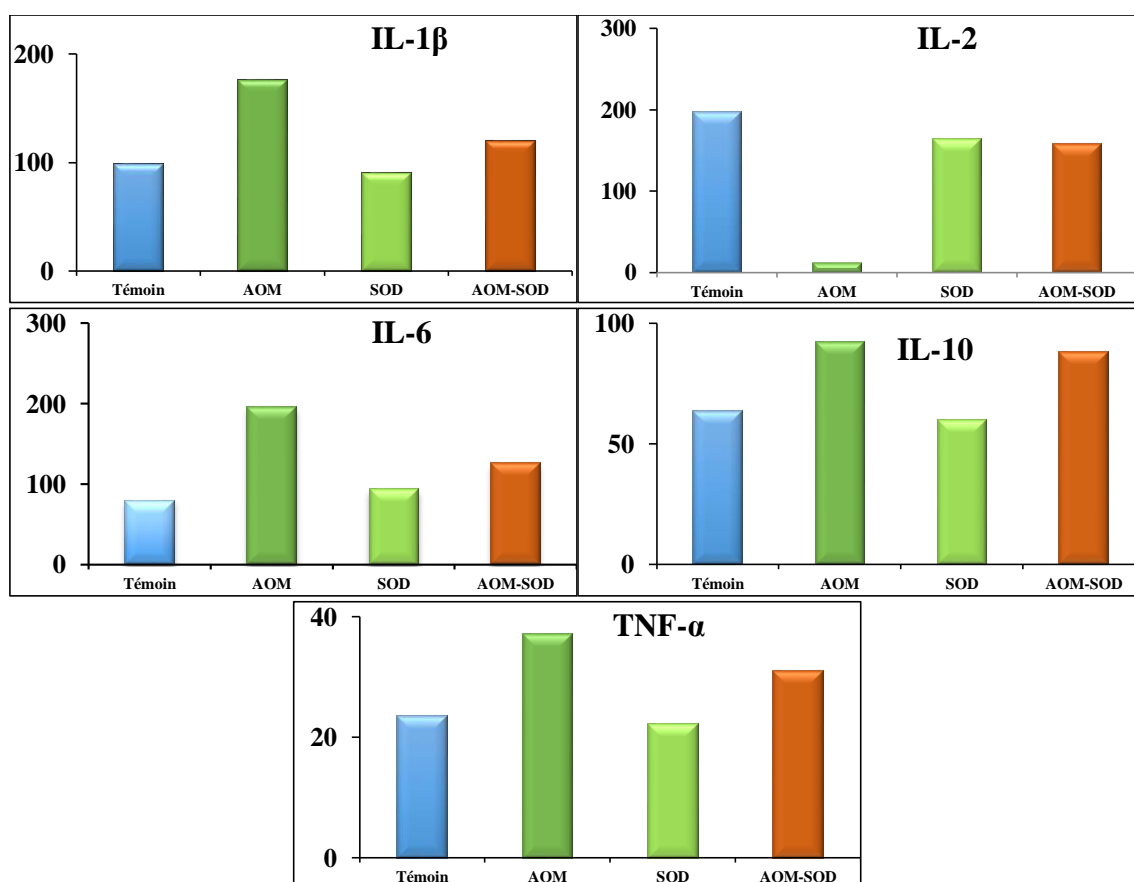


Figure 18: Effet de la glisodine sur la variation des paramètres immunologiques.

IV. 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 aberrants (ACF) au niveau du colon selon la méthode utilisée par Bird (1987).

**L'observation en microscopie 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 19 et 20 et illustrés par les figures 18,19, et 20.

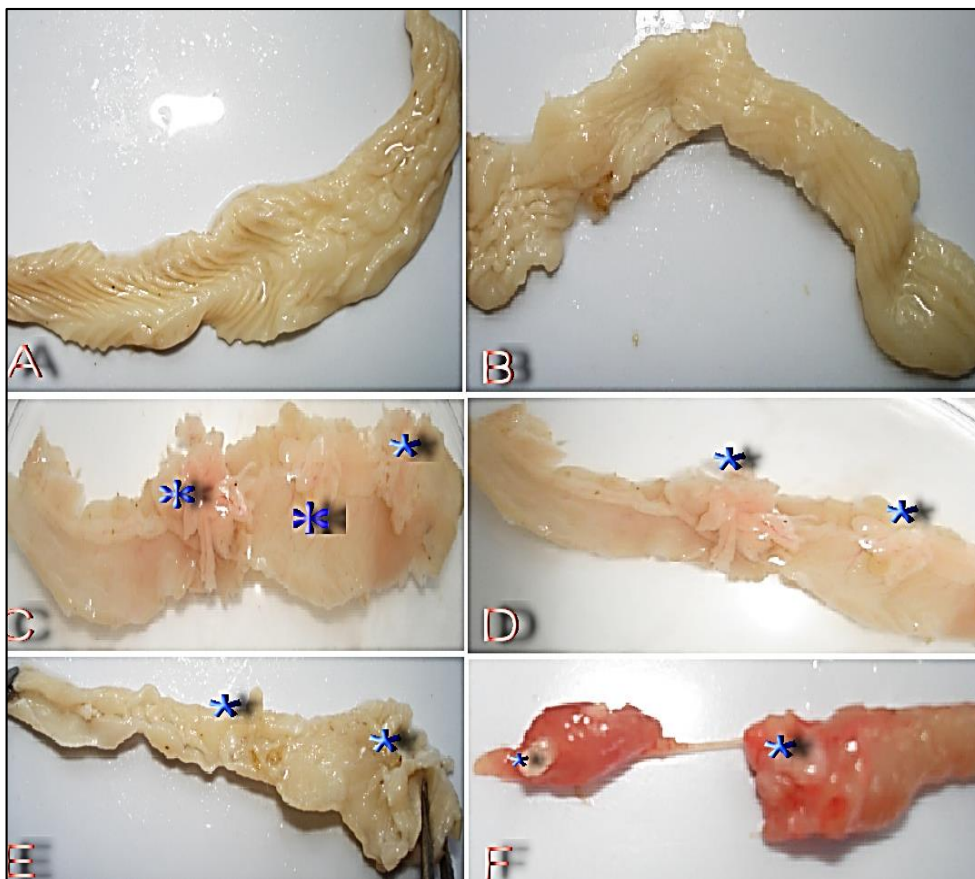


Figure 19: Vue macroscopique des colons de rattes traitées par l'AOM (C, D, E, F) montrant une présence de tumeurs (indiquées par*) en comparaison avec le colon des rattes témoins (A) et des rattes témoins traitées par la glisodine (B). F : partie distale d'un colon traité par L'AOM révélant des adénomes (Baba Ahmed ; 2008).

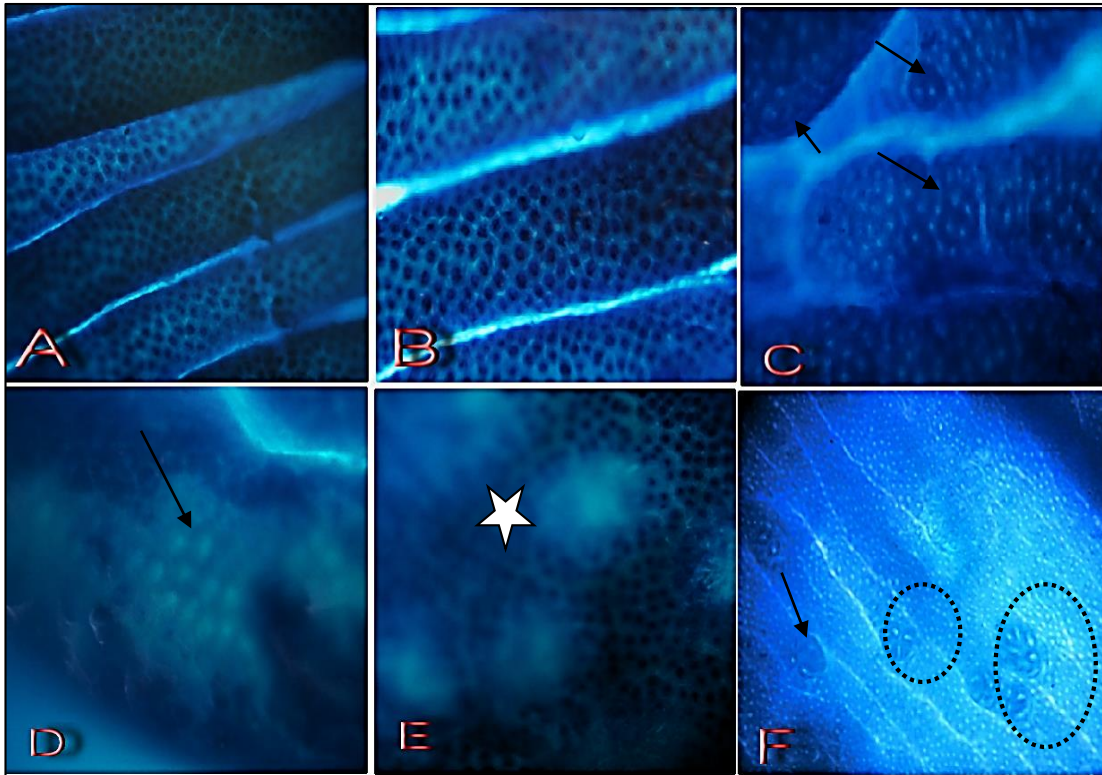


Figure 20 : Vue microscopique de colons colorés au bleu de méthylène selon Bird, des rattes traitées par l'AOM (C, D, E, F) montrant des foyers de cryptes aberrants ACF (flèche) en comparaison aux colons témoin et ceux traités par la glisodine (A, B). En C : ACF à 2, 3 et 4 cryptes (flèche) ; D : ACF multiples > 4 cryptes ; E : adénome précoce (étoile) ; F : ACF multicryptique colon AOM + SOD. Grossissement X75 et X150 (Baba Ahmed ; 2008).

IV.1. Effet de la glisodine sur la multiplicité des lésions précancéreuses (ACF aberrant crypt foci) induites par l'AOM chez la ratte.

Nos résultats révèlent, que l'incidence des lésions précancéreuses présente un pourcentage qui varie de 80 à 100 % chez les lots prétraités par L'AOM par rapport aux lots non traités T et SOD. De plus l'administration 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 diminution significative des ACF multiples > 4 cryptes (AOM+SOD : 39.6 ± 11.3 vs AOM : 76.8 ± 9.5). (Tableau 20 et 21, Figure 21 et 22).

Tableau 20: Effet de la glisodine sur l'induction des ACF (aberrant crypt foci) par l'AOM chez la ratte.

Lots	Incidence	Nb total ACF/colon	Multiplicité ACF \leq 4
Témoïn	0/5 (0%)	0	0
SOD	0/5 (0%)	0	0
AOM	5/5 (100)	156.4 ± 19.8	76.8 ± 9.5
AOM-SOD	4/5 (80)	108.6 ± 22.7 *	39.6 ± 11.3 *

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

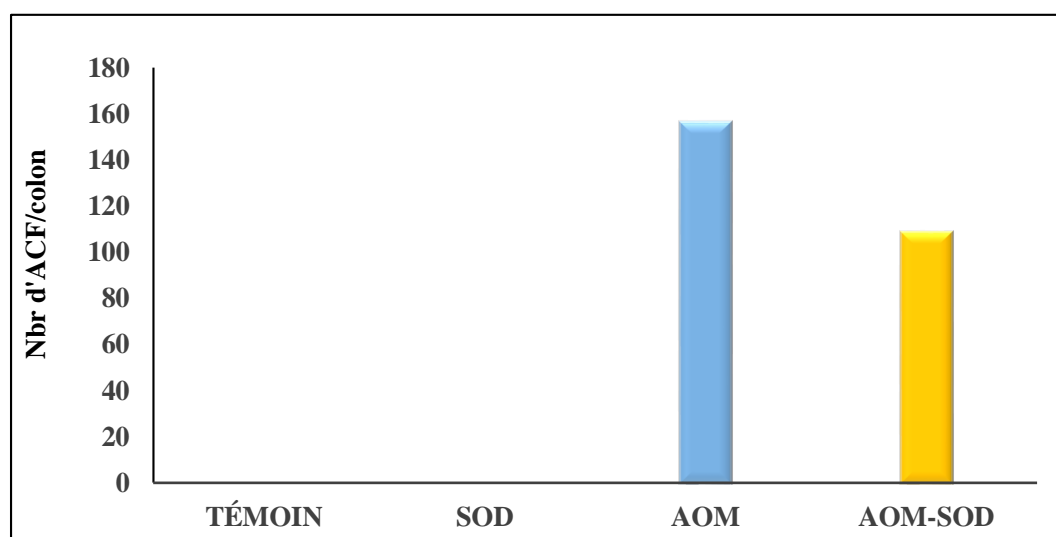


Figure 21: Effet de la glisodine sur l'induction des ACF (aberrant crypt foci) par l'AOM chez les rattes.

Tableau 21: Effet de la glisodine sur la multiplicité des ACF induit par l'AOM chez la ratte.

Lots	ACF 2 cryptes	ACF 3 cryptes	ACF ≤ 4
Témoin	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 cryptes 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

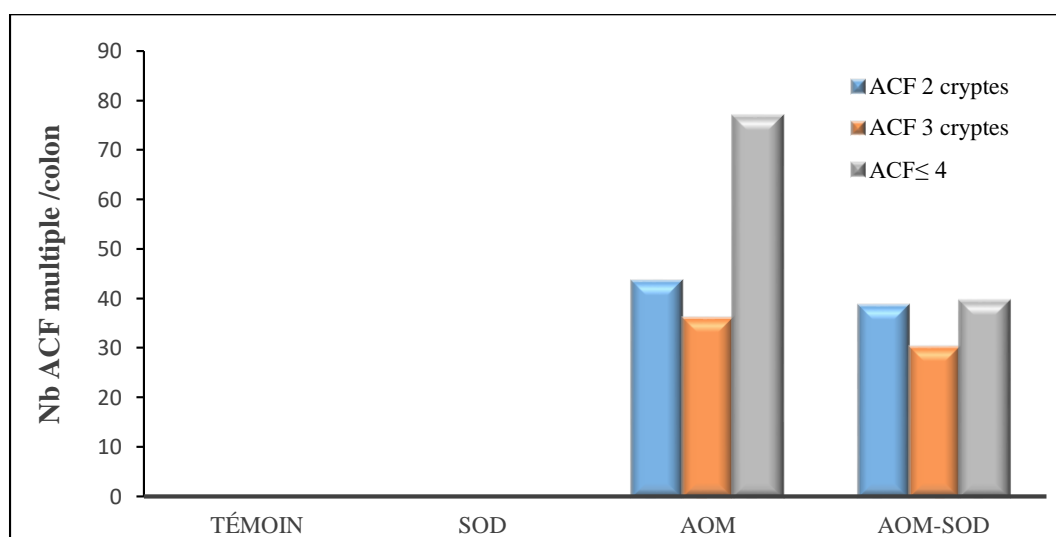


Figure 22: Effet de la glisodine sur la multiplicité des ACF induit par l'AOM chez la ratte.

IV.2. Variation de l'expression du marqueur embryonnaire du cancer colorectal

L'analyse Par la méthode ELISA du plasma des rats témoins, cancéreux et ceux traités par la glisodine a révélé une expression hautement significative de cet antigène chez les rats cancéreux comparativement aux rats témoins et ceux traités par la glisodine (tableau 22° et figure 23)

Tableau 22: Variation de la concentration du carcinoembryonnaire antigène (CEA) chez les rats témoins, cancéreux et traités par la SOD à raison de 300 mg/kgPV

Lots expérimentaux	Témoin	SOD	AOM	AOM-SOD
CEA (ng/ml)	0.595 ± 0.12	0.519 ± 0.18	3.21 ± 0.17 **	2.11 ± 0.21 *

Valeurs présentées en moyenne ± SE. ** et * P < 0.01 et P < 0.05 vs témoin et SOD ; a : P < 0.05 vs AOM

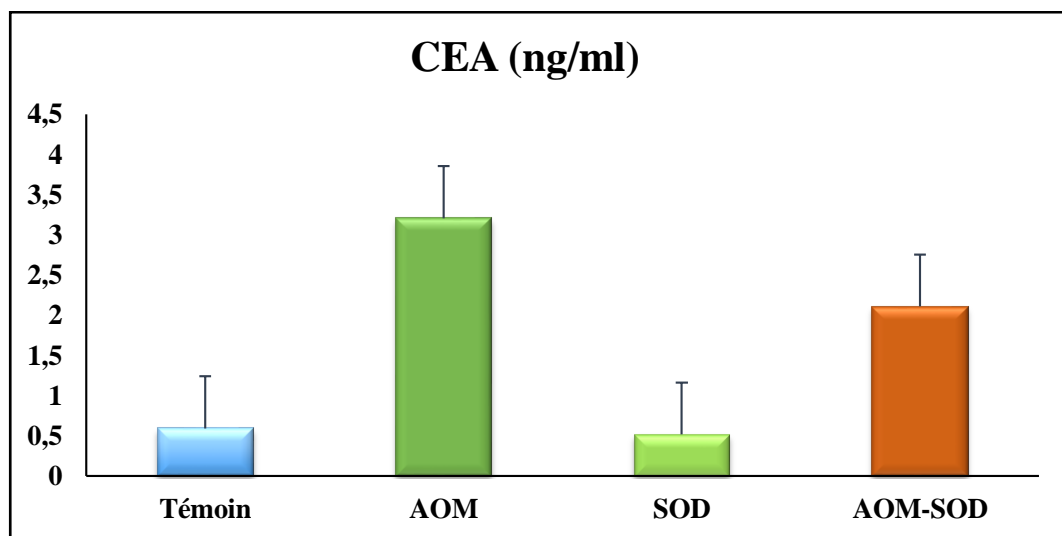


Figure 23: Variation de la concentration du carcinoembryonnaire antigène (CEA) chez les rats témoins, cancéreux et traités par la SOD à raison de 300 mg/kgPV

V. Histopathologie du colon.

L'étude histologique menée sur des colons prélevés après 12 semaines chez les rattes témoins et cancéreuses a révélée des altérations structurales au niveau des couches cellulaires qui composent le colon. De plus les observations histopathologies vont de pair avec ceux de l'étude morphométrique qui révèlent des lésions précancéreuses par l'apparition des ACF et des hyperplasies tubulaires chez les lots AOM contrairement au lot témoin. Cependant, on observe une diminution de ces lésions précancéreuses chez les rattes AOM traitées à la SOD. (Figure : 24,25 26).

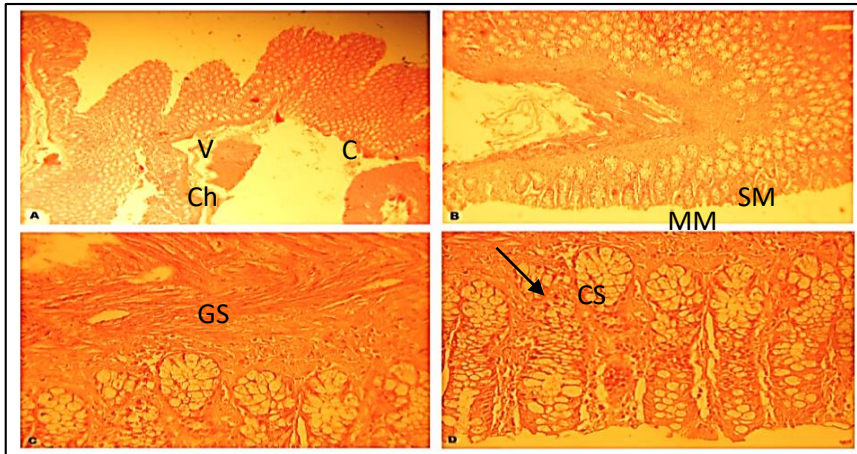


Figure 24: Coupes longitudinales du colon des rattes témoins colorées à l'HE. A : vue générale montrant les villosités (V) avec présence du chorion (Ch.) qui s'étend entre les cryptes (C) et forme l'axe central de chaque villosité (150X). B : vue plus détaillée montrant les différentes couches, la musculaire muqueuse (MM) et la sous muqueuse (MS) (300X). C : Les glandes séreuses (GS) et D : la couche séreuse (CS) avec présence des cellules caliciformes flèche noir (600X) (Baba Ahmed ; 2008).

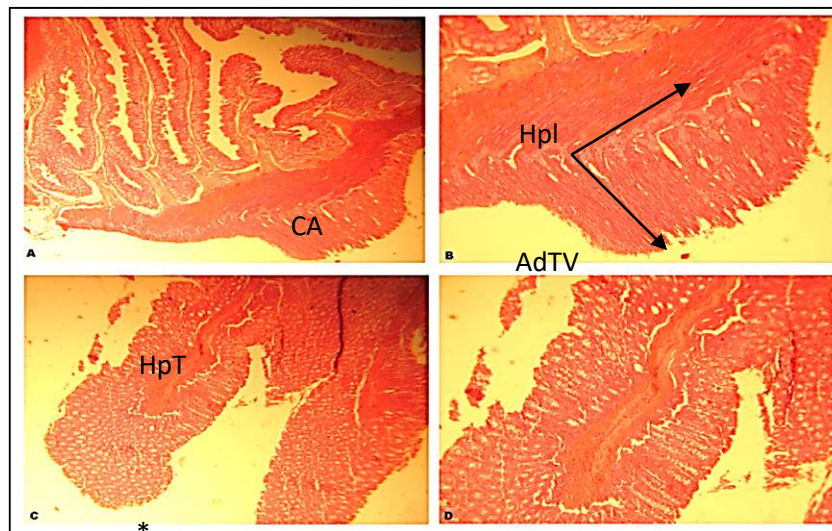


Figure 25: Coupes longitudinales du colon chez les rattes AOM colorées à l'HE. A : apparition de plusieurs cryptes aberrants (CA) (150X) B : hyperplasie très marquée des deux couches la musculaire muqueuse et la sous muqueuse (flèches noir) (300X). C : hyperplasie tubulaire qui est synonyme d'une lésion précancéreuse (HpT) et formation d'un axe conjunctivo-vasculaire (Asterix) (300X). D : vue détaillée d'un adénome tubuleux villosité (AdTV) (600X) (Baba Ahmed ; 2008).

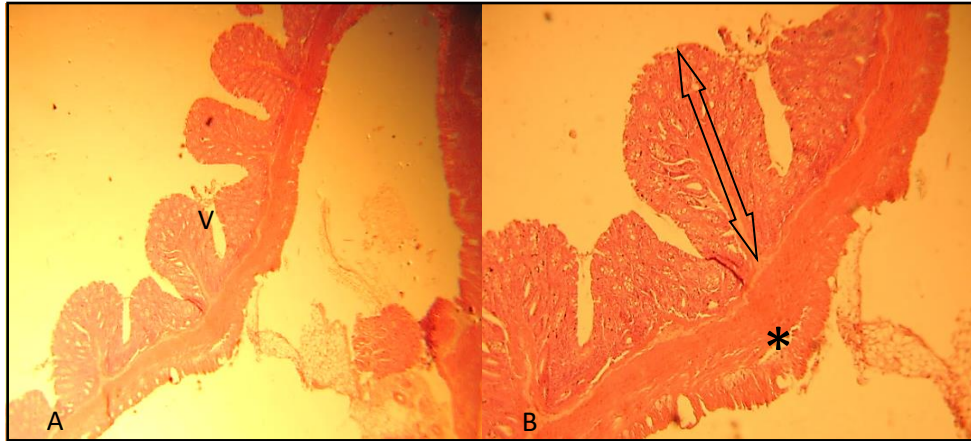


Figure 26: Coupes longitudinales du colon des rattes AMO-SOD colorées à l'HE. A : vue générale du colon montrant encore une présence d'une hyperplasie tubuleuse (V) mais cette dernière moins importante que chez les rattes AOM (150X) avec diminution du volume des villosités (grandes flèche) et décroissance de l'épaisseur des couches (*) au niveau de la coupe B (300X) (Baba Ahmed ; 2008).

Discussion.

Beaucoup d'études épidémiologiques et expérimentales ont démontré que les antioxydants non-enzymatiques ont un effet chemopreventif sur le cancer du côlon (Sengottuvelan *et al*, 2006). Un ensemble de travaux ont indiqué que la super oxyde dismutase semble être un biomarqueur en puissance de l'état de stress oxydant. Elle se présente comme une enzyme clé pour défendre l'organisme contre un radical libre très puissant, l'anion super oxyde. Cependant peu d'études ont apprécié l'effet des antioxydants enzymatiques sur la carcinogénèse du fait que ces enzymes sont rapidement détruites par le suc intestinal.

La présente étude est consacrée à évaluer sur un modèle expérimental de rattes cancéreuses, l'effet chemopreventif de la glisodine, une SOD végétale couplée à la gliadine, une protéine de blé qui sert à protéger l'enzyme contre l'effet délétère du suc intestinal.

L'utilisation de l'AOM dans la modélisation de la cancérogénèse colique pour provoquer l'apparition des ACF pré-néoplasique est très en vogue comme marqueur pour évaluer l'influence des facteurs modulateurs (Bird *et al*, 1995 ; Bird *et al*, 2000). Les ACF sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cryptes dans un seul foyer, mais ils sont plus grands que les cryptes normales. Ils se distinguent par un épithélium épais, avec des ouvertures lumineuses altérées possédant une aire périacrylique (McLellan *et al*, 1991). Ils peuvent se développer en polypes et éventuellement en cancer du côlon.

Les résultats obtenus indiquent que la fréquence des ACF est significativement augmentée après induction par l'AOM. Récemment il a été mis en évidence que les constituants de certaines plantes et leurs dérivés peuvent avoir des effets significatifs sur la diminution de l'incidence des ACF dans le côlon par leur capacité de contrôler les cellules tumorales *in vivo* et *in vitro* (Sriram *et al*, 2008 ; Volate *et al*, 2005).

Dans la présente étude, la glisodine n'a pas pu supprimer le développement des tumeurs chez les rattes AOM. Toutes les rattes traitées par l'AOM, avec ou sans SOD développent des foyers aberrants après 12 semaines de traitement, bien que le nombre de tumeurs chez chaque ratte ait diminué après consommation *per os* de glisodine. Concernant la formation d'ACF à 12 semaines après injection d'AOM, la supplémentation chronique en SOD des rattes 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 al*, 2008). Ces résultats suggèrent que l'ingestion de la SOD végétale atténue la carcinogenèse colique chez les rattes, principalement à la phase d'initiation, mais pas suffisamment à la phase de promotion. L'effet suppressif de la SOD sur la carcinogenèse pourrait être provoqué par sa propriété antioxydante.

Le stress oxydatif est défini comme une perturbation entre les pro-oxydants et les antioxydants, ce qui pourrait engendrer des dommages potentiels au niveau du métabolisme cellulaire. Le stress oxydatif peut entraîner une lésion de l'ADN suite aux attaques radicalaires associée à divers stades du processus de formation des tumeurs (Halliwell *et al*, 1989).

La peroxydation des lipides est un processus qui participe à la formation de radicaux lipidiques et au réarrangement des radicaux insaturés comme les Alcanes, malondialdéhyde (MDA) et les hydroperoxydes qui provoquent des dommages importants aux cellules (Upsani *et al*, 2001). L'MDA est un agent mutagène et génotoxique qui peut contribuer au développement du cancer chez l'homme (Feron *et al*, 1991). LPO peut induire directement une rupture de chaîne d'ADN et une oxydation des bases dans (Cochrane, 1991). In vivo, les peroxydes lipidiques possèdent également une activité promotrice tumorale (Park, 1972).

Dans notre étude, 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.

Nos résultats révèlent que les niveaux des antioxydants enzymatiques SOD, CAT, GSH, GST ont été diminués dans le colon des rattes traitées par l'AOM. Cette diminution des activités de la SOD et de la CAT pourrait être due à une augmentation anormale des niveaux d'espèces réactives d'oxygène et donc, à l'installation d'un état de stress oxydatif accru associé à une prolifération des cryptes dans le cancer colorectal malin (Cao, 1997). Ces résultats suggèrent aussi que les niveaux anormalement bas des enzymes antioxydantes sont dus à leur hyper sollicitation pour éliminer les produits de la peroxydation lipidique (Manju *et al*, 2005). La supplémentation en glisodine a diminué la peroxydation lipidique et a augmenté les niveaux d'antioxydants enzymatiques.

L'administration per os de la glisodine chez les rattes préalablement traitées par l'AOM a non seulement atténuée la formation des LPO mais aussi amélioré le niveau de l'activité de la GST, de la catalase et principalement de la superoxyde 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 côlon (Tanaka *et al.*, 1997 ; Girgin *et al.*, 2000 ; Desai *et al.*, 1984 ; Bird, 1995).

Dans la présente étude, ces enzymes antioxydantes ont été activées chez les rattes traitées par la glisodine. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Ryosuke (2009) ; Chandragiri *et al.* (2008) ; Selvaraj A *et al.*, (2009) et Sattu *et al.*, (2009) montrant que les antioxydants tels que Berberine, Lutéoline, GSH, Hespertin, Morine, Hesperidin diminueraient le nombre et la multiplicité des ACF en améliorant l'activité des enzymes antioxydantes.

Cao et al. (1997) ont également signalé que la supplémentation en antioxydants naturels a amélioré les activités antioxydants enzymatiques endogènes en atténuant le processus de la lipoperoxydation. Ceci suggère aussi que la glisodine pourrait moduler l'activité proliférative des cryptes et de ce fait diminuer leur nombre. En effet, plusieurs études ont montré que des extraits de plantes peuvent exercer des effets significatifs en diminuant l'incidence des ACF dans le colon et qu'ils 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 (Judith *et al.*, 2007); les fruits (Boateng *et al.*, 2006 ; l'oignon diététique (Sylviane *et al.* 1997); le Red palm oil (Boateng *et al.*, 2006) ; le vin rouge polyphénole (Piero *et al.*, 2005); le Polyethylene glycol (Pernilla *et al.*, 2005); l'extrait des feuilles du ginkgo (*Ginkgo biloba*) (Rikako *et al.*, 2004); les polyphénols de thé (Yukiaki *et al.*, 1999).

Notre étude, a permis de montrer une déplétion des teneurs en antioxydant non-enzymatique tel que le GSH, observée dans le côlon des animaux cancéreux. Le glutathion, qui est le premier maillon de la chaîne de la défense antioxydante des cellules des mammifères, est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, y compris le transport des acides aminés (Meister, 1988). Le GSH en conjugaison avec la GST jouent un rôle important dans la protection contre les produits chimiques cytotoxiques et cancérogènes (Burton, 1981). Le couple GSH et GST participe en synergie à la désintoxication des xénobiotiques cancérogènes, radicaux libres et peroxydes. Par conséquent la baisse importante de la concentration du GSH observée chez les rattes traitées par AOM est peut-être due à son utilisation accrue pour contrer la peroxydation lipidique. Toutefois le traitement des rattes par la glisodine semble renverser cette situation en améliorant le profil des antioxydants enzymatiques (SOD, CAT et GST). Ce

qui suggère que l'effet antioxydant de la glisodine a soulagé les cellules coliques vis-à-vis de la surproduction des radicaux libres dans un environnement cancérigène.

Nos résultats relatifs aux profils des paramètres immunologiques ont montrés une augmentation significative pour l'IL-1 β , IL-6 et l'IL-10 et hautement significative pour TNF- α , chez les rattes cancéreuses en comparaison avec les témoins. En revanche le traitement des rattes cancéreuses par la glisodine à dose de 300mg/kg pendant 12 semaines a entraîné une amélioration voir un rétablissement dans le profil pro inflammatoire avec une diminution significative pour l'IL-1 β et l'IL-6, et non significative pour IL-10 et TNF- α . Concernant le niveau plasmatique d'IL-2 (facteur de croissance des cellules T nécessaire pour la survie et la prolifération des cellules T), a été significativement réduit chez les rattes cancéreuses par rapport à celles des contrôles. Le niveau plasmatique de l'IL-2 était significativement restauré chez les rattes cancéreuses traitées par la SOD végétale. Les Cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 α , l'IL-6 et le TNF α sont élevés dans le cancer du côlon et jouent un rôle important dans le mécanisme de la tumorigénèse (Janakiram et Rao 2014 et oshima et Oshima 2012). L'IL-6 et TNF α sont produits par les macrophages activés, un mécanisme potentiel impliqué dans le développement du cancer (Oshima 2012). Le TNF α et l'IL-1 α se sont avérés être élevés dans la carcinogénèse du côlon induite par la MAM (Zaki et al 2011). Tanaka et al (2000) ont montré que au cours de l'inflammation de la muqueuse colique dans la colite induite par le DSS est associée à une augmentation de la production de cytokines inflammatoires et des chimiokines. Le taux de cytokines inflammatoires et de chimiokines diminue au cours de la période de cicatrisation post-colite. La diminution des concentrations l'IL-6 et du TNF chez les rattes traitées par la glisodine dans le côlon de indique que la muqueuse colique a pu récupérer après une période de 12 semaines de traitement.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent que le traitement à la glisodine des rattes cancéreuses a diminué d'une façon significative l'incidence des ACF, les niveaux circulants des LPO et a amélioré le profil des antioxydants enzymatique (SOD, CAT, GST) et non enzymatique (GSH). Ce traitement a également modifié les altérations au niveau histologique. Cette association macromoléculaire (SOD-Gliadine) agit comme un inhibiteur de radicaux libres en préservant les antioxydants endogènes et de ce fait protège les cellules des promoteurs cancérigènes.

D'autres études sont en cours pour évaluer les effets de la glisodine sur les marqueurs nucléaires impliqués dans l'initiation de la cancérogénèse colique.

Conclusion

Notre présente étude a été réalisée afin d'évaluer les effets chemopreventives de la glisodine, une des molécules naturelles de la classe des antioxydantes, chez les rattes albinos 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 rattes 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 chemopreventif contre le stress oxydatif cancérigène induit par l'azoxyméthane. A partir de ces résultats, il serait souhaitable de suivre nos recherches 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.

Référence

A

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., 1987. Increase in the glycostylated from of erythrocyte CuZnSOD in diabetes and close association of non-enzymatic glycosylation with enzyme activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 924 : 292-6.

Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57: 1825e35.

Ashokkumar, P., Sudhandiran, G., 2008. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Bimedicine & Pharmacotherapy.* 1-8.

B

Baker, HJ., Lindsey, J.R., Weisbroth, S.H. (eds), 1980. The laboratory rat, Vol. H, Research 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: 308-12.

Bertoni-Fredari C, Fattoreti P, Caseli U, Paoloni R, Meier-Ruge W. Vitamin E deficiency as a model of precocious brain aging: assessment by X-ray microanalysis and morphometry. *Scanning Microsc* 1995;9:289e301.

Bhalla V., Bhalla MA., 2009. Risk factors for colorectal cancer, *Oncology News* 4:84–5.

Bhalla V., Bhalla MA., 2009. Risk factors for colorectal cancer, *Oncology News* 4:84–5.

Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 95e402.

Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 1995; 93:55e71.

Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 1995;93:55e71.

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

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 rat. *Food and Chemical Toxicology*. 44: 1667–1673

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.

Burt, R.W., 1996. Cohorts With Familial Disposition For Colon Cancers In Chemoprevention Trials., *J Cell. Biochem. Suppl.*, 25, 231-135.

Burton GW, Ingold KU. Auto-oxidation of biological molecules: 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J Am Chem Soc* 1981;103:6472.

C

Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:749e60.

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 rat. *Chemico-Biological Interactions*. 10. 1016/j.cbi.Chandragiri et al,

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.

Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 91:23.

Cohen, S.M., 1988. L'alimentation Et Le Cancer., *Pour La Science*, Janvier, 20-27.

Corpet, D.E., 1989. Alimentation Et Etiologie Du Cancer Du Côlon., Cah. Nutr. Diet., 24, 375-380

Corpet, D.E., 1989. Alimentation Et Etiologie Du Cancer Du Côlon., Cah. Nutr. Diet., 24, 375-380.

D

Das U. A radical approach to cancer. Med Sci Monit 2002; 8:79e92.

Desai ID. Vitamin E analysis method for animal tissues. Methods Enzymol 1984; 105:138e43.

Droge W ,2002. Free Radicals In The Physiological Control Of Cell Function. Physiol Rev 82, 47-95.& Mates JM, Perez-Gomez C And Nunez De Castro I ,1999. Antioxidant Enzymes And Human Diseases. Clin Biochem 32, 595-603.

E

Encyclopédie Encarta 2009

Encyclopédie Larousse Médicale, 2005.

Encyclopédie Larousse Médicale 2010

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

Evans WJ ,2000. Vitamin E, Vitamin C, And Exercise. Am J Clin Nutr 72, 647S-652S & Packer L, Tritschler HJ And Wessel K ,1997. Neuroprotection By The Metabolic Antioxidant Alpha-Lipoic Acid. Free Radic Biol Med 22, 359-378

F

Feron VJ, Tie HP, deVrjer F, Woutersen RA, Cassee FR, Van Bladern PJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential mechanism of action and risk assessment. Mutat Res 1991;259:362e6.

Fiala, E.S., Sohn, O.S., 1987. Hamilton SR. Effects of Chronic Dietary Ethanol on in Vivo and in Vitro Metabolism of Methylazoxymethanol and on Methylazoxymethanol-induced DNA Methylation in Rat Colon and Liver. Cancer Res. 47: 5936e43.

Freeman BA And Crapo JD ,1981. Hyperoxia Increases Oxygen Radical Production In Rat Lungs And Lung Mitochondria. *J Biol Chem* 256, 10986-10992.

G

Garait B., 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin, Thèse de Doctorat.

Garait B., 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin, Thèse de Doctorat.

Garait B., 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin, Thèse de Doctorat.

Gescher AJ, Sharma RA, Steward WP., 2001. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. *Lancet Oncol* ; 2:371–9).

Giovannucci E, Michaud D., 2007. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology*; 132:2208–25, Yamada K, Araki S, Tamura M, Sakai I, Takahashi Y, Kashihara H, et al.,1997, Relation of serum total cholesterol, serum triglycerides and fasting plasma glucose to colorectal carcinoma in situ. *Int J Epidemiol*; 27:794–8

Girgin F, Karaoglu O, Erkus M, Tuzun S, Ozutemiz O, Dincer C, et al. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health* 2000; 59:641e52.

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 coliti. *J Toxicol Environ Health*. 59: 641-52.

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 : 641-52.

Girgin, F., Karaoglu, O., Erkus, M., Tuzun, S., Ozutemiz, O., Dincer, C., et al., 2000. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant statuts in trinitrobenzen sulfonic acid-induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health*. 59: 641e52.

Greenwald P, Milner JA, Anderson DE, McDonald SS., 2002. Micronutrients in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 2002; 21:217–30.

Greenwald P, Milner JA, Anderson DE, McDonald SS., 2002. Micronutrients in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 2002; 21:217–30.

Gutekin F, Delibas N, Sulhodtin Y, Kilinic I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin in combination with Vitamin C and Vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chloropyrifos ethyl in rat. *Arch Toxicol* 2001;75:88e96.

H

Habig, H.W., Pabst, MJ., Jakoby, W.B., 1984. Glutathion S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *Biol. Chem.* 249: 7130- 7139.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: Cheeseman KH, Slater TF, editors. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press; 1989. p. 144e7.

Hanck AB. Vitamin C and cancer. *Prog Clin Biol Res* 1988;259:307e27.

Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC And Epstein CJ ,2001. Genetic Modification Of Prenatal Lethality And Dilated Cardiomyopathy In Mn Superoxide Dismutase Mutant Mice. *Free Radic Biol Med* 31, 1101-1110

J

Janakiram NB, Rao CV. The role of inflammation in colon cancer. *Adv Exp.Med Biol.* 2014; 816:25–52.

Ji LL, Fu R And Mitchell EW ,1992. Glutathione And Antioxidant Enzymes In Skeletal Muscle: Effects Of Fiber Type And Exercise Intensity. *J Appl Physiol* 73, 1854-1859.

Joshua. M. Uronis., David., 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 rat. *Nutrition Research.* 27: 640– 646

K

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 vRAW 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.

Krause KH ,2004. Tissue Distribution And Putative Physiological Function Of NOX Family NADPH Oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57, S28-29.

Kucuk O, Churley M, Goodman MT. Increased plasma level of cholesterol-5b, 6b epoxide in endometrial cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1994;3:571e5.

L

Luck, H., 1963. Catalase in Bergmeyer, H.V. (ed), *Methods of enzymatic Analysis*. Academic press, New York, pp. 885-888.

M

Manju V, Nalini N. Chemopreventive effect of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine- induced colon cancer. *Clin chim Act* 2005; 358:60e7.

Mates JM, Perez-Gomez C And Nunez De Castro I ,1999. Antioxidant Enzymes And Human Diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603

Mates JM, Perez-Gomez C And Nunez De Castro I ,1999. Antioxidant Enzymes And Human Diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603 & Powers SK And Lennon SL ,1999. Analysis Of Cellular Responses To Free Radicals: Focus On Exercise And Skeletal Muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.

Mckelvey TG, Hollwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U And Jones HP ,1988. Mechanisms Of Conversion Of Xanthine Dehydrogenase To Xanthine Oxidase In Ischemic Rat Liver And Kidney. *Am J Physiol* 254, G753-760. & Parks DA, Williams TK And Beckman JS ,1988. Conversion Of Xanthine Dehydrogenase To Oxidase In Ischemic Rat Intestine: A Reevaluation. *Am J Physiol* 254, G768-774

McLellan EA, Medline A, Bird RP. Dose responsive and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: a putative preneoplastic lesions in rat colon. *Carcinogenesis* 1991; 12:2093e8.

McMichael AJ, McCall MG, Hartshorne JM et Woodings TL.1980. *Int. J. Cancer.* 25. 431-437

Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988;263:17205e8.

Melvin, R., Suresh, 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: 86-108.

Menvielle-Bourg, F.J., 2005. La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale .*J Phytotherapy* 3: 118e121.

Michels K., 2005. Body fatness during childhood and adolescence and incidence of breast cancer in premenopausal women: a prospective cohort study. *Breast Cancer Research.* 7. R314

Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remach J. Importance of Se-glutathione, catalase, and Cu/Zn uperoxide dismutase for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994;17:235e48.

Morel Y, Mermod N And Barouki R ,1999. An Autoregulatory Loop Controlling CYP1A1 Gene Expression: Role Of H(2)O(2) And NFI. *Mol Cell Biol* 19, 6825-6832

Mourad A.A, 2012, *Cancers des côlons, conférence pour résidents de chirurgie générale*

N

Nakagawa Y ,2000. Mitochondrial Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Inhibits The Release Of Cytochrome C From Mitochondria By Suppressing The Peroxidation Of Cardiolipin In Hypoglycaemia-Induced Apoptosis. *Biochem J* 351, 183-193.

Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T And Nakagawa Y ,2000. Mitochondrial Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Inhibits The Release Of Cytochrome C From Mitochondria By Suppressing The Peroxidation Of Cardiolipin In Hypoglycaemia-Induced Apoptosis. *Biochem J* 351, 183-193.

O

Oberley, L.W. and D.R. Spitz, 1985. Assay of Superoxide Dismutase Using Nitroblue Tetrazolium. In: Handbook of Methods For Oxygen Radical Research, Greenwald, R.A. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL., pp: 217-221.

Ohishia;T.; Kishimoto; Y. Miura; N.,Shiota, G.; Kohrid, T., Harae; Y., et al., 2002. Synergistic effects of epigallocatechin gallate with sulindac against colon carcinogenesis of rats treated with azoxymethane . cancer let. 177:49e56.

Okado-Matsumoto A And Fridovich I ,2001. Subcellular Distribution Of Superoxide Dismutases (SOD) In Rat Liver: Cu,Zn-SOD In Mitochondria. J Biol Chem 276, 38388-38393

Oshima H, Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. J Gastroenterol. 2012;47(2):97–106.

P

Packer L, Tritschler HJ And Wessel K ,1997. Neuroprotection By The Metabolic Antioxidant Alpha-Lipoic Acid. Free Radic Biol Med 22, 359-378

Packer L, Tritschler HJ And Wessel K ,1997. Neuroprotection By The Metabolic Antioxidant Alpha-Lipoic Acid. Free Radic Biol Med 22, 359-378.

Park D. Peroxyl and alcoxyl radicals cause DNA base modifications. Cancer Lett 1972;28:1235e9.

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

Poonkuzliali, 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.

Potter, J.D., Slattery, M.L., Bostick, R.M., et al., 1993.Colon Cancer: A Review Of Yhe Epidemiology., Epidemiologic Reviews,15(2), 499-545.

Powers SK And Lennon SL ,1999. Analysis Of Cellular Responses To Free Radicals: Focus On Exercise And Skeletal Muscle. Proc Nutr Soc 58, 1025-1033.

R

Ray G, Husian SA. Oxidant, antioxidants and carcinogenesis. Indian J Exp Biol 1972;40:1213e32.

Regoli , F.M., Principato, G., 1995. Glutathion-dependent and antioxydant enzymes in mussel *Mj/tilus galloprovincialis*; exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biomarkers. Aquatic Toxicology. 31: 143-164.

Riboli, E., 1996. Cancer Du Côlon Et Du Rectum., Alimentation Et Cancer., Paris TEC DOC, 7, 127-138.

Riboli, E., Decloitre, F., 1996. Introduction A L'étude Des Relations Entre Alimentation Et Cancer., Alimentation Et Cancer., Paris TEC DOC, 1, 3-18.

Richard W, Brown. 2009. Histologic Preparations: Common Problems and Their Solutions. College of American Pathologists (Ed). 156.

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 safty. Annu Rev Nutr. 22: 19e34.

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.

S

Samy RP, Gopalakrishnan P, Ignacimuthu S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. Chem Biol Interact 2006;164(1-2):1e14.

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.

Scotté F. Colonna P., Andrieu J.M, 2002, *Cancérologie*. Edition ellipse. 314p

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., Asuda, S., Furugori, M., Esaki, S., 1994. Kinase N. Radioprotective effect of antioxidant flavonoids in g-ray irradiated mice. *Carcinogenesis*. 15: 2669e72.

Site internet 1 : [http// www.wikipédia.org](http://www.wikipédia.org)

Site internet 2: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal

Site internet 3: [http// www.wikipédia.org](http://www.wikipédia.org)

Site internet 4: <http://www.astrosurf.com/luxorion/Bio/cancer-dev-tumeur.png> Site internet 5 : [http// www.wikipédia.org](http://www.wikipédia.org)

Site internet 6 : [http// www.santemaghreb.com/ algerie/ comscien.htm](http://www.santemaghreb.com/algerie/comscien.htm)

Site internet 7: <http://www.dismutance.fr/?categorie2/le-stress-oxydatif>.

Site internet 8 : http://www.probiox.com/fr/html/body_stressoxydant.htm

Site internet 9 : <http://www.dismutance.fr/?categorie2/le-stress-oxydatif>

Site internet 10 : [http// www.LesoirdAlgerie.com/cancerducôlon](http://www.LesoirdAlgerie.com/cancerducôlon)

Site internet 11 : [http// www. http://www.olivie.ma/fr/oil-health-info.html](http://www.olivie.ma/fr/oil-health-info.html)

Skrzydłewska, E., Kozusko, B., Sulkowska, M. ; Zalewski, B., Kozowski, M., Snarska; J, et al., 2003. Antioxidant potential in esophageal, stomach and colorectal cancers. *Hepatogastroenterology*. 50: 126e31.

Skulachev VP, 1998. Cytochrome C In The Apoptotic And Antioxidant Cascades. *FEBS Lett* 423, 275-280

Sohn, O.S., Ishizaki ; H., Yang , C.S., Fiala, E.S., 1991. Metabolisme of azoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis*. 12: 127e31.

Sriram N, Kalayarasan S, Ashokkumar P, Sureshkumar A, Sudhandiran G. Diallyl sulfide induces apoptosis in Colo 320 DM human colon cancer cells: involvement of caspase-3, NF-kB, and ERK-2. *Mol Cell Biochem* 2008;311:157e65.

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.

Stein, E.A., 1998. Prevention of heart disease: is LDL reduction the outcome of choice? Absolutely yes. *I/blue Health*. 1(2): 120-4.

Stewart BW, Kleihues SP, 2003. *World cancer report*. Lyon: IARC Press

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.

T

Tacchini P. Stress oxydant et les antioxydants, edel therapeutics, pse-b, 1015 Lausanne ; disponible sur : <http://m2spae.free.fr/2.%20Novembre%20-%20D%E9cembre/M.%20Marty/cours%20Tacchini%20anti-oxydant.pdf>

Tanaka T, Kawabata K, Kakumoto M. 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* 1997;58: 2550e6.

Tanaka, T., 1997. Effect of diet on human carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 25: 73e95.

Tanaka T, Kohno H, Murakami M, Shimada R, Kagami S. Colitis-related rat colon carcinogenesis induced by 1-hydroxy-anthraquinone and methylazoxymethanol acetate (Review). *Oncol Rep.* 2000;7(3):501–8.

Thannickal VJ and Fanburg BL, 2000 .Reactive Oxygen Species In Cell Signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028.

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.* 17:431-4

U

Upsani CD, Khara A, Balaraman R. Effect of Lead and vitamin E, C or spiruline on malondialdehyde, conjugated dienes and hydroperoxides in rats. *Ind J Exp Biol* 2001;39:70e4.

V

Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Rihdsdash M. Interaction of lipid peroxidation product with DNA. *Mutat Res Rev Genet Toxicol* 1998;195:137

Verhaeghe E.J., 2002. Carraghenanes et cancer du côlon : étude expérimentale chez des rats à flore humaine : mécanismes d'action, thèse de Doctorat.

Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis* 2005;26(8): 450e1456.

W

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

Weichselbaum, T.E., AMER. J., 1946. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Clin. Path.*, 16e40.

Y

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 coorectal 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.

Z

Zaki MH, Vogel P, Malireddi RK, Body-Malapel M, Anand PK, Bertin J, Green DR, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2011;20(5):649–60.

Annexe