

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1

Faculté des Sciences de la

Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1

كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2014

MÉMOIRE

Présenté par

BEGHOUL Afafe

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER EN BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE :

Toxicologie, Environnement et Santé

THÈME

Étude de cibles biochimiques (Hsp et Bcl2)

du benzo(a)pyrène responsable du cancer du poumon

Soutenue publiquement le 22/12/ 2014

DEVANT LE JURY

Président :	BOUZIDI Abdelouahab	(Pr. Univ. Sétif)
Rapporteur :	LAHOUEL Mesbah	(Pr. Univ. Jijel)
Examineurs :	BELATTAR Nouredine	(Pr.Univ. Sétif)
	MAHDADI Rachid	(MCA Univ. Sétif)

Laboratoire de Toxicologie moléculaire (Univ. Jijel)

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Nous tenons à remercier sincèrement Monsieur Mesbah LAHOUEL, en tant qu'encadreur, et Madame Wided KEBSA, en tant que co-encadreur, qui se sont montrés à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'ils ont bien voulu nous consacrer.

Nous tenons à remercier vivement les membres de jury pour le temps qui ont consacré pour l'évaluation de ce modeste travail.

Nous exprimons notre gratitude à tous nos collègues rencontrés au sein du laboratoire lors des recherches et expériences effectuées et qui ont accepté de répondre à nos questions avec gentillesse.

Je n'oublie pas mon mari pour sa contribution et ma famille pour son soutien.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma petite famille:

*Mon cher mari MOHAMED, qui a su être là
lors des nombreux moments de doute.*

A mes deux chers enfants SAMI et ZAKI

*A mes parents ABDELHAMID et NOUARA qui m'ont tout donné
sans rien en retour et qui m'ont encouragé et soutenu
dans mes moments les plus difficiles.*

*A ma chère sœur NADJET pour ses précieux conseils
durant tout mon cycle universitaire.*

*A mes frères SALIM, MOHAMMED et SAMIR qui ont toujours été
Présents pour moi et qui m'ont toujours
soutenu et encouragée psychologiquement.*

A mon coencadreur WIDED KEBSA pour le suivi de ce travail.

A mes tantes FATIMA, AISHA et ZAKIA qui m'ont toujours soutenus.

A mon cousin ZIAD

A tous mes amis en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le réconfort.

A toute la promotion de magister 2011.

Ainsi qu'à toutes les amies qui ont répondu à notre invitation



Sommaire

Introduction	1
Etude Bibliographique	
1. Cancer pulmonaire induit par le benzo(a)pyrene.....	3
1.1. <i>Le benzo(a)pyrene: définition et sources d'exposition</i>	3
1.2. <i>Toxicocinétique du benzo(a)pyrene.....</i>	4
1.2.1. Absorption et distribution.....	4
1.2.2. Élimination	5
1.2.3. Métabolisation.....	5
1.3. <i>Mécanismes de cancérisation pulmonaire par le benzo(a)pyrène</i>	11
1.3.1. Cancer de poumon.....	11
1.3.2. Mécanismes de cancérisation	13
2. Stress oxydant et protéines de choc thermique Hsp dans le cancer de poumon	17
2.1. <i>Stress oxydant et radicaux libres.....</i>	17
2.2. <i>Production de ROS par la chaîne respiratoire.....</i>	18
2.3. <i>Mécanismes de production de ROS par le B(a)P</i>	19
2.4. <i>Les systèmes de défenses antioxydantes</i>	20
2.4.1. Les antioxydants enzymatiques.....	21
2.4.2. Les antioxydants non enzymatiques	22
2.5. <i>Ciblage des protéines de choc thermique Hsp dans le cancer pulmonaire</i>	23
2.5.1. Les protéines de choc thermique ou de stress Hsp90.....	23
2.5.2. Expression et ciblage des Hsp 90 dans le cancer pulmonaire induit par le B(a)P.	24

3. Apoptose et protéines de la famille Bcl-2 dans le cancer pulmonaires induit par le B(a)P	26
3.1. <i>L'apoptose et sa regulation par les proteines de la famille Bcl-2.....</i>	26
3.2. <i>Mécanismes d'induction de l'apoptose par le B(a)P.....</i>	27
3.3. <i>Expression et ciblage des Bcl-2 dans le cancer pulmonaire induit par le B(a)P.....</i>	30

Etude Experimentale

I. Matériel et Méthodes.....	31
I.1. Matériel.....	31
I.1.1. Produits chimiques.....	31
I.1.2. Animaux	31
<i>I.1.2.1. Entretien des animaux.....</i>	<i>31</i>
I.2. Méthode.....	31
<i>I.2.1. Induction du cancer pulmonaire par le B(a)P chez le rat.....</i>	<i>31</i>
<i>I.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des poumons.....</i>	<i>32</i>
I.2.3. Examen anatomopathologique	32
<i>I.2.3.1. Examen macroscopique des poumons</i>	<i>32</i>
<i>I.2.3.2. Examen microscopique.....</i>	<i>32</i>
I.2.4. Evaluation du stress oxydatif mitochondrial	33
<i>I.2.4.1. Isolement des mitochondries pulmonaires</i>	<i>33</i>
<i>I.2.4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford</i>	<i>34</i>
<i>I.2.4.3. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde.....</i>	<i>34</i>
<i>I.2.4.4. Mesure du gonflement mitochondrial « mitochondrial swelling ».....</i>	<i>35</i>
I.2.5. Détermination de l'expression des Hsp90 et Bcl-2 dans le tissu pulmonaire	35
<i>I.2.5.1. Extraction des protéines totales</i>	<i>35</i>

<i>I.2.5.2. Identification des Hsp90 et Bcl-2</i>	36
I.2.6. Evaluation des paramètres cytosoliques du stress oxydatif	36
<i>I.2.6.1. Préparation de la fraction cytosolique</i>	36
<i>I.2.6.2. Dosage du glutathion cellulaire (GSH)</i>	37
<i>I.2.6.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)</i>	38
<i>I.2.6.4. Mesure de l'activité enzymatique de la Glutathion S-Transférase (GST) cytosolique</i> ..	38
<i>I.2.6.5. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)</i>	39
I.2.7. Analyse statistique	40
II. Résultats et discussion	41
II.1. Aspect macroscopique du poumon	41
II.2. Aspect microscopique	42
II.3. Le stress oxydant mitochondrial dans le tissu pulmonaire	43
<i>II.3.1. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxide</i>	44
<i>II.3.2. Influence du B(a)p sur le gonflement mitochondrial</i>	46
II.4. Evaluation de l'effet du B(a)P sur les paramètres cytosoliques du stress oxydatif dans le tissu pulmonaire	47
<i>II.4.1. L'activité enzymatique de la catalase</i>	48
<i>II.4.2. L'activité enzymatique de la GST</i>	50
<i>II.4.3. Taux de GSH</i>	54
<i>II.4.4. Variations des taux du MDA cytosolique</i>	58
II.5. L'expression des Bcl-2 au cours du cancer pulmonaire	61
II.6. L'expression des Hsp90 au cours du cancer pulmonaire	64
Conclusion	65
Annexe	66

Références Bibliographiques.....68

Liste des abréviations

Ac : Anticorps.
ADN : acide désoxyribonucléique.
Aha1 : aryl hydrocarbon activator 1.
AhR: Aryl hydrocarbon Receptor.
AIF : Apoptosis-inducig Factor.
AKR : Aldo-céto-réductase
Apaf-1 : Apoptotic protease activating factor-1
ARE : Elément de Réponse aux Antioxydants
ARN : Acide Ribonucléique
Arnt : Aryl hydrocarbo receptor nuclear Translocator.
ATPase : Adenylpyrophosphatase.
B(a)P : Benzo(a)pyrene
Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer.
Bax : Bcl-2 associated x protein.
BBC : Bleu Brillant de Coomassie.
Bcl-2 : B-cell lymphoma.
Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large
BIR: Baculovirus IAP Repeat
BIRC: Baculovirus IAP Repeat Containing proteins
BH : Homology Region.
Bok : *Bcl-2* related ovarian killer.
BPDE : Benzo(a)pyrène diolépoxyde.
BSA : Bovin Serum Albumin.
Ca⁺⁺ : ion de Calcium.
CaCl₂ : Chlorure de calcium.
c-kit: Tyrosin protein kinase
CARD: Caspase Recruitment Domain
CAT: Catalase
CDNB : Chlorodinitrobenzène.
CoA : Coenzyme d'Acétylation.
CPAPC : Cancer de Poumon à Petites Cellules.
CPNAPC : Cancer de Poumon Non à Petites Cellules.
Cu⁺ : ion cuivreux.
CYP 450 : Cytochrome P450
Cyt c : Cytochrome complex.
dAdo : deoxyadenosine
dCyd : deoxycytidine
dGuo : Déoxyguanosine
DT diaphorase : tardive dyskinesia Diaphorase
DD : Dihydrodiol Deshydrogénase.
DED: Death Effector Domain
dThy : deoxythymidine.

DTNB: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EAFS : Ethanol Acetic acid Formol Saline
EAO : Espèces Activées de l'Oxygène.
EC : Enzyme Commission.
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid.
EH : Epoxyde Hydrolase
EpREs : Elément de Réponse aux composés électrophiles
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.
Fe⁺² : cations ferreux.
FLT-3: Fms-Like Tyrosine kinase 3
G : Guanine.
g : force de gravité relative.
γ – GCS : γ –GlutamylCystéine Synthétase.
GPx : Glutathion peroxydase.
GS : Glutathion Synthétase.
GSH: Glutathione réduit
GSH-PX : Glutathion peroxydase.
GSSG: Glutathion oxydé
GSSG -RD : glutathione disulfide reductase
GST: Glutathione S-transférase
GR : Glutathion Réductase.
H₂O₂: Hydrogen peroxide
HAP: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCl : acide chlorhydrique.
HPLC : high performance liquid Chromatography.
H-ras : Harvey rat sarcoma viral oncogene Homolog.
HSE : Heat Schock Element
Hsp: Heat schock protein
IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein
IP: intrapéritonéale
KCl : Chlorure de Potassium.
K-ras : Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.
LPO: Lipoperoxidation
MDA: Malondialdéhyde
MDM2 : Murine Double-Minute p53 binding protein
MOMP : Mitochondrial Outer Membrane permeabilisation
Mn SOD : superoxyde dismutase-*manganèse*.
MT : Métallothionéine.
P21 : protéine à 21 kDa.
p53 : Phosphoprotein of 53 kDa.
PTP: Permeability Transition Pore
NaCl : Chlorure de sodium.
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBT: Nitro-Blu-Tétrazolium

NQO1 : NADPH Quinone Oxydoréductase1.
N-ras : neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog.
NSCLC: Non -Small Cell Lung Cancer
NF- κ B : Nuclear Factor kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells
NHE : Na⁺ / H⁺ exchanger.
NP40 : nonyl phenoxypolyethoxyethanol.
O₂ : dioxygène
O₂⁻ : anion superoxide.
OH[•] : radical hydroxyle.
PBS : phosphate buffered saline
pH : Potentiel hydrogène.
PT : Pore de Transition
RE : Réticulum Endoplasmique.
RING : Really Interesting New Gene
RIPA : Radio-Immunoprecipitation Assay
ROS : Reactive Oxygen Species
ROOH : Hydroperoxyde.
SCLC: Small Cell Lung Carcinoma
SDS : Sodium dodecyl sulfate.
SMAC-DIABLO: Second Mitochondria-derived Activator of Caspase- Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low Pi.
SOD : Super-Oxyde Dismutase
TBA: Thio-Barbituric Acid
TBARS: Thio-Barbituric Acid Reactive Substances
TBST : Tris-Buffered Saline and Tween 20.
TCA : Acide trichloracétique.
TMP : tetraméthoxypropane
TNB : Thionitrobenzoate.
TNF : Tumor Necrosis Factor
TP53 : Tumor protein 53.
TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand.
Tris : trishydroxyméthylaminométhane.
TS : Tris/Sucrose.
TSE : Tris/Sucrose/EDTA.
SP-1: Specificity Protein-1
SULT: Sulfotransférase
UDPGT : UDP-Glucuronosyl Transférases
UI : Unité Internationale.

Liste des figures et tableau

Figure 1. Régions structurales du B(a)P.	3
Figure 2. Schéma simplifié de l'induction des gènes <i>cyp1a1</i> par le B(a)P	6
Figure 3. Voies de métabolisation du B(a)P chez l'homme.	7
Figure 4. Voie d'activation du B(a)P en diol-époxydes	8
Figure 5. Formation du radical cation 9	9
Figure 6. Activation métabolique du B(a)P par les voies des diol-époxydes et des o-quinones, menant principalement à la formation respective du 7,8-B(a)P-diol-époxyde, et de la 7,8-dione-B(a)P 10	10
Figure 7. La bioactivation et la détoxification du B(a)P par les enzymes de la phase I et II, et la formation de l'ultime carcinogène le diol-époxyde 11	11
Figure 8. Principaux adduits du B(a)P 13	13
Figure 9. Formation des ROS par la voie des quinones 16	16
Figure 10. Les sites majeurs de la production de l'anion superoxyde sont le complexe I et III 19	19
Figure 11. Cycle rédox des quinones. Le cycle de réduction/oxydation des quinones entraîne une forte production d'espèces activées de l'oxygène 20	20
Figure 12. Structure des Hsp90 24	24
Figure 13. Protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille bcl-2 27	27
Figure 14. Le réseau entre Ah (aryl hydrocarbon)-récepteur qui conduit à l'activation métabolique, des dommages à l'ADN et de la signalisation apoptotique 28	28
Figure 15. Un modèle de remodelage de la membrane induite par le B (a) P et son implication dans l'apoptose 29	29
Figure 16. Des mutations inactivent les fonctions de p53 dans les cellules cancéreuses, la protéine de survie Bcl-2 reste toujours fonctionnelle 30	30
Figure 17. Schéma de la réaction entre le DTNB et les groupements –SH 37	37
Figure 18. Examen macroscopique des poumons des rats témoins et traités par le B(a)p à la dose de (100mg/kg/IP)..... 41	41
Figure 19. Examen histologique du lot témoin (A) et du lot traité par le B(a)p à la dose de (100mg/kg/IP) (B) observés en microscope optique (×4)..... 42	42
Figure 20. Examen histologique du lot témoin (C), du lot traité par le B(a)p à la dose de (100mg/kg/IP) (D) observés en microscope optique (×10)..... 43	43
Figure 21. Variation du pourcentage de la production mitochondriale de l'anion superoxyde dans les poumons des rats du groupe traité..... 44	44
Figure 22. Variation du gonflement des mitochondries pulmonaires chaque minute pendant 03 minutes des rats du groupe traité. 46	46

Figure 23. Variation de l'activité de la catalase cytosolique dans les poumons des rats du groupe traité	48
Figure 24. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion s-transférase cytosolique dans les poumons des rats du groupe traité.....	50
Figure 25. Variation des taux du glutathion cytosolique dans les poumons des rats du groupe traité	55
Figure 26. P450 1A1 et 1B1, activent la réaction de transformation du B (a) P à l'intermédiaire (+)- BPDE dans les poumons	56
Figure 27. Le cycle redox du GSH	57
Figure 28. Variation des taux de malondialdéhyde dans les poumons des rats du groupe traité.....	59
Figure 29. Les adduits de MDA	60
Figure 30. Variation de l'expression des protéines bcl-2 dans le tissu pulmonaire des rats du groupe traité par le western blot. T : témoin ; B1 : poumon du rat 1 du lot traité ; B2 : poumon du rat 2 de lot traité.....	61
Figure 31. Un des modèles par lequel le B(a)P induit le cancer du poumon	63
Figure 32. Variation de l'expression des Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats du groupe traité par le western blot. T : témoin ; B1 : poumon du rat 1 du lot traité ; B2 : poumon du rat 2 de lot traité.	64
Tableau : Caractéristiques principales des différents types de cancer pulmonaire	12

Introduction

Le cancer de poumon est la principale cause de décès par cancer dans le monde et est responsable de 1,38 million de décès estimée en 2013 (Zhu et *al.*, 2014). La consommation de cigarettes et l'exposition accrue aux polluants environnementaux sont des facteurs importants de cancer de poumon. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), tels que le benzo(a)pyrène B(a)P, sont les principales substances cancérigènes dans la fumée de cigarette et jouent un rôle crucial dans la carcinogenèse pulmonaire (Zhu et *al.*, 2014).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques constitués des carbones et des hydrogènes possédant deux ou plusieurs cycles benzéniques fusionnés, et sont générés lors de la combustion incomplète de la matière organique (Adlein, 2009). Parmi ces HAP, le benzopyrène B(a)P serait le plus puissant cancérogène du tabac impliqué dans la cancérogénèse pulmonaire (Rajat et *al.*, 2009), générant des mutations médiés d'une part par la formation d'adduit à l'ADN et d'autre part par le stress oxydatif cellulaire qui à son tour peut provoquer ou exacerber les lésions mutagènes (Adlein, 2009).

D'autre part, il est à l'heure actuelle généralement admis que les formes réactives de l'oxygène (ROS) interviennent dans la pathogenèse de nombreux cancers. En effet, en quantités sous-létales, les ROS peuvent favoriser l'apparition de cancers, par exemple en provoquant des mutations au niveau des régions codantes ou des régions régulatrices, ou en inhibant, ou au contraire en stimulant l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération ou de la différenciation cellulaires, ou de l'apoptose. Par contre, à fortes concentrations, les ROS peuvent induire directement la mort cellulaire, notamment en provoquant des réactions de peroxydation lipidique et protéique, qui peuvent favoriser la dépoliarisation mitochondriale et ainsi accélérer les phases effectrices de l'apoptose (Magesh et *al.*, 2008).

Le but de notre étude est d'élucider sur un modèle de cancer pulmonaire expérimentalement induit par le benzopyrène, le comportement du stress oxydatif dans la cellule cancéreuse. Cette étude vise également à évaluer les conséquences pulmonaires d'une exposition au B(a)P par voie intrapéritonéale sur le fonctionnement mitochondrial, la balance entre la production et l'élimination des ROS à partir de la mesure des capacités antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques; ainsi de comprendre si les protéines de

choc thermique Hsp90 et les protéines antiapoptotiques (Bcl-2) sont des cibles biochimiques pour le B(a)P lors d'un cancer pulmonaire ; et ce à travers l'évaluation du:

- ✓ Comportement mitochondrial via la mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde par le complexe III de la chaîne respiratoire, et la mesure du gonflement mitochondrial "mitochondrial swelling".
- ✓ Les antioxydants enzymatiques tels que: la catalase, le GST et non enzymatique par la mesure des taux de GSH cytosolique.
- ✓ La peroxydation lipidique par la mesure des taux du MDA cytosoliques.
- ✓ L'expression des protéines de stress Hsp90 et les protéines antiapoptotiques Bcl-2 par western blott.
- ✓ Et ce après examen macroscopique et microscopique des poumons.

Etude Bibliographique

I. Cancer pulmonaire induit par le benzo(a)pyrene

I.1. Le benzo(a)pyrene: définition et sources d'exposition

Le benzo(a)pyrène B(a)P est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) à cinq cycles aromatiques présent dans l'atmosphère sous forme particulaire et généré lors de la combustion incomplète de la matière organique (Marie, 2007). Il a une couleur jaune pâle dans la température et la pression ambiante, un poids moléculaire de 252,3 g/mol, un point de fusion de 181,1°C, et une densité de 1,351 g/cm³. Le B(a)P a une solubilité faible dans l'eau de 3x10⁻⁷g/l (à 25 °C), très soluble dans le chloroforme, soluble dans le benzène, toluène et dans le xylène (Genium, 1999). Il est constitué de deux régions de grande densité électronique et de haute activité métabolique (figure 1). La région k est la région comprise entre le quatrième et cinquième carbone et la région baie entre le neuvième et le douzième carbone (Gadouche, 2010).

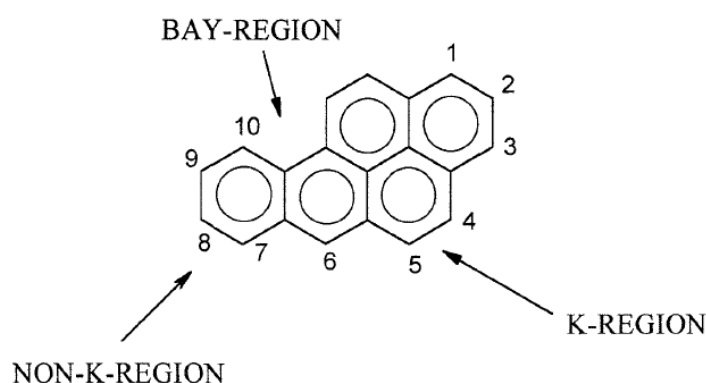


Figure 1. Régions structurales du B(a)P (Penning, 1993).

La principale source d'exposition aux B(a)P chez l'homme est l'alimentation, en particulier la consommation de viandes et poissons fumés ou grillés sur le feu, de graisses et huiles végétales. L'ingestion quotidienne moyenne de B(a)P a été estimée entre 50 à 290 ng/adulte d'après des études menées dans 6 pays européens (Tarantini, 2009).

Par ailleurs, l'ensemble de la population est exposée au B(a)P du fait de la pollution atmosphérique en zone urbaine. La fumée de tabac est une source importante d'HAP. On estime qu'une personne fumant 20 cigarettes par jour absorbe en moyenne 105 ng/jour de B(a)P et un fumeur passif 40 ng/jour (Alexander et al., 2008).

L'exposition environnementale concerne essentiellement les éruptions volcaniques, les feux de forêts et de broussailles. Dans l'exposition professionnelle, Les principales industries concernées sont les cokeries, la fabrication de l'aluminium, la fabrication d'électrodes au carbone, les raffineries de pétrole, les usines à gaz, les couvreurs de toitures (Benhamou et *al.*, 2000).

I.1.2. Toxicocinétique du benzo(a)pyrene

I.1.2.1. Absorption et distribution

Tous les HAP sont très liposolubles et sont donc rapidement absorbé par les organismes quelle que soit la voie de contact: cutanée, digestive ou pulmonaire, ils possèdent une forte affinité pour les tissus adipeux où ils peuvent être stockés pendant plusieurs années.

a. Par voie respiratoire: L'exposition de rats au benzo(a)pyrene sous forme aérosol montre que la clairance s'effectue en deux phases : une phase initiale rapide (clairance trachéale) et une phase secondaire plus lente (clairance alvéolaire) (Mitchell, 1982), avec des demi-vies de 2h à 25-56h; cette dernière est probablement due à la métabolisation du B(a)P et à la fixation des métabolites aux macromolécules. Diverses études montrent après inhalation une absorption rapide et une distribution dans les divers organes (foie, estomac, intestin), l'absorption du benzo(a)pyrène dépend de la taille des particules et du solvant utilisé pour son administration (Weyand et Bevan, 1986).

b. Par voie cutanée: l'absorption par voie cutanée du [¹⁴C] benzo(a)pyrène chez le rat, la souris, le singe, le cobaye est rapide et importante et dépend du véhicule choisi pour l'administration. Les organes cibles sont le foie, les reins et les tissus adipeux. Il a été montré de grosses différences d'absorption et de métabolisme en fonction des espèces (Wester et *al.*, 1990).

c. Par voie orale: L'absorption du benzo(a)pyrène par la muqueuse intestinale semble précéder une diffusion passive à travers la paroi. Des études chez le rat ont montré que 30 à 50 % de faibles doses sont rapidement absorbées et qu'une majeure partie est rapidement métabolisée au niveau du foie (Bonnard et *al.*, 2007).

I.1.2.2. Elimination

Dépendamment de la voie d'exposition, le système hépatobiliaire et le tractus gastrointestinal sont les principales voies d'élimination du B(a)P et de ces métabolites, quelque soit la voie d'exposition (Bonnard *et al.*, 2007). Après une administration orale de 100 mg/kg de B(a)P chez le rat, 45% de la dose est excrétée dans les urines et les fèces après 24 h. Comparativement aux diols, un taux élevé de métabolites hydroxylés est détecté dans les urines et les fèces (Ramesh *et al.*, 2001). La majorité de métabolites sont éliminées dans les fèces (70 à 75% d'une dose sous-cutanée chez la souris), la voie d'excrétion urinaire est cependant mineure (Bonnard *et al.*, 2007). Les métabolites polaires et phénoliques représentent respectivement 60 et 20% de la radioactivité détectée dans les urines. Il est estimé que 80 % du B(a)P métabolisé (métabolites polaires et dérivés phénoliques) est éliminé par la voie urinaire. La forme non métabolisée de B(a)P reste cependant très faible (Yamazaki et Kakiuchi, 1989). L'élimination est moins rapide à partir des faiblement perfusés comparée à ceux richement perfusés (Bartosek *et al.*, 1984). Il n'y a pas d'élimination via l'air expiré (Bonnard *et al.*, 2007).

I.1.2.3. Métabolisation

Le B(a)P doit être bioactivé par des enzymes tel que les CYP450, afin d'acquérir ces propriétés mutagènes et carcinogènes (Trushin *et al.*, 2012).

a. Induction des enzymes de métabolisme du B(a)P.

Le B(a)P est considéré comme un inducteur bifonctionnel: il augmente l'expression à la fois des CYP et des enzymes de détoxification de phase II (y compris les AKR). Cette induction se fait par le récepteur AhR (aryl hydrocarbon) qui est spécifique des composés aromatiques. Cett induction ce fait par 2 mécanismes (Prochaska, 1985) (figure 2).

- ✓ 1^{er} mécanisme : Après son passage dans le cytosole, le B(a)P se lie directement au AhR. Une fois lié, le AhR se dissocie de la protéine de choc thermique 90 et est rapidement transloqué dans le noyau où il forme un complexe avec son partenaire Arnt (Ah receptor nuclear translocator) pour former un hétérodimère 6S. Le complexe AhR/Arnt active l'expression d'une batterie de gènes contenant un élément de réponse aux xénobiotiques et active des éléments de réponse (AREs ou EpREs) en amont de gènes de détoxification de phase II.

- ✓ 2^{ème} mécanisme: Le B(a)P est activé par le métabolisme CYP1A1 en composés électrophiles. Ces composés électrophiles activent à leur tour d'autres composés qui lient et activent des éléments de réponse (AREs ou EpREs) en amont de gènes de détoxification de phase II (Tarantini, 2009).

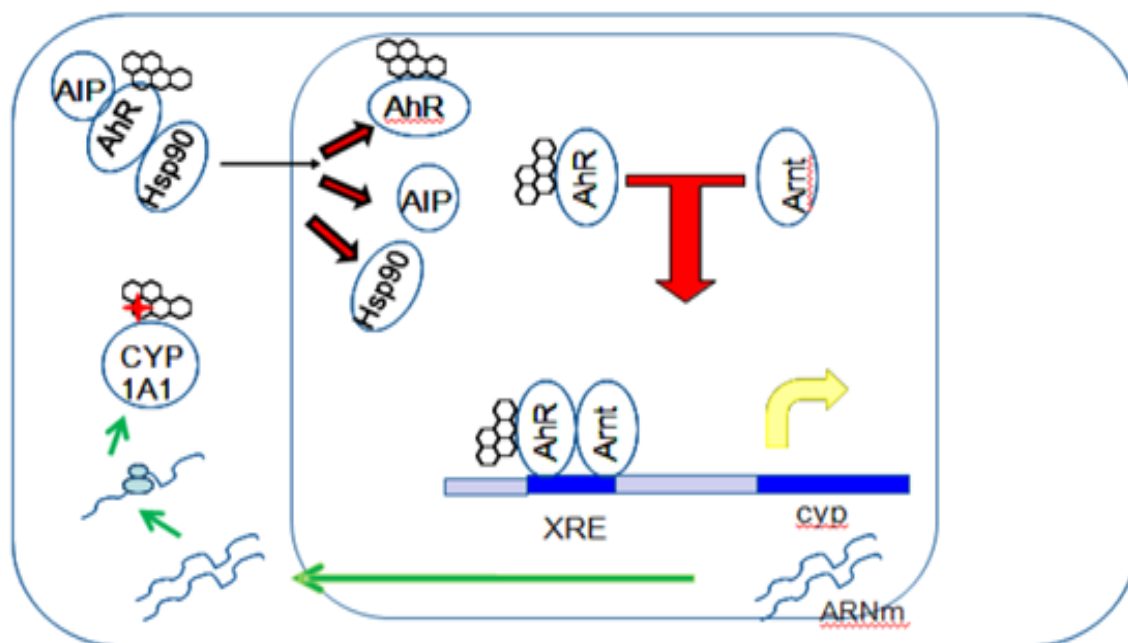


Figure 2. Schéma simplifié de l'induction des gènes *cyp1a1* par le B(a)P (Tarantini, 2009).

b. Voies de métabolisation

Une fois dans la cellule, le B(a)P est métabolisé en différents métabolites: époxydes, hydrodiols, phénols, ainsi qu'en métabolites conjugués au glutathion, au sulfate et à l'acide glucuronique. Le B(a)P est biotransformé et activé par trois voies enzymatiques (figure 3) (Jiang *et al.*, 2007):

La première voie et la plus importante implique la superfamille des cytochromes P450 (CYP450) qui catalyse la monooxygénation en époxyde par les époxydes hydrolases ; la 2^{ème} voie repose sur la formation d'un radical cation suite à l'oxydation à un électron, catalysée par des cytochromes P450 peroxydase ; enfin une voie mise en évidence plus récemment implique la formation de *o*-quinones qui se fait par les cytochromes P450/1A1/1A2 /1B1 par la mono-oxygénation, par les époxydes hydrolases et par les l'aldo-céto réductases (AKRs) (Miller 2001).

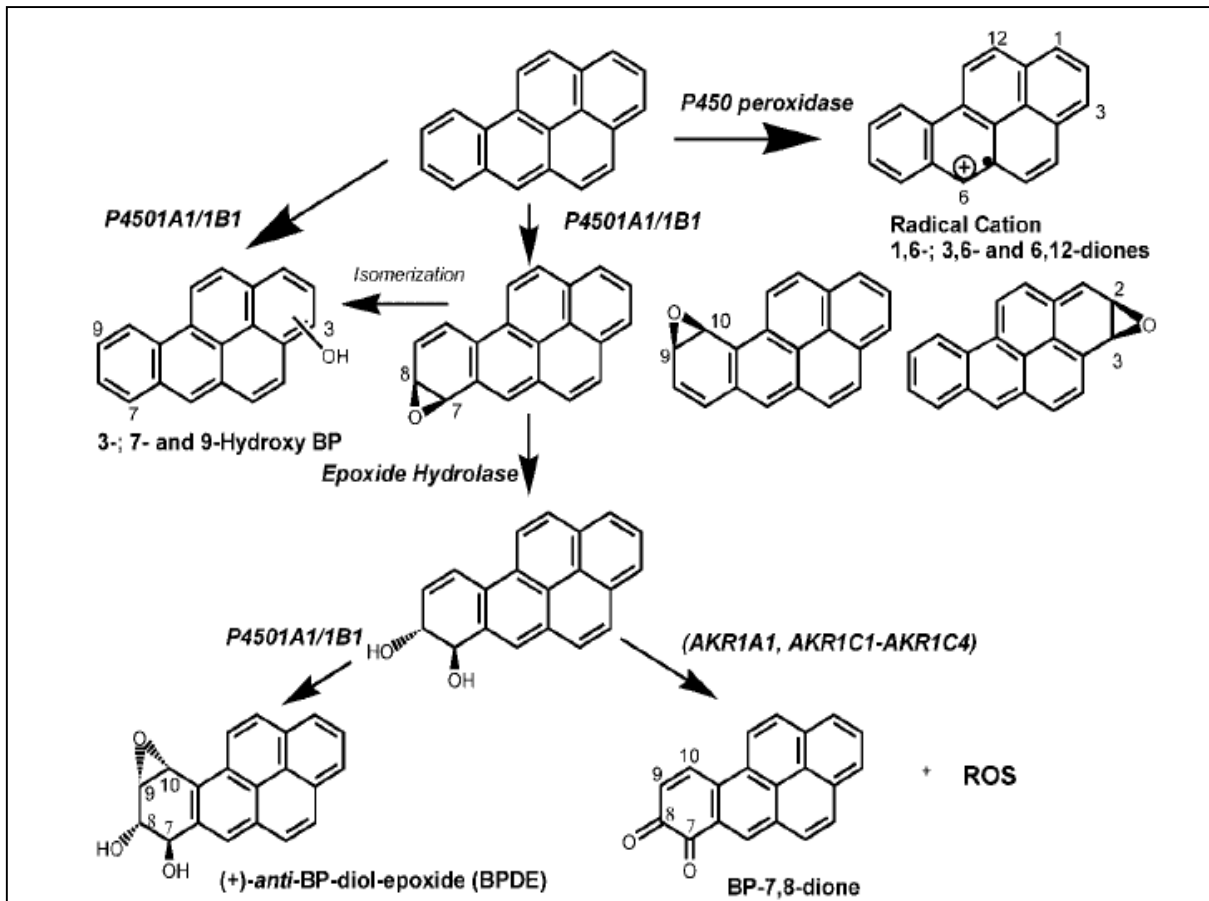


Figure 3. Voies de métabolisation du B(a)P chez l'homme (Jiang et al., 2007).

b.1. Voie des diol-époxydes

Les diol-époxydes sont issus de l'oxydation du B(a)P par le cytochrome P450 et tout particulièrement par les isoformes P450IA1 et P450IA2 (Murray et Reidy, 1990). Dans cette voie il y a une monooxygénation séquentielle catalysée par le cytochrome P450 1A1/1B1 et hydratation pour former 7α , 8β -dihydroxy-7,8-dihydroxy-B(a)P, qui subit une monooxygénation secondaire pour former (+)-anti-BPDE. Cet diol-époxyde forme des adduits stable (+)-Anti-trans-BPDE-N²-2' déoxyguanosine (dGuo) (figure 4), qui par l'intermédiaire de la dérivation trans-lésionnelle des ADN polymérase, aboutit à l'apparition de transversions G→T (Luch, 2005).

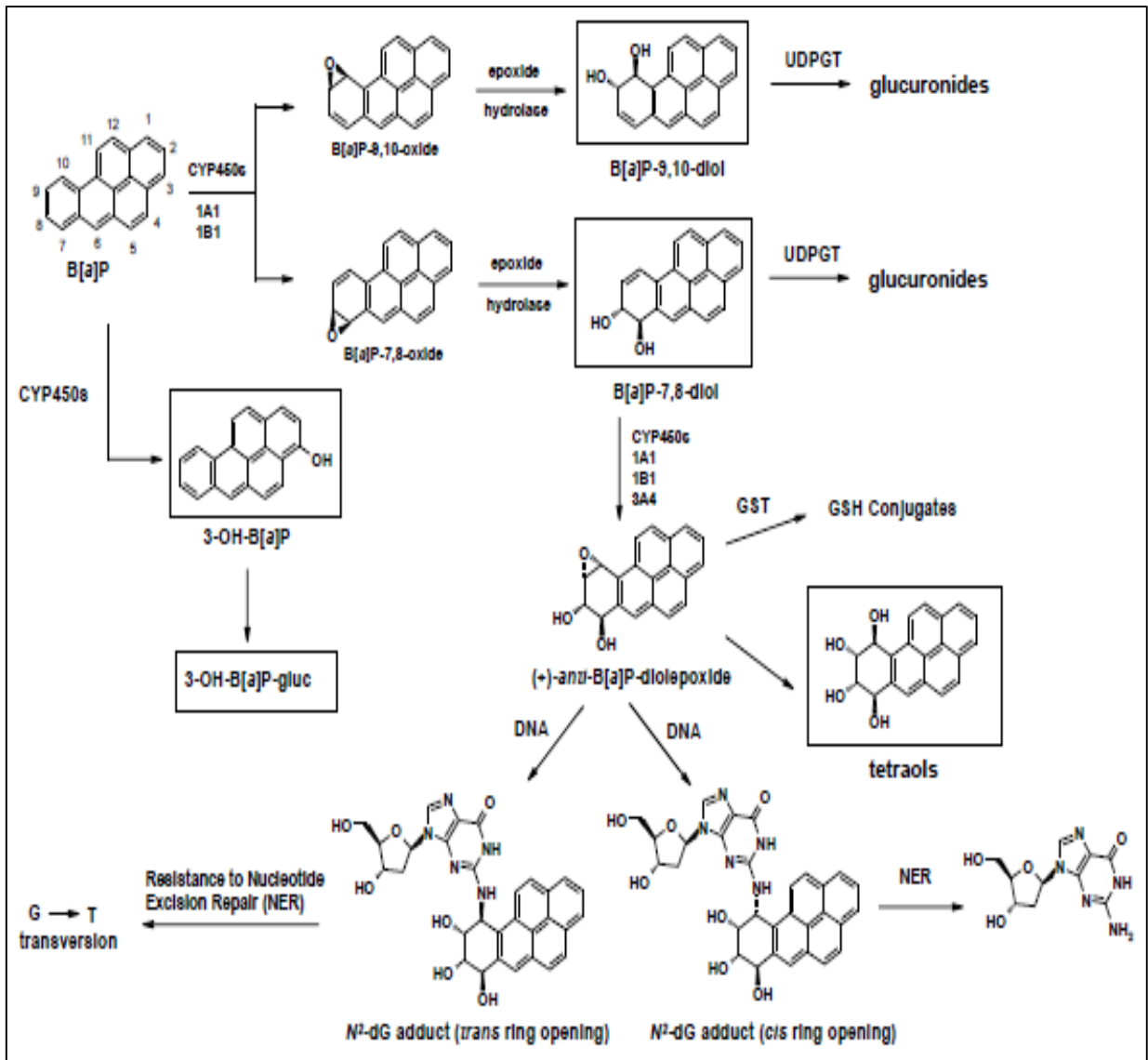


Figure 4. Voie d'activation du B(a)P en diol-époxydes (Trushin et al., 2012).

b.2. La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases

Lors de cette voie, le carbone le plus électrophile du HAP, le C6 dans le cas du B(a)P, subit une oxydation à un électron. Cette réaction, catalysée par des peroxydases dépendantes du CYP450, entraîne la formation du radical cation activé (Penning et al., 1993). Le B(a)P activé va être transformé en phénol correspondant (6-OH-BaP), qui par auto-oxydation va former les 1,6-, 3,6-, ou 6,12-dione-B(a)P (Harvey, 1991). Les quinones ainsi formées peuvent subir des réactions d'oxydoréduction afin d'être transformées en semi-quinones, qui peuvent être retransformées en quinones (Kim et al., 2000). Elle a pour mécanisme l'oxydation à un électron du B(a)P par les peroxydases cellulaires et/ou potentiellement par les cytochromes P450 (Figure 5). Elle conduit à la formation de radicaux cations qui sont instables chimiquement (Cavalieri et Rogan, 1998).

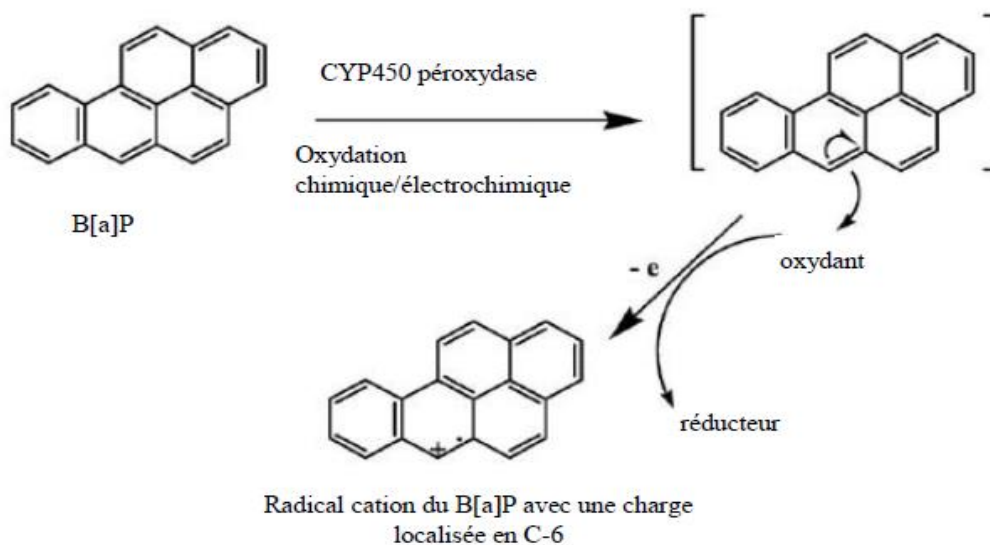


Figure 5. Formation du radical cation (Tarantini, 2009).

b.3. Voie des o-quinone

Les premières étapes de formation des *o*-quinones sont communes à celles de la voie des diol-époxydes, jusqu'à l'obtention du 7,8-dihydrodiol-B(a)P. Les enzymes du CYP450 et l'EH sont donc impliquées dans cette voie de biotransformation. Ensuite, les Aldo-Kéto Réductases (AKR) sont les enzymes impliquées dans la formation des *o*-quinones. Les AKR constituent une super-famille d'enzymes d'oxydoréduction. Une fois les quinones et les *o*-quinones formées, les nitroréductases jouent un rôle clé dans leur détoxication. Parmi elles se trouve la NAD(P)H-quinone oxydoréductase 1 (NQO1), également appelée DT diaphorase. Son induction est contrôlée par le récepteur Ah (Hasspieler et *al.*, 1996). Elle semble être impliquée dans le mécanisme de génotoxicité des quinones, par la production NADPH dépendante d'ERO (Lemaire et *al.*, 1996). La dihydrodiol déshydrogénase (DD), appartenant à la famille des AKR, entre en compétition avec le CYP450, afin de catalyser l'oxydation NADP⁺ dépendante des *trans*-7,8-dihydrodiols du B(a)P en catéchols (Penning et *al.*, 1996). Le catéchol étant lui même instable, il est transformé en *o*-quinone (7,8-dione-BaP) par deux oxydations successives à 1 e⁻; la première oxydation menant à la formation d'un radical semi-quinone, et la seconde à la *o*-quinone. Les quinones ainsi formées peuvent être retransformées en catéchol, via une réduction non enzymatique à 2 e⁻, ou en radical semi-quinone via une réduction enzymatique à 1 e⁻ catalysée par des réductases (figure 6) (Penning et *al.*, 1998).

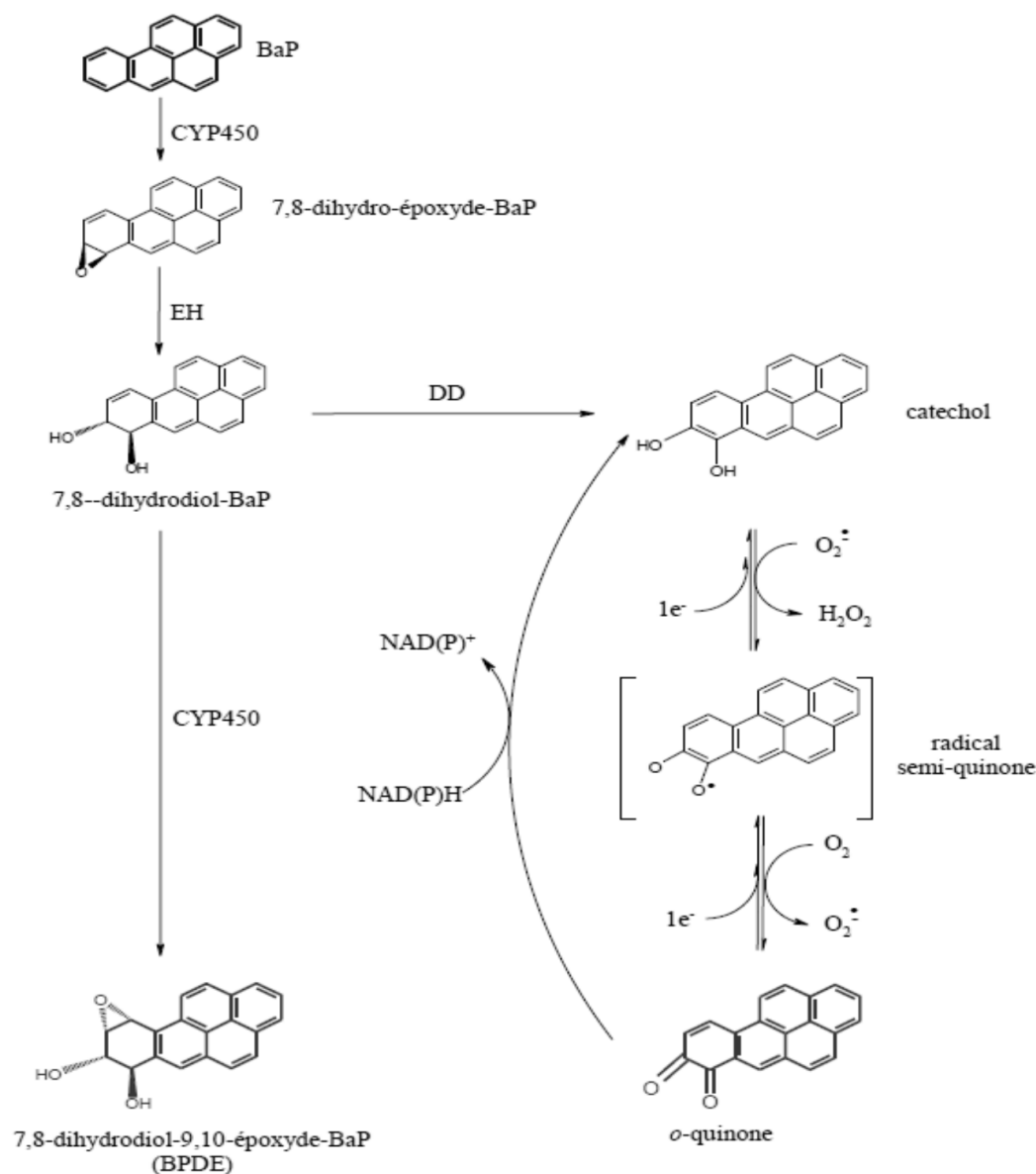


Figure 6. Activation métabolique du B(a)P par les voies des diol-époxydes et des o-quinones, menant principalement à la formation respective du 7,8-B(a)P-diol-époxyde, et de la 7,8-dione-B(a)P (Burczynski et al., 2000)

Les réactions des trois principales voies de biotransformation du B(a)P sont résumées dans la Figure 7.

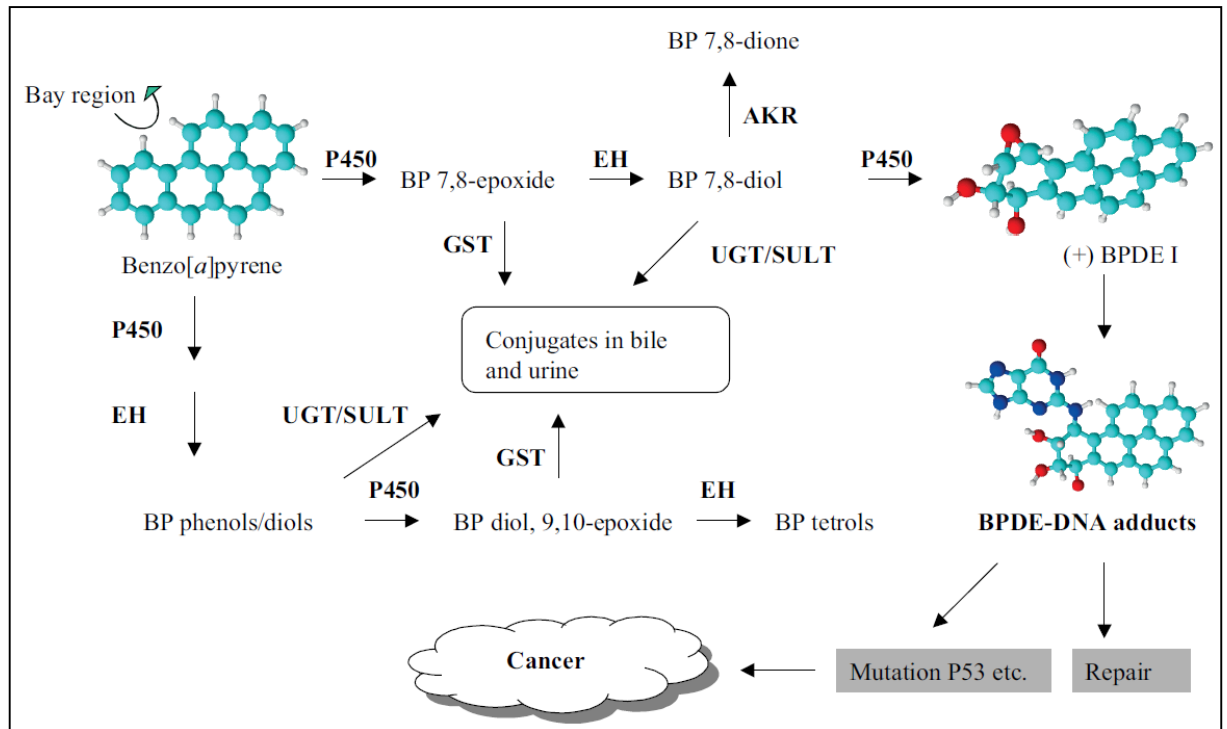


Figure 7. La bioactivation et la détoxification du B(a)P par les enzymes de la phase I et II, et la formation de l'ultime carcinogène le diol-époxyde (Sagredo, 2011).

I.3.Mécanismes de cancérisation

I.3.1. Cancer de poumon

Le poumon, principal organe de l'appareil respiratoire situé dans la cage thoracique, sert comme un site primaire pour le métabolisme des xénobiotiques environnementaux toxiques et les polluants atmosphériques. Le poumon est composé de plus de 40 types de cellules différentes. Les CYP enzymes métabolisant les xénobiotiques sont exprimés dans l'épithélium des bronches et des bronchioles, les cellules de Clara, les pneumocytes de type II, et les macrophages alvéolaires. Le tissu pulmonaire est connu pour activer les pro-cancérigènes comme le B(a)P, en intermédiaires plus réactifs qui forment facilement des adduits d'ADN (Pavek et Dvorak, 2008).

Au niveau du poumon, on distingue deux principaux groupes histologiques de cancer, soit le cancer du poumon à petites cellules (CPAPC) soit le cancer du poumon non à petites cellules (CPNAPC). Le cancer du poumon à petites cellules (CPAPC) représente de 15 % à 20 % de tous les cas de cancer du poumon diagnostiqués. Il s'agit de la forme la plus agressive de cancer du poumon. Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNAPC), de

son côté, représente approximativement 80% de tous les nouveaux cas diagnostiqués. Il se subdivise en trois types majeurs de tumeurs (tableau 1): l'adénocarcinome (40 %), le carcinome épidermoïde (30 %) et le carcinome à larges cellules (10 % à 15 %) (Côté, 2002).

Tableau 1. *Caractéristiques principales des différents types de cancer pulmonaire (Côté, 2002).*

Type	Sous-type	Caractéristiques principales
CPAPC	—	Localisation centrale avec adénopathie médiastinale. Tumeur agressive à croissance rapide. Maladie souvent avancée au diagnostic. Fortement lié à l'usage du tabac.
CPNAPC	Adénocarcinome	Lésions périphériques, souvent sans symptômes. Développement précoce des métastases. Survient chez les femmes. Moins fortement relié au tabagisme.
	Carcinome épidermoïde	Lésions centrales, endobronchiques. Développement très lent, demeure localisé. Apparition tardive des métastases. Cancer associé au tabac.
	Carcinome à larges cellules	Large masse périphérique. Semblable à l'adénocarcinome mais moins différencié évolution plus rapide.

La carcinogenèse bronco-pulmonaire comprend 3 étapes: La première appelée "initiation" résulte de mutations, la seconde étape qui fait suite à l'initiation est la "promotion" qui correspond à des défauts de contrôle de la différenciation de la croissance cellulaire ou encore une résistance à une mort programmée. La troisième étape appelée "progression" correspond à un passage à un état malin et à une instabilité génomique du matériel génétique des cellules concernées (Shields et Harris, 1993). Le benzo(a)pyrène est un promoteur tumoral chimique et un initiateur de tumeur ce qui en fait un cancérigène complet (Ségala, 2012 ; Huc *et al.*, 2003).

Comme dans la plupart des cancers, les carcinomes broncho-pulmonaires acquièrent au cours de leur développement une variété d'altérations génétiques (mutations, amplifications géniques, pertes d'allèles, instabilités chromosomiques) et épigénétiques (surexpression des gènes, extinction de l'expression par hyperméthylation des promoteurs), définissant un « carrefour régulatrice » qui intègre prolifération, apoptose, différenciation et réponses aux lésions de l'ADN (Yokota et Kohno, 2004).

I.1.3.1. Mécanismes de cancérisation

L'équilibre entre l'activation métabolique et la détoxification des substances cancérigènes varie selon les individus et la susceptibilité probable au cancer. L'induction tumorale par le B(a)P est due à la conjonction de plusieurs facteurs (Taioli, 2008)..

1. Cancérisation par formation d'adduits à l'ADN

L'activation métabolique du B(a)P en espèces électrophiles formant des adduits avec l'ADN est considérée comme l'événement crucial de la cancérogenèse pulmonaire, l'ADN nucléaire et mitochondrial, sont donc la cible majeure. Les trois voies de conversion du B(a)P forment des métabolites réactives vis-à-vis l'ADN (Figure 8) (Abdin *et al.*, 2012). Le BPDE se lie préférentiellement aux groupes amino exocycliques de la dGuo et dAdo de l'ADN (Dipple, 1994). Les désoxyribonucléosides puriques (dGuo et dAdo), étant plus réactifs que les désoxyribonucléosides pyrimidiques (dCyd et dThy), et ont un potentiel de formation d'adduits plus important (Marie, 2007). Les adduits principaux du BPDE se forment sur les atomes N2 de la dGuo, N6 de la dAdo (Marie *et al.*, 2008).

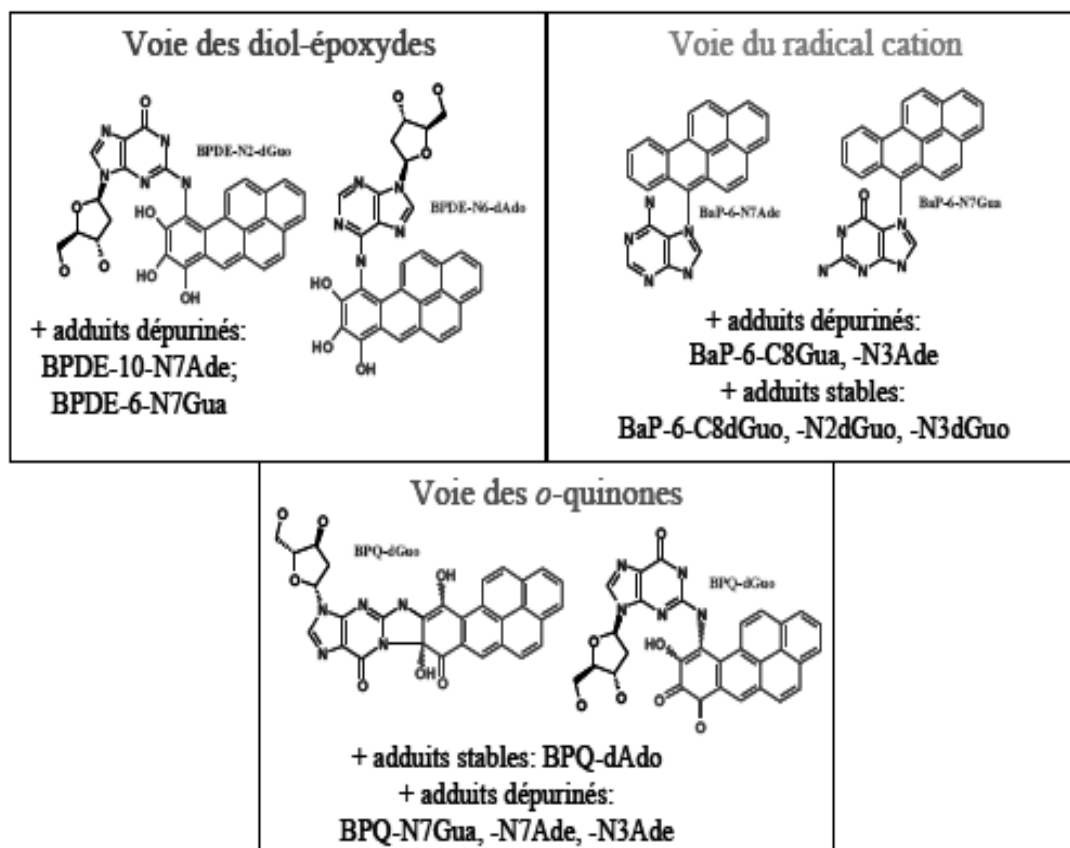


Figure 8. Principaux adduits du B(a)P (Balu *et al.*, 2004).

In vivo, la formation des adduits BPDE à l'ADN au niveau des différents organes dépend de la voie d'entrée du B(a)P (Godschalk, 2000). Plusieurs expériences menées sur des rats exposés au B(a)P par voie intrapéritonéale montrent des niveaux d'adduits maximum au niveau du poumon (Ginsberg, 1990, Qu, 1996). Les adduits de la voie du radical cation ne peuvent être produits que si le radical cation est produit à proximité de l'ADN ou de nucléosides. Les adduits ont été synthétisés par électrochimie et sont les adduits dépurinants B(a)P-N7-Gua, B(a)P-C8-Gua ainsi que les adduits stables B(a)P-C8-dGuo, B(a)P-N2-dGuo et B(a)P-N3-dGuo. En présence de dAdo l'adduit B(a)P-N7-Ade est formé. Le B(a)P-o-quinones peut réagir avec les groupes amino de la dGuo en position N2 ou en position N6 de la dAde pour former des adduits stables (Penning, 1999).

2. Mutations engendrées par les adduits

Les dérivés métaboliques du B(a)P ont une action tumorigène car ils sont capables d'induire des dommages à l'ADN et des mutations au niveau de gènes de contrôle du cycle cellulaire tels que les oncogènes et les gènes supresseurs de tumeurs. Les modifications génétiques les plus fréquentes dans le cancer du poumon sont des mutations ponctuelles dans le gène supresseur de tumeur p53 et dans le proto-oncogène K-ras (Gao et al., 1997).

A. Le gène supresseur de tumeur p 53

Le gène supresseur p53 produit, la phosphoprotéine nucléaire p53 qui est un facteur de transcription appartenant à une famille des protéines essentielles à la différenciation et à la morphogenèse épithéliale, mais spécialise dans la réponse à un large spectre de stress physiques, chimiques ou biochimiques. La P53 est un médiateur essentiel de la réponse des cellules aux expositions à des agents cancérigènes, capable d'entraîner l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose en fonction du type cellulaire, du degré de différenciation, de la nature et de l'intensité du stress. Il a un rôle de « capteur » c'est un acteur de premier plan dans la régulation de la stabilité génétique et tissulaire de l'épithélium broncho-pulmonaire (Vähäkangas et al., 2001).

La mutation du gène p53 est le changement génétique le plus fréquemment identifié dans le cancer du poumon chez l'homme (Iggo et al., 1990). On détecte des mutations de TP53 dans 50 % des NSCLC et dans plus de 70 % des SCLC. Dans les SCLC des gros fumeurs, la fréquence des mutations peut dépasser 80 %. Chez les fumeurs, la nature chimique de la mutation constitue souvent une « signature moléculaire » des agents mutagènes

de la fumée du tabac, tels que le benzo(a)pyrene et d'autres hydrocarbures polycycliques aromatiques (Le Calvez et *al.*, 2005). Dans la cellule exposée, ces agents subissent une bioactivation qui génère des métabolites capables de se fixer sur l'ADN de façon covalente. Les métabolites du benzo(a)pyrène se fixent préférentiellement sur certaines guanines, et ces mêmes guanines sont fréquemment mutées seulement dans les cancers des fumeurs (Baldi et *al.*, 2008). La voie des diol époxyde est confirmée par des études montrant que le BPDE se trouve dans les poumons des fumeurs; la localisation de ses adduits peut localiser les points chauds du gène suppresseur de tumeur p53 qui sont les codons 157, 158, 248 et 273 (Abdin et *al.*, 2012; Hussain et *al.*, 2001).

B. L'oncogène K-ras

Les mutations dans les gènes ras (K-, H- et N-RAS) sont des altérations très communes identifiées et impliquées dans de nombreux types de tumeurs et cancer humains (Keohavong et *al.*, 1996 ; Baldi et *al.*, 2008). Dans les tumeurs pulmonaires, le gène ras le plus fréquemment muté est K-ras, alors que N-ras et H-ras ont également été mutés avec une moindre fréquence (Keohavong et *al.*, 1996). Les protéines Ras jouent un rôle de relais et d'amplificateur des signaux intracellulaires déclenchés par l'activation des récepteurs tyrosine kinase tels que l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). La fréquence élevée de mutation KRAS sur un seul codon (12) dans les tumeurs de poumon a été étudiée par Feng et ses collègues. Ils ont montré que les codons 12 et 14 du gène KRAS sont des points chauds pour la formation d'adduits d'ADN induit par les carcinogènes de fumé du tabac BPDE (benzo(a)pyrène diol époxyde) (Feng et *al.*, 2002).

3. Cancérisation par génération de ROS

Les quinones qui dérivent du processus métabolique du benzo(a)pyrène produisent facilement des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par système de cycle redox dans le corps et peuvent causer des dégâts par l'oxydation des macromolécules (ADN, ARN et protéines), qui peuvent jouer un rôle important dans le processus de cancérisation par le B(a)P (Kim et lee, 1997), mais les CYP1A1 peuvent également en produire, au cours de leur activité catalytique (Morel 1999). La métabolisation du B(a)P par les dihydrodiol déhydrogénases produit des catéchols qui subissent deux oxydations à un électron avec la production concomitante de ROS pour former des HAP *o*-quinones (Smithgall, 1988). La première oxydation produit un anion *o*-semiquinone et du peroxyde d'hydrogène suivi par une

deuxième oxydation qui conduit à la formation de *o*-quinone et d'un anion superoxyde. En présence d'équivalents réducteurs cellulaires (ex: NADPH), les HAP *o*-quinones peuvent aussi être réduites en catéchols entraînant des cycles rédox supplémentaires qui amplifient la production d'espèces réactives de l'oxygène H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ (Penning *et al.*, 1996). En présence de métaux rédox tels que Fe^{2+} ou Cu^+ , H_2O_2 peut donner $\bullet OH$. Dans l'ADN, ces espèces réactives conduisent à la génération de bases oxydées notamment au niveau de la guanine (7,8-dihydro-8-oxo-guanine). De plus, $\bullet OH$ est à l'origine de cassures de brins (Penning *et al.*, 1999). Les ERO générées lors du cycle rédox des quinones entraînent des cassures simple brins, double brins ainsi que des modifications au niveau des purines ou pyrimidines ou du désoxyribose (Penning *et al.*, 1999) (Figure 9).

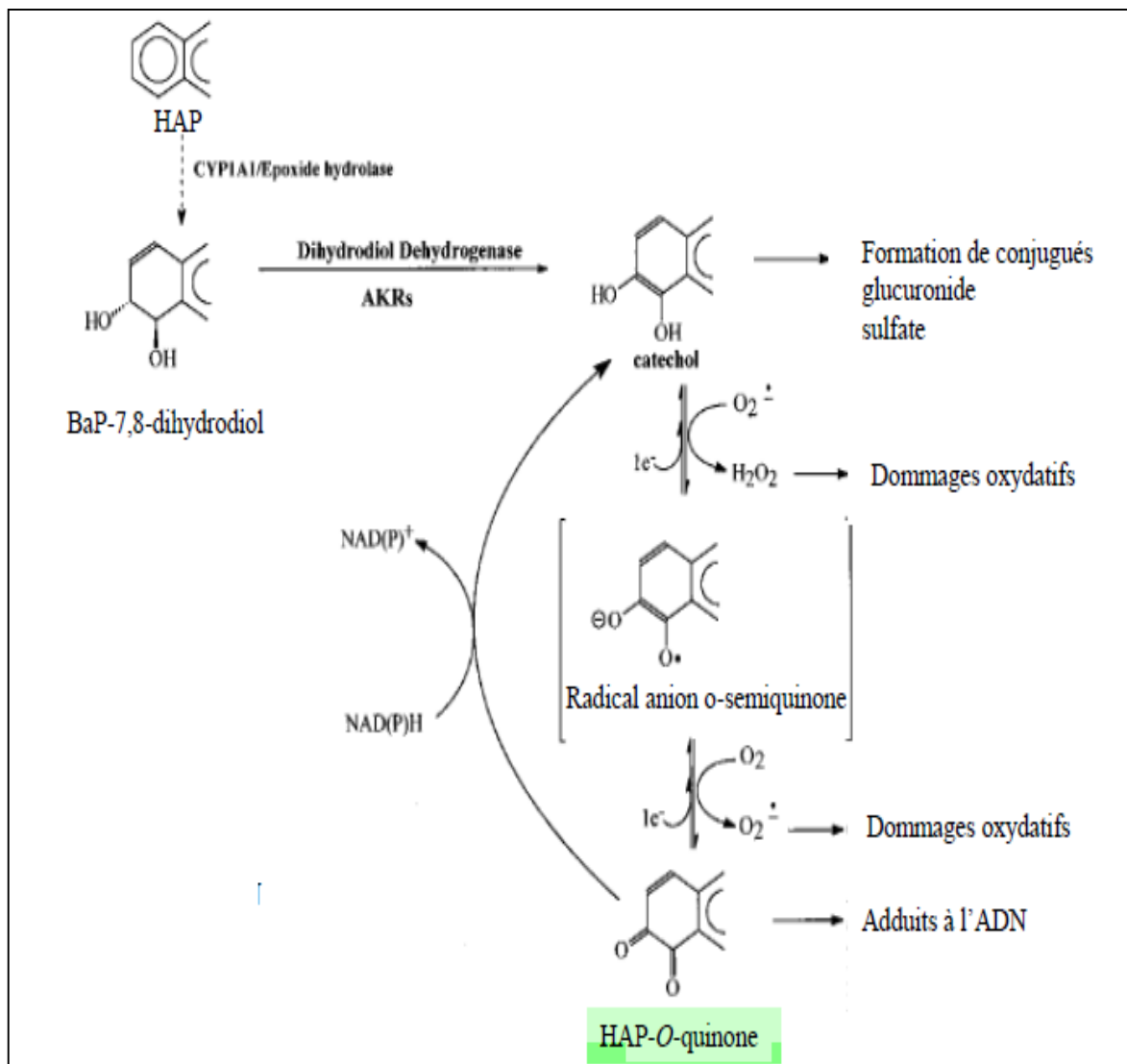


Figure 9. Formation des ROS par la voie des quinones (Tarantini, 2009).

II. Stress oxydant et protéines de choc thermique Hsp dans le cancer de poumon

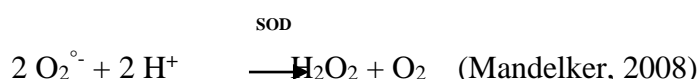
II.1. Stress oxydant et radicaux libres

Le B(a)P est connu pour être le plus puissant cancérigène. L'induction des enzymes de phase I et l'inhibition des enzymes antioxydants, provoquent l'accumulation des radicaux libres et électrophiles jouant un rôle important dans les processus chimiques de la tumorigénèse (Selvendiran et *al.*, 2004). En plus de son pouvoir de former des adduits avec l'ADN, le B(a)P provoque d'autres effets toxiques dans les cellules cibles, tel que le stress oxydatif qui peut endommager les cellules par différentes voies incluant les dommages oxydatifs des protéines, les dommages de l'ADN et la peroxydation lipidique (Cavalho et *al.*, 2011).

Le stress oxydatif est donc suggéré pour expliquer les dégâts provoqués par le B(a)P et notamment le cancer pulmonaire, il participe à la destruction des macromolécules contenues dans les cellules, notamment l'ADN, les lipides, et les protéines.

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (élection non apparié) sur sa couche externe (Halliwell et Gutteridge, 2000). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libre une grande réactivité et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices (Haleng et *al.*, 2007). En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue de ROS soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante (Defraigne et Pincemail, 2007).

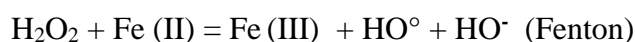
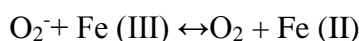
L'anion superoxyde est l'une des premières EOR à être formées, par réduction partielle d'une molécule d'O₂. Il peut conduire à la formation du peroxyde d'hydrogène par la réaction suivante:



Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ une espèce oxygénée réactive non radicalaire. Il est relativement stable, possède une demi-vie longue, et les membranes biologiques lui sont

perméables. Il est peu dangereux en soi pour la cellule, mais il constitue la source du radical hydroxyle HO° par la réaction de Fenton.

Le radical hydroxyle, présenté comme le plus toxique malgré sa faible diffusion, peut attaquer tous les types de constituants cellulaires et engendrer diverses altérations (dégradation protéique, inactivation enzymatique, lipoperoxydation, adduits à l'ADN, etc) (Gardès-Albert *et al.*, 2003). Il peut être produit par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss (Pelletier *et al.*, 2004):



Le radical hydroxyle peut réagir avec l'ADN, les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique. De même, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. En outre, lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver le site actif (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

II.2. Production de ROS par la chaîne respiratoire

Les ROS sont générées dans plusieurs compartiments et par multiples enzymes dans la cellule. Bien que toutes ces sources contribuent à la charge globale de l'oxydation, la grande majorité des ROS cellulaires (estimée à environ 90%) peut être liée à la mitochondrie (Balaban *et al.*, 2005). Les Mitochondries semblent être (quantitativement) les sites subcellulaires les plus importants de la production d'O₂• et H₂O₂ dans les organes des mammifères; la concentration à l'état stable de O₂• dans la matrice mitochondriale est d'environ 5 à 10 fois plus élevée que dans le cytosol et dans l'espace nucléaire (Cadenas et Davies, 2000). Les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont les sites essentiels de cette production à l'état normal mais surtout après exposition aux xénobiotiques et aux substances cancérigènes (Sainz *et al.*, 2012) (figure 10).

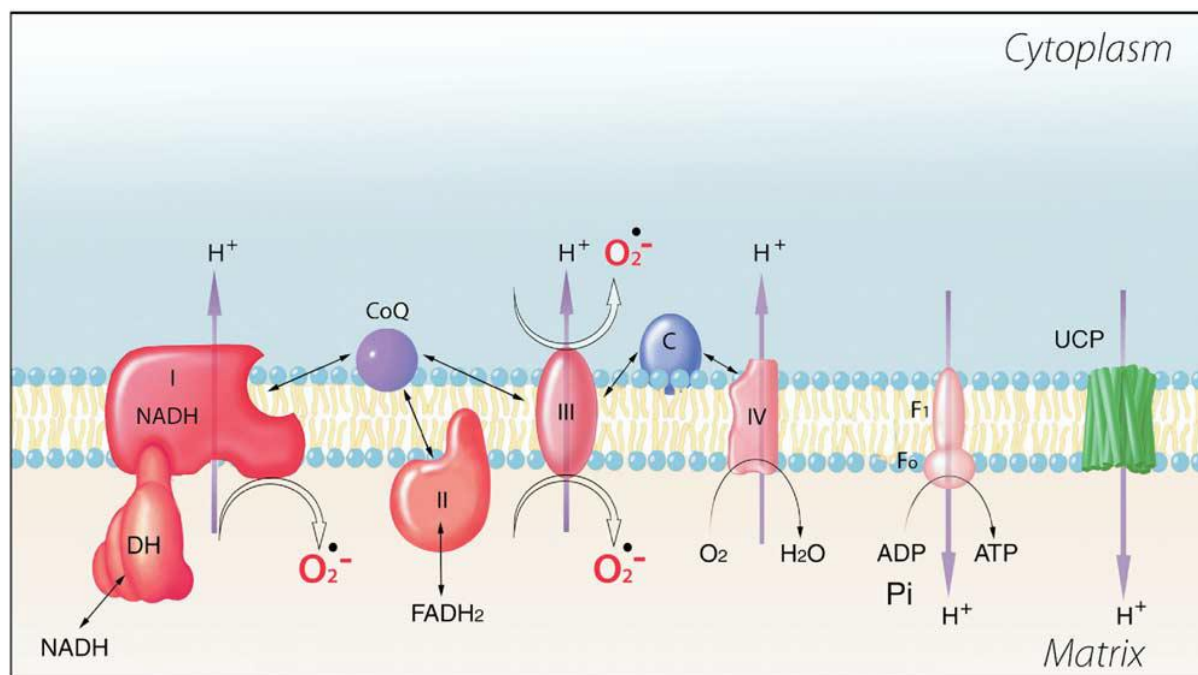


Figure 10. Les sites majeurs de la production de l'anion superoxyde sont le complexe I et III (Balaban et al., 2005).

II.2.3. Mécanismes de production de ROS par le B(a)P

Le mécanisme-même du métabolisme du B(a)P et de ces métabolites, notamment par les CYP, entraîne un stress oxydant supplémentaire via la production d'espèces activées de l'oxygène (EAO ; dont l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $OH\bullet$) ayant un rôle non négligeable dans le processus de bioactivation. Ainsi, le stress oxydant découlant de cette forte production d'EAO, entraîne l'altération de l'intégrité de l'ADN via des dommages oxydatifs, à l'origine de différentes mutations et pouvant participer à l'initiation de cancers (Nebert et al., 2000).

Plus tôt, Kumar et ces collaborateurs (2012) ont rapporté que le B(a)P médiatise sa toxicité par le déséquilibre de l'état redox cellulaire, en particulier par la génération de ROS et la régulation négative des antioxydants majeurs comme GSH dans la cellule pulmonaire.

Les quinones, composés hautement réactifs produits en fin de chaîne métabolique du B(a)P, tireraient ainsi leur activité de cycles d'oxydation-réduction (figure 11), menant à une forte production de radicaux réactifs d'oxygène tels que H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ et de semi-quinone, responsables en partie des dommages cellulaires et de cassures de l'ADN (Kim et al., 2000).

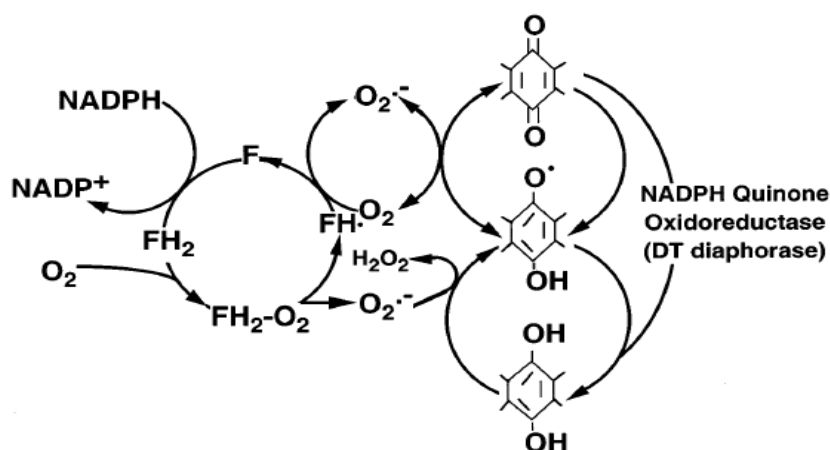


Figure 11. Cycle redox des quinones. Le cycle de réduction/oxydation des quinones entraîne une forte production d'espèces activées de l'oxygène (Kehrer, 2000)

Un mécanisme important de la production de ROS HAP- dépendante implique la conversion de ces composés en quinones. Cela se produit par transformation primaire en intermédiaires phénoliques qui peuvent ensuite subir une nouvelle oxydation. Les B(a)P, 1,6-, 3,6- et 6,12-quinones ont déjà été décrits dans les années 1970. Comme un autre mécanisme, la formation de quinones peut rivaliser avec la voie diol-époxyde. Au lieu de l'époxydation secondaire, le 7,8-diol de B(a)P peut également subir une réduction enzymatique NADPH-dépendante pour former le catéchol correspondant. En raison de son instabilité, ce produit intermédiaire est ensuite oxydé en ortho-quinones correspondantes. Au cours de ce processus, H_2O_2 et $O_2^{\cdot -}$ seront générés. En effet, les quinones sont des substrats de différentes réductases tels que aldo-kéto-réductases (les AKRs). Tant qu'il y aura réduction de la capacité des cellules à se maintenir, ces composés peuvent être reconvertis en hydroquinones (quinols) ou catéchols, qui peuvent subir de nouveau l'auto-oxydation, en générant H_2O_2 . Outre les dommages oxydatifs à l'ADN, les quinones sont très électrophile, des composés qui peuvent également former des adduits covalentes de l'ADN et des protéines (Kim et al., 2000).

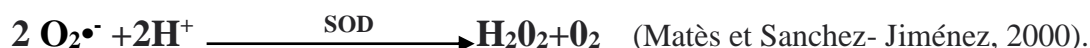
II.2.4. Les systèmes de défenses antioxydantes

D'après (Gutteridge et Halliwell, 2010) un antioxydant est défini comme « Toute substance qui retarde, prévient ou élimine les dommages oxydatifs à une molécule cible ». Pratiquement chaque cellule est dotée de mécanismes de protection contre les effets néfastes des ROS. On peut classer les antioxydants en catégories enzymatiques et non enzymatiques (Gutteridge et Halliwell, 2000).

II.2.4.1. Les antioxydants enzymatiques

Pour se protéger contre le stress oxydant, les organismes possèdent des défenses enzymatiques telles que les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), les glutathion peroxydases (GPx), les glutathion S-transférases (GST) et les métallothionéines (MT) (Figure 18).

La superoxyde dismutase : (EC 1.15.1.1) ou la SOD a été découvert en 1969 par McCord et Fridovich est une famille des métalloenzymes, sur la base du cofacteurs métallique au sein de leurs sites actifs, les SOD peuvent être séparées en trois classes: SOD cuivre / zinc (CuZnSOD ou SOD1), SOD manganèse (MnSOD ou SOD2) et de SOD fer (FeSOD ou SOD3) deux types ont été caractérisé chez les eucaryotes ; MnSOD cytosolique et MnSOD mitochondriale (Jia et *al.*, 2014), elle constitue la première ligne de défense contre les radicaux superoxydes dans les cellules (Alscher et *al.*, 2002). Cette enzyme accélère considérablement la réaction de la transformation de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et en oxygène moléculaire O_2 (Mandelker, 2008) selon la réaction:



La glutathion peroxydase : (EC 1.11.1.19) ou GPx catalyse la réduction d'une variété d'hydropéroxydes ($ROOH$ et H_2O_2) en utilisant du GSH comme donneur d'électrons, le glutathion dissulfite (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron (Lawler and Demaree, 2001). Le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule, protégeant ainsi les cellules de mammifères contre les dommages oxydatifs (Matès et Sanchez- Jiménez, 2000; Mari et *al.*, 2009). Cette enzyme catalyse la réduction d'un peroxyde en son alcool correspondant selon la réaction :



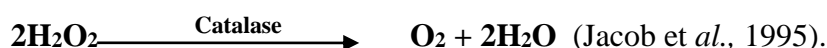
La régénération du GSH à partir du GSSG se fait principalement grâce à l'intervention de la glutathion réductase, et elle consomme une molécule de NADPH. Le NADPH provient de la voie des pentoses phosphates pour la majorité des tissus (Lawler et Demaree, 2001).



La catalase (EC 1.11.1.6 ou 2 H₂O₂ oxydoréductase): L'H₂O₂ qui vient d'être formé par la SOD, peut être à son tour métabolisé par la catalase (et/ou les GPxs). En fonction de la concentration de H₂O₂, il exerce une double fonction. À de faibles concentrations (<10⁻⁶ M) de H₂O₂, il agit comme une peroxydase, où une variété de donneurs d'hydrogène (par exemple, l'éthanol, l'acide ascorbique) peuvent être oxydés de la façon suivante :



À des concentrations élevées de substrat, la catalase décompose H₂O₂ toxique à un rythme extrêmement rapide en utilisant la réaction de "catalyse" dans lequel H₂O₂ agit à la fois comme accepteur et donneur de molécules d'hydrogène (Scandalios et al., 1997).



Le système thiorédoxine: La thiorédoxine contribue à maintenir les protéines intracellulaires à l'état réduit. La thiorédoxine réductase est une enzyme sélénodépendante. Elle catalyse la réduction de la thiorédoxine oxydée, autrement dit sa régénération aux dépens d'une molécule de NADPH, et permet également de réduire les peroxydes lipidiques et de régénérer la vitamine C (Arnér et Holmgren, 2000).

II.2.4.2. Les antioxydants non enzymatiques

Le glutathion (GSH) est un tripeptide, formé par la condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine. C'est un composé de petite masse moléculaire qui contient un groupement thiol libre apporté par la cystéine lui conférant ses principales propriétés biochimiques. Synthétisé exclusivement dans le cytosol mais distribué après dans les organites intracellulaires tel que le réticulum endoplasmique (RE), le noyau et les mitochondries (Mari et al., 2009). Toutes les cellules en contiennent à une concentration élevée de l'ordre de 0,5mM. Il présente entre autre la propriété d'être un puissant antioxydant qui protège les cellules des radicaux libres. Cette propriété est liée au fait qu'il est capable de se combiner avec l'O₂^{-•}, l'H₂O₂, et l'°OH. Il protège ainsi les cellules de la peroxydation lipidique. Enfin, il permet la régénération de la vitamine E et C oxydées qui agit également comme un antioxydant.

Le GSH est aussi impliqué dans des réactions enzymatiques antioxydantes comme co-substrat avec des glutathion peroxydases voir ci-dessous.



Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et *al.*, 1992).

En plus du glutathion, d'autres composés généralement apportés par la nourriture participent à la protection contre les radicaux libres. Les vitamines A, C, E et les caroténoïdes constituent ce qu'on appelle des *scavengers* car ils captent les électrons célibataires des radicaux et interrompent ainsi les réactions d'oxydation en chaîne, notamment la lipoperoxydation de par leur localisation membranaire (Biewenga et *al.*, 1997).

II.2.5. Ciblage des protéines de choc thermique Hsp dans le cancer pulmonaire

II.2.5.1. Les protéines de choc thermique ou de stress Hsp90

Le terme de protéines de choc thermique (Hsp) décrit leur synthèse accrue après un choc thermique. Ce sont un sous-ensemble de chaperons moléculaires, en plus de la chaleur ils sont plus connus pour leur induction rapide et abondante par le stress (Ciocca et *al.*, 2013). Les HSP sont surexprimées dans plusieurs types de tumeurs humaines, y compris celle de l'estomac, du sein, de l'endomètre, de l'ovaire, de côlon, de poumon et de la prostate (Ortiz et Salcedo, 2010). Ils sont classés en quatre familles de protéines basées sur la masse moléculaire relative: la famille HSP-20, comprenant une masse de 22 à 27 kDa; la famille HSP-60 allant de 58 à 64 kDa; la famille des HSP-70, y compris les protéines de 66-78 kDa, et la famille des HSP-90, avec des protéines de 80 à 94 kDa (Zhao et *al.*, 1994).

Un membre de la famille des Hsp: Hsp 90, est abondamment exprimé dans le cytoplasme de la plupart des cellules humaines, seulement une petite partie d'entre elles migrent dans le noyau de la cellule, sous la forme d'homo-dimères. Hsp90 existe sous deux isoformes principales (Hsp90 α , inductible, et Hsp90 β , constitutive). Elle exerce son rôle en formant un complexe multiprotéique ayant une activité ATPase (Flandrin et *al.*, 2008; Li et Buchner, 2013).

Structurellement, Hsp90 est un homodimère, chaque monomère contient trois régions liées de manière flexible, un domaine N-terminal liant l'ATP (N-domaine), un domaine intermédiaire (M-domaine), et un domaine de dimérisation C-terminal (domaine C) (Figure 12). À l'exception de la liaison chargée située entre les N et M-domaines dans les Hsp90 des eucaryotes, cette organisation de domaine est conservée de la bactérie à l'homme (Li et Buchner, 2013).

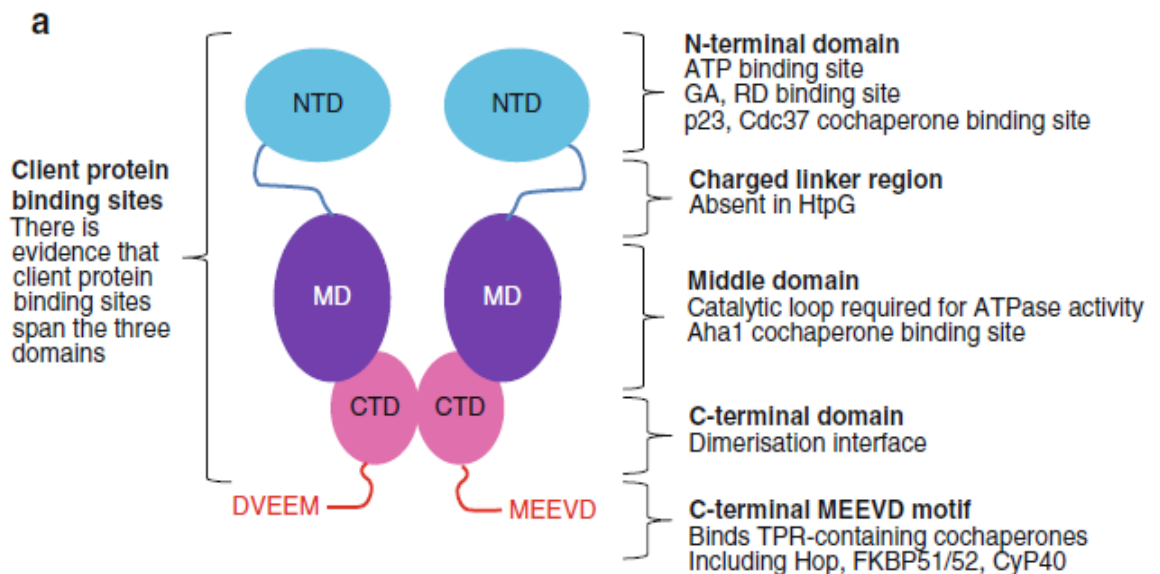


Figure 12. Structure des Hsp90 (Jackson, 2012)

Leur principale fonction comme chaperonnes moléculaires est le maintien de la stabilité et la délivrance d'autres peptides, une fonction cruciale pour la protection de l'intégrité et la croissance des cellules normales et malignes. De plus, les Hsp90 contrôlent les voies de régulation et de signalisation du cycle cellulaire. Ces découvertes ont ainsi fait des Hsp90 une nouvelle cible pour le développement de traitements anticancéreux (Wirth et *al.*, 2002).

II.2.5.2. Expression et ciblage des Hsp 90 dans le cancer pulmonaire induit par le B(a)P.

Dans les cellules cancéreuses, Hsp90 est nécessaire pour le maintien de protéines transformées telles que c-kit (tyrosine-protein kinase Kit) muté, FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3). En effet, des niveaux élevés Hsp90 α et son ARNm ont été rapportés dans de nombreuses cellules cancéreuses, telles que le cancer du poumon (Flandrin et *al.*, 2008).

Un certain nombre de rapports ont suggéré que Hsp90 joue un rôle crucial dans la progression des maladies; par exemple, l'expression Hsp90 est de 2 à 10 fois plus élevée dans

les cellules tumorales que dans les cellules normales (Li et Buchner, 2013). Dans la cellule tumorale, la machinerie associée à Hsp90 est utilisée pour protéger un grand nombre d'oncoprotéines d'une dégradation ciblée, facilitant ainsi l'addiction aux oncogènes et la survie cellulaire (Trepel *et al.*, 2010) ; des travaux récents ont montré que Hsp90 joue un rôle actif dans le maintien de la conformation de l'EGFR et en particulier les mutants de l'EGFR. Il a été montré que plusieurs lignées de cellules pulmonaires NSCLC portant un EGFR de type sauvage sont sensibles à l'inhibition de Hsp90. Ce dernier a récemment été reconnue comme une cible thérapeutique potentielle du cancer et des enquêtes sur les inhibiteurs de HSP90 sont en cours (Gallegos Ruiz *et al.*, 2008). Il a été indiqué précédemment que le B(a)P exerce un effet cytotoxique par la dérégulation de l'équilibre de stress et par la suite endommager l'ADN cellulaire, ce qui à son tour augmente la mortalité cellulaire (Mukherjee *et al.*, 2013). Mukherjee *et al.* ont démontré aussi que les Hsp90 sont surexprimés après un traitement des cellules pulmonaires par le B(a)P contribuant probablement à contrôler le niveau du stress oxydant (Carvalho *et al.*, 2011).

L'Ahr est une protéine clé pour Hsp90, c'est un facteur d'activation de la transcription qui joue un rôle dans l'induction du cancer pulmonaire par le B(a)P; ce dernier active la signalisation du AhR, cela conduit à l'augmentation de la transcription des gènes CYP1A1 et CYP1B1 qui codent pour des protéines qui rendent le B(a)P cancérigène. Récemment, il a été trouvé que la protéine p53 régule l'activité ATP-ase de Hsp90 par son effet sur l'activateur de Hsp90 ATP-ase qui est l'Aha1, par conséquent il est possible que l'expression du AhR pourrait être affecté par l'état du p53 (sauvage ou muté). La p53 silencieuse (mutée) conduit à élever le taux de AhR1 ce qui fait augmenter l'activité ATP-ase des Hsp90, cela améliore l'expression des CYP1A1 et CYP1B1 et inhibe la mort cellulaire par apoptose ; tandis que la surexpression du type sauvage de p53 fait diminuer les taux des CYP1A1 et CYP1B1 (Kochhar *et al.*, 2014).

III. Apoptose et protéines de la famille Bcl-2 dans le cancer pulmonaires induit par le B(a)P

III.1. L'apoptose et sa regulation par les proteines de la famille Bcl-2

Les ROS et les métabolites générés durant le métabolisme du benzo(a)pyrène sont des messagers secondaires impliqués dans la signalisation cellulaire de nombreux processus dont l'apoptose ou mort cellulaire programmée: une forme physiologique de mort cellulaire hautement régulée, elle implique habituellement des cellules individuelles dans un tissu et ne provoque pas l'inflammation (Chen et *al.*, 2003). Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont le bourgeonnement de la membrane plasmique, le rétrécissement cellulaire par condensation du cytoplasme et de la chromatine, l'activation massive des caspases, la fragmentation de l'ADN internucleosomale et la formation de vésicules ou corps apoptotiques qui sont ensuite phagocytés par les cellules adjacentes ou par des macrophages (Yan et *al.*, 2013).

Les principales molécules de l'apoptose sont: Les récepteurs membranaires de mort, les protéines cytoplasmiques (Caspases, Apaf-1, IAP), les protéines mitochondriales (cytochrome C, Protéines régulatrices des IAPs, AIF), les protéines de la famille Bcl-2 et la protéine p53 (Robert, 2010; Holme et *al.*, 2007).

Les membres de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ont une importance cruciale dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire (Robert, 2010). Une famille assez hétérogène d'une vingtaine de protéines qui sont soit mitochondriales, soit capable de s'associer à la mitochondrie lors d'un processus d'activation. Cette famille contient au moins une région d'homologie (BH), et comprend aussi bien des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL) qui contiennent quatre domaines (BH) (Riedl et Shi, 2004), que pro-apoptotiques (Bax, Bak, Boc) qui contiennent trois domaines (figure 13), le troisième groupe comporte au moins huit protéines ne contenant qu'un seul domaine d'homologie, le domaine BH3 (Solary, 2006). Le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule détermine sa sensibilité à un signal de mort (Adams et Cory, 1998). Les molécules anti-apoptotiques siègeraient au niveau de la mitochondrie (Kim et *al.*, 2006) tandis que les protéines pro-apoptotiques posséderaient une localisation différente (cytosol ou microtubules). À la suite d'un signal apoptotique, ces dernières s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation et le relargage des molécules solubles proapoptotiques de l'espace

intermembranaire mitochondrial dans le cytosol, l'étape du non retour de l'apoptose (Solary, 2006).

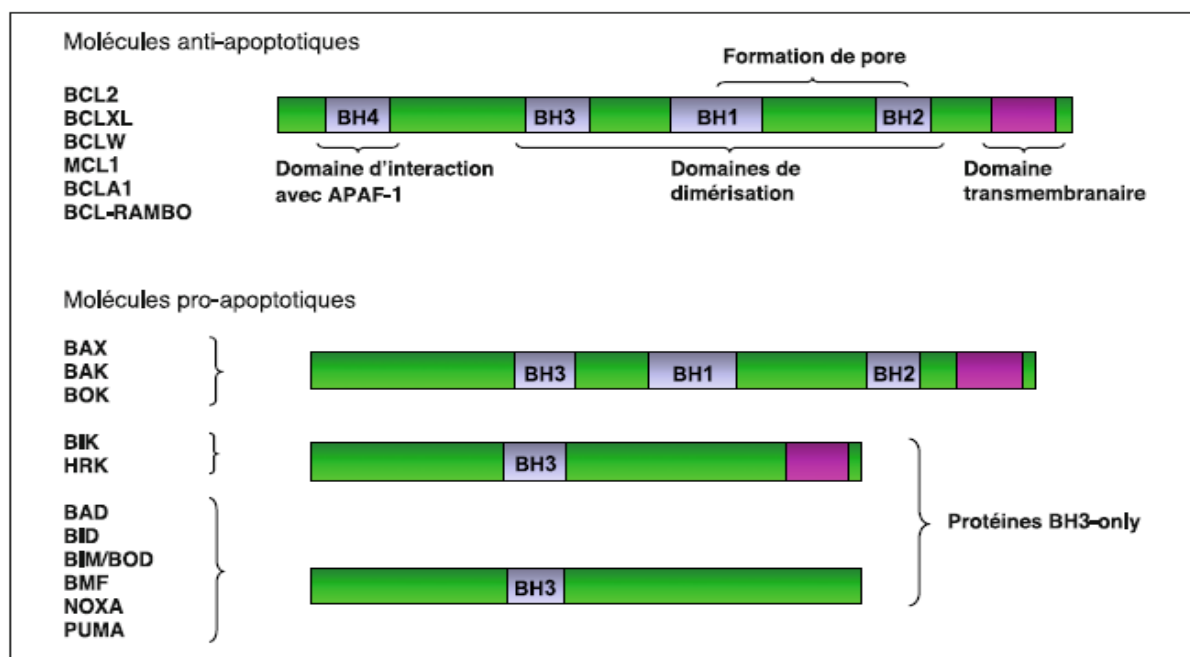


Figure 13. Protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Robert, 2010).

III.2. Mécanismes d'induction de l'apoptose par le B(a)P

En plus de son effet cancérigène bien connu, le B(a)P peut également induire l'apoptose dans différents types de cellules (Solhaug et al., 2005). Il a été montré récemment qu'une faible concentration du benzo(a)pyrène (50 nM), induit une apoptose dans une lignée cellulaire épithéliale hépatique chez le rat, par l'intermédiaire de multiples voies (Gorria et al., 2008):

- ✓ Une voie p53-dépendante déclenchée par endommagement de l'ADN (Dendelé et al., 2014) : L'apoptose initiée par B (a) P-7, 8 - dihydrodiol était liée à l'activation du récepteur Ah et l'induction de CYP1A1 (figure 14), un événement qui peut conduire à la formation d'BPDE-2, cela produit des changements dans la famille anti et pro-apoptotique des protéines Bcl-2 qui sont corrélées avec la libération du cytochrome c mitochondrial et l'activation des caspases (Chen et al., 2003).

Une autre voie parallèle et dépendante de l'activation de l'échangeur Na⁺/H⁺ NHE1 suite à la production de H₂O₂ lors du métabolisme du B(a)P (Gorria et al., 2008), à l'origine d'un changement biphasique du pH intracellulaire et permettant une accélération du

processus apoptotique des cellules exposées à une faible concentration du benzo(a)pyrène (Gorria, 2008).

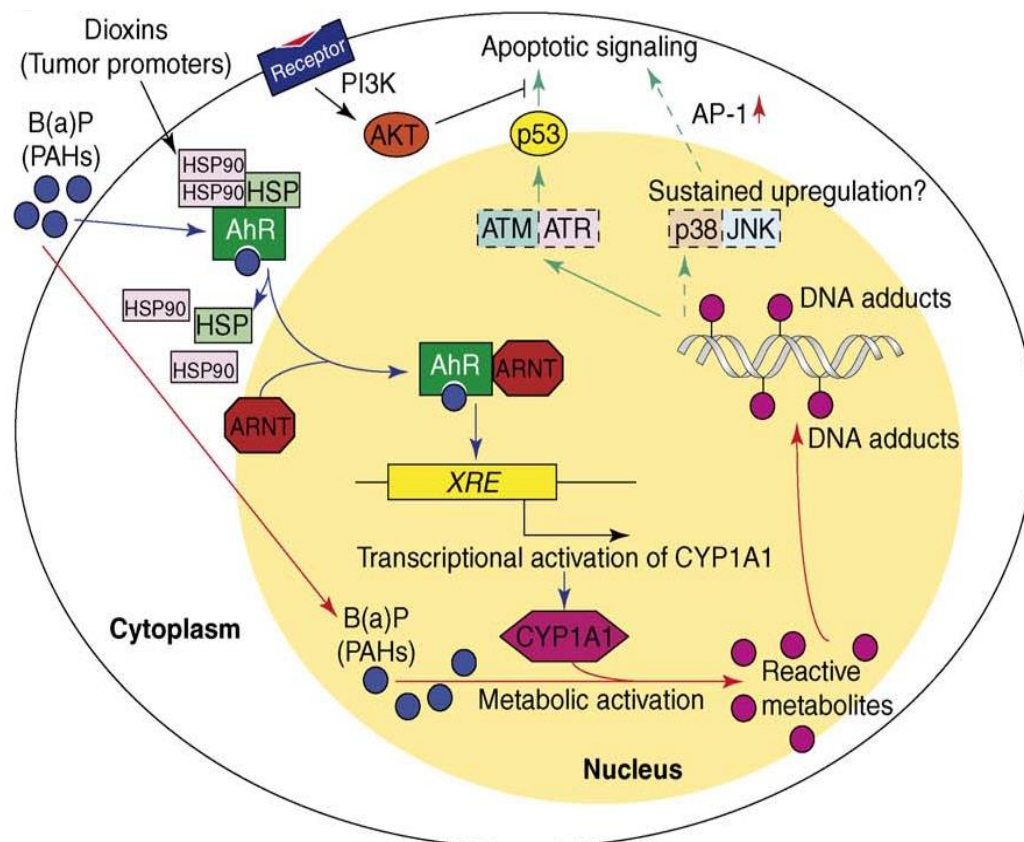


Figure 14. Le réseau entre Ah (aryl hydrocarbon)-récepteur qui conduit à l'activation métabolique, des dommages à l'ADN et de la signalisation apoptotique (Roos et Kaina, 2006).

Récemment, il a été montré que l'exposition au B (a) P pourrait modifier la composition des microdomaines membranaires en cholestérol et des acides gras (Carvalho *et al.*, 2011). Le B(a)P induit une diminution des taux de cholestérol dans les microdomaines membranaires qui ont été liées à une expression réduite de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase. L'AhR et la formation de ROS ont été impliqués dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des lipides (figure 15) (Tekpli *et al.*, 2010).

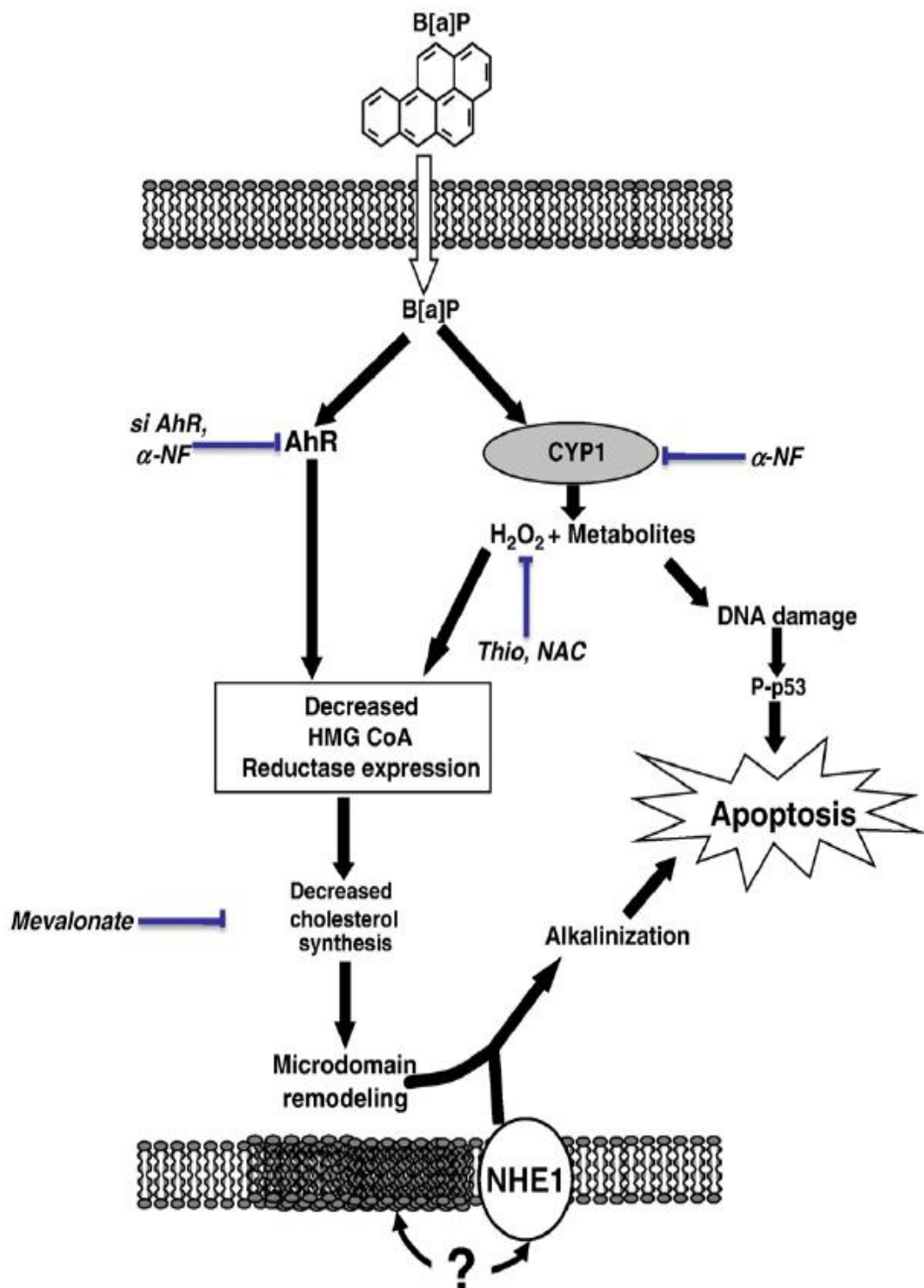


Figure 15. Un modèle de remodelage de la membrane induite par le B (a) P et son implication dans l'apoptose (Tekpli et al., 2010).

III.3. Expression et ciblage des Bcl-2 dans le cancer pulmonaire induit par le B(a)P

Le gène suppresseur de l'apoptose cellulaire: Bcl-2, inhibe l'apoptose par la régulation des protéines y impliqués. L'apoptose cellulaire peut être régulée par l'activation ou l'inactivation de la perméabilité du pore interne de transition de la mitochondrie, qui est impliqué dans la régulation du Ca^{++} dans la matrice ainsi que le pH et le voltage. Plusieurs rapports ont été suggéré qu'il y a des pores de transition PT dans la membrane interne de la mitochondrie, qui conduisent indirectement à la libération du cytochrome c (cyt c) dans le cytosol, les protéines impliquées dans cette libération sont contrôlées via des protéines pro et anti-apoptotiques. Une fois le cyt c, libéré dans dans le cytosol, il active les caspases 9 et 3 qui conduisent vers l'apoptose (Gu et *al.*, 2013). Le Bcl-2 est un composant essentiel dans ce processus parcequ'il réprime l'initiation de l'apoptose par l'inhibition de la perméabilité du pore de transition de la mitochondrie. La sur-expression des Bcl-2 inhibe l'apoptose cellulaire et augmente le risque de la transformation maligne (Gu et *al.*, 2013). L'inhibition des Bcl2 forment donc une cible importante pour le traitement du cancer pulmonaire.

La surexpression de la protéine Bcl-2 anti-apoptotique et mdm2 (le régulateur négatif du p 53) est souvent trouvé dans le cancer pulmonaire chez l'homme. Il a été trouvé que le B(a)P induit l'expression de mdm2, Bax et p21 avec une manière indépendante de p53 des lignées cellulaires du cancer pulmonaire. En effet, dans les fibroblastes, il est trouvé que le B(a)P induit une accumulation nucléaire du p53 avec une expression élevée de mdm2 mais sans aucune induction de p21. La surexpression de Bcl-2 et la mutation en p53 (figure 16), sont des phénomènes communs dans le cancer pulmonaire. La prolifération cellulaire et l'apoptose se produisent dans deux sens opposés durant le cancer pulmonaire induit par le B(a)P, ainsi les gènes p53 et Bcl-2 ont un rôle important dans l'initiation du cancer (Manna et *al.*, 2009).

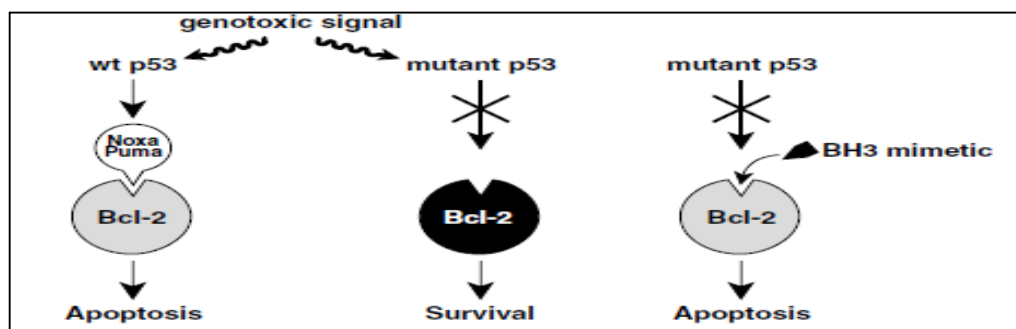


Figure 16. Des mutations inactivent les fonctions de p53 dans les cellules cancéreuses, la protéine de survie Bcl-2 reste toujours fonctionnelle (Cory et *al.*, 2003).

Partie Expérimentale

I-Matériel et méthodes

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de recherche de toxicologie moléculaire, à l'université de Jijel. Elle a pour but d'élucider sur un modèle de cancer expérimental induit par le benzo(a)pyrène, le comportement du stress oxydatif dans le tissu pulmonaire lors d'un cancer. Ce travail nous permettra de comprendre si les Hsp90 et les Bcl-2 seraient des cibles du stress oxydatif induit par le benzo(a)pyrène.

I.1.Matériel

I.1.1. Produits chimiques

Le benzo(a)pyrène flacon de 50 mg, 96 % (HPLC) et les produits chimiques utilisés dans tous les dosages sont de qualité analytique et proviennent de *Sigma-Aldrich* (USA).

I.1.2. Animaux

I.1.2.1. Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur des rats mâles Wistar Albinos provenant de l'institut Pasteur Alger (Algérie). Les animaux pesant environ 120 g sont élevés dans des cages de 06 rats chacun, les cages ont 17 cm de hauteur, 40 cm de longueur et 28 cm de largeur. Ils ont libre accès à l'eau de robinet et à la nourriture. L'animalerie est maintenue à une température ambiante (20-26°C), une hygrométrie de 60% et un cycle jour-nuit 12h-12h. Le renouvellement de la litière se fait 03 fois par semaine. Après une mise en quarantaine de 7 jours, les rats sont utilisés pour effectuer cette étude.

I.2. Méthodes

I.2.1. Induction du Cancer pulmonaire par le B(a)P chez le rat

L'induction chimique de cancer broncho-pulmonaire a été réalisée sur des rats Albinos Wistar par injection intra-péritonéal (IP) d'une dose unique de 100 mg/kg de B(a)P véhiculé dans 0.5ml de l'huile d'olive (Gunning et *al.*, 2013). 12 rats ont été utilisés dans cette étude et ont été réparties en 2 groupes de 6 animaux chacun:

- Le groupe 1 (témoin) a servi de témoin en recevant une administration de dose unique par voie intra-péritonéale de 0.5 ml d'huile d'olive (excipient de dissolution du benzo(a)pyrène).
- Le groupe 2 (B(a)P) regroupant les rats recevant une dose unique de benzo(a)pyrène de 100 mg/kg dissout dans l'huile d'olive et administrée par voie intra-péritonéale.

I.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des poumons

Les animaux ont été sacrifiés après anesthésie (par l'éther) après 16 semaines du traitement, durée suffisante à la croissance de la tumeur. Au moment du sacrifice, chaque poumon a été collecté, lavé à plusieurs reprises avec une solution de NaCl 9‰ et imbibé en papier buvard pour débarrasser les poumons du sang, puis pesé et soumis à un examen macroscopique à la recherche d'éventuels signes d'inflammation ou de cancérisation. Ainsi, chaque poumon divisé en trois fractions :

- La première est pesée puis plongée dans le TSE (250 mM sucrose, 20mM Tris base, 10 mM EGTA, pH 7.4) à 4°C et utilisée pour la préparation de la suspension mitochondriale utilisée pour le dosage des paramètres mitochondriaux (anion superoxyde et gonflement).
- La seconde est pesée puis stocké à - 20°C jusqu'à l'analyse du stress oxydatif cellulaire.
- La troisième est plongée dans le liquide fixateur (formol à 10%) pour l'étude histologique.

I.2.3. Examen anatomopathologique

I.2.3.1. Examen macroscopique des poumons

Au moment du sacrifice, les poumons sont rapidement prélevés et plongés dans une solution de NaCl 9 ‰. Un examen minutieux sous binoculaire a été effectué à la recherche des signes de cancérisation.

I.2.3.1. Examen microscopique

a. Fixation et inclusion

La fixation des organes est réalisée immédiatement après prélèvement des organes à température ambiante dans de l'EAFS (ethanol-acetic acid-formol saline fixative) : Ethanol

absolu, acide acétique, formaldéhyde (40%), NaCl (0.9%) (40:5:10:45 v/v) pH 3.5 (Harrison, 1984). La durée minimale de fixation est de 48 H. les organes sont ensuite déshydratés dans des bains successifs de 20 minutes chacun dans l'éthanol 70°, de l'éthanol 90°, de l'éthanol absolu puis deux bains de xylène. Enfin l'organe est prêt pour son inclusion dans la paraffine.

b. Coupes histologiques et étalement

Chaque bloc de paraffine est débité à l'aide d'un microtome en coupes de 5µm d'épaisseur, les coupes sont étalées et collées sur des lames avec un gel de gélatine 2% puis séchées pendant une nuit dans une étuve réglée à une température de 35-42°C.

c. Déparaffinage et réhydratation

Le déparaffinage des coupes est réalisé avec deux bains successifs de 15 minutes chacun dans du xylène suivis de deux autres bains de même durée d'éthanol absolu. Les coupes sont réhydratées en les plongeant dans des bains successifs d'éthanol 95°, deux bains d'éthanol 70° et un bain d'eau distillée.

d. Coloration et montage des coupes

Les coupes sont colorées par l'hématoxyline de Groat 1% suivie de l'éosine. Brièvement, les lames sont plongées et laissées dans des bains successifs de : 5 minutes dans de l'hémalum 2%, 3 minutes dans l'eau, 5 secondes dans l'éthanol – HCl, 2 minutes dans l'eau.

Les lames sont ensuite plongées dans un bain d'éosine pendant 2 minutes suivies d'un bain d'eau distillée de 20 secondes. Les lames sont alors plongées dans une solution de bicarbonate de soude 1% pendant 20 secondes pour bleuir l'hémalum avant une déshydratation dans deux bains d'alcool absolu et deux autres de xylène.

I.2.4. Evaluation du stress oxydatif mitochondrial

I.2.4.1. Isolement des mitochondries pulmonaires

Pour l'extraction des mitochondries, 1 gramme de poumon est coupé finement dans du tampon TSE à 4°C. Le poumon coupé est ensuite lavé deux fois dans le même tampon et homogénéisé dans un potter de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 steered

firm. New Jersey USA) avec 3 ml de TSE, ce qui permet la destruction des cellules et la libération des mitochondries.

L'homogénat récupéré est centrifugé une première fois à 800g pendant 10 mn (centrifugeuse Sigma 6K15) permettant ainsi l'élimination des gros débris cellulaires. Le surnageant issu de cette centrifugation est centrifugé une deuxième fois à 8000g pendant 10 mn à 4°C, le culot obtenu est resuspendu dans 2 ml du TSE et centrifugé à 8000g pendant 10 mn. Le culot obtenu de cette dernière centrifugation est suspendu dans 400µl du tampon TS (250 mM sucrose, 20mM Tris base, pH 7.4) à 20°C pour obtenir la suspension mitochondriale utilisée pour la mesure de l'anion superoxyde et du gonflement mitochondrial et ce après le dosage des protéines par la méthode de Bradford (Sanders *et al.*, 2000).

I.2.4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

1. Principe

Cette méthode détermine la concentration protéique, elle est basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu brillant de coomassie (BBC) qui se lie avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant la concentration en protéines dans l'échantillon

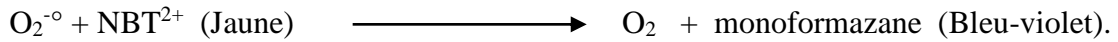
2. Déroulement du dosage

Pour le dosage des protéines, 100µl de la suspension ou de fraction cytosolique diluée au 1/5^{ème} avec de l'eau distillée (100µl BSA pour la gamme étalon) sont ajoutés à 4 ml du réactif bleu brillant de coomassie (BBC). Après agitation au vortex et incubation à température ambiante pendant 5 mn, la lecture de l'absorbance est effectuée à 595 nm (Bradford,1976). La concentration des protéines est déduite à l'aide de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions par la BSA (Bovin Serum Albumin) (Voir Annexe).

I.2.4.3. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde

L'anion superoxyde est le principal radical libre généré par la mitochondrie notamment par les complexe I et III de la chaîne respiratoire (Bartic et Larsson, 2013). La génération de superoxyde a été évaluée selon la méthode décrite selon (Zini *et al.*, 1999), en mesurant la

réduction du nitrobluetetrazolium (NBT^{+2}) par l'anion superoxyde en monoformazane, qui absorbe à 560 nm, selon la réaction suivante :



Dans un volume final de 1,2 ml de tampon respirant contenant la roténone, nous avons introduit 16.5 μl de la suspension mitochondriale à 1 mg/ml, 1.2 μl de la cyclosporine à 1 μM , 12 μl du NBT^{+2} à 100 mM. Après incubation pendant 1 min nous avons ajouté 7,2 μl de succinate à 6mM. La variation de l'absorbance est suivie à 560 nm pendant 4 minutes. Le pourcentage de production de l'anion superoxyde est calculé en prenant le 100% du control.

I.2.4.4. Mesure du gonflement mitochondrial « mitochondrial swelling »

Les changements du statut de la perméabilité mitochondriale ont été évalués spectrophotométriquement comme décrit par Kristal et al. (1996). Le changement d'absorbance était mesurée à 540 nm et la diminution de l'absorbance indique l'augmentation du gonflement mitochondrial ce qui est le résultat de la perte du potentiel membranaire mitochondrial et de l'ouverture de PTP mitochondrial.

Dans un volume final de 1.8 ml du tampon respirant, nous avons introduit 0.2 mg de protéine /ml de suspension mitochondriale et 10.8 μl du succinate à 6 Mm. Après une minute d'incubation nous avons ajouté 2,25 μl du Ca Cl_2 à 100 mM pour induire le gonflement. La décroissance de l'absorbance est suivie à 540 nm chaque minute pendant 5 min.

I.2.5. Détermination de l'expression des Hsp90 et Bcl-2 dans le tissu pulmonaire

I.2.5.1. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totale est réalisée selon la méthode de Biaoxue et *al.*, (2012) avec quelques modifications. Pour cela, 0.1 g de tissu pulmonaire est broyée dans 0.5 ml de PBS froid. Après centrifugation à 500g pendant 5min à température ambiante, on jette le surnageant et on reprend le culot dans le tampon RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% de dodécylsulfate de sodium (SDS), 1% NP-40, le désoxycholate de sodium à 0,5%, 1 mM de phénylméthyl sulfonyle fluorure, 100 mM de leupeptine et 2 mg /ml d'aprotinine, pH 8,0). Après sonication (03 pulsations de deux secondes), les tubes eppendorfs sont mis dans

un petit pot contenant de la glace pour éviter l'augmentation de la température. Après centrifugation à 13000g/15mn à température ambiante, le surnageant est récupéré puis conservé à -20°C et utilisé comme source de protéines pour le western blot (Biaoxue et *al.*, 2012). Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (1976).

I.2.5.2. Identification des Bcl-2 et Hsp90

50µg des protéiques (30µl de la fraction) de chaque échantillon sont déposées sur des membranes de nitrocellulose imbibées de tampon Tris-Glycine-SDS, le gel SDS-polyacrilamide à 8% sert pour assurer une charge égale de protéines, la migration est effectuée par un transfert à 100V pendant 1 heure. Les membranes étaient colorées avec 0,2% de rouge ponceau, puis décolorées avec H₂O. Après le blocage avec 5% de lait écrémé à température ambiante (22°C), un lavage se fait au TBST (50Mm Tris /150Mm NaCl / 0.05% tween20), 2 fois pendant 5 mn, on coupe les membranes en 02 segments :

Les bandes de 10 à 55 KDa pour détecter les Bcl-2 et l'Actine (26 KDa et 42 KDa respectivement), les bandes de 55 à 100 KDa pour détecter les Hsp90 (90KDa) puis on applique l'anticorps primaire (Ac de souris pour les bcl-2 et Ac de lapin pour les Hsp90). Après incubation avec l'anticorps primaire sous agitation pendant toute la nuit à 4°C et lavage au TBST 3 fois pendant 5 mn température ambiante, on applique les anticorps secondaires pour les Bcl-2: anticorps anti souris, pour les Hsp90: anticorps anti-lapin. Les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires sous agitation à température ambiante pendant 1heure. Après 3 lavages de 5min au TBST sous agitation, la détection est réalisée par chimiluminescence (Kit ECL BioRAD) après 1 min d'incubation. Les membranes sont ensuite lavées au TBST et conservées humides à 4°C (Xia et *al.*, 2006).

I.2.6. Evaluation des paramètres cytosoliques du stress oxydatif

I.2.6.1. Préparation de la fraction cytosolique

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par (Iqbal et *al.*, 2003). Pour cela 0,5 g de poumon sont coupés et homogénéisés avec 3 volumes de tampon phosphate (0,1 M; pH 7,4) contenant du KCl à 1,17% à l'aide d'un broyeur de Dounce.

L'homogénat est d'abord centrifugé à 2000 tours/min pendant 15 minutes à 4°C pour séparer les débris nucléaires ensuite à 9600 tours/min, pendant 30 minutes. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source pour le dosage des paramètres cytosoliques.

1.2.6.2. Dosage du glutathion cellulaire (GSH)

La méthode que nous avons employé (Akerboom et Sies, 1981) est basée sur l'évaluation du contenu en groupement -SH par spectrophotométrie. Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfures S-S (Figure 17).

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

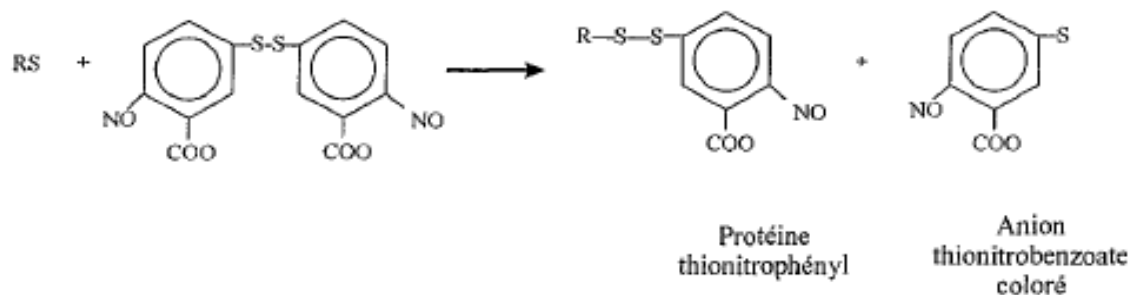


Figure 17. Schéma de la réaction entre le DTNB et les groupements -SH (Akerboom et Sies, 1981).

50 μ l de la fraction cytosolique sont additionnés à 10 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH=8. Après agitation, on a prélevé 3 ml de ce mélange auquel on a ajouté 20 μ l de la solution de DTNB 0.01M. Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante l'absorbance est lue à 412 nm.

Le taux de GSH est déduit à partir d'une courbe d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions (voir annexe), et dans laquelle l'absorbance est une fonction linéaire de la concentration en GSH (μ mol/ml). Les résultats seront exprimés en μ mol/mg de tissu.

I.2.6.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

La réaction de dosage du malondialdéhyde repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques.

Le résultat du dosage du malondialdéhyde par l'acide thiobarbiturique est donc la somme du malondialdéhyde préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du malondialdéhyde, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du malondialdéhyde s'est substituée la notion de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (thiobarbituric acid reactive substances ou TBARS). L'extraction du dérivé MDA-(TBA)₂ est réalisée par le n-butanol à pH acide, cette opération permet d'éliminer en partie les interférents dans la réaction des TBARS.

On a procédé selon la méthode décrite par Okhawa et *al.*, (1979). En résumé, 0.5 ml de la fraction cytosolique est additionné à 0.5 ml de TCA 20% et 0.5 ml de TBA 0.67%. Ce mélange est ensuite incubé pendant 15 min au bain-marie à 100°C, puis refroidit. Lorsque le mélange est froid, il est additionné de 4 ml de n-butanol puis centrifugé à 3000 g pendant 15 min. Le surnageant est ensuite récupéré et son absorbance est mesurée à 530 nm.

Le taux de MDA est déduit à partir d'une droite d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions que les échantillons avec le 1,1,3,3-tetraméthoxypropane « TEP ». La concentration en MDA est exprimée en nmol/mg/ml (voir annexe).

I.2.6.4. Mesure de l'activité enzymatique de la Glutathion S-Transférase (GST) cytosolique

L'activité de la GST a été évaluée selon la méthode de Habig et *al.* (1974) qui consiste à fournir à l'enzyme un substrat, en général du chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et de glutathion, un mélange de 850 µl de tampon phosphate à 0,1 M de pH 6,5 et de 50 µl de CDNB à 20mM à été préparé et à été incubé à 37°C pendant 10 min. La réaction est déclenchée par l'addition à ce mélange de 50 µl d'une solution de GSH à 20 mM et 50 µl de fraction cytosolique. Un contrôle est préparé

dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm toutes les minutes pendant 5 min. Les résultats sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Enzyme (UI/ml)} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min test} - \Delta A_{340}/\text{min blanc}) / V_t \times F_d}{9.6 \times V_e}$$

V_t : volume total (ml) de l'essai.

F_d : facteur de dilution.

9.6 : coefficient d'extinction molaire (mM de glutathion- Chlorodinitrobenzène conjugué à 340nm).

V_e : volume (ml) de l'enzyme utilisée.

Les résultats sont exprimés en UI/g de protéines.

I.2.6.5. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité enzymatique de la catalase est déterminée par la méthode de Clairbone (1985). Le principe de cette méthode est basé sur la disparition du H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25°C. 1 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH 7.2 a été additionné de 0.95 ml de peroxyde d'hydrogène 0.019 M et 25 μ l fraction cytosolique. Puis l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 240 nm pendant 2 minutes.

La cinétique de la catalase n'obéissant pas au model Michaelien, on a pas utilisé la loi de Beer-Lambert. La constante de vitesse de la catalase est définie par la relation:

$$K = 2.3 / \Delta t \times \log_{10} (DO_0 / DO_t)$$

DO_0 : absorbance à 0 min

DO_t : absorbance au moment "t"

Δt : interval de temps

K: UI

L'activité enzymatique est exprimée en unités UI/g de protéines.

I.2.7. Analyse statistique

Les résultats graphiques sont présentés sous forme de moyenne \pm d'écart-type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes de groupe témoin et traité, en utilisant le test T de Student avec:

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

II. Résultats et discussion

Le cancer du poumon est la principale cause de décès dans de nombreux pays. En raison de sa fonction dans la respiration, le tissu pulmonaire est exposé à des polluants atmosphériques tels que le B(a)P, un composé type de la famille des HAP ; du fait de sa liposolubilité, les plus petites particules sont directement déposées dans le parenchyme pulmonaire profond où une métabolisation a lieu (Tompa et Langenbach, 1979). Il est démontré que le métabolisme du B(a)P peut provoquer des cytotoxicités, des effets génotoxiques, mutagènes et cancérigènes dans le tissu pulmonaire (Mosserova et *al.*, 2009).

Cette étude a pour but d'évaluer les conséquences pulmonaires d'une exposition au B(a)P par voie intrapéritonéale sur le fonctionnement mitochondrial, la balance entre la production et l'élimination des ROS à partir de la mesure des capacités antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques; ainsi de comprendre si les protéines de choc thermique Hsp90 et les protéines antiapoptotiques (Bcl-2) sont des cibles biochimiques pour le B(a)P lors d'un cancer pulmonaire.

Les résultats obtenus montrent une cancérisation du poumon après exposition au benzo(a)pyrene.

II.1. Aspect macroscopique du poumon

L'aspect macroscopique des poumons des rats témoins présente une couleur rose avec une structure intacte (Figure 18 (A)). Alors que les poumons des rats traités par le B(a)P, montrent la présence de nodules de couleur plus claire (Figure 18 (B)), deux cas de tumeur généralisée caractérisée par la fusion des lobules pulmonaires ont été observés.

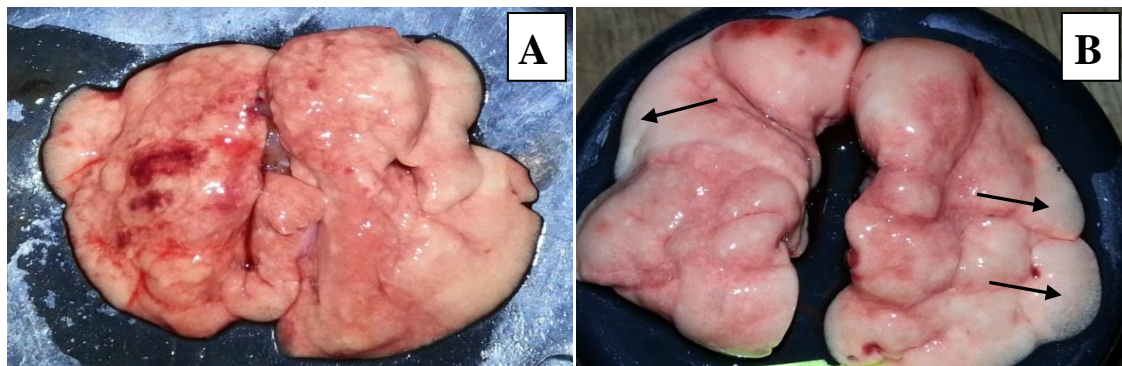


Figure 18. Aspect macroscopique des poumons des rats témoins et traités par le B(a)P à la dose de (100mg/kg/IP). Les flèches indiquent les nodules. (A) : poumon de rat témoin, (B) : poumon de rat traité par le B(a)P.

II.2. Aspect microscopique

Des preuves expérimentales ont montré que pendant la carcinogenèse pulmonaire induite par le B(a)P, différentes altérations cellulaires et histopathologiques peuvent être identifiées comme l'hyperplasie, la dysplasie, le carcinome in situ et le carcinome invasif (Rajat et *al.*, 2007). L'examen microscopique des coupes histologiques réalisées sur des poumons des lots témoins ne montre aucune anomalie, on observe des espaces alvéolaires de dimensions régulières (Figure 19 (A)); alors que ceux du lot traité sont caractérisés par un rétrécissement causé par l'envahissement de l'espace alvéolaire par les cellules cancéreuses (Figure 19 (B)), ceci est associé à un épaissement du septum interalvéolaire. Des zones hyperprolifératives de haute densité cellulaire sont également observables chez les rats traités par le benzo(a)pyrène.

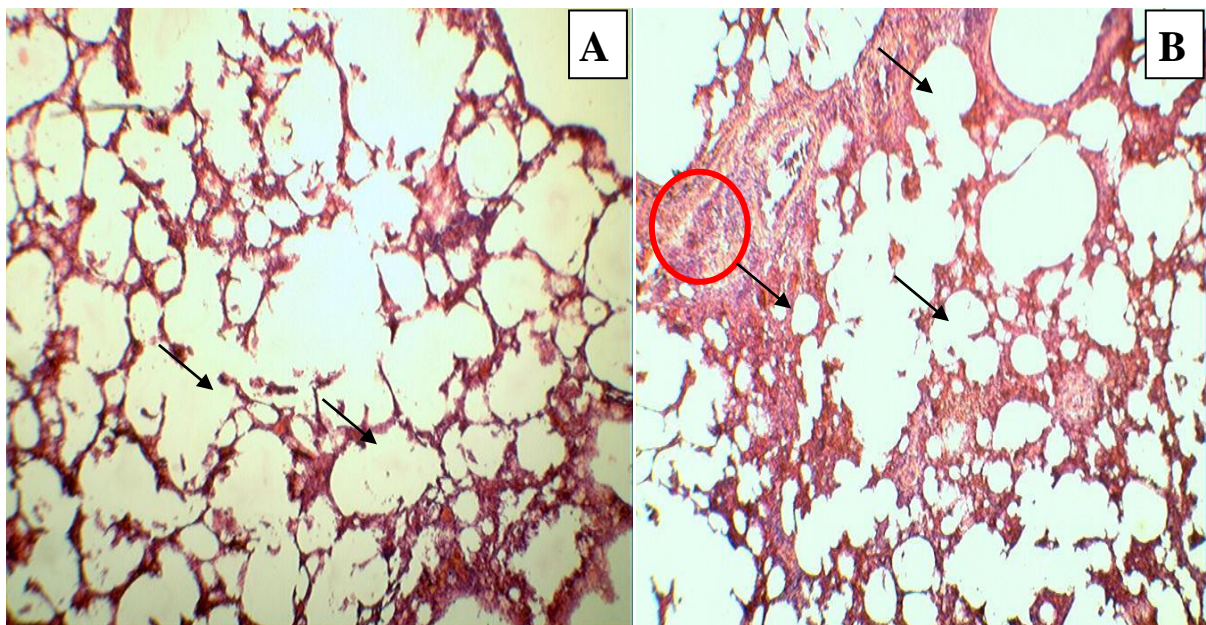


Figure 19. Examen histologique du lot témoin (A) et du lot traité par le B(a)p à la dose de (100mg/kg/IP) (B) observés en microscope optique ($\times 40$). Les flèches montrent les espaces alvéolaires. Le cercle rouge indique la zone d'hyperprolifération.

Le grandissement ($\times 100$) et ($\times 400$) (Figure 20) montrent des infiltrations des neutrophiles et lymphocytes suite à une inflammation locale dans la muqueuse bronchique

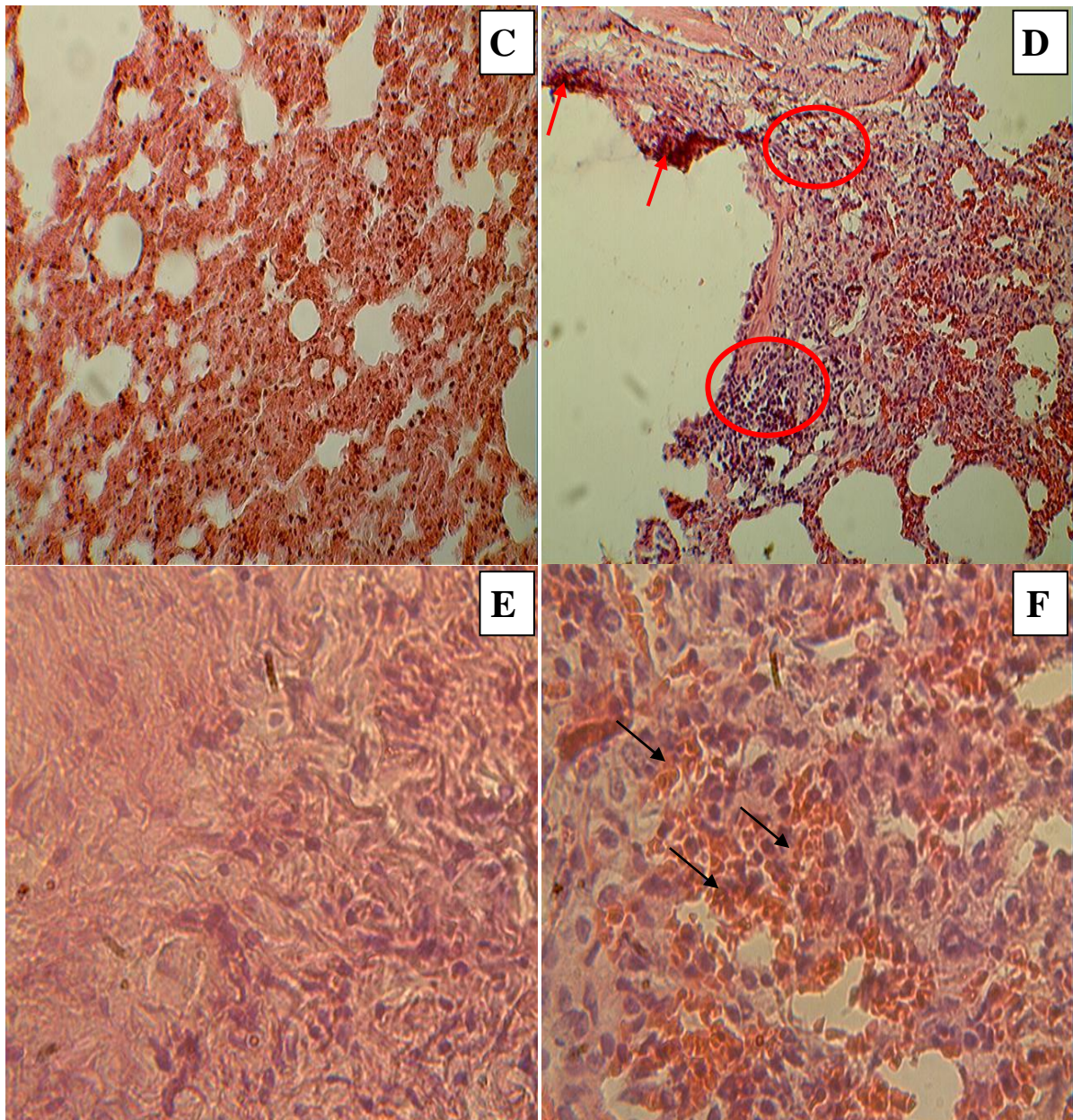


Figure 20. Examen histologique du lot témoin (C), du lot traité par le B(a)p à la dose de (100mg/kg/IP) (D) observés en microscope optique ($\times 100$), Les flèches rouges indiquent l'épaisseur de la paroi alvéolaire après l'inflammation, ainsi du lot témoin (E) et du lot traité (F) observés à ($\times 400$). Les cercles rouges et les flèches montrent des infiltrations des neutrophiles et des lymphocytes.

II.3. Le stress oxydant mitochondrial dans le tissu pulmonaire

Pendant longtemps, les mitochondries sont connues en tant qu'organites responsables de la production d'ATP par phosphorylation oxydative des sites primaires de β -oxydation des acides gras, métabolisme des acides aminés et des lipides et même un organite ayant un rôle

pivot dans l'initiation de l'apoptose. L'accumulation de preuves cellulaires a commencé de décrire les mitochondries comme l'un des régulateurs centraux de nombreux processus. L'élucidation continue du rôle de la régulation de la mitochondrie d'une gamme de conditions pathologiques, y compris le cancer car elle est considérée comme la première source productrice de ROS (Desler et Rasmussen, 2014). C'est pourquoi l'étude des paramètres mitochondriaux, nous donne une idée générale sur l'état des cellules vis-à-vis des dégâts oxydatifs provoqués par les polluants tels le B(a)P, ainsi pour connaître également si la mitochondrie est une cible ou non du B(a)P.

II.3.1. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde

La mesure de la production de l'anion superoxyde par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale constitue le paramètre le plus important dans l'étude du stress oxydant, car le superoxyde est le principal précurseur des autres espèces réactives de l'oxygène responsables de l'induction du stress oxydant.

Les résultats obtenus de l'effet du B(a)P sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde sont représentés dans la figure 21, et montrent que les rats du lot traité par le

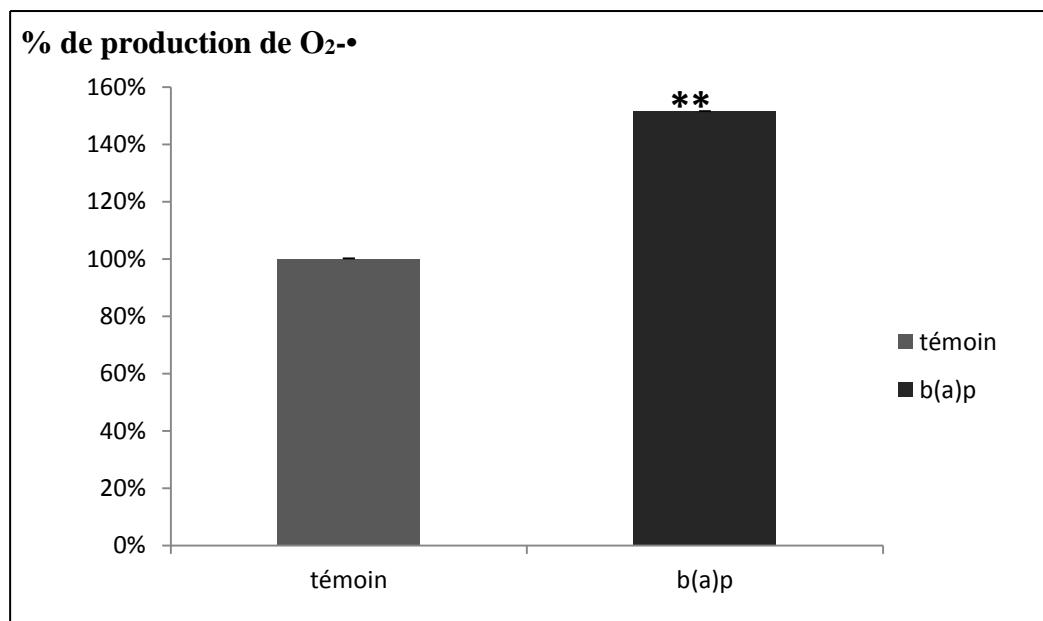


Figure 21. Pourcentage de la production mitochondriale de l'anion superoxyde dans les poumons des rats du groupe traité. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type, test de Student. Comparaison du lot traité par le B(a)P : 100 mg/kg par voie IP, par rapport au lot témoin. $P < 0.01$: très significatif (**).

B(a)P expriment une augmentation significative du pourcentage de la production de l'anion superoxyde atteint 151.51% par rapport au lot témoin.

Plusieurs xénobiotiques interagissent avec la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, ce qui augmente le taux de production d'O₂^{•-} à travers deux mécanismes différents. Certains d'entre ces composés stimulent le stress oxydatif, car ils bloquent le transport d'électrons, ce qui augmente le niveau de réduction des transporteurs situés en amont du site d'inhibition. D'autres xénobiotiques peuvent accepter un électron de la chaîne respiratoire et de le transférer à l'oxygène moléculaire (cycle redox), en stimulant la formation de l'anion superoxyde sans inhiber la chaîne respiratoire (Turrens, 2003).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Holme et *al.* (2007), qu'ils suggèrent que le B(a)P provoque une augmentation de la production de l'anion superoxyde *via* l'activation du p53, qui ne peut pas être le cas ici tant qu'on est dans un état de cancer pulmonaire qui se caractérise par la mutation ou l'inhibition de cette protéine (Brahmi et *al.*, 2011).

Magesh et *al.* (2008) ont trouvé également une augmentation de la production mitochondriale de ROS (H₂O₂ et O₂^{•-}) dans le poumon suite à une administration du B(a)P, d'ailleurs, d'un côté une production classique de ROS par le métabolisme du B(a)P par la voie des o-quinone, de l'autre côté la production mitochondriale durant la respiration s'associent pour développer un taux élevé de ROS. La LPO peut affecter l'activité de certains enzymes et des complexes mitochondriaux ce qui augmente la production de l'anion superoxyde qu'elle est assurée essentiellement par le complexe I et III de la chaîne respiratoire (Magesh et *al.*, 2008).

Georgellis et *al.* (1988) ont trouvés des résultats différents, ils trouvent que le B(a)P inhibe la génération de l'anion superoxyde dans les testicules. Une inhibition des ATPase dans le tissu pulmonaire durant un cancer a été décelé, ainsi la peroxydation des lipides de la membrane mitochondriale provoque la perte de son intégrité et de ses fonctions enzymatiques, telque Na⁺/K⁺ ATPase, Mg⁺²ATPase et Ca⁺² ATPase qui sont responsables du transport de Na⁺, K⁺, Mg⁺² et Ca⁺² (Georgellis et *al.*, 1988).

La chaîne respiratoire mitochondriale constitue donc la principale source endogène de ROS dans la plupart des tissus. Un bas niveau physiologique de ces oxydant est maintenue par une variété de défenses antioxydantes. L'équilibre délicat entre les défenses antioxydantes et la production de ROS peut être perturbé soit par un déficit de la défense enzymatique,

l'inhibition du flux des électrons ou l'exposition à des xénobiotiques tel le B(a)P. Ce déséquilibre apparaît comme un déclencheur de divers processus pathologiques, tel que la mort cellulaire ou le cancer (Turrens, 2003).

II.3.2. Influence du B(a)P sur le gonflement mitochondrial

Le gonflement mitochondrial est le résultat de l'ouverture d'un pore ou d'un canal au niveau de la membrane mitochondriale dont le diamètre à l'ouverture complète est de 3 nm « pore géant de la mitochondrie ». Cette ouverture conduit à une augmentation rapide de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne vis-à-vis des molécules de poids moléculaire inférieur à 1500 daltons, l'eau et les électrolytes sont responsables du gonflement.

Ce phénomène se traduit par une diminution progressive de l'absorbance de la suspension mitochondriale à 540 nm (figure 22).

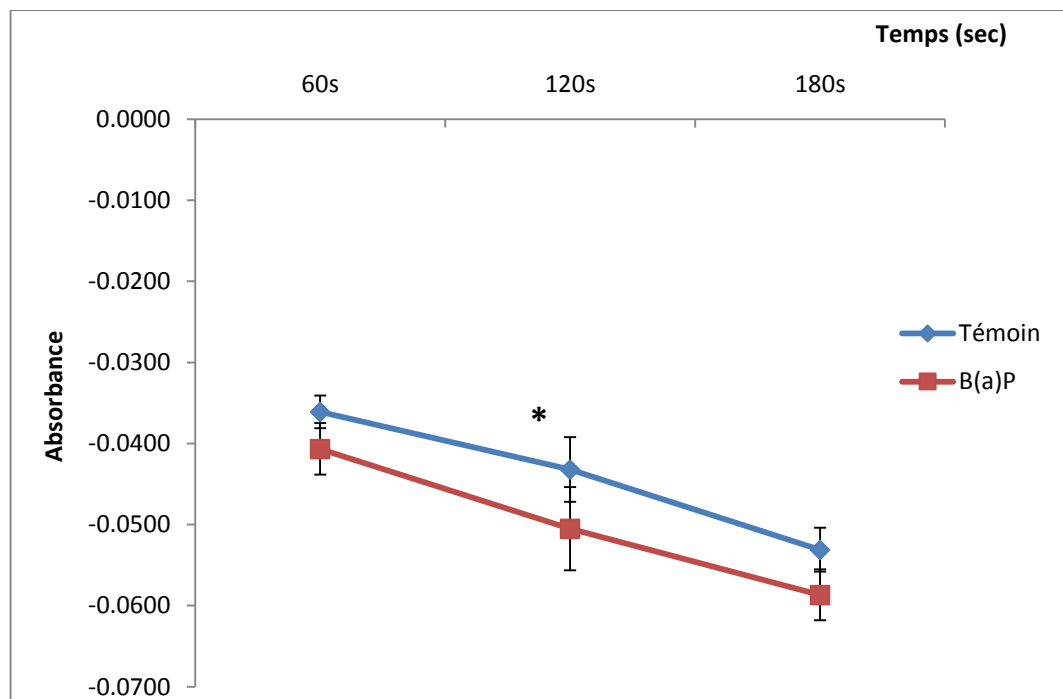


Figure 22. Gonflement des mitochondries pulmonaires chaque minute pendant 03 minutes des rats du groupe traité. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type, test de Student. Comparaison du lot traité par le B(a)P : 100mg/kg par voie IP, par rapport au lot témoin. $p < 0.05$: significatif (*).

L'incubation des mitochondries pulmonaires des rats dans le tampon respirant en présence de succinate comme substrat du complexe III suivie par l'addition de CaCl_2 aboutit à une diminution accrue de la DO à 540 nm. Cette diminution de la densité optique traduit l'augmentation du volume de la matrice mitochondriale suite à l'ouverture du pore de transition de perméabilité membranaire par le calcium. Le même résultat est obtenu en présence du B(a)P.

Les résultats de l'effet du B(a)P sur le gonflement mitochondrial ou sur l'induction ou l'inhibition de l'ouverture du pore géant (PTP) *in vivo* sont représentés dans la figure 22.

On suggère un effet de gonflement mitochondrial chez les rats traités par le B(a)P supérieur à celui des rats témoins. Cette différence se traduit par un changement de l'ouverture du PTP sous l'effet de B(a)P. Des recherches similaires ont trouvés différents résultats concernant l'effet du B(a)P sur le gonflement et puis l'apoptose par voie intrinsèque (Holme et *al.*, 2007; Anandakumar et *al.*, 2013). Nos résultats révèlent qu'il y a un gonflement mitochondrial significatif, ces résultats sont en accord avec ceux de Holme et *al.*, (2007), ils suggèrent que le B(a)P provoque l'apoptose durant son métabolisme qui produit des ROS, causant une activation de l'échangeur $1 \text{ Na}^+/\text{H}^+$ (NHE1), cela résulte en une augmentation du pH intracellulaire (alcalinisation), combinée avec l'activation du p53 induisant ainsi l'apoptose par l'activation de la transcription des protéines pro-apoptotiques NOXA et PUMA favorisant l'activation de la caspase-3 qui se termine par l'apoptose (Holme et *al.*, 2007; Robert, 2010; Anandakumar et *al.*, 2013).

Ko et *al.*(2004) ont ainsi démontré l'induction de l'apoptose par le B(a)P dans l'hépatocyte, par le biais de l'activation de la cascade des caspases, le dysfonctionnement mitochondrial et l'activation du p53. Des études qui précèdent montrent l'activation de la caspase-3 par le B(a)P un effecteur principal de l'apoptose (Ko et *al.*, 2004).

II.4. Evaluation de l'effet du B(a)P sur les paramètres cytosoliques du stress oxydatif dans le tissu pulmonaire

Le B(a)P nécessite une activation métabolique pour produire ses effets cancérigènes. Parmi ces métabolites les B(a)P-quinones sont connues pour être associées à l'induction des dommages oxydatifs des différents tissus. Le B(a)P peut induire différentes tumeurs dans les tissus tels que le tissu mammaire, cutané et œsophagien en fonction des voies d'administration (Kim et *al.*, 2000), il provoque aussi le cancer pulmonaire via l'induction d'un

état de stress oxydatif (Anand et al., 2013). Pour ces raisons, les produits de la peroxydation lipidique et l'activité des enzymes anti-oxydantes ont été étudiés dans le cytosol de la cellule pulmonaire des rats au cours de la transformation métabolique du B(a)P.

II.4.1. L'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la catalase est spécifiquement inféodée à la transformation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Elle est principalement située dans le peroxysome. Elle prévient donc des dommages oxydatifs au sein du peroxysome, et empêche sa propagation dans le reste de la cellule. L'activité de la catalase comme antioxydant est étroitement liée à la modulation de la cancérogénèse (Kim et Lee, 1997).

Dans la présente étude sur la base du fait que le B(a)P génère des ROS dans son processus métabolique, nous avons l'intention d'évaluer l'effet du B(a)P sur l'activité enzymatique de la catalase.

La figure 23 montre la variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique entre le lot témoin et le lot traité par le B(a)P à (100 mg/Kg /IP).

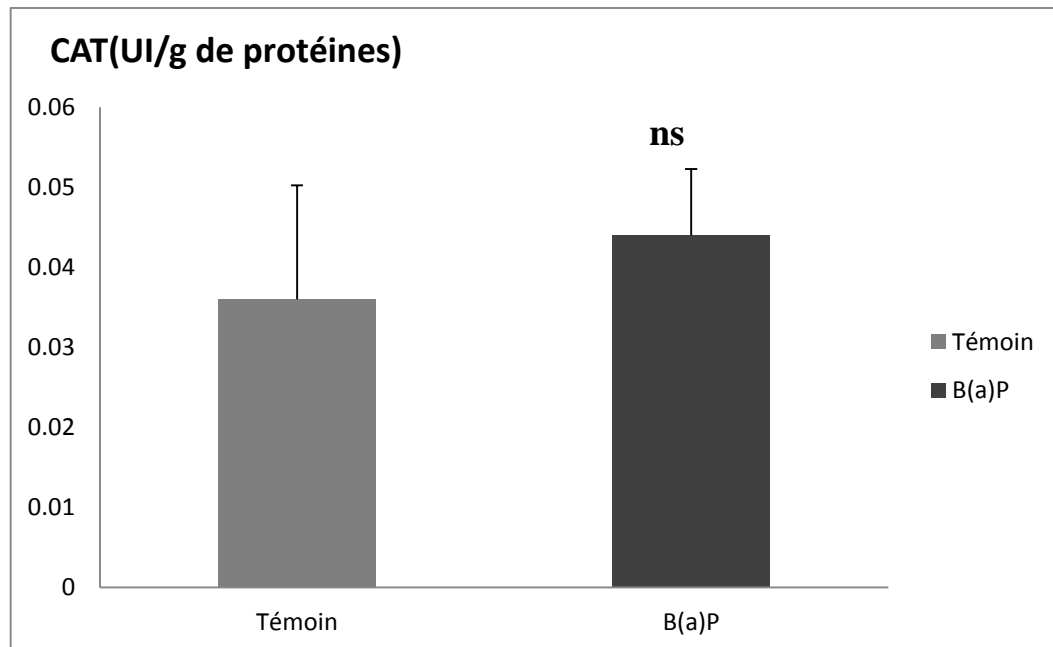


Figure 23. L'activité de la catalase cytosolique dans les poumons des rats du groupe traité. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type, test de Student. Comparaison du lot traité par le B(a)P : 100mg/kg par voie IP, par rapport au lot témoin. $P > 0.05$: non significatif (ns).

Une augmentation non significative ($p > 0.05$) de l'activité enzymatique est observée chez le lot traité par le B(a)P, l'activité de la catalase atteint 0.044 ± 0.008 UI/g de protéines alors que chez le lot témoin elle est de 0.036 ± 0.014 UI/g de protéines. Ces résultats sont en accord avec Kim et Lee (1997) qu'ils n'ont trouvé aucune augmentation significative de la catalase dans le tissu pulmonaire, suite à une exposition au B(a)P tandis qu'ils trouvent une diminution de cette enzyme dans les autres organes (foie et rein), cela est expliqué par un épuisement de cette enzyme suite à une exposition répétée au B(a)P qui génère des ROS durant son métabolisme notamment les dérivés quinones, cet épuisement peut être expliqué aussi par la modification oxydative de la catalase étant une protéine dans un milieu riche en ROS, cela lui permettra de former des groupement carbonyle qui seront des excellents substrats pour le système protéolytique cellulaire (Kim et Lee, 1997). L'activité de la catalase peut être diminuer dans les cancers comme résultat de la consommation de cette enzyme qui catalyse la production excessive du peroxyde d'hydrogène par les cellules cancéreuses (Kamaraj et al., 2009). De nombreuses études ont montré que la production excessive de ROS induite par le B(a)P rompre l'équilibre entre la production des ROS et les défenses anti-oxydantes (Ma et al., 2011; Kim et Lee, 1997). Il est prouvé que l'activité enzymatique de la catalase est diminuée dans les cancers pulmonaires induits par le B(a)P chez différents animaux d'expériences (Paul et al., 2011). Les cellules néoplasiques peuvent piéger les antioxydants essentiels pour fournir les exigences de la croissance tumorale, cette déficience de l'activité de la CAT peut être expliqué aussi par l'aggravation de l'inflammation pulmonaire (Al-Jasabi et al., 2013).

Il est largement admis que l'induction d'enzymes anti-oxydantes est une stratégie majeure pour la protection des cellules contre une grande variété de composés toxiques endogènes et exogènes telles que les espèces réactives de l'oxygène et des produits chimiques cancérigènes (Paul et al., 2011). La surexpression de la CAT provoque une augmentation significative des AhR et de ses ARNm (Wang et al., 2009), la génération endogène de H_2O_2 et $O_2^{\cdot -}$ inhibe la liaison de la protéine sp1 avec le promoteur de l'AhR d'où une diminution de l'expression de l'AhR (Tang et al., 2010) ce dernier induit la transcription des enzymes impliquées dans le métabolisme du B(a)P. La surexpression de la CAT peut induire aussi l'expression des autres enzymes de la phase II du métabolisme, ce qui fait réduire le taux des dihydrodiols qui sont des substrats pour les UGT (UDP-glucuronosyltransferase) et SULT (Sulfotransférase). Alors la CAT peut réduire aussi l'expression des autres enzymes de la

phase II du métabolisme, ce qui fait réduire le taux des dihydrodiols qui sont des substrats pour les UGT et SULT. Alors la CAT peut réduire l'induction du stress oxydatif par le B(a)P via deux mécanismes :

- ✓ La catalase piège le H_2O_2 induit par le B(a)P, et réduit par la suite son médiation dans la peroxydation lipidique.
- ✓ La surexpression de la CAT inhibe la génération des métabolites réactifs et par conséquent réduit l'induction des ROS et la peroxydation lipidique par le B(a)P (Wang *et al.*, 2009).

Une augmentation de la SOD, un paramètre qui n'est pas été étudié ici, entraîne une augmentation de la production de H_2O_2 , cela cause également une diminution de la catalase.

II.4.2. L'activité enzymatique de la GST

Notre étude nous a permis de mesurer l'activité de cette enzyme dans la cellule pulmonaire après un stress induit par le B(a)P. La figure 24 montre la variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique suite à une administration du B(a)P (100mg/Kg/IP).

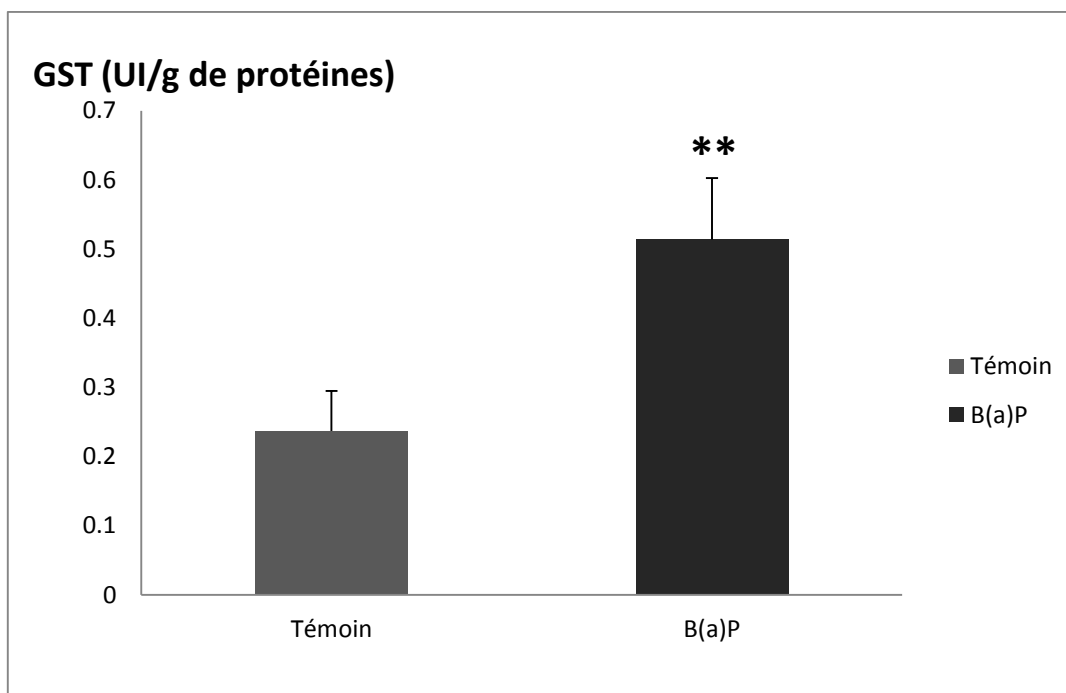


Figure 24. L'activité enzymatique de la glutathion s-transférase cytosolique dans les poumons des rats du groupe traité. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type, test de Student. Comparaison du lot traité par le B(a)P : 100mg/kg par voie IP, par rapport au lot témoin. $p < 0.01$: très significatif (**).

Les GST représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (George et Buchanan, 1990). Mais la fonction la plus étudiée des GST en ce qui concerne la prévention de la pollution environnementale demeure leur activité de catalyser des réactions de conjugaison entre un peptide, le GSH, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles, capables de réagir dangereusement avec des macromolécules comme les acides nucléiques (ARN, ADN). La catalyse de cette conjugaison du glutathion avec certains substrats représente une étape dans la formation de composés qui seront moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ ce qui favorise leur élimination de l'organisme (Ma *et al.*, 2011). La GST est impliquée également dans la réduction des dommages des ROS dans différentes cellules.

Notre résultat montre une augmentation très significative ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique est observée chez le lot traité par le B(a)P, l'activité de la GST atteint 0.513 ± 0.089 UI/g de protéines alors que celle du lot témoin est de 0.237 ± 0.057 UI/g de protéines.

Bien que le B(a)P en lui-même est relativement non toxique, il est bioactivé *in vivo* par le cytochrome P450 et les peroxydases générant des radicaux libres et des intermédiaires réactifs électrophiles hautement toxiques comme le BPDE qui peut endommager de manière irréversible l'ADN par la formation des liaisons covalentes qui sont très difficiles à réparer par les enzymes de la réparation de l'ADN (Güven *et al.*, 2006). Ces adduits sont responsables de l'étape d'initiation de la cancérogenèse chimique, conduisant au développement de la tumeur (Gil et Adonis, 2003). Ce BPDE a une spécificité élevée pour la GST, récemment il a été démontré que la réaction de conjugaison de GSH catalysé par la GST est un bon moyen pour la détoxification de l'anti-BPDE (Güven *et al.*, 2006; Venugopal *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009).

Les résultats de notre étude sont en accord avec des études précédentes qui ont révélé que l'exposition au B(a)P peut induire l'activité de la GST (Zhang *et al.*, 2012). L'expression de la GST qui est induite en réponse a une contamination par les hydrocarbures aromatiques polycycliques est un moyen de défense cellulaire contre la cytotoxicité du B(a)P, notamment ses principaux métabolites: les dihydrodiols (Elovaara *et al.*, 2007, Bouraoui *et al.*, 2008). Il est bien connu que le métabolisme du cytochrome P450 joue un rôle important dans la

production d'intermédiaires réactifs du B(a)P qui induisent des dommages oxydatifs dans les cellules, ce qui conduit à l'induction des éléments de réaction d'oxydation ainsi que des augmentations de l'expression de la GST (Romero et *al.*, 1997). Cette protection est plus effective contre la toxicité du composé de départ le B(a)P que le B(a)P_7,8_dihydrodiol. La raison de cette différence et la vitesse limite pour l'activation sont imposées en premier à l'étape d'époxidation du CYP1A1 et d'autre part de la haute réactivité et l'instabilité du métabolite ultime le BPDE formé à partir du B(a)P 7,8-dihydrodiol (Kabler et *al.*, 2009). Bouraoui et *al.* (2008) ont également noté une augmentation significative de l'activité de la GST après 36h d'exposition au B(a)P, des études récentes ont démontré que le GSH et la GST réduisent les liaisons covalentes des époxydes des cancérigènes connus comme le B(a)P (Bouraoui et *al.*, 2008). La conjugaison des métabolites réactifs de B(a)P en particulier le B(a)P-7,8-diol avec le GSH par la GST peut inactiver ce composé et prévenir la formation des adduits avec l'ADN et la mutagénicité. Donc l'augmentation de l'expression de la GST est généralement observée quand la cellule est stressée (Carvalho et *al.*, 2011). Une telle augmentation de la GST est trouvée dans le tissu pulmonaire des fumeurs (Elovaara et *al.*, 2007).

L'induction des enzymes de détoxification de phase II du métabolisme comme la GST conduit à une réduction de la mutagénicité du B(a)P-7,8-dihydrodiol de 3 fois dans la cellule exprimant la GST et le CYP1A1 est attribué à la prévention de la formation des adduits BPDE-dG par l'expression des GST. Il a été trouvé que la GST peut détoxifier seulement une fraction (jusqu'à 60%) des métabolites mutagènes générés à partir de l'activation métabolique du B(a)P par l'activité du CYP1A1. Il a été démontré que le taux des adduits du BPDE-dGu formé via l'activité enzymatique des CYP est doublée dans les cellules traitées par la solution de la fumée du tabac, comparé avec les cellules non traitées. Les ROS dans la fumée du tabac peuvent activer la seconde étape de la voie d'activation métabolique du B(a)P conduisant à l'augmentation de formation des adduits BPDE-dG dans le poumon, ils ont démontré aussi qu'en diminuant le taux des radicaux libres se traduit par une diminution du taux de BPDE-dG dans la cellule pulmonaire (Alexandrov et *al.*, 2010).

Il est plus évident que l'ensemble des gènes induits par l'Ahr inclut un nombre des enzymes du métabolisme de la phase II comme le GST, UGT et NADPH : quinone réductase 1. L'activation de l'Ahr par les toxiques comme le B(a)P induit l'expression de ces gènes (Wang et *al.*, 2009).

La surexpression de la CAT et la SOD induit non seulement les enzymes de métabolisme de la phase I comme le CYP1A1 et 1B1, mais aussi de la phase II comme la GST comme réponse à l'exposition au B(a)P. La surexpression de la CAT et la SOD joue une réduction significative dans les intermédiaires du B(a)P, en parallèle avec la diminution significative dans l'expression du CYP. D'autre part on a noté que l'exposition au B(a)P augmente significativement l'activité totale des GST et de ces ARNm dans les cellules présentant une haute expression des SOD et CAT, cela indique que l'augmentation du taux des enzymes de la phase II comme les GSTs peut être un mécanisme par lequel la SOD et la CAT réduisent la réactivité des intermédiaires du B(a)P. Il a été observé que la baisse de l'AhR diminue l'induction de l'expression du GST par le B(a)P et l'activité totale de la GST ce qui fait élever l'accumulation des intermédiaires réactives du B(a)P dans la cellule à haute expression de SOD et CAT. Cette haute expression fait augmenter l'expression des enzymes de la phase II en accélérant la détoxification du B(a)P via un mécanisme qui introduit l'AhR (Wang *et al.*, 2009).

L'équilibre entre l'activation métabolique et la détoxification des substances cancérigènes varie entre les individus et affecte la susceptibilité au cancer. Les personnes ayant une activation plus élevée et la capacité de désintoxication moins élevée, sont les plus exposés pour les cancers liés au tabagisme (Taioli, 2008). Le niveau de protection contre la cytotoxicité du B(a)P était proportionnel aux niveaux de l'activité de la GST. Cela peut avoir des implications importantes pour le métabolisme du B(a)P au niveau physiologique, car le foie a une activité disponible du CYP beaucoup plus élevée comme première étape d'époxydation que le poumon, un tissu cible primaire (Kabler *et al.*, 2009). Le taux des GST dans les poumons est toujours plus bas que celui dans le foie (Elovaara *et al.*, 2007). Ainsi, le B(a)P-7,8-dihydrodiol, un métabolite stable, peut être formé dans le foie et remis en circulation vers le poumon, où la deuxième époxydation au métabolite diol-époxyde hautement toxique et mutagène se produirait plus facilement, depuis poumon exprime constitutivement CYP1B1 qui catalyse facilement cette deuxième étape (Kabler *et al.*, 2009).

D'autre part, on trouve des résultats contradictoire ; différents auteurs ont décrit l'effet du tabac sur la GST dans différents tissus humains, Manchester et Jacoby (1982) ont observé que la fumée de tabac réduit l'activité de la GST dans le placenta humain, des résultats similaires sont trouvés au niveau des lymphocytes. L'effet inhibiteur du tabac sur la GST est difficile à expliquer (Petruzzelli *et al.*, 1988). L'activité de la GST hépatique diminue par 79%

après 24 heures du traitement par le B(a)P par rapport au témoin, cela peut être attribué au taux élevé des ROS (Ma et *al.*, 2011), ainsi Rajat et *al.* (2007) ont trouvé une diminution significative de l'activité de la GST cytosolique du poumon après traitement par le B(a)P.

D'autres recherches ont montré que l'étude cinétique de la réponse des GST paraît peu significative vis-à-vis d'une contamination par le B(a)P, et ceci, par comparaison aux niveaux d'induction chez les témoins relatifs. En effet, les seules différences significatives entre les polychètes traités par le B(a)P et leurs témoins relatifs ont été enregistrées après 36 et 48 h d'exposition, alors le seul effet significatif enregistré a été signalé après 36 h. Ces résultats confirment ceux soutenus par d'autres auteurs concernant la réponse de cette classe d'enzymes. En effet, une inhibition de cette dernière a été observée chez la moule *Mytilus galloprovincialis* contaminée par le B(a)P. De même, d'autres études ont montré une absence de changement chez le poisson *Myoxocephalus scorpius* provenant de sites contaminés par rapport à leurs témoins relatifs. Des études menées aussi en terrain ont montré une inhibition de la réponse des glutathion-S-transférases chez des bivalves *Scrobicula plana* collectés dans un site contaminé par comparaison à des organismes provenant de sites de référence (Bouraoui et *al.*, 2008).

Notant que les promoteurs de la GST contiennent les éléments de réponse, tels que un élément de réponse aux antioxydants et un élément de réponse aux xénobiotiques (Luo et *al.*, 2011), les différences individuelles dans le métabolisme cancérigène peuvent affecter le risque de cancer en modifiant le flux des métabolites qui se lient à l'ADN, et par conséquent la fréquence de mutation. De nombreuses enzymes, tels que le cytochrome P450 et la glutathion-S-transférases, sont impliqués dans l'activation métabolique des carcinogènes à des adduits à l'ADN et à leur détoxification en autres produits. De nombreuses études ont examiné la relation entre les variantes des gènes codant pour ces enzymes, telles que le CYP1A1, la GST et le cancer. Le résultat de ces études a montré généralement une modeste association et ont été inconsistant (Hecht, 2003).

II.4.3. Taux de GSH

Le glutathion est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) contenant un thiol, il sert comme un cofacteur pour les glutathion peroxydases. Le glutathion et d'autres thiols de bas poids moléculaire ont l'avantage dans les réactions d'oxydoréduction d'être facilement oxydés et

régénérés. Grâce à ces caractéristiques, le glutathion peut jouer un rôle essentiel dans de nombreuses réactions biochimiques et pharmacologiques (Mates, 2000).

Certains des rôles importants de glutathion sont: la réduction ou l'inactivation des ROS par la formation de glutathion disulfure (GSSG) et la conjugaison du glutathion réduit (GSH) pour l'élimination des xénobiotiques (Hayes et McLellen, 1999). Les résultats obtenus de notre étude sont représentés dans la figure 25.

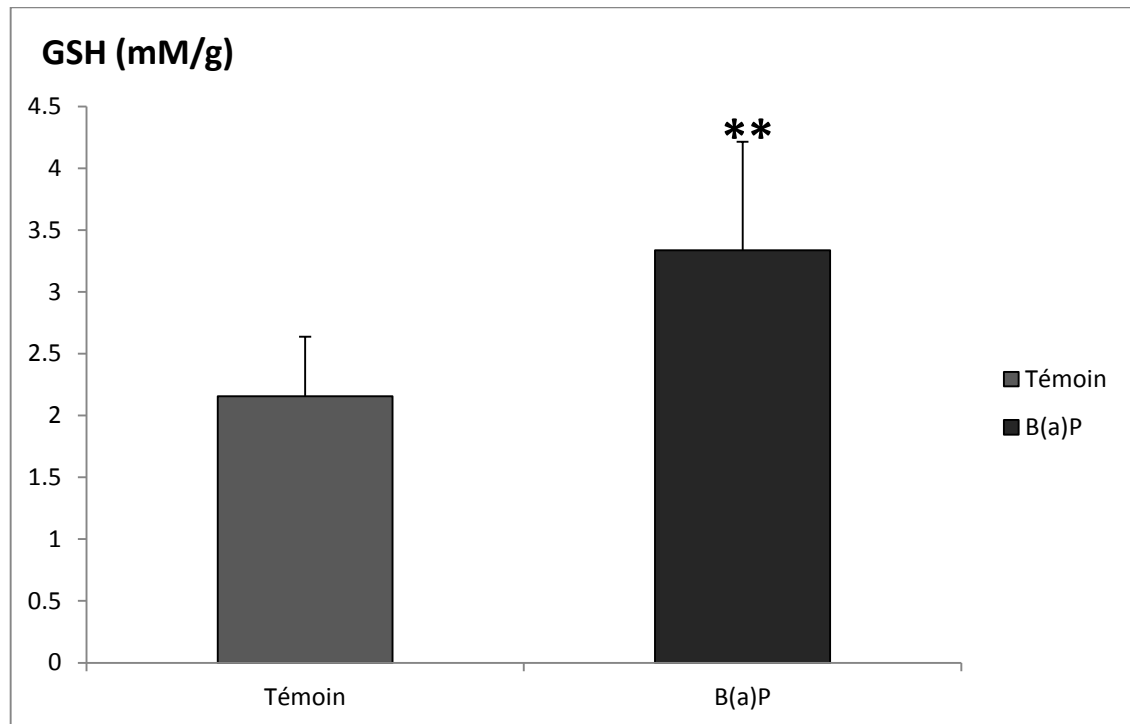


Figure 25. Taux du glutathion cytosolique dans les poumons des rats du groupe. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type, test de Student. Comparaison du lot traité par le B(a)P : 100mg/kg par voie IP, par rapport au lot témoin. $p < 0.01$: très significatif (**).

Une augmentation très significative ($p < 0.01$) du taux de GSH est observée chez le lot traité par le B(a)P, le taux de GSH atteint 3.337 ± 0.876 mM/g de poumon alors que chez le lot témoin elle est de 2.155 ± 0.482 mM/g.

Des résultats différents sont trouvés chez Romero et *al.*, (1997), ils suggèrent que les métabolites réactifs du B(a)P provoquent une augmentation du taux de Ca^{+2} intracellulaire, qui est accompagné avec une diminution des taux de GSH, il est mentionné précédemment que l'altération de l'homéostasie du calcium génère un stress oxydatif mitochondrial qui provoque la formation des ROS, ces dernier font épuiser le GSH cellulaire (Romero et *al.*,

1997). Une étude réalisée sur les reins traités par le diesel *per os*, montre une augmentation significative du GSH, qui est induit par le taux élevés des ROS générés par les constituants du diesel notamment les HAP (Uboh et *al.*, 2013), ces résultats sont en accord avec ceux de notre étude.

Les BPDE-GSH une fois sécrétés par les cellules sont métabolisés à leur adduits cystéinyl glycine correspondants par le γ -glutamyl-transpeptidase, qui est localisée sur la surface externe de la membrane plasmique. On a noté que la GST est inductible par les ROS générés par le B(a)P, cette induction résulte une augmentation de la conversion du (+)-BPDE au BPDE-GSH, qui fait diminuer la disponibilité du (+)-BPDE pour se lier à l'ADN et former les adduits (figure 26), les cellules exprimant un taux élevé des ROS et qui ont une induction de l'AhR, ont une augmentation des taux d'adduits BPDE-GSH de 10 fois par rapport à la cellule non induite (Gelhaus et *al.*, 2011).

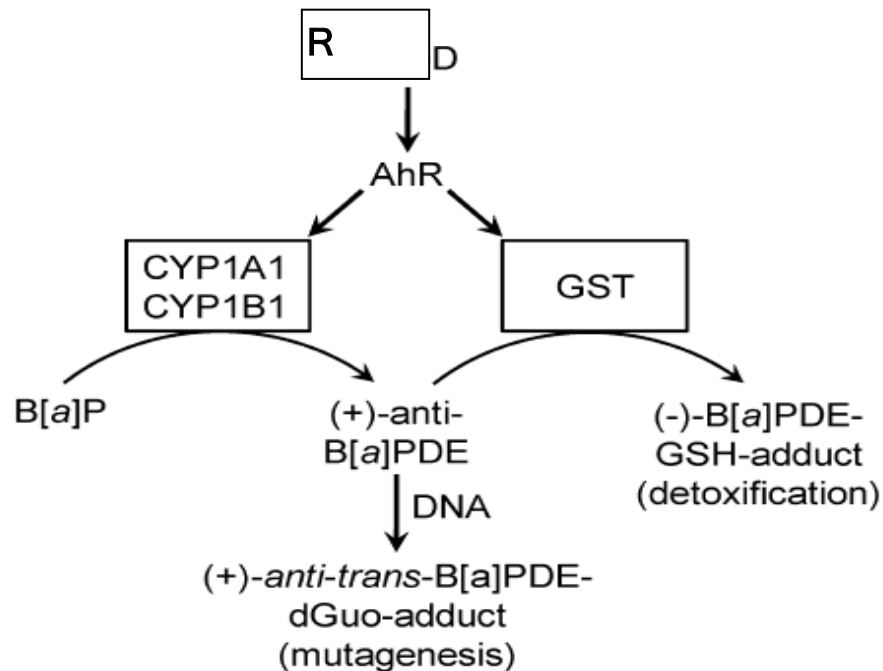


Figure 26. P450 1A1 et 1B1, activent la réaction de transformation du B (a) P à l'intermédiaire (+)-BPDE dans les poumons (Gelhaus et *al.*, 2011).

Le GSH agit comme l'antioxydant le plus important dans les systèmes vivants, car il est un décapant de H₂O₂, des peroxydes lipidiques et leur produit comme 4-hydroxynonental, Kumar et *al.* (2006) ont trouvé une diminution du taux de glutathion chez des rats traité par le B(a)P *per os*, ce qui est peut être dû à l'utilisation importante de glutathion par les enzymes de synthèse d'une part, et d'une réduction de l'activité des enzymes de synthèse de glutathion tels

que la glucose-6-phosphate déshydrogénase, et la glutathion peroxydase, et la neutralisation des radicaux hydroxyle et oxygène singlet d'autre part (Kumar et *al.*, 2006).

L'exposition des hépatocytes de rat et des fibroblastes humains à des concentrations aussi élevées que 30 mM BaP-3,6-quinone, un agent à cycle redox connu, pendant 30 min a également échoué d'épuiser le GSH intracellulaire dans ces cellules. On peut conclure que les différences de résultats observées dans les niveaux de glutathion sont le résultat d'une stimulation de production du GSH et son propagation dans la cellule d'une part, et de la formation des BPDE-GSH d'autre part (Hernadfalvi et *al.*, 2007), une baisse du niveau de GSH trouvé dans des animaux traités par le B(a)P peut être en raison de l'utilisation de plus de cet antioxydant par les cellules tumorales (Kumar et *al.*, 2006).

Bien que les mitochondries produisent des ROS en continu au cours de la phosphorylation oxydative, qui fuit à partir de superoxyde de la chaîne de transport des électrons est balayé par la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD) et cytoplasmique et les GSH peroxydases en diminuant le taux de GSH. (Hashizume et *al.*, 2012). La fumé de cigarette qui contient de nombreux composés électrophiles et ROS, épuise également les niveaux de GSH cytosolique dans les cellules épithéliales des alvéoles *in vitro* et *in vivo* dans les poumons (Rahman et Macnee, 1999).

Le système redox GSH est crucial dans le maintien intracellulaire homéostasie GSH (figure 27), ce qui est essentiel aux processus physiologiques cellulaires normaux et représente l'un des systèmes les plus importants de défense antioxydants dans le poumon (Rahman et Macnee, 1999). Pris ensemble, les augmentations marquées dans la concentration de GSH dépendent de l'activité de l'enzyme impliquée dans le taux du glutathion et de son synthèse (GSH-PX, GSSG-RD, γ -GCS, et GS), cycle redox (GSH-PX et GSSG-RD), et la défense antioxydante (Haddad et *al.*, 2000).

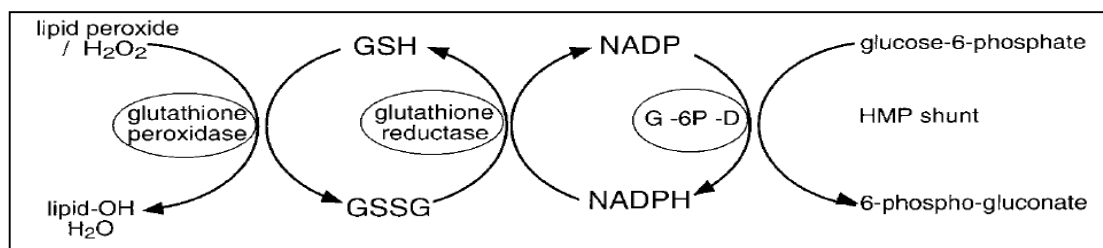


Figure 27. Le cycle redox du GSH (Rahman et Macnee, 1999).

Des études antérieures ont montré que les souris ont un certain niveau de stress oxydatif basal qui est indiqué par une augmentation de l'oxydation de l'ADN et l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes, tels que le glutathion peroxydases et le glutathion disulfure réductase. Cette augmentation de la demande sur l'offre de GSH peut limiter la disponibilité du GSH pour maintenir l'état d'équilibre et l'adaptation des niveaux de glutathion (Kariya *et al.*, 2007).

Une augmentation et une diminution des niveaux de GSH ont été décrites après l'exposition des rats à une variété de facteurs de stress. Par exemple, les niveaux de GSH étaient diminués de façon significative dans plusieurs organes et fluides corporels après un diabète, une toxicité induite par l'aluminium ou l'alloxane, cela est expliqué par l'épuisement des GSH tout en luttant contre la production de radicaux libres que cela cause. Alternativement, l'augmentation des niveaux de glutathion dans la présente étude pourrait s'expliquer par l'amélioration de l'apoptose due au stress après administration du B(a)P, qui augmenterait la disponibilité des substrats d'acides aminés pour la synthèse du glutathion (Fatani *et al.*, 2006), en effet, le taux de synthèse du GSH est contrôlé par la quantité de γ -GCS-présente, de la disponibilité de la L-cystéine, et la rétro-inhibition exercée par GSH sur γ -GCS (Rahman et Macnee, 1999) ; ainsi les cellules néoplasiques peuvent séquestrer les antioxydants essentiels de la circulation, pour alimenter la demande de la tumeur qui se développe, les variations du taux de prolifération des cellules cancéreuses sont accompagnés par des changements dans leur niveaux intracellulaire en glutathion et par conséquent ceux-ci pourraient être reflétés dans leurs mécanismes antioxydantes (Kamaraj *et al.*, 2009).

II.4.4. Variations des taux du MDA cytosolique

C'est l'un des produits finaux de la dégradation des acides gras. C'est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Le taux du MDA est proportionnel à l'extension de la peroxydation lipidique (Aust *et al.*, 1985). En effet, la peroxydation lipidique résulte en la dénaturation des acides gras polyinsaturés composant les membranes.

Ainsi, lors d'un stress causé par l'introduction d'un polluant comme le B(a)P, lorsque les systèmes anti-oxydants deviennent inefficaces, les dommages cellulaires peuvent être estimés par le taux de MDA. De ce fait, cela constitue un bon biomarqueur pour la mesure du stress oxydant. La figure 28, montre les résultats de notre étude.

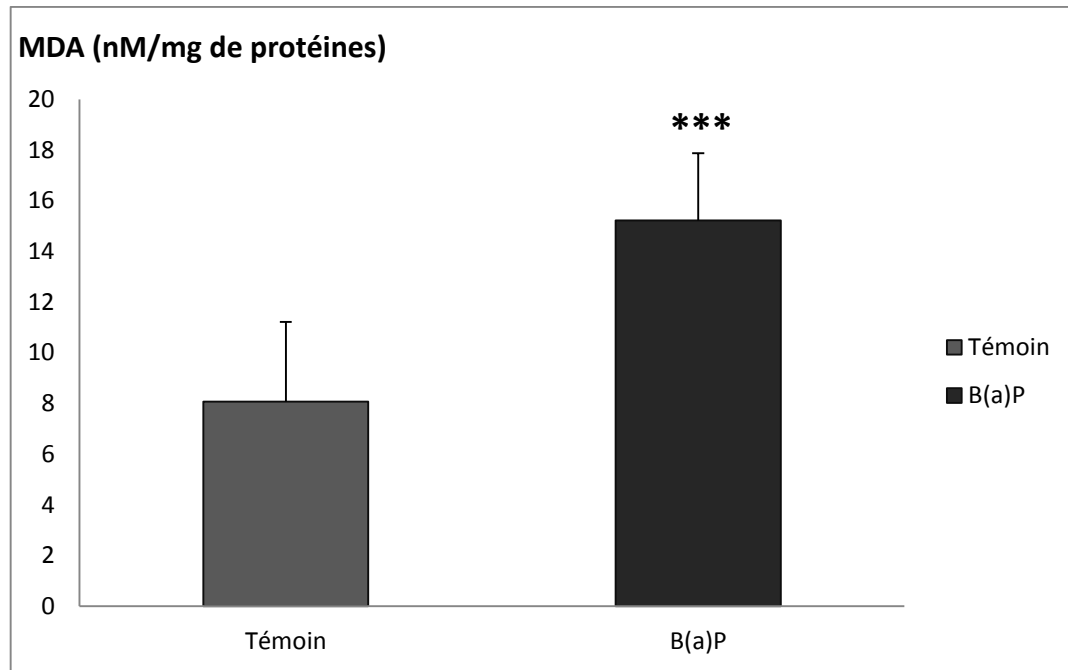


Figure 28. Taux de malondialdéhyde dans les poumons des rats du groupe traité. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type, test de Student. Comparaison du lot traité par le B(a)P : 100mg/kg par voie IP, par rapport au lot témoin. $p < 0.001$: hautement significatif (***).

Les résultats obtenus montrent une augmentation hautement significative des taux du MDA dans les poumons des rats traités par le B(a)P, les mêmes résultats sont trouvés dans la plupart des études similaires du B(a)P (Venugopal *et al.*, 2007 ; Uboh *et al.*, 2013).

Le B(a)P est un puissant agent cancérigène interagissant avec des lipides membranaires et par conséquent, induit la formation de ROS. L'activation du stress oxydatif par le B(a)P de la LPO est notamment connue pour être impliqué dans la carcinogenèse. La peroxydation lipidique peut entraîner une cascade d'effet en dérivant des radicaux lipidiques, en causant des dommages de membrane supplémentaire. Des niveaux accrus de produits de peroxydation des lipides jouent un rôle dans les premières phases de la croissance tumorale. Il a été montré que les sous-produits de la LPO peuvent provoquer des altérations profondes dans l'organisation structurale et fonctionnelle de la membrane cellulaire, y compris une diminution de la fluidité membranaire, augmentation de la perméabilité de la membrane, l'inactivation des enzymes liées à la membrane et la perte d'acides gras essentiels (Venugopal *et al.*, 2007).

Les radicaux libres réagissent avec les lipides provoquant la peroxydation et libérant des produits tels que les radicaux MDA, hydroperoxyde et hydroxyle. Le MDA a également été

rapporté pour provoquer une mutagenèse dans divers tissus par la formation d'adduits avec l'ADN (figure 29), le majeur adduit identifié est le MDA-dG. (Wang *et al.*, 1996). Faber *et al.* (1995) ont montré que les patients atteints du cancer de poumon ont des niveaux plus élevés de MDA par rapport aux témoins (Venugopal *et al.*, 2007). Dans la présente étude, une augmentation des niveaux de la peroxydation des lipides a été trouvée dans le poumon des animaux porteurs de cancer du poumon induit par le B(a)P. Le MDA est sans doute le plus mutagène des produits de la peroxydation lipidique. C'est pourquoi il est considéré comme ayant une implication dans l'initiation des cancers (Wang *et al.*, 1996), Il a été affirmé qu'il agit comme un promoteur de tumeur et un co-agent cancérigène en raison de sa haute toxicité et son pouvoir inhibiteur sur les enzymes de protection (Rajat *et al.*, 2007).

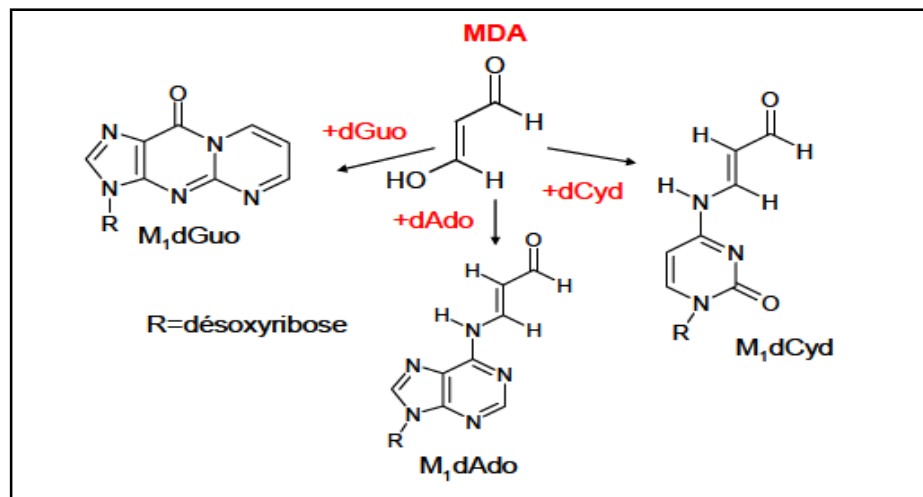


Figure 29. Les adduits de MDA (Berger *et al.*, 1993).

En outre, La formation accrue des peroxydes lipidiques témoigne la diminution des activités des enzymes antioxydantes dans le poumon des animaux intoxiqué par le benzo(a)pyrène par rapport aux animaux témoins normaux (Rajesh et Perumal, 2013).

La LPO est considéré comme l'un des mécanismes fondamentaux de dommages cellulaires causés par les radicaux libres. Le B (a) P est une substance cancérigène très efficace dans l'interaction avec les lipides de la membrane et par conséquent, induire la formation de radicaux libres. Les radicaux libres réagissent avec les lipides provoquant la peroxydation, entraînant la libération de produits tels que le malondialdéhyde, le peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyles. Une augmentation des peroxydes lipidiques indique de graves dommages à la membrane cellulaire, l'inhibition de plusieurs enzymes, fonction cellulaire et la mort cellulaire (Kumar *et al.*, 2006).

II.5. L'expression des Bcl-2 au cours du cancer pulmonaire

Bcl-2 est le membre fondateur d'une famille de protéines dont les interactions dictent le destin d'une cellule (Adams et Cory, 1998). La famille Bcl-2 est largement classée en deux groupes qui régulent l'apoptose. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w ; favorisent la survie des cellules. Les membres pro-apoptotiques Bax, Bak, Bok, Bik ; qui sont activés par des stimuli apoptotiques et favorisent la mort cellulaire (Liu et *al.*, 2006). Le rapport entre les deux groupes antagoniste détermine si une cellule résiste à un stimulus apoptotique. Les Bcl-2 jouent un rôle important dans l'induction du cancer pulmonaire par le B(a)P (Anand et *al.*, 2013), pour cette raison on évalue dans notre étude les variations des Bcl-2 après le traitement par le B(a)P pour investiguer la relation entre un cancer pulmonaire provoqué par le B(a)P et l'expression des bBcl-2. La figure 30 montre les résultats obtenus de la mesure des Bcl-2 par le western blot chez les rats traités par le B(a)P et le rat témoin.

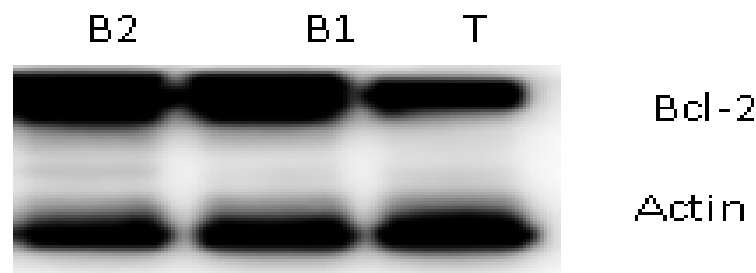


Figure 30. Variation de l'expression des protéines Bcl-2 dans le tissu pulmonaire des rats du groupe traité par le western blot. T : témoin ; B1 : poumon du rat 1 du lot traité ; B2 : poumon du rat 2 de lot traité.

Une large bande de Bcl-2 qui indique une haute expression des Bcl-2 est estimée après traitement par le B(a)P (100 mg/kg par voie IP) chez les rats traités B1 et B2 par rapport au rat témoin T, qui se caractérise par une bande plus restreinte. La haute expression des Bcl-2 antiapoptotiques à été révélé par plusieurs études précédentes (Manna et *al.*, 2009; Brahmi et *al.*, 2011; Anand et *al.*, 2013; Gu et *al.*, 2013).

Des études avec des résultats similaires ont démontré que l'interaction du B(a)P avec les gènes de p53 et les gènes de Bcl-2 a un rôle important dans l'initiation du cancer de poumon (Manna et *al.*, 2009). En effet, une haute expression des Bcl-2 antiapoptotiques et une régulation négative du p53 sont souvent trouvées dans le cancer du poumon chez l'homme. Il

est évident à partir de ces études que des directions opposées de l'apoptose se produisent pendant la toxicité induite par le B(a)P chez les rats (Brahmi *et al.*, 2011). La signalisation des Bcl-2 pour provoquer le cancer est très compliquée, en agissant sur différentes molécules qui activent les voies antiapoptotiques (Luanpitpong *et al.*, 2013).

La surexpression des Bcl-2 après le traitement par le B(a)P empêche l'apoptose; cette protéine se situe principalement intégrée sur la membrane externe des mitochondries. La surexpression de Bcl-2 empêche l'efflux du cytochrome c à partir des mitochondries et l'initiation de l'apoptose (Yang *et al.*, 1997), ainsi le Bcl-2 est un élément essentiel dans le processus anti-apoptotique, car il bloque l'initiation de l'apoptose par inhibition de la perméabilité du pore de transition de la membrane mitochondriale. Ainsi, un rôle possible de la protéine Bcl-2 dans la prévention de l'apoptose est de bloquer la libération de cytochrome c par les mitochondries. (Gu *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2013).

Par conséquent, la surexpression de Bcl-2 inhibe l'apoptose (Gu *et al.*, 2009) en agissant d'un côté, comme un régulateur négatif de la cascade biologique qui mène vers l'apoptose (Yang *et al.*, 1998) et en favorisant de l'autre côté, la survie cellulaire par l'augmentation du risque de la transformation maligne des cellules pulmonaire (Gu *et al.*, 2009). on conclue alors que le type cellulaire et la concentration du B(a)P (Zhu *et al.*, 2014) ainsi la vitesse de métabolisation jouent un rôle important dans le type de toxicité cellulaire provoquée (Holme *et al.*, 2007), d'autre part Luanpitpong *et al.* (2013) ont montré que la dégradation des Bcl-2 anti-apoptotique se fait surtout à travers les protéasomes par un mécanisme qui fait interagir les ROS; paradoxalement, dans les cellules du cancer du poumon, la formation de ROS qui est induite par différents agents induisant l'apoptose, y compris le B(a)P, a été montré être impliqué dans la régulation de la protéine Bcl-2.

Des études ont montré que la surexpression du Bcl-2 dans le poumon provoque une augmentation du NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B cell) un facteur de transcription qui a aussi un effet antiapoptotique, ainsi des études sur de différents types cellulaires ont montré que le traitement de ces cellules par des inhibiteurs de NF- κ B se traduit par la diminution de l'expression des Bcl-2, en parallèle un traitement par des activateurs connus du NF- κ B résulte en une augmentation de l'expression des Bcl-2 (Anand *et al.*, 2013). L'activation du NF- κ B peut être induite par les ROS notamment le H₂O₂ (Li et Karin, 1999), qui est généré durant le métabolisme du B(a)P par la voie des o-quinones (Burczynski *et al.*, 2000). Un activateur de

NF- κ B plus puissant que le H_2O_2 est le TNF (Tumor necrosis factor) (Li et Karin, 1999). Par contre, d'autres études ont mentionné un effet contraire de cet facteur, Hopewell et *al.* (2013) ont trouvé récemment l'effet suppresseur de tumeur dans le poumon des souris, cela est expliqué par l'activation de l'infiltration des cellules T dans le cancer pulmonaire chez l'homme (Hopewell et *al.*, 2013). Un certain nombre d'études ont suggéré un rôle possible pour la régulation du Bcl-2 par le NF- κ B, qui se diffère d'un tissu à l'autre mais le mécanisme jusqu'à maintenant n'est pas très clair (Heckman et *al.*, 2002), la figure 31 montre un mécanisme proposé de l'activation du Bcl-2 par le NF- κ B dans un cancer pulmonaire induit par le B(a)P.

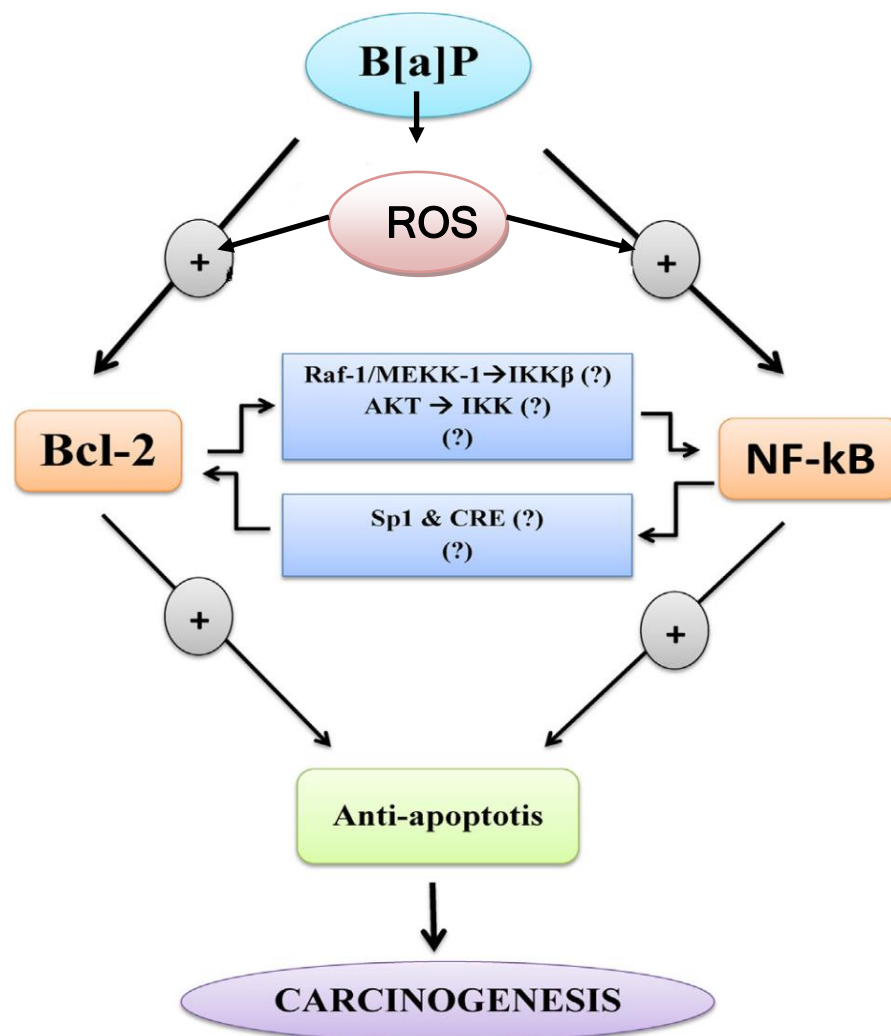


Figure 31. Un des modèles par lequel le B(a)P induit le cancer du poumon (Anand et *al.*, 2013).

Plusieurs recherches ont révélé que la surexpression de c-myc, Bcl-2 et mdm2, et la mutation en ras et p53 sont des phénomènes communs dans le cancer du poumon, la mutation p53 se produit souvent en retard dans la tumorigenèse du poumon de souris chimiquement induite. Le Bax est un promoteur de l'apoptose, membre de la famille des Bcl-2. La protéine bBcl-2 est connue pour former des hétérodimères avec la protéine Bax *in vivo*. Le rapport molaire de la protéine Bcl-2, bax décide si l'apoptose est induite ou inhibée dans plusieurs tissue (Anandakumar et al., 2013).

II.6. L'expression des Hsp90 au cours du cancer pulmonaire

Les Hsp90 sont des protéines de stress, également régulée positivement dans plusieurs cancers, comme les cancers du sein (Biaoxue et al., 2012). L'étude actuelle permet d'étudier l'importance de l'expression des Hsp90 lors d'un cancer pulmonaire induit par le B(a)P.

La figure 32 montre l'absence de Hsp 90 aussi bien dans le lot témoin que dans le lot traité au benzo(a)pyreneune mauvaise detection des HSP90.

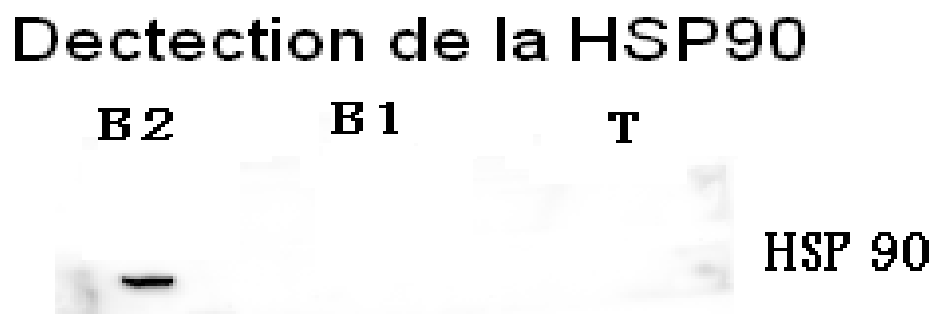


Figure 32. Variation de l'expression des Hsp90 dans le tissu pulmonaire des rats du groupe traité par le western blot. T : témoin ; B1 : poumon du rat 1 du lot traité ; B2 : poumon du rat 2 de lot traité.

On a mis en evidence l'expression de ces proteines de choc. L'absence de son expression dans notre étude peut être expliquée soit par la non spécificité de la cible au polluant, soit par un problème technique de non spécificité des anticorps utilisés pour sa révélation

Conclusion

Conclusion

L'effet toxique du B(a)P sur le poumon de rat peut être évalué par deux mécanismes principaux qui engendrent des différents effets toxiques cellulaires.

La métabolisation en espèces o-quinones qui par le biais génèrent des ROS attaquant les différentes macromolécules cellulaires, déregule la balance anti/prooxydante cellulaire, en agissant sur les molécules et les enzymes antioxydantes, et en interférant avec la signalisation cellulaire par l'inhibition ou l'activation de certains facteurs y impliqués. D'autre part la formation du métabolite toxique ultime du B(a)P qui est le BPDE qui réagit avec les macromolécules notamment l'ADN en induisant une inactivation de certains facteurs qui régulent la croissance cellulaire.

En tous les cas, à savoir le type cellulaire, le taux et le type de ROS, l'induction des gènes de métabolisme, tous ces facteurs interagissent pour engendrer un effet anti-apoptotique médié par la surexpression des Bcl-2 ou pro-apoptotique par la surexpression de p53.

Au cours de notre étude, on révèle un aspect anti-apoptotique se caractérise par une réaction inflammatoire dans le tissu pulmonaire, une induction du système antioxydant, des produits de peroxydation lipidique, qui altère l'intégrité de la mitochondrie avec un léger gonflement, et surtout une surexpression des Bcl-2 comme facteur antiapoptotique. Les Hsp 90 non détecté, s'exprime normalement dans cette étude, pour aider la cellule à survivre dans un milieu riche en polluants et ROS. Les Bcl2 constituent donc une cible importante de stress oxydant induit par le métabolisme du B(a)P ce qui empêche la cellule pulmonaire d'entrer en apoptose et assurer donc la survie et la croissance tumorale.

Cette étude démontre que les cellules pulmonaires lors d'un cancer induit par le benzo(a)pyrène sont soumises à un stress oxydatif marqué. Un tel niveau d'oxydation du milieu cellulaire devrait induire les cellules en apoptose ou en nécrose, pourtant ces cellules réussissent à survivre dans de telles conditions de stress suite à la surexpression des Bcl2. D'autres études sont nécessaires afin d'élucider les mécanismes de cette induction du cancer d'une part, la signalisation du B(a)P ou de ces métabolites d'autre part, avec les facteurs pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques.

Annexe

Figure 1 : La courbe d'étalonnage de la BSA (Serum Bovin Albumin)

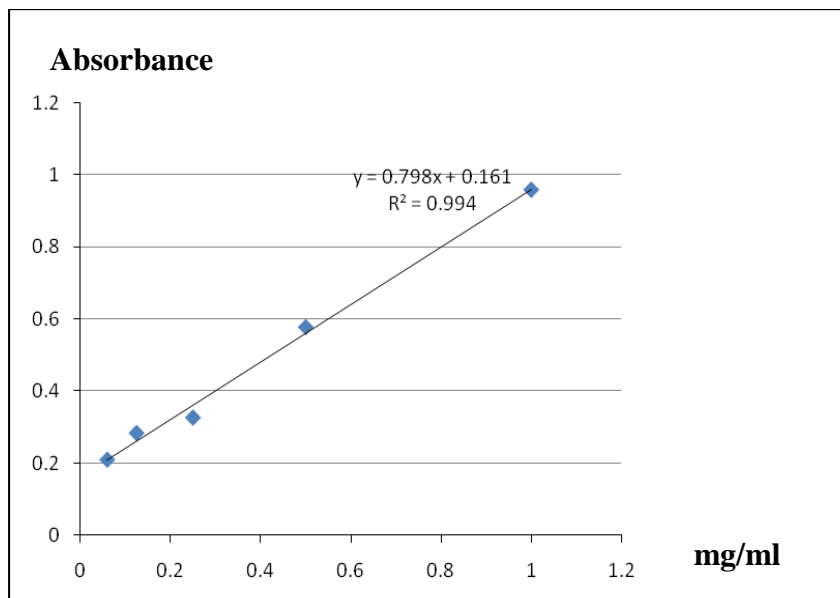


Figure 2 : Courbe étalon tracée en fonction de GSH de glutathion (GSH)

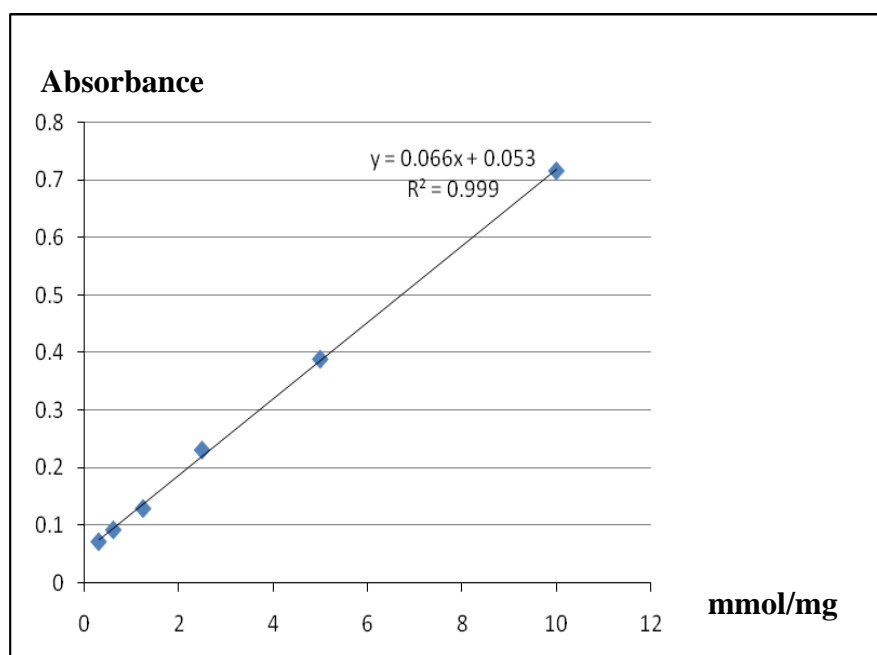
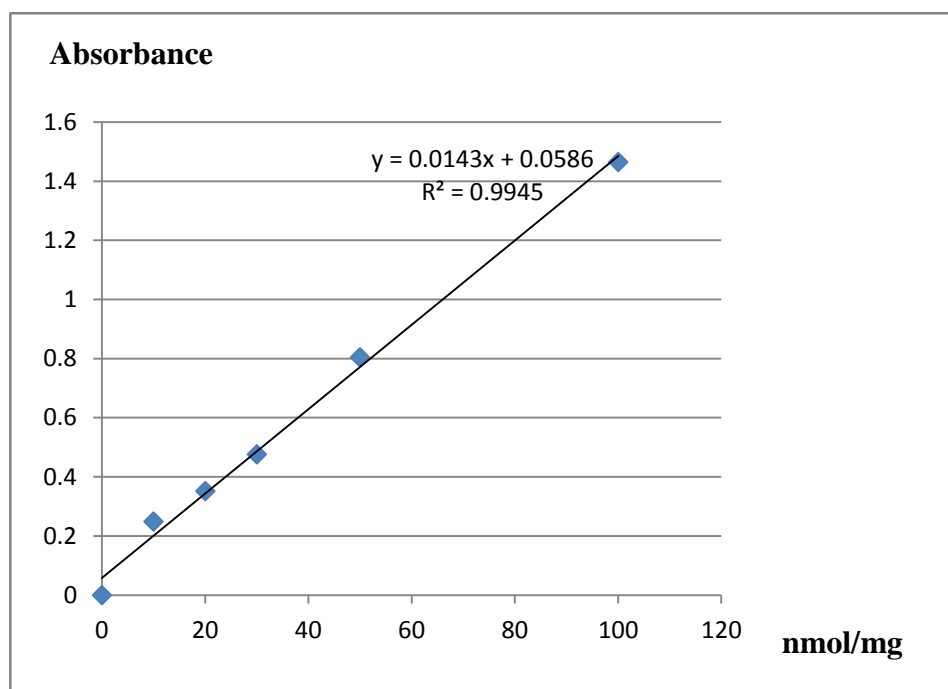


Figure 3 : La courbe d'étalonnage du malondialdéhyde (MDA)

Références Bibliographiques

1. Adams J. M. et Cory S., 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*; 281 : 1322-1326.
2. Akerboom T. P. et Sies H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology*; 77: 373-382.
3. Alexander I., Benford D., Cockburn A., Cravedi J.P., Dogliotti E., Di Domenico A. et al., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food: Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA journal*; 724 : 1-114.
4. Alexandrov K., Rojas M. et Satarug S., 2010. The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. *Toxicology letters*; 198 : 63-68.
5. Al-Jasabi S., Saad A. et Haque E. E., 2013. The Role of Antioxidant Anthocyanin in the Attenuation of Lung Cancer Caused by Benzo (a) Pyrene in Balb/C Mice. *Middle-East journal of scientific research*; 14 (2) : 168-172.
6. Alscher R.G., Erturk N. et Heath L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*; 53(372) : 1331-1341.
7. Anandakumar P., Kamaraj S., Jagan S., Ramakrishnan G. et Devaki T., 2013. Capsaicin provokes apoptosis and restricts benzo(a)pyrene induced lung tumorigenesis in Swiss albino mice. *International immunopharmacology*; 17 : 254-259.
8. Anand J. R., Rijhwani H., Malapati K., Kumar P., Saikia K. et Lakhar M., 2013. Anticancer activity of esculetin via-modulation of Bcl-2 and NF- κ B expression in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Biomedicine & preventive nutrition*; 3 : 107-112.
9. Arnér, E. S. et Holmgren A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry*; 267 : 6102-6109.
10. Aust S. D., Morehouse L. A. et Thomas C. E., 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of free radicals in biology & medicine*; 1 : 3-25.
11. Baldi I, Bard D, Barouki R, Benhamou S. Benichou J. Bernie M. O. et al., 2008. Cancer du poumon. In : Cancer et environnement: expertise collective, *Inserm*, p : 59-172.

12. Balu N., Padgett W.T., Lambert G.R., Swank, A.E., Richard, A.M. et Nesnow, S., 2004. Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo(a)pyrene-7,8-quinone from reactions at physiological pH. *Chemical research in toxicology*; 17 (6) : 827-838.
13. Bartosek I., Guaitani A., Modica R., Fiume M. et Urso R., 1984. Comparative kinetics of oral benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats: study with hydrocarbon mixtures. *Toxicology letters*; 23(3) :333-9.
14. Benhamou S., Demenais F., Dupret I.M., Haguenoer I.M., Leszkowicz A., Stucker I. et al., 2000. Métabolisme et mécanisme d'action des principales substances cancérigènes d'origine professionnelle. In : Susceptibilité génétiques et expositions professionnelles, *travaux du groupe d'expert réunis par l'INSERM, France*, p : 25-62.
15. Berger M., de Hazen M., Nejari A., Fournier J., Guignard J., Pezerat H. et al., 1993. Radical oxidation reactions of the purine moiety of 2'-deoxyribonucleosides and DNA by ironcontaining minerals. *Carcinogenesis*; 14 : 41-6.
16. Biaoxue R., Xiling J., Shuanying Y., Wei Z., Xiguang C., Jinsui W. et al., 2012. Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Journal of experimental & clinical cancer research*; 31 (70) : 1-14.
17. Biewenga, G. P., Haenen, G. R., et Bast, A., 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General pharmacology* ; 29(3) : 315-331.
18. Bonnard N. Brondeau M.T., Clavel T., Falcy M., Jargot D., Lafontaine M. et al., 2007. Benzo(a)pyrene. *Fiche toxicologique* 144 :1-4.
19. Bouraoui Z., Ghedira J., Jebali J., Banni M., Clerendeau C., Narbonne J. F. et al., 2008. Etude de l'effet du cadmium et du benzo(a)pyrène sur des enzymes de phase I et phase II de biotransformation chez le polychète *neréis diversicolor*. *Revue des sciences de l'eau* ; 22(3) : 451-459.
20. Bradford M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Bindin. *Analytical biochemistry*; 72 : 248-254.
21. Brahmi D., Ayed Y., Bouaziz C., Zourgui L., Hassen W., Bach H., 2011. Hepatoprotective effect of cactus extract against carcinogenicity of benzo(a)pyrene on liver of Balb/C mice. *Journal of medicinal plants research*; 5(18) : 4627-4639.

22. Burczynski M.E. et Penning T.M., 2000. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-ketoreductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer research*; 60(4) : 908-15.
23. Cadenas E. et Davies K.J.A., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine*; 29 : 222-230.
24. Carvalho R. N., Bopp S. K., Lettieri K., 2011. Transcriptomics Responses in Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana* Exposed to the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Benzo(a)pyrene. *Plos one* ; 6(11) : e26985.
25. Cavalieri E. et Rogan E. 1998. Mechanisms of tumor initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons in mammals. In: Neilson A. H. (ed.). PAHs and related compounds – biology. *Springer*, Germany; p 81-117.
26. Centenera M. M., Fitzpatrick A. K., Tilley W. D. et Butler L. M., 2013. Hsp90: Still a viable target in prostate cancer. *Biochimica et biophysica acta*; 1835 : 211-218.
27. Chen S., Nguyen N., Tamura K., Karin M. et Tukey R. H., 2003. The Role of the Ah Receptor and p38 in Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol and Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced Apoptosis. *The journal of biological chemistry* ; 278 (21) :19526-19533.
28. Ciocca D. R., Arrigo A. P., Calderwood S. K., 2013. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Archives of toxicologie*; 87 :19-48.
29. Clairbone A., 1985. Catalase activity. In : Greenwald R. A. (ed.). Handbook for methods for oxygen radical research, *CRC Press*: Boca Raton, Fla.; p : 283-284.
30. Cooper C.S., Grover P.L. et Sims P., 1983. The metabolism and activation of benzo(a)pyrene. *Progress in drug metabolism*; 7 : 295-396.
31. Cory S., Huang D.C. et Adams J.M., 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*; 22 : 8590-8607.
32. Côté N., 2002. Le cancer du poumon non à petites cellules : d’hier à aujourd’hui. *Pharmactuel* ; 35 (4) : 161-162.
33. Defraigne J.O. et Pincemail J., 2007. Stress oxydant et antioxydant : Mythes et réalités. *Revue médicale de liège* ; 62(4): 1-10.
34. Dendelé B., Tekpli X., Hardonnière K., Holme J. A., Debure L., Catheline D. et al., 2014. Protective action of n-3 fatty acids on benzo(a)pyrene-induced apoptosis through

- the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. *Chemico-biological interactions*; 207 : 41-51.
35. Desler C. et Rasmussen L. J., 2014. Mitochondria in biology and medicine-2012. *Mitochondrion*; 6 : 2-6.
 36. Dipple A., 1994. Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *International agency for research on cancer scientific publication*; 125 : 107-29.
 37. Ellman G.L., 1959. Plasma antioxidants. *Archives on biochemistry and biophysics*; 82 : 70-77.
 38. Elovaara E., Mikkola J. Stockmann-Juvala H. Luukkanen L., Keski-Hynnil H., Kostianen R., et al., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolizing enzyme activities in human lung, and their inducibility by exposure to naphthalene, phenanthrene, pyrene, chrysene, and benzo(a)pyrene as shown in the rat lung and liver. *Archives of toxicologie*; 81: 169–182.
 39. Faber M., Coudray C., Hida H. Mouseau M. et Favier A., 1995. Lipid peroxydation products and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biological trace element research*; 47 : 117- 23.
 40. Fatani A. J., Al-Zuhair H. A., Yaquob H. I., Abdel-Fattah A. A., El-Sayed M. I. et El-Sayed F. A., 2006. Protective Effects of the Antioxidant *Ginkgo Biloba* Extract and the Protease Inhibitor Aprotinin Against *Leiurus Quinquestriatus* Venom-Induced Tissue Damage in Rats. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*; 12 (2) : 255-275.
 41. Feng, Z., Hu W., Chen J. X., Pao A., Li H., Rom W. et al. 2002. Preferential DNA damage and poor repair determine ras gene mutational hotspot in human cancer. *Journal of the national cancer institute*; 94(20) : 1527-36.
 42. Fertuck K.C., Matthews J.B. et Zacharewski T.R., 2001. Hydroxylated benzo(a)pyrene metabolite are responsible for in vitro estrogen receptor-mediated gene expression induced by benzo(a)pyrene, but do not elicit uterotrophic effects in vivo. *Toxicological sciences*; 59 : 231-240.
 43. Flandrin P., Guyotat D., Duval A., Cornillon J., Tavernier E., Nadal N., et al., 2008. Significance of heat-shock protein (HSP) 90 expression in acute myeloid leukemia cells. *Cell stress and chaperones*; 13 : 357- 364.

44. Fretland A.J., Omiecinski C.J., 2000. Epoxydehydrolyases: biochemistry and molecular biology. *Chemico-biological interactions*; 129 : 41-59.
45. Gadouche L., 2010. Identification de médicaments interagissant sur la génotoxicité du benzo(a)pyrène. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biologie, *université du Québec à Montréal*, pp 3-4.
46. Gallegos R. M., Floor K., Roepman P., Rodriguez J. A., Meijer G. A., Mooi W. J. et al., 2008. Integration of Gene Dosage and Gene Expression in Non-Small Cell Lung Cancer, Identification of HSP90 as Potential Target. *Journal pone*; 3(3) : e1722.
47. Gao H.G., Chen J.K., Stewart J., Song B., Rayappa C., Whong W.Z. et al., 1997. Distribution of *p53* and *K-ras* mutations in human lung cancer tissues. *Carcinogenesis* ; 18(3) : 473- 478.
48. Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques. *L'actualité chimique* ; (Nov-Dec) : 91-96.
49. Gelhaus S. L., Harvey R. G., Penning T. M. et Blair I. A., 2011. Regulation of Benzo(a)pyrene-Mediated DNA- and Glutathione-Adduct Formation by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Human Lung Cells. *Chemical research in toxicology* ; 24, 89-98.
50. Genium Publishing Corporation (Genium). 1999. Genium's Handbook of Safety, Health and Environmental Data for Common Hazardous Substances, *McGraw Hill*, New York ; p : 72-142.
51. George G. S. et Buchanan G., 1990. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish physiology and biochemistry* ; 8(6) : 437-449.
52. Georgellis A., Marinetta T. et Rydstorm J., 1988. Generation of Superoxide Anion and Lipid Peroxidation in Different Cell Types and Subcellular Fractions from Rat Testis. *Toxicology and applied pharmacology* ; 94: 362-373.
53. Gil L. et Adonis M., 2003. Genomics and proteomics offers new hopes towards a personalized approach to lung cancer prevention and treatment. *Electronic journal of biotechnology* ; 6(3):168-173.
54. Ginsberg G.L., Atherholt T.B., 1990. DNA adduct formation in mouse tissues in relation to serum levels of benzo(a)pyrene-diol-epoxide after injection of benzo(a)pyrene or the diolepoxide. *Cancer research* ; 50(4):1189-94.

55. Godschalk R.W., Moonen E.J., Schilderman P.A., Broekmans W.M., Kleinjans J.C. et Van Schooten F.J., 2000. Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*; 21(1):87-92.
56. Gorria M., Tekpli X., Rissel M., Sergent O., Huc L., Landvik N. et al., 2008. A new lactoferrin- and iron-dependent lysosomal death pathway is induced by benzo(a)pyrene in hepatic epithelial cells. *Toxicology and applied pharmacology* ; 228 : 212-224.
57. Gower J.D. et Wills E.D., 1984. The generation of oxidation products of benzo(a)pyrene by lipid peroxidation : a study using gamma-irradiation. *Carcinogenesis* ; 5(9) :1183-9.
58. Gu Q., Hu C., Chen Q. et Xia Y., 2013. Tea polyphenols prevent lung from preneoplastic lesions and effect p53 and bcl-2 gene expression in rat lung tissues. *International journal of clinical and experimental pathology*; 6(8): 1523-1531.
59. Gu Q., Hu C., Chen Q., Xia Y., Feng J. et Yang H., 2009. Development of a rat model by 3,4-benzopyrene intra-pulmonary injection and evaluation of the effect of green tea drinking on p53 and bcl-2 expression in lung carcinoma. *Cancer detection and prevention*; 32: 444-451.
60. Gunning W. T., Kramer P. M., Lubet R. A., Steele V. E, End D. W., Woiters W. et al. 2003. Chemopreventive of benzo(a)pyrene induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. *Clinical cancer research*; 9(5): 1927-30.
61. Gutteridge J. M. et Halliwell, B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York academy of sciences*; 899: 136-147.
62. Gutteridge J. M. et Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications* ; 393(4): 561-564.
63. Güven G. S., Güven M., Onaran I., Ulutin T. et Hacıhanefioglu S., 2006. Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo(a)pyrene in cultured human lymphocytes: Influence of glutathione S-transferase M1 genotype. *Genetics and molecular biology* ; 29(1) : 142-147.
64. Habig W. H., Pabst M. J. et Jakoby W. B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of biological chemistry* ; 249: 7130-7139.

65. Haddad J. J. et Land S. C., 2000. O₂-evoked regulation of HIF-1 α and NF- κ B in perinatal lung epithelium requires glutathione biosynthesis. *American journal of physiology-lung cellular and molecular physiology* ; 278: L492-L503.
66. Hahn, M. 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution (1). *Chemico-biological interactions*; 141: 131-160.
67. Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. et Chapelle J.P., 2007. Le stress oxydant ; *Revue médicale de Liège* ; 62(10) : 628-638.
68. Hankler F., Stolpmann K. et Luch A., 2012. Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses. In: Luch A. (Ed.). *Molecular, clinical and environmental toxicology: environmental toxicology*, (3). *Springer*, Germany; p: 107-131.
69. Harvey R.G., 1991. Metabolic activation, DNA binding, and mechanisms of carcinogenesis. In: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, chemistry and carcinogenicity*. *Cambridge university press*, New York; p: 50-95.
70. Harrison P. T., 1984. An ethanol-acetic acid-formol saline fixative for routine use with special application to the fixation of non-perfused rat lung. *Laboratory animals* ; 18 : 325-331.
71. Hashizume M., Mouner M., Chouteau J. M., Gorodnya O. M., Ruchko M. V., Potter B. J. et al., 2012. Mitochondrial-targeted DNA repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 protects against ventilator-induced lung injury in intact mice. *American journal of physiology-lung cellular and molecular physiology* ; 304: L287-L297.
72. Hasspieler B.M., Douglas Haffner G., Adeli K., 1996. Influence of DT diaphorase on quinone-mediated genotoxicity in human and fish cell lines. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*; 360 (1): 43-49.
73. Hayes J. D. et McLellen L. I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free radical research* ; 31: 273-300.
74. Hecht S. S., 2003. Tobacco Carcinogens, their Biomarkers and Tobacco-Induced Cancer. *Cancer* ; 3 : 733- 744.
75. Heckman C. A, Mehew J. W, et Boxer L. M., 2002. NF- κ B activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene*; 21: 3898- 3908.

76. Hernadfalvi N., Langhans W., Meyenburg C., Onteniente B., Richard D. et Arsenijevic D., 2007. Role for glutathione in the hyposensitivity of LPS-pretreated mice to LPS anorexia. *European cytokine network* ; 18 (2) : 39-45.
77. Holme J.A., Gorria M., Arlt V.M., Øvrebø S., Solhaug A., Tekpli X., et al., 2007. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo(a)pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chemico-biological interactions* ; 167 : 41-55.
78. Hopewell E. L., Zhao W., Fulp W. J., Bronk C. C., Lopez A. S., Massengill M., et al., 2013. Lung tumor NF-κB signaling promotes T cell-mediated immune surveillance. *The journal of clinical investigation* ; 12 (6): 2509-2522.
79. Hussain S. P., Amstad P., Raja K., Sawyer M., Hofseth L., Shields P. G. et al., 2001. Mutability of p53 Hotspot Codons to Benzo(a)pyrene Diol Epoxide (BPDE) and the Frequency of p53 Mutations in Nontumorous Human Lung. *Cancer research* ; 61, 6350–6355.
80. Iqbal M., Som D.S., Yasumasa O., Masayoshi F. et Shigero O., 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology & toxicology*; 92: 33-38.
81. Jackson S.E., 2013. Hsp90 : structure and function. *Topics in current chemistry* ; 328: 155-240.
82. Jacob R. A., 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition research* ; 15 (5) : 755-66.
83. Ji L.L., Fu R. et Mitchell E.W., 1992. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *Journal of applied physiology* ; 73(5) : 1854-1859.
84. Jia H., Sun R., Shi W., Yan Y., Li H., Guo X. et al., 2014. Characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase gene from *Apis cerana cerana* and its role in oxidative stress. *Journal of insect physiology* ; 60 : 68-79.
85. Jiang H., Gelhaus S.L., Mangal D., Harvey R.G. Blair I.A. et Penning T.M., 2007. Metabolism of benzo(a)pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical research in toxicology* ; 20(9) : 1331-41.
86. Kabler S. L., Seidel A., Jacob J., Doehmer J., Morrow C. S., et Townsend A. J., 2009. Differential protection by human glutathione S-transferase P1 against cytotoxicity of

- benzo(a)pyrene, dibenzo(a,l)pyrene, or their dihydrodiol metabolites, in bi-transgenic cell lines that coexpress rat versus human cytochrome P4501A1. *Chemico-biological interactions*; 179(2-3) : 240-246.
87. Kamaraj S., Ramakrishnan G., Anandakumar P., Jagan S. et Devaki T., 2009. Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Investigational new drugs*; 27 : 214-222.
 88. Kariya C. Leitner H., Min E., Heeckeren C., Heeckeren A. et Day B. J., 2007. A role for CFTR in the elevation of glutathione levels in the lung by oral glutathione administration. *American journal of physiology-lung cellular and molecular physiology* ; 292 : L1590-L1597.
 89. Kehrer J., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* ; 149 (1) : 43-50.
 90. Keohavong P., DeMichele M. A., Melacrinis A. C., Landreneau R. J., Weyant R. J. et Siegfried J. M., 1996. Detection of *K-ras* Mutations in Lung Carcinomas: Relationship to Prognosis. *Clinical cancer research* ; 2 : 411-418.
 91. Kim H. S., Kwack S.J. et Lee B.M., 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo(a)pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo(a)pyrene. *Chemico-biological interactions*; 127 (2) :139-150.
 92. Kim K. B. et Lee B.M., 1997. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer letters*; 113: 205-212.
 93. Kim R., Emi M. et Tanabe K., 2006. Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer chemotherapy pharmacology* ; 57: 545-553.
 94. Ko C. B., Kim S. J., Park C., Kim B. R., Shin C. H., Choi S., et al. 2004. Benzo(a)pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepalcl7 cells via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction. *Toxicology* ; 199 : 35-46.
 95. Kochhar A., Kopelovich L. Sue E., Guttenplan J.B., Herbert B.S., Dannenberg A.J., et al., 2014. P53 Modulates Hsp90 ATPase Activity and Regulates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling ; *Cancer Prevention research (Philadelphia, Pa)* ; 12 : [Epub ahead of print].

96. Kristal B.S., Park B.K., et Yu B.P., 1996. 4-hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry*; 271: 6033-6038.
97. Kumar M., Sharma V.L., Sehgal A. et Jain M., 2012. Protective effects of green and white tea against benzo(a)pyrene induced oxidative stress and DNA damage in murine model. *Nutrition and cancer* ; 64(2): 300-306.
98. Kumar R. V., Ravikumar V., Shivashaugari K. S., Kamaraj S., et Dvaki T., 2006. Chemopreventive Role of Lycopene and D- Arginine in B(a)P Induced Lung Cancer with Reference to Lipid Peroxidation, Antioxydant System and Tumor Marker Enzymes. *International journal of cancer research* ; 2(3) : 224-233.
99. Lawler J. M. et Demaree S. R. 2001. Relationship between NADP-specific isocitrate dehydrogenase and glutathione peroxidase in aging rat skeletal muscle. *Mechanisms of ageing and development* ; 122: 291-304.
100. Lemaire, P., Sturve, J., Förlin, L., Livingstone, D.R. 1996. Studies on aromatic hydrocarbon quinone metabolism and DT-Diaphorase function in liver of fish species. *Marine environmental research* ; 42 (1-4): 317-321.
101. Li N. et Karin M. 1999. Is NF-kB the sensor of oxidative stress? *The FASEB Journal: official publication of the federation of American societies for experimental biology*; 13 (10): 1137-1143.
102. Liu X. J., Zhang L. Q., Liu X. L. et He F. C., 2006. Role for the Bcl-2 family proteins and BH3 domain in apoptosis. *Progress in biochemistry and biophysics*; 33: 221-225.
103. Luch A., 2009. Chemicals as Tumor-inducing Agents. *Discovery medicine* ; 5 ; (29):472-7.
104. Luch A., 2005. Nature and nurture-lessons from chemical carcinogenesis. *Nature reviews/cancer* ; 5 : 113- 125.
105. Luo W., Kinsey M., Schiffman J. D. et Lessnick S. L., 2011. Glutathione S-transferases in pediatric cancer. *Frontiers in oncology* ; 1(39) : 1-11.
106. Luanpitponga S., Chanvorachoteb P., Stehlikc C., Tsed W., Callerya P. S., Wange L., et al., 2013. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. *Molecular biology of the cell*; 858-896.

- 107.Ma J. Q., Liu C. M., Qin Z. H., Jiang J. H. et Sun Y. Z., 2011. Ganoderma applanatum terpenes protect mouse liver against benzo(a)pyren-induced oxidative stress and inflammation. *Environmental toxicology and pharmacology* ; 31 : 460-468.
- 108.Manchester D. K. et Jacoby E. H., 1982. Glutathione S-transferase activities in placentas from smoking and non-smoking women. *Xenobiotica* ; 12: 543- 547.
- 109.Mandelker L., 2008. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Veterinary clinics of North America small animal practice*; 38(1): 1-30.
- 110.Manna S., Mukherjee S., Roy A., Das S. et Pandaa C. K., 2009. Tea polyphenols can restrict benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis by altered expression of p53-associated genes and H-ras, c-myc and cyclin D1. *Journal of nutritional biochemistry* ; 20 : 337-349.
- 111.Marie C., 2007. Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. Thèse de doctorat, université Joseph Fourier, *Grenoble I ; France*, p 10.
- 112.Marie C., Maitre A., Douki T., Gateau M., Tarantini A., Guiraud P., et al., 2008. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo(a)pyrene DNA adducts. *Journal of applied toxicology*; 28(5): 579-590.
- 113.Mari M., Morales A., Colell A., Garcia-Ruiz C. et Fernandez-Checa J., 2009. Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxidants & redox signals* ; 11 : 2685-700.
- 114.Mates M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* ; 153: 83-104.
- 115.McCord J.M., Fridovich I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of biological chemistry* ; 244: 6049-6055.
- 116.Miller K.P. et Ramos K.S., 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo(a)pyrene and related hydrocarbons. *Drug metabolism reviews* ; 33(1): 1-35.
- 117.Mitchell C. E., 1982. Distribution and retention of benzo(a)pyrene in rats after inhalation. *Toxicology letters*; 11(1-2): 35-42.
- 118.Morel Y., Mermoud N. et Barouki R., 1999. An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H₂O₂ and NFI. *Molecular and cellular biology* ; 19(10): 6825-32.

119. Moserova M., Kotrbová V., Aimová D., Šulc M., Frei E. et Stiborová M., 2009. Analysis of benzo(a)pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of method. *Interdisciplinary toxicology* ; 2(4): 239-244.
120. Mukherjee A., Boujedaini N. et Khuda-Bukhsh., 2013. Homeopathic Thuja 30C ameliorates benzo(a)pyrene induced DNA damage, stress and viability of perfused lung cells of mice in vitro. *Journal of integrative medicine* ; 11(6) : 397-404.
121. Okhawa H., Ohishi N. et Yagi K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical biochemistry* ; 95: 351-358.
122. Ortiz A. G. et Salcedo J. M., 2010. Heat shock proteins as targets in oncology. *Clinical and translational oncology* ; 12:166-173.
123. Paul S., Bhattacharyya S. S., Samaddar A., Boujedaini N. et Khuda-Bukhsh A. R., 2011. Anticancer potentials of root extract of polygala Senega against benzo(a)pyrene-induced lung cancer in mice. *Journal of Chinese integrative medicine* ; 9(3) : 320-327.
124. Pavek p. et Dvorak Z., 2008. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 super family in human extrahepatic tissues. *Current drug metabolism* ; 9(2) : 129-143.
125. Pelletier E., Campbell P.G., Denizeau F., 2004. Ecotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement ; *Presses de l'Université du Québec*, p : 182-183.
126. Penning T.M., 1993. Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chemico-biological Interactions* ; 89, 1-34.
127. Penning T.M., Burczynski M.E., Hung C.F., McCoull K.D., Palackal N.T., Tsuruda L.S., 1999. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chemical research in toxicology* ; 12(1):1-18.
128. Penning T.M., Ohnishi S.T., Ohnishi T. et Harvey R.G., 1996. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chemical research in toxicology* ; 9(1):84-92.

129. Petruzzelli S., Bernard P., Paoletti P., Rane A., Giuntini C., et Pacifici G. M., 1988. Presence of epoxide hydrolase and glutathione s-transferase in human pulmonary alveolar macrophages. *European journal of clinical pharmacology*; 34: 419-421.
130. Prochaska H.J., De Long M.J. et Talalay P., 1985. On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*; 82(23): 8232-6.
131. Qu S. X. et Stacey N.H., 1996. Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo(a)pyrene. *Carcinogenesis*; 17(1):53-9.
132. Rahman I. et Macnee W., 1999. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *American physiological society*; L1067-L1088.
133. Rajat K. D., Sarmistha B. et Sudin B., 2007. Amélioration of benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in strain A mice by diphenylmethyl selenocyanate. *Experimental and toxicologic pathology*; 58: 351- 360.
134. Rajesh V. et Perumal P., 2003. Cytoprotective effect of *Smilax zeylanica* Linn. Leaves against benzo(a)pyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in Swiss albino mice. *Oriental pharmacy and experimental medicine* ; 13:267-277.
135. Ramesh A., Inyang F., Hood D.B., Archibong A.B., Knuckles M.E. et Nyanda A.M., 2001. Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Experimental and toxicologie pathology*; 53(4):275-90.
136. Riedl S. J. et Shi Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Molecular cell biology*; 5: 897-907.
137. Robert J., 2010. Signalisation cellulaire et cancer. *Springer* ; Bordeaux, France ; p : 215-228.
138. Robin M.A., 2005. Implications physiopathologiques des cytochromes P450. *Hepato-gastro and oncologie digestive* ; 12 (4) :241-49.
139. Romero D. L., Barbara M. J., Lauer F. T., Born J. L., et Burchiel S. W., 1997. Depletion of Glutathione by benzo(a)pyrene Metabolites, Ionomycin, Thapsigargin, and Phorbol Myristate in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Toxicology and applied pharmacology* ; 144 : 62-69.

140. Roos W.P. et Kaina B., 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine* ; 12 (9): 440-450.
141. Sagredo C., 2011. Biotransformation of benzo(a)pyrene - Analysis, metabolism and adduct formation in rats and Ahr knockout mice. Thèse de doctorat, *Oslo, Norway* ; p.11.
142. Sainz R. M., Lombo F. and Mayo J. C., 2012. Radical Decisions in Cancer: Redox Control of Cell Growth and Death. *Cancers* ; 4 : 442-474.
143. Sanders S. P., Bassett D. J. P., Harrison S. J., Pearse D., Zweier J. L., et Becker P. M., 2000. Measurements of Free Radicals in Isolated, Ischemic Lungs and Lung Mitochondria. *Lung* ; 178:105-118.
144. Ségala G., 2012. Cancer: les mécanismes biologiques, *Futura sciences* ; 1-21.
145. Scandalios J. G., Guan L. et Polidoros A. N., 1997. Catalases in Plants: Gene Structure, Properties, Regulation, and Expression. In: Scandalios J. G.,(Ed). Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, (34). *Cold spring harbor monograph archive* ; p: 343-406.
146. Sies H., 1981. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine* ; 91(3C): 31S-38S.
147. Selvendiran K., Thirunavukkarasu C., Singh J. P. V., Padmavathi R., Sakthisekaran D., 2004. Chemopreventive effect of piperine on mitochondrial TCA cycle and phase-I and glutathione-metabolizing enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Molecular and cellular biochemistry* ; 271(1-2) :101-106.
148. Shields P.G. et Haris C.C., 1993. Principles of carcinogenesis: chemical. In: Vincent T. et DeVita (Ed). *Cancer, Principles and practice of Oncology*. Lippincott, Philadelphia; p: 200-211.
149. Smithgall T. E., Harvey R.G. et Penning T.M., 1988. Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *The journal of biological chemistry*; 263(4):1814-20.
150. Solary E., 2006. La mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques. *Bulletin du cancer*; hors série : 61-70.

- 151.Solhaug A., Øvrebø S., Mollerup S., Lag Marit, P. E. Schwarze, Nesnow S. et al., 2005. Role of cell signaling in B(a)P-induced apoptosis: characterization of unspecific effects of cell signaling inhibitors and apoptotic effects of B(a)P metabolites. *Chemico-biological interactions* ; 151:101-119.
- 152.Sung C.C., Hsu Y.C., Chen C.C., Lin Y.F. et Wu C.C., 2013. Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* ; 2013 :1-15.
- 153.Taioli E., 2008. Gene-Environment interaction in tobacco-related cancers. *Carcinogenesis* ; 29(8) : 1467-1474.
- 154.Tang T., Lin X., Yang H., Zhou L. C., Wang Z., Shan G., Guo Z. M., 2010. Overexpression of antioxidant enzymes upregulates aryl hydrocarbon receptor expression via increased Sp1 DNA-binding activity. *Free radical biology & medicine* ; 49: 487-492.
- 155.Tarantini A., 2009. Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélange. Thèse de doctorat, école doctorale ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement (ED-ISCE), France ; p.13-16.
- 156.Tekpli X ., Rissel M., Huc L., Catheline D., Sergent O., Rioux V. et al., 2010. Membrane remodeling, an early event in Benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Toxicology and applied pharmacology* ; 243: 68-76.
- 157.Tompa A. et Langenbach R., 1979. Culture Of Adult Rat Lung Cells: Benzo(a)Pyrene Metabolism And Mutagenesis. *In vitro* ; 15 (8) : 569-578.
- 158.Trepel J., Mollapour M., Giaccone G. et Neckers L., 2010. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Cancer* ; 10: 537-49.
- 159.Trushin N., Alam S., El-Bayoumy K. Krzeminski J., Amin S.G., Gullett J. et al., 2012. Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or intergrated genomes. *Journal of carcinogenesis*; 11(1): 1-9.
- 160.Turrens J. F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The journal of physiology* ; 552(2) : 335-344.
- 161.Uboh F. E., Ufot S. U. et Eyong E. U., 2013. Comparative Effect of Withdrawal from Exposure on Gasoline and Diesel Induced Nephrotoxicity in Male Albino Wistar Rats. *Journal of clinical toxicology* ; 3: 170.

162. Vähäkangas K.H., Bennett W. P., Castrèn K., Welsh J. A., Khan M. A., Blömeke B., et al., 2001. P53 and K-ras Mutations in Lung Cancers from Former and Never-Smoking Women. *Cancer research*; 61: 4350-4356.
163. Magesh V. Durgabhavani K., Rajendran P., Ekambaram G., et Sakthisekaran D., 2008. Reduction of mitochondrial oxidative damage and improved mitochondrial efficiency by administration of crocetin against benzo(a)pyrene induced experimental animals. *Biological and pharmaceutical bulletin* ; 31(9) : 1639-1645.
164. Venugopal R., Senthilnathan P., Magesh V., Raj Kapoor B et Sakthisekaran D., 2007. Chemotherapeutic efficacy of *Solanum trilobatum* along with paclitaxel in lung cancer bearing swiss albinos mice. *Internationnal journal of cancer rsearch*; 3(2): 119-126.
165. Viau, C., Hakizimana G., and Bouchard M., 2000. Indoor exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon monoxide in traditional houses in Burundi. *International archives of occupational and environmental health* ; 73(5): 331-8.
166. Wang M., Dhingra K., Hittelman W. N., Liehr J. G., Andrade M., et Li D., 1996. Lipid Peroxidation-induced Putative Malondialdehyde-DNA Adducts in Human Breast Tissues. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* ; 5 : 705-710.
167. Wang Z., Yang H., Ramesh A., Roberts II L. J., Zhou L. C., Lin X. et al., 2009. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase accelerates benzo(a)pyrene detoxification by upregulation of the aryl hydrocarbon receptor in mouse endothelial cells. *Free radical biology & medicine* ; 47 : 1221-1229.
168. Wester R. R., Maibach H. I., Bucks D. A., Sedik L., Melendres J., Liao C. et al., 1990. Percutaneous absorption of (14C) DDT and (14C) benzo(a)pyrene from soil. *Fundamental and applied toxicology*; 15(3): 510-6
169. Weyand E. H. et Bevan D. R., 1986. Benzo(a)pyrene disposition and metabolism in rats following intratracheal instillation. *Cancer research*; 46(11): 5655-5661.
170. Wirth D., Gustin P., Drion P.V., Dessy-Doize C. et Christians E.S., 2002. Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*). I : Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Annales de médecine vétérinaire* ; 146: 201-216.
171. Xia L., Wurmbach E., Waxman S. et Jing Y., 2006. Upregulation of Bfl-1/A1 in leukemia cells undergoing differentiation by all-transretinoic acid treatment attenuates chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Leukemia* ; 20 : 1009-1016.

172. Yamazaki H., Kakiuchi Y., 1989. The uptake and distribution of benzo(a)pyrene in rat after continuous oral administration. *Toxicological & environmental chemistry*; 24(1/2): 95-104.
173. Yan C., Oh J. S., Yoo S. H., Lee J. S., Yoon Y. G., Oh Y. J. et al., 2013. The targeted inhibition of mitochondrial Hsp90 overcomes the apoptosis resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B cells via necroptosis. *Toxicology and applied pharmacology* ; 266 : 9-18.
174. Yang C. S., Yang G. Y., Landau J. M., Kim S. et Liao J. 1998. Tea and tea polyphenols inhibit cell hyperproliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression. *Experimental lung research*; 24(4): 629-639.
175. Yang J., Liu X, Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J. et al., 1997. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* ; 275 (5303): 1129-32.
176. Yokota J et Kohno T., 2004. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer science*; 95: 197-204.
177. Zhang L., Wu H., Liu X., Chen L. Wang Q., Zhao J. et al., 2012. Molecular cloning and differential expression patterns of sigma and omega glutathione S-transferases from *Venerupis philippinarum* to heavy metals and benzo(a)pyrene exposure. *Chinese journal of oceanology and limnology* ; 30(3) : 413-423.
178. Zhao Y., Chacko S. et Levin R.M., 1994. Expression of stress proteins (HSP-70 and HSP-90) in the rabbit urinary bladder subjected to partial outlet obstruction. *Molecular and cellular biochemistry* ; 130: 49-55.
179. Zhu W., Cromie M. M., Cai Q., Lv T., Singh K., Gao W., 2014. Curcumin and Vitamin E Protect against Adverse Effects of Benzo(a)pyrene in Lung Epithelial Cells. *Journal pone e92992* ; 9 (3) : 1-11.

Dirrigé par : Pr. LAHOUEL M.

Présenté par :
BEGHOUL Afafe

Étude de cibles biochimiques (Hsp et Bcl-2) du benzo(a)pyrène responsable du cancer du poumon

Résumé- Le benzo(a)pyrène B(a)P est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) hautement cancérigène pour le poumon après administration. Notre étude consiste à évaluer l'état du stress oxydatif cellulaire sur un modèle de cancer pulmonaire expérimentalement induit par le benzo(a)pyrène chez le rat Wistar albinos, lors de l'administration d'une dose unique du B(a)P à 100 mg/Kg par voie intrapéritoniale, et de comprendre si les protéines de choc thermique Hsp90 et les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 sont des cibles biochimiques pour le B(a)P lors du cancer pulmonaire. Après 4 mois du traitement, un changement du statut oxydatif a été enregistré chez les rats recevant le B(a)P: une augmentation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$); une augmentation du gonflement mitochondrial, ainsi qu'une peroxydation lipidique marquée par l'élévation des taux du MDA. Une augmentation des niveaux des paramètres antioxydants est détectée comme le taux de GSH, l'activité enzymatique de la GST avec une modification non significative de la CAT. Une surexpression en protéines Bcl-2 a été enregistré également. On conclue de cette étude que le B(a)P peut induire après son métabolisation un état de stress oxydant cellulaire qui peut se développer vers un cancer ou une apoptose selon la voie de signalisation qui y interagit et que les Bcl-2 constituent une cible majeure du B(a)P.

Mots clés: Benzo(a)pyrène, Cancer de poumon, Stress oxydant, Bcl-2, Hsp90.

Abstract- Benzo(a)pyrene B(a)P is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) highly carcinogenic to the lung by different administration routes. Our study is to assess the state of cellular oxidative stress in a model of lung cancer experimentally induced by benzo(a)pyrene in albino Wistar rats by intrapéritonial administration of a single dose of B(a)P 100 mg/ Kg, and to understand whether heat shock protein Hsp90 and Bcl-2 anti-apoptotic proteins are biochemical targets for B(a)P in lung cancer. After 4 months of treatment, changes in oxidative status was observed in rats treated with B(a)P: an increase in mitochondrial production of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$); increased mitochondrial swelling and lipid peroxidation marked by elevated levels of malondialdehyd MDA. Increased levels of antioxidant parameters are detected as GSH level, enzymatic activity of GST with no significant changes in CAT activity. Overexpression in Bcl-2 protein was also recorded. This study concluded that B(a)P may induce, after its metabolism, a state of cellular oxidative stress that may develop into cancer or apoptosis depending on the signaling pathway by which it interacts and Bcl-2 protein constitutes a major target.

Keywords: Benzo (a) pyrene, Lung cancer, Oxidative stress, Bcl-2, Hsp90.

المخلص - البنزو (أ) بيرين ، ب (أ) ، من الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات المسرطنة ، حيث يحفز الإصابة بسرطان الرئة بعد إعطائه بمسالك مختلفة. تهدف دراستنا إلى تقييم حالة الإجهاد التأكسدي الخلوي من خلال نموذج لسرطان الرئة محفز تجريبيا عند الجرذان البيضاء ويستار من خلال إعطاء جرعة واحدة للبنزوبيرين تحت الغشاء البريتوني بجرعة قدرها 100ملغ/كغم. كما تهدف هذه الدراسة إلى فهم ما إذا كانت بروتينات Bcl-2 و Hsp90 أهدافا بيوكيميائية للبنزوبيرين خلال سرطان الرئة. بعد 4 أشهر من المعالجة، سجلنا تغيرات في الوضع التأكسدي للفران التي كانت تتلقى البنزوبيرين: من خلال زيادة معتبرة في إنتاج الميتوكوندري للأنيون فوق الأكسيد ($O_2^{\bullet-}$) ، زيادة انتفاخ الميتوكوندري ونسبة عالية من بيروكسيد الدهون (MDA). كما تم تسجيل زيادة في مستويات مضادات الأكسدة مثل الغلوتاثيون GSH، نشاط إنزيم الغلوتاثيون S- ترانسفيراز (GST) ، مع تغير غير معتبر في نشاط إنزيم الكاتالاز (CAT) . كما تم الكشف عن زيادة في بناء البروتين Bcl-2 المضاد للموت الخلوي المبرمج. نستنتج من هذه الدراسة أن البنزو (أ) بيرين بعد استقلابه الخلوي يولد حالة من الإجهاد التأكسدي الخلوي قد تتطور إلى سرطان أو موت خلوي مبرمج و هذا حسب مسالك الإشارات التي تتولد جراء ذلك، ويعتبر بروتين Bcl-2 هدفا رئيسيا للبنزو (أ) بيرين.

الكلمات المفتاحية: بنزو (أ) بيرين، سرطان الرئة، الإجهاد التأكسدي ، بروتين Bcl-2، بروتين Hsp 90.

