

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun - Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Biologie"

Spécialité: "Infectiologie"

Présenté et soutenu publiquement le 24 juin 2015 par :

- Mlle AFFANE SARA

- Mlle BENABDALLAH HALIMA

THEME

Induction du cancer colorectal

Chez le Rat *Wistar*

JURY:

- | | | |
|-----------------|------------------|--|
| -Président: | M. TADJ A. | MAA Faculté des SNV |
| -Promoteur: | Mme. BENGUIAR R. | MAA Faculté des SNV |
| -Co-promoteur : | Mme. BENARABA R. | MCB Faculté des SNV |
| -Examineur: | M. HEMIDA H. | MAA Institut des Sciences Vétérinaires |

Année universitaire: 2014–2015

Remerciements

*Avant tout nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volenté, la patience et la santé durant toutes ces années d'études et que grâce à lui ce travail à pu être réalisé*

*Tout d'abord, nous tenons à exprimer nous plus vifs remerciements et notre sincère gratitude a notre promotrice **Madame Benguiar Rachida**, qui nous aide dans la réalisation de ce travail par leurs précieux conseils, son soutien, ses encouragements qu'il n'hésitera jamais à nous proposer dans les moments difficiles et ses efforts immenses qui ont contribué dans la bonne marche de ce travail.*

*Nous remercions chaleureusement notre Co-promotrice **Madame le Docteur Benaraba Rachida**, pour sa disponibilité, ses informations, son aide et ses orientations apportées au profit du travail effectuer.*

*Nous adressons notre sincères remerciements à **Monsieur Hemida Houari**, Enseignant à l'institut des Sciences Vétérinaires de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret, qui nos accueillie au sein de son laboratoire, pour son guide précieux, ses judicieux conseils pratiques durant l'expérimentation. Nous lui exprimons nos vives reconnaissances et nos profondes et respectueuses considérations pour avoir accepté d'examiner notre modeste travail.*

*Un grand remerciement pour **Monsieur Tadj** pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger et présider le jury de la soutenance de ce mémoire. Vous acceptez l'expression de nos sincères remerciements.*

*Nous exprimons notre haute gratitude à **Madame Boumezrag Assia** de l'institut des Sciences Vétérinaires de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret, pour son soutien, sa gentillesse et son aide précieuse.*

*Nous adressons également nos sincères remerciements au docteur **Mechouare**, Médecin spécialiste d'Anatomie-Pathologie, d'avoir suivi le déroulement et la réalisation des coupes histologique, nous lui exprimons notre profonde gratitude pour tous ses précieux conseils, son aide dévouement pour le travail, sa sympathie et toute les ressources qu'il a mis à notre disposition, nous le remercions ainsi pour le temps qu'il a consacré pour nous.*

Enfin, nos sincères remerciements sont destinés à tous le personnel du laboratoire d'Autopsie clinique de l'Institut des Sciences Vétérinaires, au laboratoire de Technologie Alimentaire, Biochimie, et Zootechnie de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université Ibn Khaldoun-Tiaret.

*Et aux membres du laboratoire des Analyses médicales et d'Anatomie-Pathologie de l'Hôpital de Youcef Damardji précisément le chef service de laboratoire Monsieur **Chelik Ahmed** et les Polycliniques de Zaaroura et Dahmouni-Tiaret.*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail avec grand amour

A mes chers et respectueux parents,

Mon père mon premier encadrant, depuis ma naissance ; Ma très chère mère;

Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements,

Et qui sont la source de tendresse, de noblesse et d'affection

Qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et j'ai éclairé le chemin par leurs Conseils

J'espère qu'un jour, je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi,

et que dieu leur prête bonheur et longue vie.

*A mon unique frère **Mohamed Abdenour** ;*

*A mes chères sœurs **Fatima, Nour elhouda** ;*

*A ma petite sœur **Kamar Aya** ;*

En témoignage de la fraternité, mes souhaits de bonheur de santé et de succès

A mon cher fiancé

*Et à tous les membres de ma famille **AFFANE** et **MELLAH***

*A ma chère binôme, **Halima***

*A mes Amies et collègues, particulièrement **Hafida** et **Amina***

AFFANE SARA

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail à :

Ceux à qui je dois tant et qui m'ont tout donné sans rien en retour, mes chers parents, ma mère et mon père, qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices durant toute leur vie et qui nous ont toujours aimé nous voir réussir. Ceux qui me rappelant que la volonté fait les grands aucune dédicace ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous

Je les remercie pour tout ce qu'ils nous ont fait, que dieu les protège, leur donne santé et longue vie et les garde pour nous.

Mes grands parents je vous remercie pour vos bénédictions et vos prières m'ont été d'un grand secours pour mener à bien ma vie que dieu tout puissant vous comble de santé et les accorde une longue vie

Mes très chères sœurs chacune et sa petite famille

*Mes petites sœurs **Khadidja, Zineb, Kheira, Nacera, Fatima***

*Mes deux frères **Omar, Abderrahmane***

Mes oncles et mes tantes et toutes leurs familles

A tous mes enseignants du primaire jusqu'à l'université sans exception

A ma chère binôme Sara pour sa patience et son encouragement

*A tous mes amis surtout : **Amina, Hafida, Imane, Imane, Fatma, Nacema, Badra**, vous représentez pour mon cœur le symbole de gentillesse et la vraie amitié merci pour le soutien et l'encouragement que vous m'aviez donné tout le long de mes études que dieu vous protège*

A mes collègues de promotion

A tous ceux que j'ai omis de citer.

BENABDALLAH HALIMA

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Sommaire

Introduction

I. Synthèse Bibliographique	2
1. Le Cancer	2
1.1. Le colon et la Cancérogénèse colique	2
1.2. Mécanisme de la Cancérogénèse colique	3
1.3. Modèles de cancérogenèse colique	5
1.3.1. Modèles animaux	5
a. Rats induits à diméthylhydrazine (DMH) / azoxyméthane (AOM)	6
1.3.2. Foyers de cryptes aberrantes (FCA)	7
1.3.3. Foyers Déplétés en Mucine (MDF)	7
1.4. Cancérogénèse et Alimentation	8
1.4.1. Les graisses et le cancer colorectal	9
1.4.2. Rôle des lipides dans la carcinogenèse colique	9
1.5. Cancer et le stress oxydant	10
II. Partie Expérimentale	12
1. Matériel et Méthodes	12
1.1. Objectif du travail	12
1.2. Lieu et durée de travail	12
1.3. Matériel et produits chimiques	12
1.4. Traitement et suivi des animaux	13
1.5. Composition de régime expérimental	15
1.6. Procédure expérimental	16
1.7. Prélèvement et préparation du matériel biologique	17

1.7.1. Prélèvement sanguin.....	17
1.7.2. Prélèvement d'organes	17
1.7.3. Prélèvement du colon pour l'étude histologique.....	17
1.7.4. Préparation de l'homogénat d'organe.....	17
1. Préparation de l'homogénat du foie et côlon:	17
1.8. Dosage des paramètres biochimiques.....	18
1.8.1. Détermination des teneurs en cholestérol total	18
1.8.2. Détermination des teneurs en (High Density Lipoprotein) HDL et LDL (Low Density Lipoprotein)	19
1.8.3. Détermination de l'activité des transaminases plasmatiques	19
1.8.4. Détermination des teneurs en Gamma Glutamyl transférase (γ -gGT).....	20
1.8.5. Dosage des protéines totales (méthode de Bradford).....	21
1.9. Analyses des paramètres oxydatifs.....	21
1.9.1. Détermination du pouvoir antioxydant total par la méthode de FRAP « Ferric Reducing antioxydant power ».....	21
1.9.2. Oxydation des protéines: groupement thiols (Faure et Lafond, 1995).....	22
1.10. Etude histologique du colon.....	22
1.11. Analyse statistique.....	24
2. Résultats et Discussions	25
2.1. Impact du régime hypergras (HF) et de la DMH sur l'évolution de la masse corporelle.....	25
2.2. Effet du régime (HF) et la DMH sur la nourriture ingérée et l'apport calorique des différents groupes.....	26
2.3. Effet du régime HF et DMH sur les poids des organes.....	27
2.4. Teneurs des paramètres biochimiques plasmatiques.....	28
2.4.1. Impact du régime HF et DMH sur les teneurs plasmatique en cholestérol,HDL et LDL.....	28

2.4.2. Impact du régime (HF) et DMH sur les teneurs plasmatique en TGO, TGP et γ GT.....	30
2.5. Evaluation du pouvoir réducteur total au niveau plasmatique et tissulaire.....	32
2.6. Evaluation de l'oxydation des groupement Thiols SH plasmatique et tissulaire.....	34
2.7. Effet du régime HF et DMH sur la formation des Foyers de cryptes aberrantes (FCA)	36
Conclusion et Perspectives	38
Références Bibliographiques	39
Annexes	48
Résumé	66

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AG** : Acides Gras
- AGMI** : Acides Gras Monoinsaturés
- AGPI** : Acides Gras Polyinsaturés
- AGS**: Acide Gras Saturés
- ALT** : Alanine Aminotransférase
- AOM** : Azoxymethane
- APC** : Adenomatous Polyposis Coli
- ARN** : Acide Ribonucléique
- AST** : Aspartate Aminotransferase
- ANOVA** : Analyse de la variance à un critère de classification
- BSA** : Albumine bovine sérique
- CA** : Crypte Aberrante
- CCR**: Cancer Colorectal
- COX-2**: Cyclooxygénase-2
- DCC**: Deleted in Colon Carcinoma
- DMH**: 1, 2-dimethylhydrazine
- DTNB** : 5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque)
- DO** : Densité optique
- EDTA** : Ehyène diamine tétraacétate
- EOA** : Espèces oxygénées activées
- ERO**: Espèces Réactives de l'oxygène
- FAP** : Polypose Adénomateuse Famimiale
- F344** : Fisher
- FCA** : Foyer de crypte aberrante
- FRAP**: Ferric Reducing Ability Plasma
- γGT** : Gamma-glutamyl-transpeptidase
- GOT** : glutamate-oxalo-acetate-transaminase
- GSH**: Glutathion réduit
- GTP** : glutamate-pyruvate-transaminase
- H2O2** : Eau oxygéné

HDL: High Density Lipoprotein
HF : *High Fat*
HID-AB: High-Iron Diamine Alcian Blue
HNE : Hydroxynonenal
IGF-1: Insulin-like growth factor-1
LDL: *Low Density Lipoprotein*
MAM : Méthylazoxyméthanol
MDA : Malondialdehyde
MDF : Foyer déplété en mucine
Min : Multiple intestinal neoplasia
NAC : N-Acetyl-Cystéine
ONAB: Office Nationale d'Aliment de Bétail
PBS : tampon phosphate
SOD: Super oxyde dismutase
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
RNS: Espèces réactives d'azote
SDS: Sodium Dédocyl Sulfate
SEM : Erreur Standard à la Moyenne
TPTZ: Tripyridyl-s-Triazine
WCRF: World Cancer Research Fund

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Matériel et produits chimiques utilisés.	13
Tableau n°2 : Composition du régime standard et hypergras.....	15
Tableau n°3 : profil lipidique de la graisse ovine	15
Tableau n°4 : Poids des organes chez les rats durant les 16 semaines de traitement.....	28
Tableau n°5 : Pouvoir réducteur plasmatique ($\mu\text{mol/l}$), hépatique et du colon ($\mu\text{mol/g}$ de Protéine) chez les différents groupes des rats après 16 semaines de Traitement.....	33
Tableau n°6 : Oxydation des groupements thiol plasmatique ($\mu\text{mol/l}$) hépatique et du Colon ($\mu\text{mol/g}$ de protéine) chez les différents groupes de rats après 16 Semaines de traitement.....	35

Liste des figures

Figure n°1 : Anatomie du côlon humain et structure de la muqueuse colique	3
Figure n°2 : Les différentes étapes de la cancérogenèse colique	5
Figure n°3 : Métabolisme de 1-2 Diméthylhydrazine (DMH).....	6
Figure n°4 : Altération phénotypique et génétique inclus dans le développement de carcinogénèse colorectale dans un model animale traité par DMH/AOM.....	8
Figure n°5 : Protocole du suivie des rats au cours de l'étude.....	14
Figure n°6 : Diagramme récapitulatif de la procédure expérimentale.....	16
Figure n°7 : Evolution de la masse corporelle des rats durant les 16 semaines de traitement.....	25
Figure n°8 : a) Poids final b) Gain de poids des rats durant 16 semaines de traitement.....	26
Figure n°9 : a) Nourriture ingérée b) l'apport calorique des différents groupes durant les 16 semaines de traitement.....	27
Figure n°10 : Teneurs plasmatique en cholestérol, HDL et LDL chez les rats durant les 16semaines.....	29
Figure n°11: a) Teneurs plasmatique en TGO et TGP, b) Teneur en γ GT chez les rats durant les 16 semaines.....	31
Figure n°12: Teneurs hépatique en TGO et TGP chez les rats durant les 16 semaines.....	32
Figure n°13: Aspects macroscopique des colons des rats témoins (a) et traitées par la DMH (b,c)	37
Figure n°14 : Observations microscopiques (X40) des coupes histologiques des colons de Des rats témoins après 16 semaines de traitement.....	37

Introduction

Introduction

Le cancer colorectal est le troisième dans le monde chez les deux sexes confondus 400 mille décès par cancer colorectal sont enregistrés chaque année. De ce fait, Il constitue une préoccupation majeure de la santé en Algérie (**Meddah et al., 2009**). Et il est caractérisé par une croissance cellulaire incontrôlée au niveau du côlon et du rectum (**Kuhnowski, Bauters, 2005**). En effet, la majorité de ces cancers sont dits sporadiques et 5 à 10% sont de forme génétique. Les causes de cette pathologie sont complexes, probablement multifactorielles (environnementales, génétique, facteurs hormonales, et le mode de vie).

Actuellement, l'alimentation est considérée comme l'une des causes majeures puisqu'on lui attribue plus d'un tiers des cas de cancers (**Corpet, 2012**). En effet, l'étude des conséquences d'une alimentation riche en lipides sur les risques de développement du cancer colorectal a fait l'objet de nombreux travaux (**Delage et al., 2005**). Une des tendances actuelles est de privilégier un effet de la quantité et la qualité des acides gras ingérée. Pour mieux comprendre l'interaction entre environnement et cancer et, plus particulièrement, entre alimentation et cancer, l'épidémiologie ne suffit pas et les modèles expérimentaux sont nécessaires. Il a été clairement établi que l'augmentation des apports énergétiques alimentaires et plus particulièrement lipidiques augmente la persistance de stress oxydatif, conduisant à un dommage de l'ADN lié à la surproduction cellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives d'azote (RNS) qui sont également impliquées dans les mécanismes et les processus pathologiques du cancer (**Kuratko et al., 1991**).

En outre, de nombreuses études, basées sur la cancérogénèse chimique chez le rat utilisant comme agent initiateur des carcinogènes indirects comme la diméthylhydrazine (DMH) ou l'azoxyméthane (AOM). Ces carcinogènes sont activés au niveau du foie et gagnent l'intestin par le sang ou par la bile sous forme de conjugués à l'acide glucuronique. Ils engendrent des foyers de cryptes aberrantes, considérés comme de bons marqueurs préneoplasiques (**Bastide, 2012, Mario et al., 2014**).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'induire sur un modèle expérimental animal des lésions précancéreuses par un traitement simultané par un régime alimentaire hypergras (riche en acides gras saturés d'origine animale) et une substance carcinogène DMH et de le valider comme un régime promoteur de la cancérogenèse colique. La sélection de la dose efficace est basée sur l'évaluation de l'impact du régime/ DMH d'une part, sur des paramètres biochimiques et oxydatifs, d'autre part sur la formation des foyers de cryptes aberrantes du colon.

Synthèse
Bibliographique

I. Synthèse Bibliographique

1. Le Cancer

Le cancer est une affection polymorphe vraisemblablement connue depuis l'antiquité qui a vu au cours du 20^{ème} siècle son incidence croître considérablement pour constituer de nos jours l'un des fléaux majeurs menaçant la santé publique. Il se définit comme une pathologie ayant pour origine des altérations génétiques de cellules somatiques qui entraînent des modifications physiologiques de celles-ci. Ces modifications conduisent à la formation de cellules cancéreuses, donc le cancer est « une origine clonale », à partir d'une seule cellule somatique, dont les mécanismes de régulation de la croissance, de la différenciation, et de la prolifération ont été gravement perturbés. De plus les caractères nouveaux acquis sont transmis à la descendance cellulaire. Alors, les cellules tumorales n'obéissent plus aux mécanismes de contrôle d'une croissance normale chez l'hôte, elles prolifèrent de façon anarchique, incontrôlée. (**Potter et al. ,1993**)

1.1. Colon et la Cancérogénèse colique

Le côlon humain est un organe musculaire d'environ 1.5 m de long. (**Saladin, 2014**) Il se divise en cinq parties : le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde. On trouve ensuite le rectum et l'anus. Le gros intestin occupe un rôle important d'absorption, en ce qui concerne l'eau et les sels minéraux. Son rôle dans la digestion est plus limité ; la flore bactérienne qui est le peuple est à l'origine de la fermentation des glucides non digérés. Les produits de cette fermentation (acides gras à chaîne courte) sont impliqués dans la bonne santé de la muqueuse colique. La surface interne du gros intestin est caractérisée par des dépressions séparées par des plis semi-lunaires s'étendant sur un tiers environ de la circonférence de la paroi. En effet, la paroi du côlon est constituée de quatre tuniques, caractéristiques du tube digestif (**Mac Farlane et Stover, 2007**)

(Figure n°1):

- La **muqueuse**, couche la plus interne, est constituée d'un épithélium de revêtement qui s'invagine en glandes ou cryptes de Lieberkühn, et d'un tissu conjonctif sous-jacent très lâche, riche en tissu lymphoïde, le chorion. Les glandes de Lieberkühn sont constituées de plusieurs types de cellules : les cellules caliciformes, qui sécrètent le mucus intestinal, les cellules absorbantes (ou colonocytes), et les cellules souches, qui permettent le renouvellement cellulaire. La muqueuse est le siège d'échanges entre la lumière intestinale et l'intestin. Ces échanges concernent essentiellement les ions (sodium, potassium, bicarbonate, chlore), et l'eau.

- La **sous-muqueuse**, est constituée d'un tissu conjonctif dense, où est localisé un important réseau vasculaire.
- La **muscleuse**, est constituée de deux couches de tissus musculaire lisse qui assurent les mouvements permettant l'excrétion des matières fécales.
- La **séreuse**, est une couche externe, composée par un tissu conjonctif tapissé par un épithélium simple.

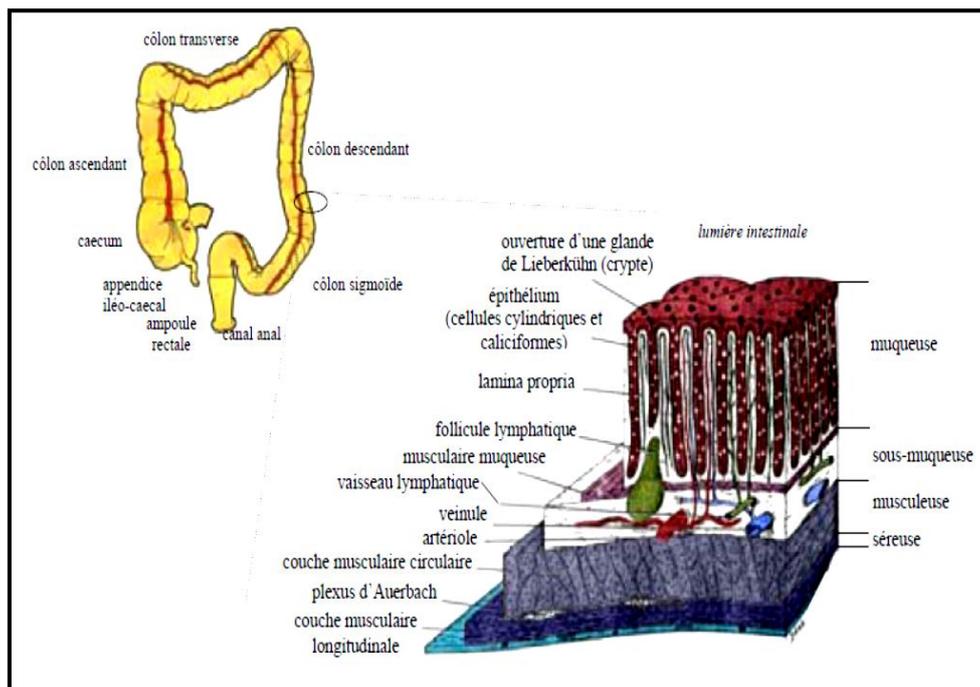


Figure n°1 : Anatomie du cœlon humain et structure de la muqueuse colique
(Scalon et Sanders,1995)

1.2. Mécanisme de la cancérogenèse colique

La cancérogenèse colorectale est caractérisée par une croissance cellulaire incontrôlée au niveau du cœlon et du rectum. Elle désigne ainsi la transition de la situation saine d'un tissu vers les adénomes et adéno-carcinomes. Cette transition est complexe, multigénétique, multiétapes et peut s'étaler sur plusieurs décennies. Au niveau du cœlon, la majorité des cancers sont dits sporadiques (sans historique familial) et seulement 5 à 10% sont de forme génétique. En termes d'incidence et de mortalité, le cancer colorectal se situe au 3ème rang des cancers après le cancer de la prostate et des poumons pour les hommes ; et au 3ème rang des cancers après le cancer du sein et des poumons pour les femmes (WCRF, 2007). En Algérie, Le CCR vient en troisième position avec 11.7 % des cancers masculins et 8.1 % des

cancers féminins avec une incidence brute de 11.5% et incidence standardisée de 13.4% au niveau d'Alger (**Registre des tumeurs d'Alger, 2006**). Ces mécanismes peuvent être divisés en plusieurs phases que sont les phases d'initiation, de promotion, de progression, et d'invasion (**Figure n°2**).

❖ **Phase d'initiation :**

Elle résulte d'une interaction brève et irréversible entre un agent cancérigène et le matériel génétique du tissu cible. La réaction engendre une lésion moléculaire, ou mutation, qui transforme certaines cellules en cellules quiescentes, phénotypiquement indistinctes des autres cellules, mais qui mémorisent une altération génétique qui sera exprimée lors d'une stimulation ultérieure. Cette mutation est due à une absence de réparation ou une réparation incomplète ou non conforme de l'ADN. Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs ont un rôle fondamental dans l'apparition du cancer, puisqu'ils coordonnent le développement et la division cellulaire. Par mutation, ils deviennent des oncogènes en favorisant la prolifération cellulaire (**Weinberg, 1996**). Ces cellules sont donc anormales sans qu'aucune tumeur ne soit encore cliniquement observable, tant que d'autres agents, appelés promoteurs, n'interviennent pas.

❖ **Phase de promotion :**

Les cellules du tiers supérieur des cryptes se divisent, mais sans être éliminées suffisamment rapidement, entraînant l'apparition d'un bourgeonnement, probablement dû à une hypométhylation de l'ADN. Puis la mutation de *K-ras*, gène dont la fonction est essentielle à la signalisation cellulaire dans son état normal, mais qui devient oncogène lorsqu'il est altéré, entraîne une surexpression de la cyclo-oxygénase COX-2, enzyme de synthèse des prostaglandines.

❖ **Phase de Progression :**

Plusieurs étapes mènent à la formation d'une tumeur maligne irréversible. L'instabilité chromosomique, la déficience en enzymes de réparation de l'ADN, et surtout une délétion sur le gène *18q* entraînant une perte de l'expression de *DCC* (Deleted in Colon Carcinoma), un gène suppresseur de tumeur. Une mutation du gène *TP57* entraîne ensuite une perte de la protéine p53, élément central de régulation de la division cellulaire, ce qui mène à un processus dysplasique non contrôlé. Les cellules cancéreuses n'entrent plus en apoptose, et donnent lieu à un amas de cellules anormales désordonnées et hypervascularisées.

❖ **Phase d'Invasion :**

A ce stade, les cellules tumorales sont capables de sécréter des enzymes, comme les métalloprotéases matricielles, qui digèrent les membranes, et permettent ainsi l'invasion des tissus adjacents. Il y a alors dissémination des cellules tumorales par la voie sanguine et le système lymphatique, et formation de métastases (**Weinberg, 1996**).

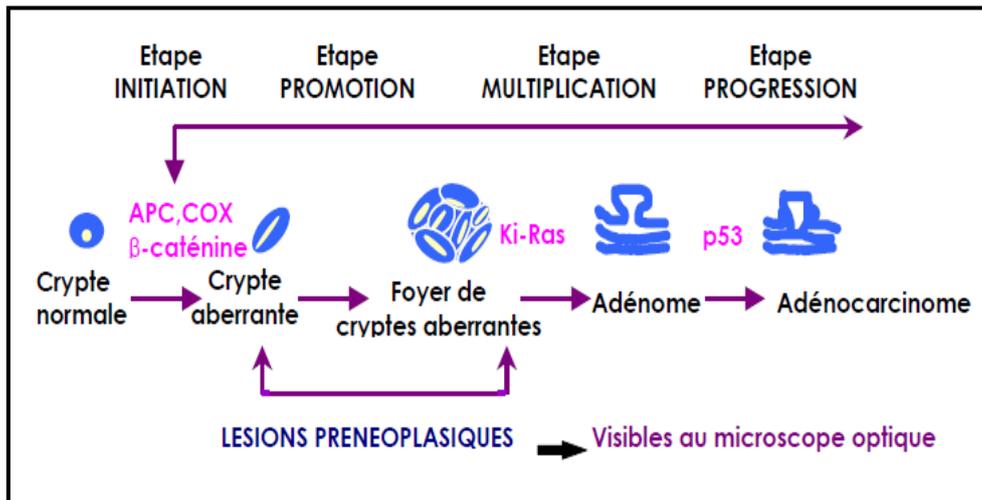


Figure n° 2 : Les différentes étapes de la cancérogenèse colique (**Groubet, 2002**).

1.3. Modèles de cancérogenèse colique

1.3.1. Modèles animaux

Il existe plusieurs modèles animaux permettant d'étudier l'effet d'agents nutritionnels promoteurs, sur la cancérogenèse colorectale. La première étape nécessaire étant que ces animaux développent un cancer ou des lésions précancéreuses, pour qu'il soit possible d'étudier l'effet des aliments qu'ils vont ingérer sur le développement de leur maladie. L'idéal pour être plus proche de ce qui se passe chez l'homme serait d'attendre que les tumeurs se développent spontanément, chez des animaux non mutés génétiquement. Cela a été fait par **Newmark** et son équipe (2009), qui ont montré un effet initiateur et promoteur d'un régime riche en lipides et pauvre en calcium, en vitamine D et en composés méthylé chez des souris (**Yang et al .,2008**). Mais ce type d'étude présente une sérieuse contrainte de temps est très peu utilisée en pratique. Pour pallier ce problème, il existe deux types de modèles animaux qui permettent d'accélérer l'apparition des tumeurs : les modèles chimio-induits, auxquels il a été injecté un cancérigène chimique ; et les modèles génétiques, comme les souris *Min*, mutées sur *Apc*, qui développent spontanément des tumeurs en quelques semaines.

1. Rats induits à diméthylhydrazine (DMH) / azoxyméthane (AOM)

De nombreuses études ont démontré que le traitement par un carcinogène chimique (DMH ou AOM) induit l'apparition des lésions précancéreuses (en 100 jours), et des tumeurs en un an voire plus chez un modèle animal (rats *Wistar*, Sprague-Dawley ou Fisher F344) (Femia et Caderni, 2008). En effet, les deux cancérigènes coliques les plus utilisés sont la DMH et son métabolite l'AOM. La DMH est métabolisée dans le foie en AOM, qui est ensuite transformée en méthylazoxyméthanol. Ce dernier métabolite forme alors des ions méthyl-carbonium CH_3^+ , un électrophile qui provoque des mutations par mésappariements au niveau G-T sur l'ADN. Les tumeurs induites par ces cancérigènes chez le rat ont beaucoup de caractéristiques histopathologiques communes avec les tumeurs humaines. Le développement de lésions préneoplasiques et de carcinomes est similaire, et présentent souvent une mutation sur le gène *K-ras* (30-60%). Comme dans les tumeurs humaines mutées sur *Apc*, ces tumeurs accumulent de la β -caténine dans le noyau, même si, contrairement à ces dernières, elles présentent rarement une mutation *Apc* (8%), et jamais de mutation sur *p53* (Corpet et Pierre, 2005). À l'heure actuelle deux types de lésions précancéreuses se forment à partir de la muqueuse normale : les foyers de cryptes aberrantes (FCA) et les foyers déplétés en mucine (MDF) (figure n°3).

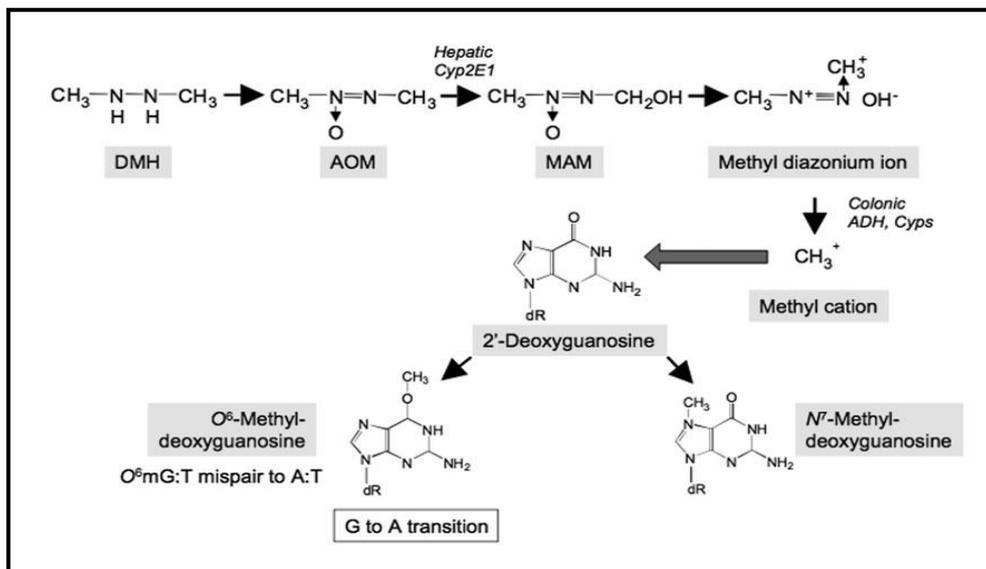


Figure n°3: métabolisme du 1, 2 diméthylhydrazine(DMH) (Rosenberg et al., 2009).

1.3.2. Foyers de cryptes aberrantes (FCA)

En 1987, Bird découvre des lésions dans le colon de rongeurs ayant reçu un carcinogène quelques semaines auparavant. Ce sont des FCA (foyers de cryptes aberrantes). Ces foyers seraient des lésions précurseur de cancer colorectal, se formant avant les adénomes. **Pretlow et al.**, montrent en (1991) que des lésions semblables apparaissent fréquemment sur la muqueuse du colon de patients atteints de cancer, et ce, de façon beaucoup plus importante que dans le colon de personnes autopsiées n'ayant pas présenté de cancer. De plus, ces FCA ont une distribution dans le colon semblable à celle des tumeurs colorectales, apparaissant plutôt dans le colon distal, à la fois chez l'homme et dans le modèle murin. Selon **Cheng et al.**, (2003) parmi les différents types histopathologiques de FCA on trouve des FCA non dysplasiques qui sont caractérisés par une muqueuse normale, pas de modification importante de l'épithélium entourant les cryptes, des cryptes augmentées en taille, avec des noyaux légèrement allongés ou augmentés de taille, pas de stratification, pas de déplétion en mucine. Elles peuvent ne pas être dysplasiques mais seulement légèrement hyperplasiques. En outre, des FCA dysplasiques qui présentent des cellules anormales à différents degrés, avec des noyaux augmentés en taille, allongés, et parfois stratifiés et dépolarisés. Le nombre de cellules caliciformes est fortement diminué. Ces derniers sont communs chez les patients atteints de FAP. Ils apparaissent également chez des patients atteints de cancer colorectal sporadique ; ils ont alors des caractéristiques légèrement différentes (mutations APC, méthylations...). Elles peuvent passer d'un type histopathologique à l'autre comme une sévère dysplasie, et avec des carcinomes invasifs chez le rat. Ces caractéristiques constituent des indices du caractère précancéreux de ces lésions (**Cheng et al.**, 2003).

1.3.3. Foyers Déplétés en Mucine (MDF)

En 2003, **Caderni** et ses collaborateurs mettent en évidence une nouvelle lésion apparaissent chez des rats traités par un carcinogène: les MDF. En observation microscopique après coloration par la procédure High-Iron Diamine Alcian Blue (HID-AB), les MDF ont été identifiés par les critères suivants : Absence ou faible production de mucine, Distorsion de l'ouverture de la lumière des cryptes comparées à celles qui entourent la lésion, élévation de la lésion par rapport à la surface du colon et multiplicité (nombre de cryptes par foyer) supérieur à trois. La caractérisation histologique de ces lésions a montré des signes dysplasiques caractéristiques du cancer du colon. En effet, leur nombre et leur multiplicité sont donc corrélés à la carcinogenèse chez le rat. De plus, contrairement aux ACF, le nombre de MDF a le même ordre de grandeur que les tumeurs observées par la suite (<10 MDF/colon

et 2 tumeurs/colon, en moyenne). Elles seraient donc une sous-catégorie de FCA qui pourrait peut-être prédire l'apparition de tumeurs mieux que les FCA. En 2008, Femia et ses collaborateurs montrent que le nombre total et la multiplicité des MDF sont augmentés par l'acide cholique, tout comme les tumeurs mais contrairement aux ACF.. Comme de nombreuses tumeurs colorectales, les cellules des MDF ont une activation du signal Wnt avec une accumulation de β -caténine dans le cytoplasme et le noyau (Femia et al., 2005).

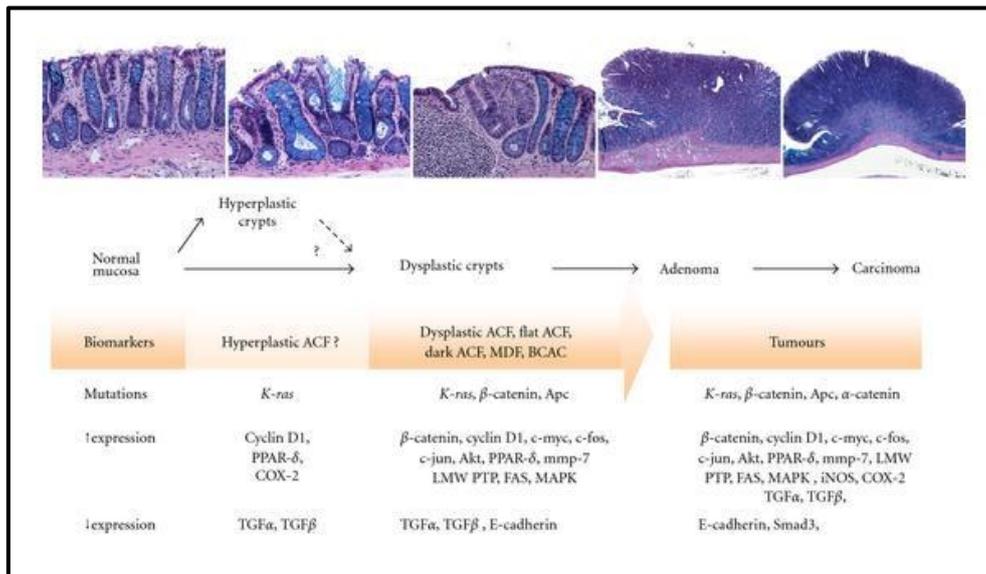


Figure n°4: Altération phénotypique et génétique inclus dans le développement de carcinogénèse colorectale dans un model animale traité par DMH/AOM (Perše, 2005).

1.4. Cancérogénèse et Alimentation

De nombreuses études épidémiologiques ont contribué à mieux appréhender les conséquences de notre alimentation sur les risques de cancer. Globalement, ces études suggèrent l'existence d'une corrélation positive avec des apports élevés en matière grasse, en viande, en sucre, et une corrélation négative avec des apports en fibres, en amidon, et surtout en fruits et légumes (Potter, 1996 ; Riboli et al., 1996). Les études épidémiologiques ont également cherché à préciser le rôle possible de différents nutriments ou composés alimentaires, mais aussi les aspects diététiques plus généraux comme la consommation énergétique totale, les habitudes culinaires ou l'activité physique.

1.4.1. Les graisses et le cancer colorectal

L'étude des conséquences d'une alimentation riche en lipides sur les risques de développement du cancer colorectal a fait l'objet de nombreux travaux. De ce fait, plusieurs études ont montré qu'un régime riche en graisses augmente le nombre de tumeurs chez des rats chimio-induits et chez des souris mutées sur le gène *Apc*, qui sont les deux principaux modèles animaux utilisés pour étudier la cancérogénèse colorectale. Les lipides alimentaires augmentent l'excrétion des acides biliaires détergents et agressifs dans le côlon (**Parnaud et Corpet, 1997**). De plus, un régime riche en graisses augmente le risque d'obésité, facteur de risque du cancer colorectal classé comme « convainquant » par le **WCRF** en **2010**. L'augmentation de l'insulino-résistance est associée à une augmentation du glucose, des acides gras libres, de l'insuline, et d'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) dans le sang. Ces facteurs augmentent la prolifération et diminuent l'apoptose des cellules cancéreuses, ce qui a pour conséquence une promotion de la croissance tumorale (**Calle et Kaaks, 2004**).

1.4.2. Rôle des lipides dans la carcinogenèse colique

Les lipides, ou leurs acides gras, semblent jouer un rôle promoteur dans les cancers colorectaux. La première hypothèse pour expliquer ce rôle s'appuie sur le fait que les graisses sont la source alimentaire la plus concentrée en énergie. L'excès d'énergie serait promoteur de nombre de cancers en favorisant la prolifération des cellules tumorales. Une autre hypothèse suppose que les graisses agissent via les acides biliaires. L'ingestion de graisses déclenche la sécrétion d'acides biliaires dans l'intestin, permettant l'émulsion et l'absorption des lipides. Les acides biliaires primaires sont métabolisés en acides biliaires secondaires par une enzyme de la flore colique, l'alpha-déhydroxylase. Ces derniers sont cytotoxiques, ils induisent une prolifération compensatrice des cellules épithéliales de la muqueuse colique, via le système de la protéine kinase C (**Parnaud et Corpet, 1997**).

De même, les acides biliaires peuvent provoquer des dommages à l'ADN, et pourraient induire des mutations sur le gène *K-ras* impliqué dans la cancérogénèse colorectale. Cox-2 est rarement exprimé dans la plupart des tissus normaux, mais est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses. Cox-2 inhibe l'apoptose dans les cellules cancéreuses et favorise l'angiogenèse. En outre, la bile secondaire (acide docosahexaénoïque) déclenche la production du récepteur de type urokinase et le facteur d'activation est associée à l'augmentation du caractère invasif des cellules Cancéreuse du colon. Néanmoins, ce rôle

promoteur des acides biliaires est controversé car d'autres études montrent qu'ils ne seraient ni des initiateurs ni des promoteurs du cancer colorectal (**Khil et Gallaher ,2004**).

Or la prolifération épithéliale est un aspect important de la promotion des tumeurs. Il semble que l'effet dépende du type d'acide gras, saturé ou non, et de la place de la double liaison pour les polyinsaturés. L'action promotrice des lipides saturés pourrait venir du fait qu'ils sont moins bien absorbés que les acides gras insaturés par la muqueuse de l'intestin grêle. La concentration luminale en acides gras à longue chaîne serait augmentée dans le côlon et favoriserait la prolifération cellulaire.

D'après les expériences réalisées chez le rat, les acides gras mono-insaturés seraient sans effet sur la cancérogenèse colorectale. Les acides gras polyinsaturés de la série n-6 seraient promoteurs, et ceux de la série n-3 inhiberaient au contraire la croissance des tumeurs. Les lipides alimentaires pourraient aussi stimuler directement la prolifération cellulaire, via le diacylglycérol, relargué dans le côlon par l'hydrolyse des triglycérides par les bactéries intestinales. La composition en acides gras du diacylglycérol varie avec le régime lipidique. Il est possible que le type de diacylglycérol ait une influence sur l'activation de la protéine kinase C et donc sur la prolifération cellulaire (**Parnaud et Corpet, 1997**).

1.5. Cancer et le stress oxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle), le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'ADN avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés et ainsi causer des mutations, ou perturber les voies de signalisation régulant la croissance et la mort cellulaires (**Stoicov et al., 2004**). Il est désormais bien établi que des mutations germinales de l'ADNmt jouent un rôle important dans certaines maladies (**DiMauro et Schon, 2001**).

Cependant, contrairement à ces maladies, ce sont des mutations somatiques de l'ADNmt qui sont observées dans les cancers, que ce soit des tumeurs solides ou hématologiques

(Bianchi et al., 1995). Le rôle exact de ces mutations somatiques de l'ADNmt dans le développement et la progression des cancers n'est pas clairement élucidé. Ces mutations pourraient être à l'origine d'une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à la libération de taux anormalement élevés d'EROs. Ces EROs étant responsables de dommages oxydatifs de l'ADNmt, pourraient, à leur tour, altérer la respiration et ainsi générer des taux importants d'EROs. Ce cercle vicieux à l'origine d'une production croissante d'EROs, réalisant une condition de stress oxydatif permanent, serait donc favorable au processus de cancérogenèse **(Wei ,1998)**. En effet, par l'intermédiaire des lésions de l'ADNn qu'elles produisent, en particulier au niveau d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur **Gille et al., (1992)**, les EROs jouent un rôle important dans l'initiation et la promotion de la cancérogenèse. Il n'est cependant pas exclu que les mutations de l'ADNmt survenant au cours des cancers ne soient, en fait, que la conséquence de lésions oxydatives liées à une production accrue d'EROs induite par le processus tumoral lui-même selon un mécanisme qui reste jusqu'alors inconnu **(Ozawa, 1995 ; Laurent,2008)**.

Partie

Experimentale

II. Partie Expérimentale

1. Matériel et Méthodes

1.1. Objectif du travail

L'objectif de cette présente étude consiste à induire un cancer colorectal chez le rat *Wistar* par une voie chimique et nutritionnelle. En déterminant non seulement l'effet initiateur de DMH administrée par voie sous cutanée mais également l'effet promoteur d'un régime riche en graisse « *High Fat* » sur la cancérogénèse colique. Cette étude s'intéresse aussi à comparer l'effet inducteur de deux doses (15mg et 30mg/kg de poids corporel) de 1,2-diméthylhydrazine (DMH).

1.2. Lieu et durée de travail

La démarche expérimentale a été réalisée sur une période allant du 02 Novembre 2014 au 30/4/2015.

Elle a été effectuée au sein des laboratoires suivants :

- ✚ Laboratoire d'Autopsie clinique de l'Institut des Sciences Vétérinaires, «*Université Ibn Khaldoun-Tiaret*».
- ✚ Laboratoire de Technologie Alimentaire, Biochimie, et Zootechnie de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie «*Université Ibn Khaldoun-Tiaret*».
- ✚ Laboratoire de Santé animale de l'Institut des Sciences Vétérinaires, «*Université Ibn Khaldoun-Tiaret*».
- ✚ Laboratoire d'Anatomie Pathologique «*Hôpital de Youcef Damardji-Tiaret*».
- ✚ Laboratoire des Analyses médicales «*Polyclinique de Zaaroura, Dahmouni-Tiaret*».

1.3. Matériel et produits chimiques

Le matériel et les produits chimiques nécessaires à l'accomplissement de ce travail sont cités dans le tableau suivant :

Tableau n°1: Matériel et produits chimiques utilisés

<i>Matériel et appareillages</i>	<i>Réactifs et produits chimiques</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Agitateur magnétique thermique (Stuart) - Bain marie - Balance analytique (Akern Als) - Ultraturax (T25) - Centrifugeuse (Zuzi) - Microscope photonique - Microtome - Spectrophotomètre(JobinYvon Hitachi) - pH mètre - Béchers - Fioles - Gants chirurgicaux - Lames et lamelles - Micropipettes - Pince métallique - Portoirs - Seringues jetables stériles - Tubes à essai - Tubes Héparinés 	<ul style="list-style-type: none"> - 1,2-diméthylhydrazine (Sigma) - Acétone (99%) - Acide phosphorique à 85% - Bleu de coomassie G250 - Sérum albumine de bœuf(BSA) (Sigma) - DTNB (5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque) - Eau distillée - Eau physiologique NaCl (0,9%) - Eosine - Ethanol 95% - Chlorure ferrique (FeCl₃) - Formol 10% - HCL (chlorure d'hydrogène) - Hématoxyline de Harris - N-Acetyl-Cystéine (NAC)(sigma) - Paraffine - Tampon acétate pH 3,6 - Tampon phosphate PBS - Tartate double de sodium (Na₂HPO₄) - Tartrate double de potassium (KH₂PO₄) - Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) - Xylène

1.4. Traitement et suivi des animaux

Des rats *Wistar* mâles adultes (**239,88±24,79g**) de provenance de l'institut Pasteur d'Alger, dès leur réception ces animaux ont été séparés en 3 lots (6 rats par lot), placés dans des cages individuelles et ont été hébergés dans des conditions favorables au sein de l'animalerie du laboratoire d'autopsie clinique de l'Institut des Sciences Vétérinaires (*Université Ibn khaldoun. Tiaret*), où règne une température constante (~25°C) et un éclairage qui varie selon un rythme circadien 12 h jour : 12 h nuit, ces derniers ont eu accès à volonté à l'eau de boisson et à un régime commercial de l'**ONAB** (l'Office Nationale d'Aliment de Bétail, Rahwiya Wilaya Tiaret,) pendant 15 jours. Après cette acclimatation, ces

animaux ont subi, durant 16 semaines (**Figure n°5**), un régime hyperlipidique (HF) et des injections sous cutanées de DMH à 15 ou 30 mg/kg afin d'évaluer l'amplitude de réponse des acides gras sur le développement des lésions précancéreuses par rapport à la concentration en DMH, ainsi 03 groupes ont été distingués :

- ✓ Les animaux du premier groupe (**HGS**) ont reçu simultanément un régime hypergras (HF) contenant 48% de graisse animale d'origine ovine et injections sous cutanées d'une solution saline (**NaCl 0,9%**) (**Groupe témoin**).
- ✓ Les rats du second groupe (**HGD1**) ont été traités simultanément par le régime hypergras (HF) et des injections sous cutanées de **DMH à 15mg/kg**.
- ✓ Les animaux du troisième groupe (**HGD2**) ont été traités simultanément par le régime cité précédemment (HF) avec des injections sous cutanées de **DMH à 30mg/kg**.

Au cours de ce traitement, les animaux ont eu l'accès à volonté à la nourriture et à la boisson. Les poids des rats ainsi que la quantité de nourriture ingérée ont été pesés une fois par semaine.

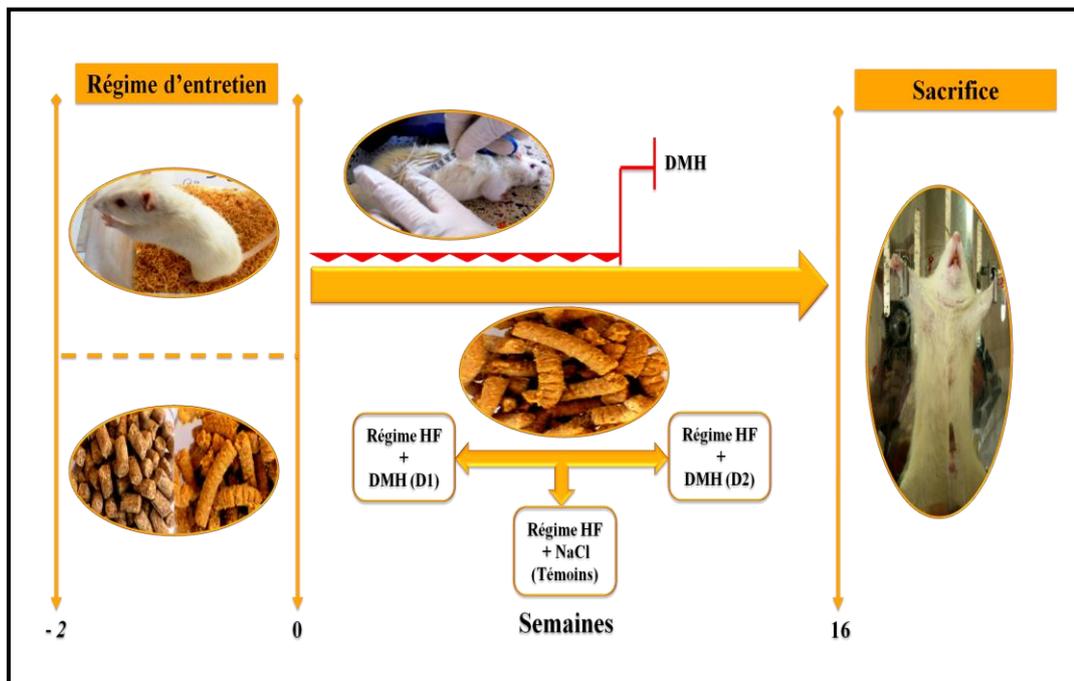


Figure n° 5: Protocole du suivi des rats au cours de l'étude.

1.5. Composition de régime expérimental

Les études réalisées sur des modèles animaux montrent qu'il existe un lien entre les graisses alimentaires et le risque de cancer, plus particulièrement le cancer colorectal. En effet, un régime riche en lipides peut augmenter de façon reproductible l'incidence et le nombre de tumeurs intestinale chez les rats initiés par un cancérigène (Corpet, 2012). Cependant, peu d'études se sont intéressés à confirmer l'effet promoteur des graisses sur la cancérogénèse colique chez le rat *Wistar*. Dans ce contexte, la composition de régime hypergras (HF) ainsi que la constitution en acides gras saturés de la matière grasse utilisée décrite dans les tableaux suivants :

Tableau n° 2: Composition du régime standard et hypergras (Sauvant et al., 2004).

	Standard (%)	Hypergras(%)
Amidon	42,12	2,58
Cellulose	3,34	3,17
Protéines	18,09	15,93
Matière grasse	0	48
Calories (KJ/100g)	410,54	680,95

Tableau n° 3: Profil lipidique de la graisse ovine (Sauvant et al., 2004).

Acide gras	Composition	Pourcentage (%)
A. laurique	C12 :0	0,1
A. myristique	C14 :0	3,3
A. palmitique	C16 :0	25,3
A. palmitoléique	C16 :1	3,4
A. stéarique	C18 :0	19,2
A. oléique	C18 :1	37,5
A. linoléique	C18 : 2 ω -6	2,8
A. α Linoléique	C18 : 3 ω 3	0,6
A. arachidonique	C20 : 4 ω -6	0,2

1.6. Procédure expérimentale

La procédure expérimentale suivie au cours de cette étude est récapitulée dans l'organigramme suivant :

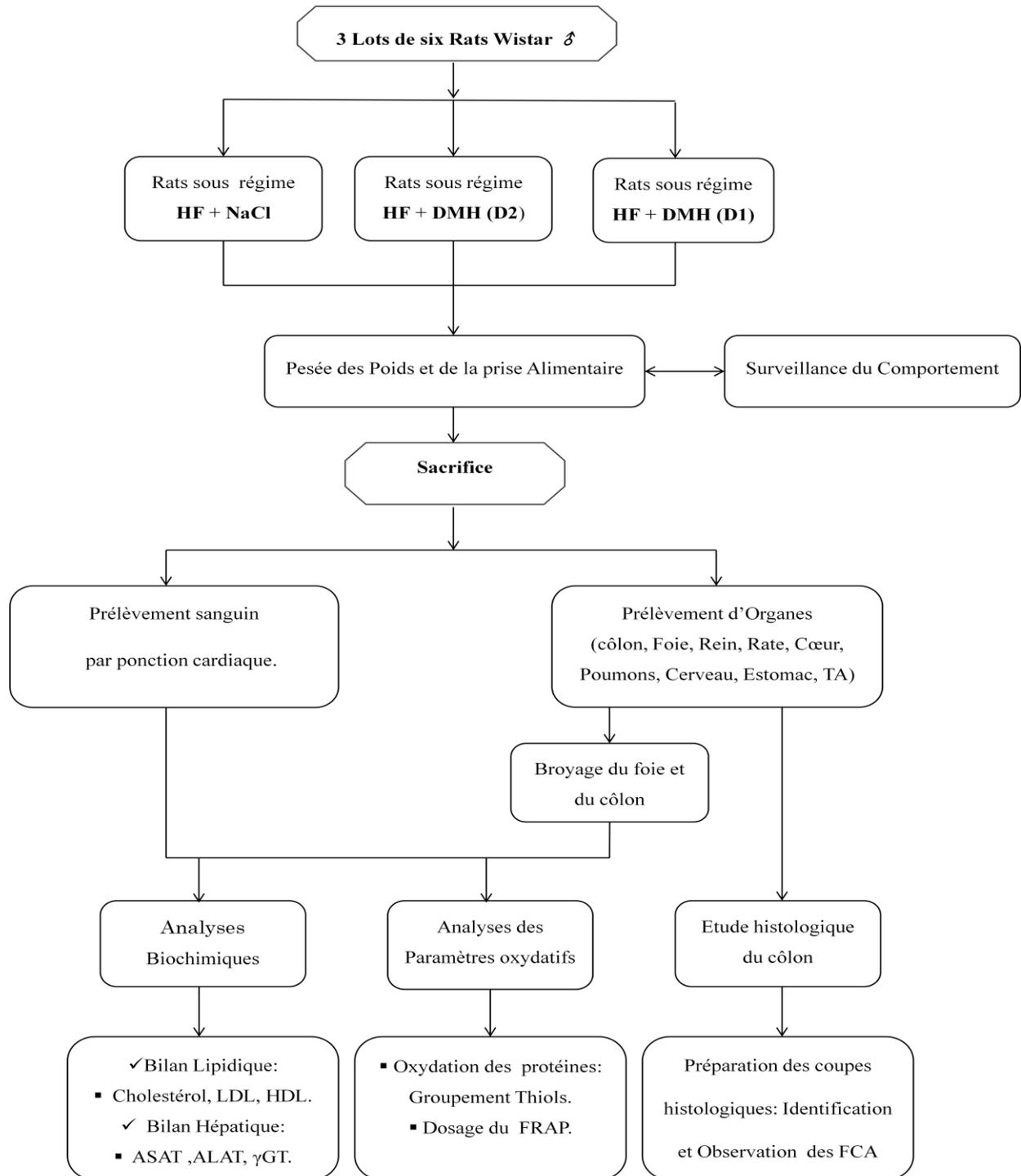


Figure n° 6 : Diagramme récapitulatif de la procédure expérimentale.

1.7. Prélèvement et préparation du matériel biologique

1.7.1. Prélèvement sanguin

Les animaux, à jeun depuis une nuit, sont anesthésiés à l'éther de pétrole par inhalation et sacrifiés. Le sang a été prélevé par ponction intracardiaque et récupéré dans des tubes héparines. Après une légère agitation, les tubes ont été incubés dans la glace pendant 45 min avant d'être centrifugés à 3000 tr/mn pendant 10 min. Le plasma a été ensuite récupéré, aliquoté et conservé à -20°C pour les analyses biologiques ultérieures, concernant les paramètres biochimiques et oxydatifs.

1.7.2. Prélèvement d'organes

Après le prélèvement sanguin, le colon, le cœur, les poumons, le foie, la rate, l'intestin grêle, les reins, le cerveau, le muscle et les tissus adipeux sont soigneusement prélevés, rincés avec l'eau physiologique glacée (NaCl) à 0,9% puis pesés et conservés à -80°C.

1.7.3. Prélèvement du colon pour l'étude histologique

Avant la conservation du colon, ce dernier a été rincé avec une solution saline glacée à 0,9%, puis ouvert longitudinalement et directement fixé au formol à 10% pour l'étude histologique.

1.7.4. Préparation de l'homogénat d'organe

Deux types d'homogénats d'organes ont été préparés selon les tests et les paramètres à déterminer, soient les paramètres biochimiques ou oxydatifs.

1. Préparation de l'homogénat du foie et côlon:

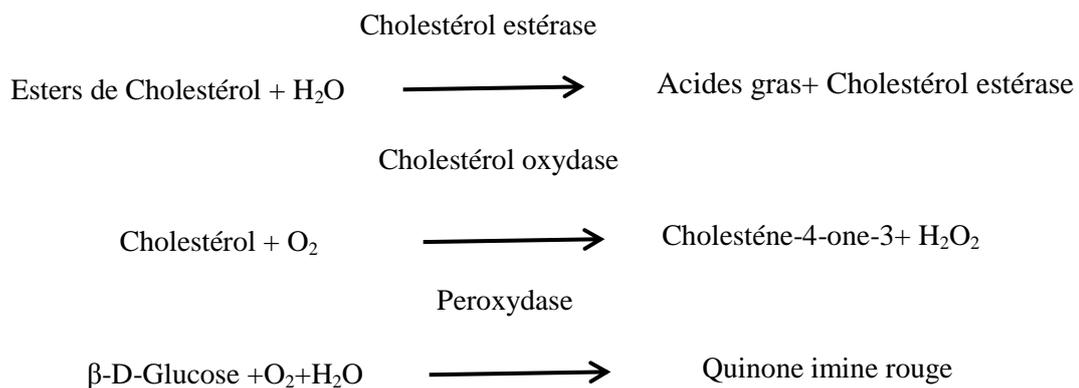
0,5g d'organe (foie, côlon) a été additionné dans 5 ml de tampon PBS à pH 7,4 (le mode opératoire de préparation de tampon PBS est présent dans **l'annexe n°5**). Le mélange a été broyé à l'ultraturax, puis centrifugé à 3000 tours/ min pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré directement dans un tube sec pour les dosages oxydatifs et pour les dosages biochimiques un volume de SDS (1%) a été ajouté. Ce dernier a été incubé une heure dans la glace et conservé à -20°C.

1.8. Dosage des paramètres biochimiques

1.8.1. Détermination des teneurs en cholestérol total

Principe :

Le cholestérol total a été dosé par une méthode colorimétrique et enzymatique (Valdigué, 2000) et ce au niveau du plasma et des homogénats d'organe. Les esters de cholestérol sont hydrolysés par la cholestérol estérase en cholestérol libre et acides gras. Ce cholestérol libre produit et celui préexistant est oxydé par une enzyme cholestérol oxydase en Δ^4 cholesterone et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier en présence de peroxydase, oxyde le chromogène en un composé coloré en rouge. La densité optique du quinonimine colorée mesurée à 505 nm est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol contenu dans l'échantillon est exprimée en g/l (Fasce et al., 1982).



Mode opératoire :

10 μ l de chaque échantillon (plasma ou homogénat d'organe) et l'étalon ont été prélevés et ensuite ajoutés à 1ml de la solution de travail, l'ensemble a subi une homogénéisation à l'aide d'un vortex, le mélange ainsi obtenu a été incubé pendant 10 minutes à 37°C. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 505 nm. Notons que l'étalon a été utilisé afin de quantifier le taux du cholestérol dans les échantillons cet étalon contient une quantité précise de cholestérol qui est de 2 g/l, ce dernier a subi les mêmes conditions expérimentales que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en g/l de cholestérol et calculés selon la formule suivante :

$$\text{Cholestérol (g/l)} = (\text{Densité optique de l'échantillon} / \text{Densité optique de l'étalon}) \times 2 \text{ g/l.}$$

1.8.2. Détermination des teneurs en (High Density Lipoprotein) HDL et LDL (Low Density Lipoprotein).

Principe :

La lipoprotéine LDL du plasma est précipitée par le phosphotungstate en présence d'ions de magnésium (Kit Spinreact, Spain). Après centrifugation à 4000xg pendant 20 min, le surnageant récupéré correspond aux LDL. La lecture se fait à une longueur d'onde $\lambda=505$ nm. Les concentrations en cholestérol des LDL plasmatiques sont déterminées selon la formule de **Friedewald *et al.*, (1972)** :

$$\text{Chol. LDL} = \text{Chol. Total} - (\text{Chol. HDL} + \text{TG}/5, 6).$$

Mode opératoire :

1ml de l'échantillon (plasma ou homogénat d'organe) a été ajouté à 100 μ l de réactif issu de mélange de deux réactif (R1 et R2). Le mélange a été incubé pendant 10 min à température ambiante puis centrifugé 15min à 3500 à 4000 tr et ensuite le surnageant a été dosé par la même procédure de cholestérol total (**Biolabo, 2011**).

1.8.3. Détermination de l'activité des transaminases plasmatiques

Principe :

L'alanine aminotransférase (ALT) est une transaminase connue sous le nom de glutamate-pyruvate-transaminase (GTP). L'ALT catalyse le transfert du groupe aminé de la L-alanine vers l' α -cétoglutarate pour donner du L-glutamate. La détermination de l'activité de l'ALT s'effectue par une méthode cinétique (**Teco, 2007**). La lecture a été faite à une longueur d'onde $\lambda = 340$ nm.

L'aspartate aminotransférase (AST) est une transaminase également connue sous le nom de glutamate-oxalo-acetate-transaminase (GOT). Elle catalyse le transfert du groupe aminé du L-aspartate vers l' α -cétoglutarate pour donner du L-glutamate. La lecture a été faite à une longueur d'onde $\lambda = 340$ nm (**Teco, 2007**).

Acide glutamique + acide pyruvique \longrightarrow acide cétonique + alanine

Aspartate + α -Ketoglutarate \longrightarrow Glutamate + Oxalacetate

Oxalacetate + NADH+H⁺ \longrightarrow Malate +NAD⁺

Mode opératoire :

50 μ l de l'échantillon soit d'origine plasmatique ou d'homogénat a été ajouté à 500 μ l de solution de travail issu d'un mélange de deux réactifs (R1et R2) préparé selon le kit **Biomaghreb**. Puis le mélange a été incubé dans une étuve à 37°C. La lecture de l'absorbance s'effectue après chaque minute pendant 3min à 340nm. Le résultat est exprimé par la différence entre les deux absorbance par min.

1.8.4. Détermination des teneurs en Gamma Glutamyl transférase (γ -GT).

Principe :

L'activité de γ -GT mesurée dans le sérum est presque exclusivement d'origine hépatobiliaire. Son activité est augmentée dans toutes les formes d'atteintes hépatiques. Le γ -GT est le plus sensible des indicateurs enzymatiques pour les maladies hépatobiliaires (**Biolabo, 2011**). La détermination cinétique γ -GT se fait selon la réaction suivante:

Gluta carboxy + glycylglycine \longrightarrow T L-Yglutamylglycylglycine +5amino 2 nitrobinzoate

Mode opératoire :

100 μ l de sérum ou l'homogénat d'organe a été ajouté à 1ml de réactif de travail préparé a partir de deux réactifs (R1etR2) et pré incubé à 37°C. Le mélange (échantillon + réactif) a été incubé pendant 1 min et après chaque minute une lecture de l'absorbance s'effectue pendant 3min à 405 nm. Le résultat est exprimé par la différence entre les deux absorbance par min.

1.8.5. Dosage des protéines totales (méthode de Bradford)

Principe :

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectrophotométrique utilisée pour déterminer la concentration des protéines en solution. Cette méthode repose sur la propriété du bleu de Coomassie à se lier, en milieu acide, aux protéines et de former ainsi un complexe de couleur bleu qui absorbe à 595 nm. La concentration des protéines dans les échantillons est déterminée par comparaison à une gamme étalon, réalisée dans les mêmes conditions, avec une solution standard de sérum albumine bovine (**Bradford ,1976**).

Mode opératoire :

100µl du surnageant de l'homogénat d'organe a été homogénéisé avec 5ml de réactif Bradford. Le mélange a été agité et laissé à température ambiante pendant 10 mn à l'abri de la lumière pour la stabilisation de la couleur. La lecture d'absorbance s'effectue à une longueur d'onde de 595nm. Pour la gamme étalonnage est obtenue à partir d'une solution de sérum albumine de bœuf (BSA) (la courbe de la gamme d'étalonnage figure en **annexe n°10**).

1.9. Analyses des paramètres oxydatifs

1.9.1. Détermination du pouvoir antioxydant total par la méthode de FRAP « Ferric Reducing Antioxydant Power »

Principe :

La méthode «FRAP » est une technique colorimétrique développé par **Benzie et Strain (1996)** est basée sur la réduction d'un complexe tripyridyltriazine [(Fe (III)-TPTZ)₂] en un complexe Tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)₂] à faible pH de 3,6 en présence d'un antioxydant (AH). Cette réduction donne une coloration bleue intense avec une absorbance maximale à 593nm.

Mode opératoire :

Ce test est basé sur la mesure de la réduction par le plasma ou l'homogénat d'organe et dans des conditions d'acidité (pH 3,6), d'une solution comprenant du tampon acétate, une solution à base de 2,4,6 Tripyridyl-s-triasine (TPTZ), et un sel ferrique ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$), ce qui provoque la formation du complexe TPTZ- Fe^{++} , de couleur bleue. Une gamme étalon est obtenue à partir d'une solution mère de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 1mM (31,25 μM à 500 μM) (**la courbe de la gamme d'étalonnage figure en annexe n°11**) La solution FRAP est préparée à partir des trois solutions initiales : tampon acétate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2, 3\text{H}_2\text{O}$ et $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) à pH 3,6, TPTZ à 10 mM et $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ à 20mM) et placée à 37°C pendant toute la durée de l'analyse. 100 μl d'échantillons ou de la solution-gammes sont ajoutés à 900 μl de la solution FRAP. La lecture des échantillons se fait après 30 minutes par spectrométrie à 593 nm.

1.9.2. Oxydation des protéines : groupements Thiols (Faure et Lafond, 1995)

L'oxydation des protéines a été déterminée selon Faure et Lafond (1995) par la mesure des groupements thiols dans le plasma. Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfures S-S. Le principe de dosage des groupements SH est basé sur leur réaction avec le 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) pour former un composé coloré ($\lambda = 412 \text{ nm}$). La gamme étalon est obtenue avec une solution de N-Acetyl-Cystéine (NAC) 0,125 à 4 $\mu\text{mol/L}$. 250 μl d'échantillon ou de gamme sont ajoutés à 375 μl de tampon phosphate (pH=08) et 125 μl de DTNB. Après 15 minutes de repos à l'obscurité la lecture est réalisée à 412 nm. (**La courbe de la gamme d'étalonnage figure en annexe n°12**).

1.10. Etude histologique du colon

La technique histologique utilisée est celle décrite par **Martoja (1967)**. Elle a pour but d'identifier les cryptes aberrantes au niveau du colon. Ce processus a suivi les étapes suivantes :

A- Fixation

La fixation représente le temps essentiel de la technique histologique, elle a pour but d'immobiliser les structures en respectant leur morphologie et en les conservant. La fixation s'effectue dans 10% du formol.

B- Déshydratation et inclusion

Une fois le fixateur est éliminé par un rinçage à l'eau distillée, l'étape de la déshydratation a été faite par passage dans des bains successifs et concentrés d'éthanol. Les spécimens sont trempés trois fois d'éthanol (70% ,95% et pure) puis deux fois dans l'acétone et enfin trois fois dans le xylène. un milieu intermédiaire est également requis car la paraffine n'est pas plus miscible, pour cela, les échantillons sont plongés trois bain successifs de xylène. Ces derniers sont ensuite immergés dans deux bains de paraffine pré-fondue à 60°C dans une étuve, puis ils déposés dans des moules à inclusion rempli de paraffine fondue. Une cassette d'inclusion a été identifiée pour chaque organe issu de chaque animal, déposés sur le moule et recouverte de paraffine.

C- Confection des coupes

Après solidification de la paraffine, les blocs formés ont été congelés à -20°C pour être réduit en coupe microscopiques d'épaisseur de 5µm grâce à un microtome. Les coupes sont ensuite collées sur des lames et séchées à température ambiante jusqu'au moment de la coloration.

D- Coloration

Cette étape comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation, elle a été assuré par une succession de bains d'alcools de titre décroissant, après cette réhydratation les coupes subis une coloration nucléaire en utilisant l'hématoxyline et un colorant cytoplasmique, l'éosine.

E- Montage

Le montage " lame-lamelle" se fait en déposant une goutte de baume de canada, ensuite la lecture a été réalisée à l'aide d'un microscope photonique tri-oculaire (Zeiss primo star) couplé a une caméra de type Axiocomer c5S.

1.11. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme de moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). En utilisant logiciel STATISTICA (version 6.1, Statsoft, Tulsa. OK).

La comparaison entre les différents groupes a été effectuée par le test ANOVA à un facteur complété par le test LSD.

Une valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme seuil de signification. On note que :

- Pour un $p < 0,05$ la différence est significative
- Pour un $p < 0,01$ la différence est très significative
- Pour un $p < 0,001$ la différence est hautement significative.

Résultats et Discussions

2. Résultats et Discussions

2.1. Impact du régime hypergras (HF) et de la DMH sur l'évolution de la masse corporelle

Au début de l'expérimentation, les rats utilisés ont un poids initial homogène de $239,88 \pm 24,79\text{g}$ et reçoivent pendant les 16 semaines un régime hypergras (HF) (48%) enrichi en matière grasse animale riche en acides gras saturés. A la fin de l'expérimentation, le poids corporel final des trois lots atteignent une masse corporelle de $(306,00 \pm 22,54\text{g})$ pour les rats témoins (RHG), $(308,8 \pm 36,86\text{g})$ pour les rats soumis au régime (HF) traités par la DMH 15 mg/kg (RHGD1) et $(291 \pm 55,66\text{g})$ pour les rats nourris par le même régime cité précédemment et traités par 30 mg/kg (RHGD2). En notant par conséquent un gain de poids de $(73,50 \pm 20,11, 71,50 \pm 28,21$ et $62,40 \pm 27,95$ respectivement) pour les trois groupes de rats (Figure n°8).

L'évolution des poids corporels, au cours de l'étude, chez les trois lots de rats, est représentée dans la (Figure n°7). Le traitement par la DMH n'induit aucune différence significative entre les trois groupes. Ces résultats corroborent ceux indiqués par d'Eunju et al., (2007).

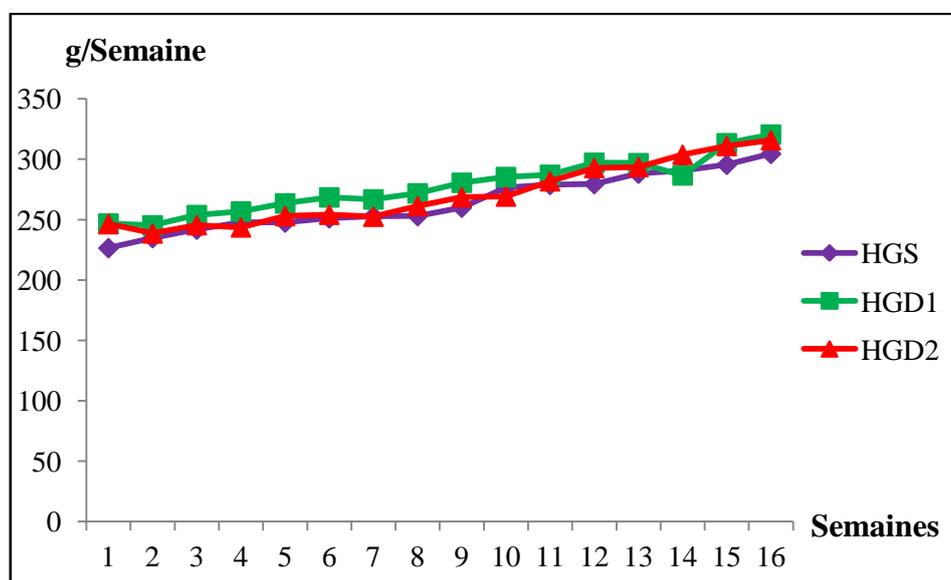


Figure n°7 : Evolution de la masse corporelle des rats durant les 16 semaines de traitement.

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$

HGS :Hypergras+solution Saline, HGD1 :Hypergras+DMH Dose1,

HGD2 : Hypergras+DMH Dose2.

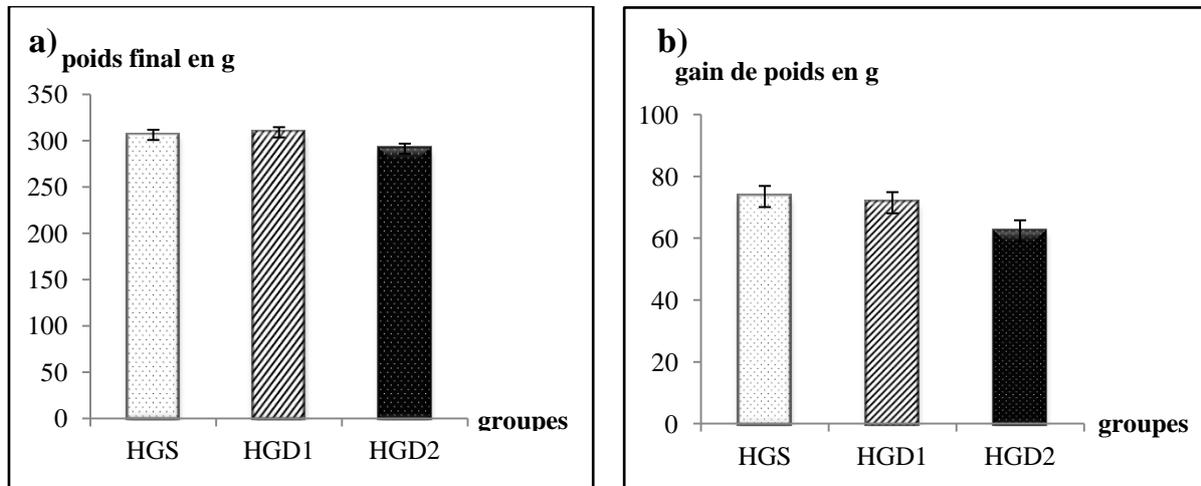


Figure n°8 : a) Poids final b) Gain de poids des rats durant 16 semaines de traitement.

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$

RHGS : Hypergras+solution Saline, RHGD1 : Hypergras+DMH Dose1

RHGD2 : Hypergras+DMH Dose2

2.2. Effet du régime (HF) et la DMH sur la nourriture ingérée et l'apport calorifique des différents groupes

Au cours de la durée d'expérimentation, les animaux du groupe témoin (HGS) ingèrent environ 77.76 ± 13.56 g/semaine soit une quantité d'aliment équivalente à 529.96 ± 103.83 kcal /semaine, une quantité de 78.91 ± 15.23 g soit $537,78 \pm 92.41$ Kcal pour les rats du groupe (HGD1) également les rats du groupe (HGD2) ingèrent une quantité de 78.76 ± 18.39 g équivalente à 537.34 ± 125.18 K kcal/semaine (figure n°9). L'induction par la DMH ne provoque aucune variation sur la prise alimentaire et l'apport énergétique des rats, en effet aucune différence significative n'est observée entre l'apport énergétique ingéré des rats.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de West et York. (1998) ; Roland et al., (2007) qui démontrent à partir de l'expérimentation animale que le pourcentage d'énergie provenant de l'alimentation hypergras est positivement corrélée avec la graisse et qu'un régime alimentaire contenant plus de 30% des apports énergétiques sous forme de lipides entraîne une surcharge pondérale observée chez les rats. Aussi d'autres études démontrent que

les rats nourris avec un régime riche en graisses sont plus sensibles à l'induction de tumeur du côlon par la DMH (Bandaru, 1977).

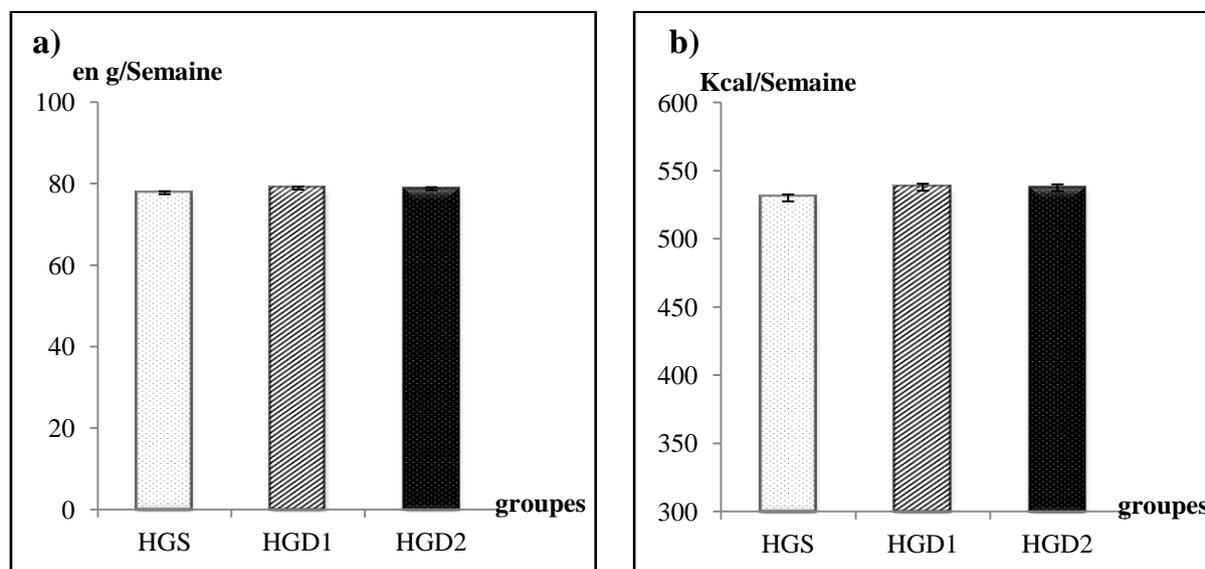


Figure n°9 : a) Nourriture ingérée b) l'apport calorifique des différents groupes durant les 16 semaines de traitement.

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes SEM avec n=6

HGS : HyperGras+solution Saline, HGD1: HyperGras+DMH Dose1,

HGD2 : HyperGras+DMH Dose2

2.3. Effet du régime HF et DMH sur les poids des organes.

Après 16 semaines d'expérimentation, Le poids des organes chez les trois groupes est montré dans le **tableau n°4**. Le traitement par la DMH ne provoque aucune variation significative sur le poids des organes des rats par rapport au groupe témoin. Ceci est en concordance avec les travaux de **Eunju et al., (2007)** et **Al-Henhena et al., (2014)**.

Tableau n° 4 : Poids des organes chez les rats durant les 16 semaines de traitement.

Organes (en g)	HGS	HGD1	HGD2
Colon	3,98±0,71	3,93±0,70	4,31±0,94
Foie	8,45±1,20	8,48±0,96	8,03±1,28
TA	6,25±1,69	5,80±3,36	5,66±1,70
Rate	0,93±0,17	0,94±0,13	1,01±0,27
Intestin	7,36±1,85	5,95±0,98	6,44±1,04
Reins	1,75±0,20	1,76±0,12	1,68±0,21
Poumons	1,96±0,28	2,06±0,65	2,66±0,75
Muscle	2,20±0,66	1,91±1,02	2,36±0,69
Cœur	0,91±0,11	1,00±0,20	0,90±0,12
Cerveau	1,26±0,05	1,40±0,22	1,40±0,25

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes SEM avec n=6

HGS :Hypergras+solution Saline, HGD1: Hypergras+DMH Dose1,

HGD2 : Hypergras+DMH Dose2

2.4. Teneurs des paramètres biochimiques plasmatiques

2.4.1. Impact du régime HF et DMH sur les teneurs plasmatiques en cholestérol, HDL et LDL.

Les résultats d'évaluation de l'impact du régime HF et DMH sur les paramètres biochimiques montrent une augmentation significative ($p < 0,05$) des teneurs plasmatiques en cholestérol observé chez les rats recevant le régime HF et DMH à 15mg/Kg ou 30mg /kg comparés aux rats du groupe témoin (**0,80±0,24 g/l** vs **1,10±0,17g/l**), (**0,80±0,24 g/l** vs **1,08 ±0,14 g/l**).

Parallèlement, une augmentation très significative ($p < 0,01$) de taux plasmatique de LDL est observée chez les rats ayant ingérés un régime HF avec une injection sous cutanée de DMH à 15 ou 30mg/kg, on note respectivement (**0,64±0,16g/l ; 0,56±0,11g/l**) vis-à-vis des rats soumis au HF (**0,41±0,04 g/l**). Néanmoins on note une diminution significative ($p < 0,05$) de la teneur en HDL chez les rats du groupe HGD1 et HGD2 (**0,49±0,06g/l ; 0,52±0,10g/l**) comparée aux rats du groupe témoins (**0,63±0,08g/l**) voir figure n°10.

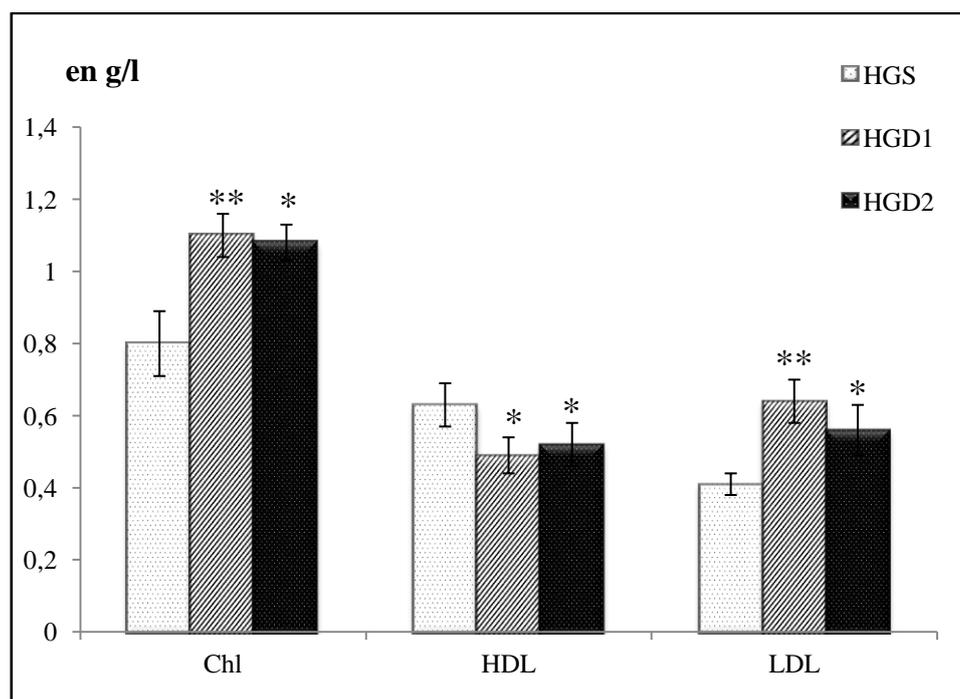


Figure n°10 : Teneurs plasmatique en cholestérol, HDL et LDL chez les rats durant les 16 semaines.

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes SEM avec n=6

***différence très significative HGS vs HGD1 et HGS vs HGD2.*

** différence significative HGS vs HGD1 et HGS vs HGD2.*

HGS :HyperGras+solution Saline,HGD1 :HyperGras+DMH Dose1,

HGD2 : HyperGras+DMH Dose2.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Bandaru et al., (1977)** qui confirment que les animaux nourris un régime riche en graisses ont toujours eu une incidence plus élevée de développer une tumeur du côlon avec une dose 150 mg/kg de DMH, et qu'une forte association entre l'incidence du cancer colorectal d'une part et la concentration élevée d'acides biliaries fécaux et les métabolites de cholestérol chez l'homme d' autre part. D'autres études faites sur l'effet de régime Hypergras et DMH certifient que l'augmentation d'apport de graisse animale améliore les taux d'acides biliaries sécrétés et de cholestérol dans la bile et que les acides biliaries et le cholestérol sont convertis en acides biliaries secondaires et stéroïdes par des bactéries du côlon, qui sont en outre métabolisés par les bactéries du côlon en carcinogènes (**QI et al.,2015**) . Les acides biliaries ne présentent pas d'effets cancérigènes

directs; cependant, ils augmentent le taux d'induction du cancer par des agents cancérigènes via l'accélération du renouvellement cellulaire. Cette étude a montré que la consommation d'une alimentation riche en matières grasses a augmenté de façon significative l'incidence des adénomes et des adénocarcinomes colorectaux. En outre, les acides biliaires induisent l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans des cellules de cancer colorectal. Ainsi la consommation d'un régime riche en graisses ne provoque pas seulement une augmentation de la sécrétion biliaire mais également une résistance à l'insuline. D'autre part l'obésité, une population obèses ayant des niveaux élevés de sucre dans le sang ont presque le double risque de développer des cancers liés à l'obésité, alors que les populations obèses avec le taux de sucre dans le sang normal ne portent pas un risque accru de développer des cancers colorectal (Qi et al., 2015). D'après Pincemail et al., (1999) le dommage oxydatif provoque des changements dans la structure des LDL. La peroxydation induite dans les LDL par les EOA provoque la formation d'aldéhydes (MDA et HNE) qui peuvent à leur tour oxyder les LDL. De même Parnaud et Corpet (1997) démontrent que les lipides pourraient aussi stimuler directement la prolifération cellulaire, via le diacylglycérol, relargué dans le colon par l'hydrolyse des triglycérides par les bactéries intestinales. La composition en acides gras du diacylglycérol varie avec le régime lipidique. Il est possible que le type de diacylglycérol ait une influence sur l'activation de la protéine kinase C et donc sur la prolifération cellulaire.

2.4.2. Impact du régime (HF) et DMH sur les teneurs plasmatique en TGO, TGP et γ GT.

Les résultats d'évaluation de l'impact du régime expérimental et DMH sur les teneurs plasmatiques en TGO et TGP indiquent une variation significative ($p < 0,05$) du groupe HGD2 avec une augmentation de **41,98%** du taux de TGO, de **41,74%** du taux de TGP comparativement au groupe de rats témoins HGS. Suivant les mêmes observations, les rats ayant ingérés le régime HF et administrés par la DMH à 30 mg /kg ne présentent aucune différence significative pour le taux de γ GT en comparaison avec les groupes HGD1 et HGS (Figure n°11).

Dans le foie, les teneurs en TGO et TGP chez les rats du groupe HGD2 sont significativement supérieures que celles des rats témoins HGS. On note respectivement (TGO= **98,23±45,99UI/L** vs **50,03±21,65UI/L**) et (TGP= **21,30±15,66UI/L** vs **9,39±3,90UI/L**) (Figure n°12). En effet, le traitement par la DMH entraîne une

augmentation des taux de TGO et TGP, ceci confirme les travaux menés par **Sorial et al., (2014)** ils ont démontré que ces transaminases sériques sont considérées comme des indicateurs sensibles de lésions hépatiques. L'atteinte hépatique a été indiquée par l'augmentation des niveaux de TGO et TGP.

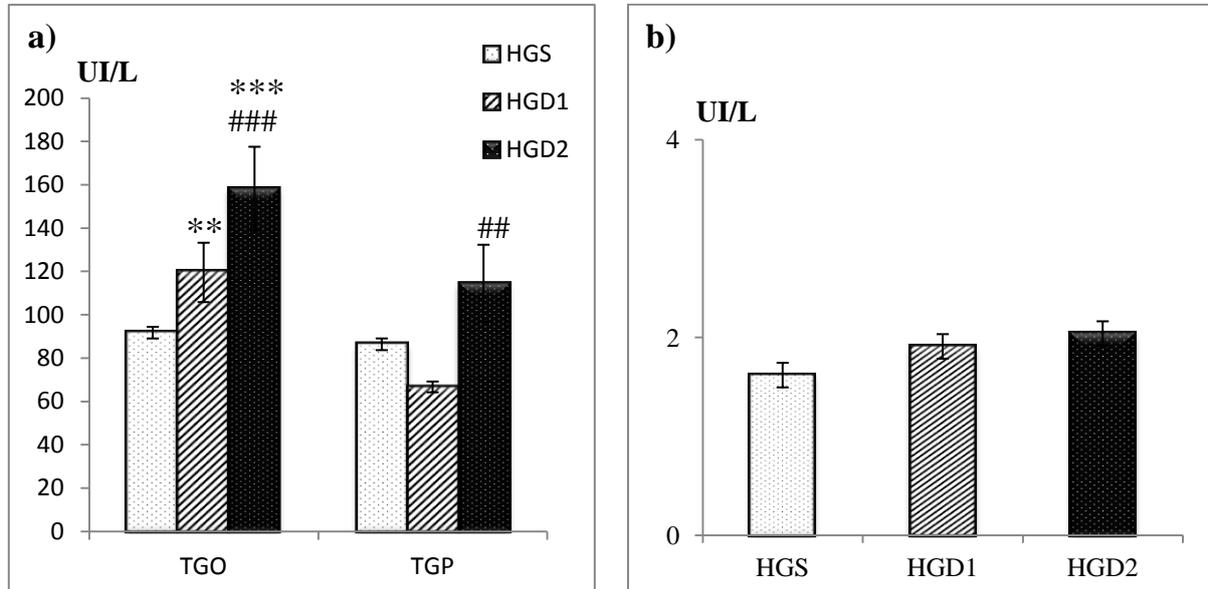


Figure n°11: a) Teneurs plasmatique en TGO et TGP, b) Teneur en γ GT chez les rats durant les 16 semaines.

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes SEM avec n=6

****différence hautement significative HGS vs HGD2.*

***différence très significative HGS vs HGD1.*

###différence hautement significative HGD1 vs HGD2.

##différence très significative HGD1 vs HGD2.

HGS :HyperGras+solution Saline,HGD1 :HyperGras+DMH Dose1,

HGD2 : HyperGras+DMH Dose2.

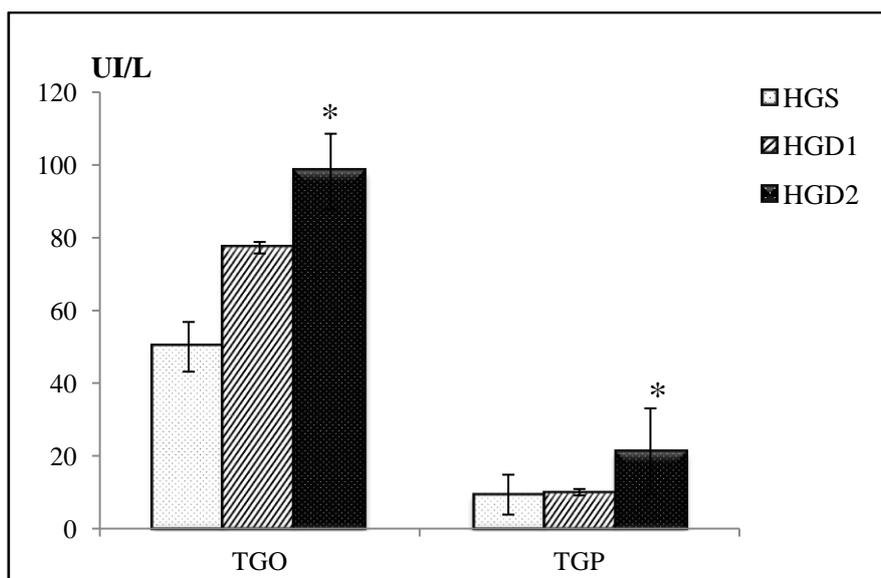


Figure n°12 : Teneurs hépatique en TGO et TGP chez les rats durant les 16 semaines.

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes SEM avec n=6

*différence significative HGS vs HGD1.

HGS :HyperGras+solution Saline,HGD1 :HyperGras+DMH Dose1,

HGD2 : HyperGras+DMH Dose2.

2.5. Evaluation du pouvoir réducteur total au niveau plasmatique et tissulaire

Les résultats du pouvoir réducteur total plasmatique et tissulaire sont représentés dans le **tableau n°5**, ces derniers montrent que l'administration de la DMH influence de manière significative le pouvoir réducteur (PR) au niveau plasmatique et tissulaire. Dans cette étude, une diminution hautement significative observée chez les rats ayant traités par la substance cancérogène DMH (30mg/kg) HGD2 (**97,88±6,23 $\mu\text{mol/l}$**) vis-à-vis des rats du groupe traités par la DMH (15mg/kg) et des rats du groupe témoin (**113,15±7,24 $\mu\text{mol/l}$** ; **115,34±7,28 $\mu\text{mol/l}$**) respectivement.

Dans le foie et colon, le pouvoir réducteur des rats du groupe HGD2 est hautement significativement inférieur à celui des rats témoins HGS. Cette variation est marquée par une diminution de **43,61%** du PRH, et de **45,93%** du PRC notant ainsi une différence significative entre le groupe HGD1 et HGD2 (**18,05±4,76 $\mu\text{mol/g de protéine}$** versus **23,79±2,75 $\mu\text{mol/g de protéine}$**) au niveau hépatique.

Tableau n° 5 : Pouvoir Réducteur Plasmatique ($\mu\text{mol/l}$), hépatique et du colon ($\mu\text{mol/g}$ de protéine) chez les différents groupes de rats après 16 semaines de traitement.

	HGS	HGD1	HGD2
PRP	115,34 \pm 7,28	113,15 \pm 7,24	97,88 \pm 6,23*** ^{##}
PRH	32,01 \pm 5,32	23,79 \pm 2,75**	18,05 \pm 4,76*** [#]
PR du C	288,09 \pm 53,02	159,37 \pm 45,56***	155,75 \pm 46,53***

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes SEM avec n=6

****différence hautement significative HGS vs HGD1 et HGS vs HGD2.*

***différence très significative HGS vs HGD1.*

^{##}différence très significative HGD1 vs HGD2. # différence significative HGD1 vs HGD2.

HGS :Hypergras+solution Saline, HGD1 :Hypergras+DMH Dose1,HGD2 : Hypergras+DMH Dose2.

PRP : pouvoir réducteur plasmatique. PRH : pouvoir réducteur hépatique,

PR du C pouvoir réducteur du colon

Nos résultats montrent que le traitement par la DMH a réduit le pouvoir réducteur au niveau plasmatique et tissulaire. En effet, le cancer du colon chimio induit provoque non seulement la production excessive de radicaux libres, mais aussi la diminution des capacités de défense antioxydantes par la baisse de certaines activités des enzymes antioxydantes (**Hamiza et al., 2012**). Il a été démontré que la DMH (30mg/kg) provoque une diminution dans le pouvoir antioxydant total plasmatique et des modifications de la balance « oxydante-antioxydante (**Eunju et al., 2007**). En effet, la DMH est métabolisée par les enzymes dépendantes des cytochromes P450 du foie et conjuguée par des glucurono-transférases. Au niveau du colon, la déconjugaison par des enzymes bactériennes fécales, les β -glucuronidase, provoque le relargage du méthylazoxyméthanol (MAM) métabolite alors transformé dans les cellules coliques en dérivé extrêmement cancérigène, le méthyldiazonium. Ce composé induit le stress oxydatif via de la méthylation de macromolécules telles que l'ADN et le processus de cancérisation (**Prasad et al., 2014 ;Dadkhah et al., 2014**).

L'évaluation du pouvoir réducteur indique que celui-ci semble être réduit chez les rats du groupe HGD2, due à la forte dose de DMH (30mg /kg). Ces résultats sont en accord avec les travaux d'**Eunju et al., (2007)** qu'ils démontrent qu'un régime riche en lipides et la DMH sont capable d'induire des dégâts cellulaires comparables à ceux provoqués par les radicaux libres, à savoir une augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et des dommages de l'ADN (**Arul et al.,2011**).Ceci a été confirmé par **Perse et al., (2009)**,ces derniers attestent que l'alimentation riche en lipide à des rats traités par la DMH (20mg /kg) démunie l'activité de la SOD et de la catalase au niveau sérique et hépatique (**Devasena et al.,2006**).

2.6. Evaluation de l'oxydation des protéines par le groupement thiols plasmatique et tissulaire

Les résultats d'évaluation de l'oxydation des protéines groupement thiol dévoilent que la DMH et le régime Hypergras induisent une diminution non significative au niveau plasmatique entre le groupe témoin (HGS) et les deux groupes HGD1 et HGD2 (**44,07±28,13 µmol/l vs 35,90±10,02 µmol/l et 35,68±14,30 µmol/l**) tableau n°6.

Parallèlement, une diminution hautement significative ($P < 0,001$) des groupements SH au niveau du foie et du colon est observée chez les rats traités par DMH (30mg/kg), on note respectivement (groupes SH foie = **1,25±0,44µmol/g protéine**; groupes SH colon=**14,07±7,69**) vis-à-vis des rats témoins (groupes SH foie = **4,10±0,6**, groupes SH colon=**32,80±4,35**).

De même, nos résultats indiquent une différence hautement significative des groupements SH au niveau du foie et du colon entre le groupe HGD1 (groupes SH foie =**2,31±0,50 µmol/g de protéine**, groupes SH colon =**14,18±4,99 µmol/g de protéine**) et le groupe témoins HGS (groupes SH foie =**4,10±0,6 µmol/g de protéine** groupes SH colon=**32,80±4,35 µmol/g de protéine** respectivement). Et une diminution très significative des groupements SH au niveau du foie entre le groupe HGD1 (**12,31±0,50 µmol/g de protéine**) et le groupe HGD2 (**1,25±0,44 µmol/g de protéine**).

Tableau n°6 : Oxydation des groupements thiol plasmatique ($\mu\text{mol/l}$), hépatique et du colon ($\mu\text{mol/g}$ de protéine) chez les différents groupes de rats après 16 semaines de traitement.

	HGS	HGD1	HGD2
Groupes SH Plasmatique	44,07 \pm 28,13	35,90 \pm 10,02	35,68 \pm 14,30
Groupes SH Hépatique	4,10 \pm 0,66	2,31 \pm 0,50***	1,25 \pm 0,44***##
Groupes SH du Colon	32,80 \pm 4,35	14,18 \pm 4,99***	14,07 \pm 7,69***

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes SEM avec n=6

****différence hautement significative HGS vs HGD1 et HGS vs HGD2.*

##différence très significative HGD1 vs HGD2.

HGS : Hypergras+solution Saline, HGD1 :Hypergras+DMH Dose1,

HGD2 : Hypergras+DMH Dose2.

Ces données sont en accord avec ceux de **Vincent et al., (2007)** qui montrent que les teneurs en protéines carbonylées augmentent chez les obèses et les patients cancéreux (**Pincemail et al., 1999**). En effet, l'oxydation des protéines est un signe de l'endommagement tissulaire, causé par le stress oxydatif. Elles sont considérées comme des marqueurs de l'oxydation des protéines (**Mayne, 2003**). Ces carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés (particulièrement l'histidine, proline, arginine et lysine) (**Lean et Burn, 2007**). D'après **Adams (2001)**, L'oxydation des protéines peut conduire à la formation d'acides aminés oxydés et de chaînes latérales d'acides aminés altérées avec des carbonyles réactifs. D'autres études, établissent une carte de la carbonylation caractéristique des protéines dépendantes avec une alimentation riche en calories dans le but de fournir un nouvel aperçu de la pathogenèse des maladies métaboliques dérivées de la forte consommation de matières grasses et de glucides raffinés. Les protéines oxydées ainsi que des sites spécifiques de dommages oxydatifs ont été identifiés et discutés pour illustrer les conséquences de l'oxydation des protéines. Les conséquences possibles de ces carbonylations de protéines portent sur la prise de poids excessive et résistance à l'insuline (**El-Shafey et al., 2011 ; Mendez et al., 2014**).

2.7. Effet du régime HF et DMH sur la formation des Foyers de cryptes aberrantes (FCA)

La **figure n°13** ci-dessous indique l'observation macroscopique des colons issus des rats témoins ainsi que des rats traités par la DMH. Les résultats dévoilent que les colons des rats témoins ne présentent aucun changement macroscopique perceptible, cependant des nodules sont détectés lors de l'observation des colons des rats traités par la DMH ; pour approfondir l'investigation apprécier l'effet du DMH sur la formation des cryptes aberrantes, nous avons réalisé des coupes histologiques des colons issus des rats ayant subi le traitement au DMH à raison de 15 ou 30 mg/kg (**Figure n°14**). En effet, les coupes histologiques effectuées sur les colons des animaux témoins (HGS) montrent une architecture normale ; portent une muqueuse de type colique régulier, constituée de glande et de crypte d'architecture homogène (**figure n°14 a**). En revanche, les colons des rats soumis un régime HF et traités par une injection sous cutanée de DMH (15mg/kg) pendant 09 semaines dévoilent une dysplasie légère (**figure n°14 b**). D'autre part, l'analyse des coupes histologiques des colons des rats reçu le régime HF et soumis à la plus forte dose de DMH (30mg/kg) montre des altérations importantes caractérisés par une dysplasie légère et moyenne (**figure n°14 c**).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Bird (1987)** qui a fait l'hypothèse que les FCA soient des lésions pré-néoplasiques. Elles sont spécifiquement induites de façon dose dépendant, par des cancérogènes coliques du type diméthylhydrazine (DMH) chez les rongeurs. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Bird (1987)** qui a fait l'hypothèse que les FCA soient des lésions pré-néoplasiques. Elles sont spécifiquement induites de façon dose dépendant, par des cancérogènes coliques du type diméthylhydrazine (DMH) chez les rongeurs. Ceci a été confirmé par **Mario et al .,(2014)**, ces derniers indiquent que le traitement par la DMH induit l'apparitions des dysplasie légères et modérés chez le rat *Wistar* pendant 15 semaines de traitement .

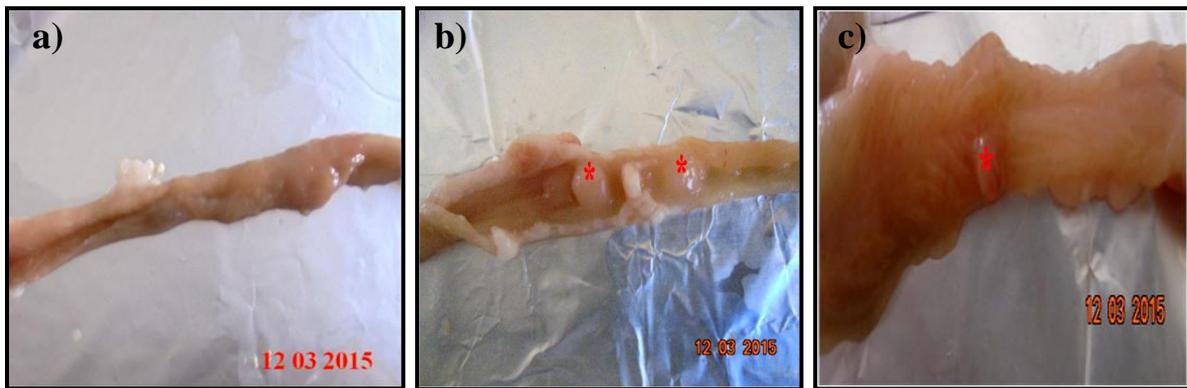


Figure n°13: Aspects macroscopiques des colons des rats témoins (a) et traités par DMH (b : colons des rats du groupe HGD1, c : colon des rats du groupe HGD2 montrant la présence des nodules indiquées par *)

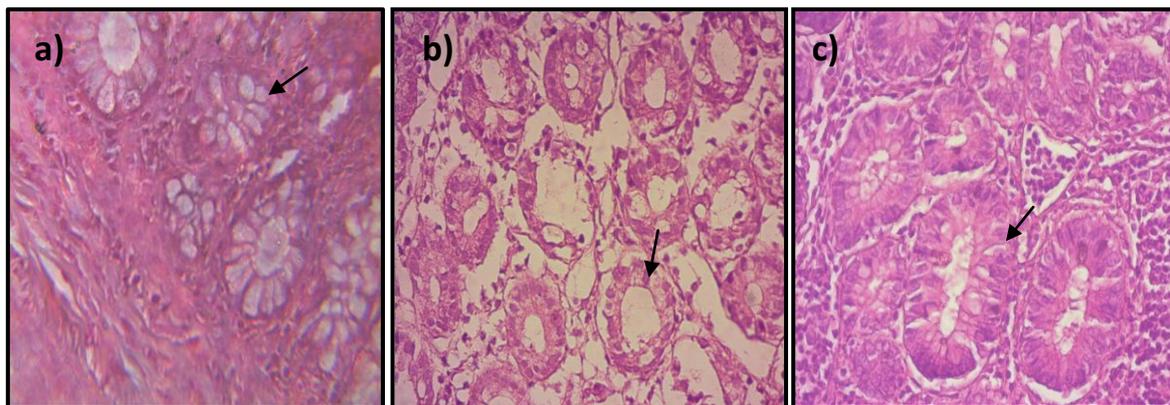


Figure n°14 : Observations microscopiques des coupes histologiques des colons de rats après 16 semaines de traitements (Coloration a H & E, G x40)

- a) Colons des rats du groupe témoin ; b) colons des rats du groupe HGD1;
c) colon des rats du groupe HGD2

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Le cancer colorectal est un problème majeur de santé publique qui nécessite un renforcement des stratégies et potentialités de prévention financières et humaines. Actuellement, l'alimentation influence dans une large mesure le risque de développement d'un cancer colorectal. Cette présente étude s'intéresse à induire, sur un modèle expérimental animal des lésions précancéreuses par un régime hypergras (HF) et par la DMH. Les résultats obtenus après 16 semaines de traitement, révèlent que le régime HF induit des lésions précancéreuses chez les rats traités par la DMH en comparaison avec les rats témoins sous régime hypergras. Ceci est évalué par une augmentation significative des teneurs plasmatiques en cholestérol ($0,80 \pm 0,24$ g/l vs $1,10 \pm 0,17$ g/l) et ($0,80 \pm 0,24$ g/l vs $1,08 \pm 0,14$ g/l), en LDL ($0,41 \pm 0,04$ g/l vs $0,64 \pm 0,16$ g/l ; $0,56 \pm 0,11$ g/l) et des teneurs plasmatique et hépatique en TGO et TGP (TGO= $50,03 \pm 21,65$ UI/L vs $98,23 \pm 45,99$ UI/L) et (TGP= $9,39 \pm 3,90$ UI/L vs $21,30 \pm 15,66$ UI/L). En revanche, ils influencent le statut antioxydant des rats en provoquant une diminution hautement significative du pouvoir réducteur plasmatique ($115,34 \pm 7,28$ μ mol/l vs $97,88 \pm 6,23$ μ mol/l) et en groupement thiol ($44,07 \pm 28,13$ vs $35,68 \pm 14,30$) en comparaison avec les rats témoins.

Parallèlement, les rats soumis à un régime hyperlipidique et traités par la plus forte dose de DMH (30mg/kg) favorisent le développement des foyers de cryptes aberrantes en comparaison avec des rats induits par la faible dose de DMH (15mg/kg) et des rats témoins.

L'ensemble de ces résultats démontrent que ce régime a un effet promoteur sur le cancer du colon et peut être par conséquent proposé comme un régime impliqué dans le développement de la cancérogénèse colique chez un modèle expérimental animal chimio induit par la plus forte dose de DMH (30mg/kg). Cependant, il est clair que des tests supplémentaires et des investigations plus profondes sont nécessaires à entreprendre afin de consolider ces résultats. Ainsi dans la continuité de ce présent travail plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Il est fort intéressant de:

- ❖ Quantifier les foyers de cryptes aberrantes (FCA) et foyers déplétés en mucine (MDF)
- ❖ Evaluer l'impact de ce régime et DMH sur la peroxydation lipidique
- ❖ Suivre l'expression par immunohistochimie de quelques biomarqueurs précoces du cancer colorectal tels que l'AFP , COX-2 et la β -cathénine.

Références
Bibliographiques

A

Adams S., Green P., Claxton R. (2001). Réactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways, *Frontiers in Bioscience A*,(6): 17-24.

Al-Henhena N., Rozaida P.Y.Y., Salmah I., Najm W., Shaden A., Khalifa., El-Seedi Habdulla M.A.(2014).Chemopreventive Efficacy of *Andrographis paniculata* on Azoxymethane-Induced Aberrant Colon Crypt Foci *In Vivo*, *Journal of PLOS ONE*,(9):1-12.

Arul.A.B., Savarimuthu I.,Alsaif .M .A., Al Numair K. S.(2012).Multivitamin and mineral supplementation in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis and evaluation of free radical status, antioxidant potential, and incidence of ACF, *NRC Research Press*,(90):45-54.

B

Bandaru.S., Reddy.K.,Watanabe and Weisburger .J. H.(1977).Effect of High-Fat Diet on Colon Carcinogenesis in F344 Rats Treated with 1,2-Dimethylhydrazine, Methylazoxymethanol Acetate, or Methylnitrosourea, *Cancer Res*,(37):4156-4159.

Bastide N.M., Fabrice H.F., Pierre., Corpet D.E. (2012).Heme Iron from Meat and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis and Review of the Mechanisms involved,*Cancer Prev Revs*,4(2) 43-50.

Benzie F., Strain J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry* (239):70-76.

Bianchi M.S., Bianchi N.O.,Bailliet G.(1995). Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients, *Cytogenet Cell Genet*, (71):99-103.

Biolabo.(2011).Cholesterol-HDL(PTA),les Hautes Rives 02160,Maizy,France.

Bird R.P. (1987).Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings, *Cancer letters*, (37):147-151.

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

C

Caderni G., Femia A.P., Giannini A., Favuzza A., Luceri C., Salvadori M. (2003).

Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis, *Cancer Res*,63(10):2388-92.

Calle E.E., Kaaks R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms, *Nat Rev Cancer*, Aug,4(8):579-91.

Cheng J.L., Futakuchi M., Ogawa K., Iwata T., Kasai M., Tokudome S., Hirose M., Shirai T. (2003). Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2- dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett*, (196):161-168.

Chua A. C.G., Borut Klopčič., Lawrance Ian C., Olynyk J. K., Debbie Trinder.(2010). Iron: An emerging factor in colorectal carcinogenesis, *World J Gastroenterol* , 16(6): 663-672.

Cohen C., Cardoso J.F. R., Garcia .S.B., Vannucchi H. (2014). Vitamin E Supplementation in Chemical Colorectal Carcinogenesis: A Two-Edged Knife, *Journal nutrients*,3214-3229.

Corpet D.E.(2012), Mécanismes de l'effet pro-cancer des viandes : revue bibliographique, *Revue Méd Vét*, 163 (1) : 43-48.

Corpet D. E., Pierre F. (2005). How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men, *European Journal of Cancer* (41):1911–1922.

D

Dadkhah .A., Fatemi .F., Malayeri .M., Jahanbani .A., Batebi .F., Ghorbanpour. Z.(2014).The Chemopreventive Effect of *Nigella Sativa* on 1,2-dimethylhydrazine-induced Colon Tumor, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 48:39-48.

Delage B., Bairras C., Buaud B., Pallet V ., Cassand P.(2005). A high-fat diet generates alterations in nuclear receptor expression: Prevention by vitamin A and links with cyclooxygenase-2 and b-catenin, *Int. J. Cancer*, (116): 839-846.

Devasena T. V. P., Menon., Rajasekharan, K. N .(2006).Prevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione during colon carcinogenesis., *Pharmacological Reports*, (58): 229–235.

DiMauro S , Schon E.A, (2001),mitochondrial DNA mutations in human disease.*Am J Med Genet*,(106) :18-26.

Dingeon B.,Ann. Biol.Clin (1975) . Kit biomaghreb, 33, 3.

E

El-Shafey.A.F., ALEXANDER E., ARMSTRONG J. R. TERRIL L.,MIRANDA D., GROUNDS P. G., ARTHUR .(2011). Screening for increased protein thiol oxidation in oxidatively stressed muscle tissue, *Free Radical Research*, Early Online, 1-9.

Eunju P., Jeon.G.I., Park.J.S .,Paik.D.H.(2006).A probiotic strain *Bacillus polyfermenticus* Reduces DMH Induced Precancerous Lesions in F344 Male Rat, Department of food and nutrition, Kyungnan University;masan,569-574.

F

Fasce C.F., Clin.Chem. (1982). 18901.Kit biomaghreb.

Faure .P.,Lafond J.L. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as possible indicator of protein oxidation, *Analysis of free radicals in biological systems*, 237-248.

Femia A.P, Bendinelli B, Giannini A et al. (2005). Mucin-depleted foci have *beta-catenin* gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2- dimethylhydrazine-treated rats. , *Int J Cancer (116)*: 9-15.

Femia A .P., Paulsen j .E .p., Dolara. Alexander j, Caderni G. (2008).Correspondence between Flat Aberrant Crypt Foci and Mucin-depleted Foci in Rodent Colon Carcinogenesis. *Anticancer research* (28): 3771-3776.

Fossati P., prencipe I., Clin.Chem. (1982).28, 2077 Kit biomaghreb.

Friedwald T.W., Fredrickson D.S .,Levy R.J. (1972). LDL cholesterol estimation. *Clin Chem. (18)*: 499-501.

G

Gille J.J., Joenie H, Cell. (1992). culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia *multat Res*, (275): 14-405.

Groubet. R, (2002), etude de l'action de la vitamine A sur le risque de cancer colique lie a une surcharge lipidique, Université bordeaux, P159.

Guangying Q., Tang .B.O., Zhou. L., Jikihar. H., Kiwata. A., Sakamoto. Y., Tang. F., Xiao. S., Wang. Z. Wu .Q, Lu. H. Wu .Z., Zeng. S., Shimamoto.F.(2015). Effects of high-fat diet on 1, 2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colorectal tumours in rats, *Biomedical Reports* (3): 289-294.

H

Hamiza O.O., Rehman M. U., Rehan Khan M. T., Khan A. Q., Farrah A. A. L., Sultana S. (2012). Amelioration of 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) Induced Colon Oxidative Stress, Inflammation and Tumor Promotion Response by Tannic Acid in Wistar Rats .*Asian Pacific J Cancer Prev*, 13 (9): 4393-4402.

K

Khil, J., Gallaher D. D. (2004). Beef tallow increases apoptosis and decreases aberrant crypt foci formation relative to soybean oil in rat colon. *Nutr Cancer*, (50): 55-62.

Kuhnowski D. F., Bauters P. F. (2005). La revue de praticiens : Cancerologie, onco-hématologie, tsunami Lile, P896.

Kuratko. C ., Pence B. C. (1991). Rat Colonie Antioxidant Status: Interaction of Dietary Fats with 1,2-Dimethylhydrazine Challenge 1-2, *Biochemical and molecular roles of nutrients*, (90): 278-282.

L

Laurent P. (2008),mutation de l'AND mitochondrial et cancer colorectal,revue gastroenterologie clinique et biologique,1(29) :33-44.

Lean M.E J, Burn J. (2007). Tentatives pharmacologiques et nutritionnelles pour corriger le stress oxydatif. Journées annuelles de diabétologie de l'Hôpital Dieu. 1-10.

M

MacFarlane A.J., Stover PJ. (2007). Convergence of genetic, nutritional and inflammatory factors in gastrointestinal cancers, Nutr Rev Dec,65(12 Pt 2):157-66.

Mario J. J., Bruno C. B., Davi S. C., Antenor T. L. (2014).Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats, Journal of Coloproctologie, 3 4(3):167–173.

MartojaP. M., Martoja R. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale : Masson et Cie ed, P377.

Mayne S.T. (2003). Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research, J Nutr. 133(3):933 - 940.

Meddah.D., Meddah.B., touil A .T., Ghalek M., Sahraoui T. (2009). Etude épidémiologique du cancer du colon chez des patients de l'ouest algérien. Journal of African Cancer, 31-35.

Mendez I., Pazos M., Molinar-toribio E., Sanchez-martos V., Gallardo J.M., Rosa nogues M., Torres J.I., Medina I. (2014). Protein Carbonylation Associated To High-Fat High-Sucrose Diet And Its Metabolic Effects.,

Moghadasian. M. H., Freeman. H. J., Godin D. V. (1996).Endogenous antioxidant status in neoplastic and adjacent tissues in 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats: effects of olsalazine, Oxford University Press, (17):983-98.

N

Newmark H.L., Yang K., Kurihara N., Fan K., Augenlicht L.H., Lipkin M. (2009). Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer. *Carcinogenesis*. Jan, 30 (1):88-92.

O

Oshio H.A., Onogawa T. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates cyclooxygenase-2 gene transcription through bile acid transport in human colorectal cancer cell lines. *J Gastroenterol* (3): 538-549.

Ozawa T. (1995). Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta*, (1271):89-177

P

Parnaud.G., Corpet D.E. (1997). Cancer colorectal : le rôle controversé de la consommation de viande, Université de Toulouse, Aliments & Cancer, INRA ENVT, Toulouse, France, 84(9) :899-911.

Perse M ., Cerar A. (2011). Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-14.

Perse M, Injac R, Strukelj B, Cerar A. (2009). Effects of high-fat mixed-lipid diet and exercise on the antioxidant system in skeletal and cardiac muscles of rats with colon carcinoma, *pharmacological reports*, (61):909-916.

Perše M ., Cerar A.(2005). The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat - experimental colorectal carcinogenesis, *radiol oncol*, 39(1): 61-70.

Pincemail .J., Meurisse .M., Limet .R., Defraigne .J. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin, *Vaisseaux, Cœur, Poumons* ,4 : 5.

Prasad Ganga .V., Shishir Kawade. B. S., Jayashree, Neetinkumar D., Reddy Albi Francis., Pawan.G., Nayak, Anoop Kishore.K., Nandakumar.C., Mallikarjuna Rao and Rekha R., Shenoy.(2014). Iminoflavones Combat 1,2-Dimethyl Hydrazine-Induced Aberrant Crypt Foci Development in Colon Cancer, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International ID 569130, 7 pages.

Pretlow, TP., Barrow.B.J., Ashton V.V.S et al.(1991). Aberrant Crypts: Putative Preneoplastic Foci in Human Colonic Mucosa, *Cancer Research* march, (51): 1564 -1567

Potter J.D. (1996). Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes and Control*, (7): 127- 146

Potter, J.D., Slattery M.L., Bostick R.M., et al. (1993). Colon cancer: a review of epidemiology, *Epidemiologic Reviews*, 15(2), 499-545.

Q

Qi G., Bo Tang., Zhou L., Jikihara. H., Kiwata . A., Sakamoto Y., Tang F., Xiao S., Wang Z., Wu Q., Lu H., Wu., Shimamoto F. Z.(2015). Effects of high-fat diet on 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colorectal tumours in rats, *Biomedical Reports* (3): 289-294.

R

Registre des tumeurs en Algerie. (2006).

Riboli E, Decloître F, Collet-Ribbing C. (1996). Alimentation et cancer - Evaluation des données scientifiques, Edition Lavoisier, Tec et Doc, Paris.

Rosenberg .D.W., Giardina.C., Takuji T.(2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 30(2):183-196.

Roland B., Imerich J. S., Bollheimer L. C. (2007). High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents, *Metabolic Disorders in Rodents*, Buettner, Scho" Imerich, and Bollheimer, *Obesity* 798S-808S

S

Saladin K.S.(2014).Human Anatomy,Mc Graw Hill,NewYork,P736.

Samir I., Abou-Shafey A., Masoud A., Elgendy S. (2011). Cancer chemopreventive potential of the Egyptian flaxseed oil in a rat colon carcinogenesis bioassay - implications for its mechanism of action, Asian Pacific Journal Cancer Preview, (12) 2385-2392.

Sauvant D., Perez J.P., Tran G. (2004). Table de la composition de valeur nutritive des matières destinées aux animaux d'élevage ,2^{ème} revue et corrigé ,16,rue claude bernard 75231 ,paris Cedex 05.

Scalon V.C., Sanders T(1995). Essentials of anatomy and physiology, 2nd Edition, Ed. Davis FA,P591.

Sorial A., Moharib., Abd El Maksoud N., Ragab H. M., Shehata M.M.(2014). Anticancer activities of mushroom polysaccharides on chemically induced colorectal cancer in rats, Journal of Applied Pharmaceutical Science., 4(07): 054- 063.

Srihari T. ; Balasubramaniyan V. ; Nalini N. (2008). Role of oregano on bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental colon carcinogenesis, Canadian journal of physiology and pharmacology , 10(86): 667-674.

Stoicov C., Saffari R., Cai X., Hasyagar C., Houghton J. (2004). Molecular biology of gastric cancer: Helicobacter infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling Gene,(341):1-17.

T

Teco diagnostics. (2007). ALT (SGPT) Kinetic Method TC Matrix, Anaheim, 1268 N. Lakeview Ave.

Teco diagnostics. (2007). AST (SGOT) Kinetic Method TC Matrix, Anaheim, 1268 N. Lakeview Ave.

V

Valdigué P.(2000).Biochimie Clinique,2^{ème} édition ,Allée de la Croix Bossée F-94234, Cachan cedex, P356.

Vincent H.k., Innes K.E., Vincent K.R. (2007) .Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9(6):813-839.

W

WCRF. WCRF/AICR Systematic Literature Review Continuous Update Project Report : The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer. WCRF and American Institute for Cancer Research, Washington DC.

Weinberg R.A. (1996). How cancer arises. *SciAm*, 275(3): 62-70. Review.

West D.B., York B. (1998).Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models, *American Society for Clinical Nutrition* 505S–512S.

Wei Y.H.(1998).oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging,*Proc Biol Med* (217):53-63.

Williams C. S., Mann M., Du Bois R. N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development, *Oncogene* (18):7908 – 7916.

Y

Yang K., Kurihara N., Fan K., Newmark H., Rigas B., Bancroft L., et al. (2008). Dietary induction of colonic tumors in a mouse model of sporadic colon cancer,*Cancer Res*, 68(19):7803-10.

Z

Zhu Q .C., Gao R .Y., Wu W., Guo. B., Peng. J.Y., Qin H. L, (2014), Effect of a high-fat diet in development of colonic adenoma in an animal model, *World J Gastroenterol* 7:20(25):8119-8129.

Annexes

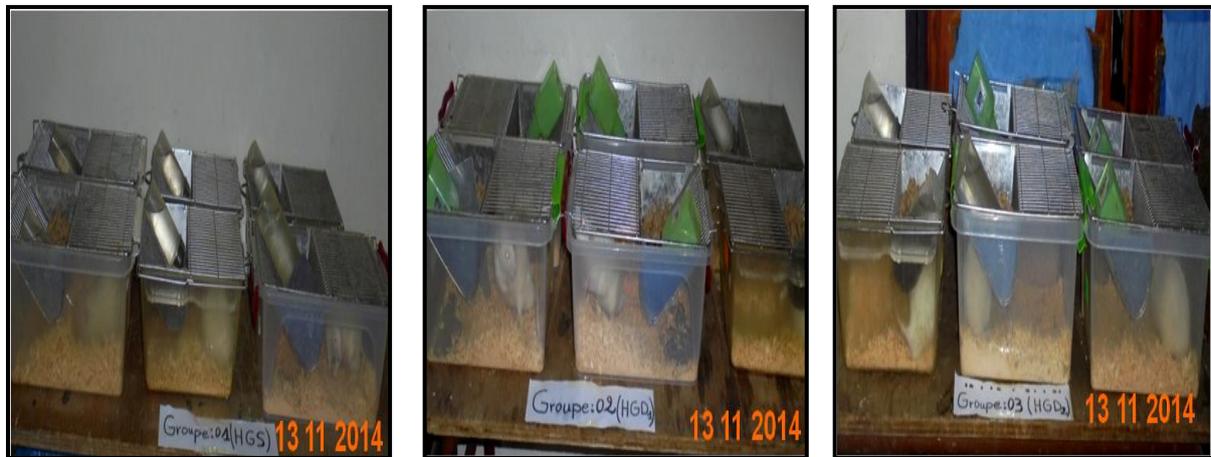


Figure n°1 : répartition des rats *wistar* en trois groupes.



Figure n°2 : Pesé des rats.



Figure n°3 : Rats des trois groupes avant le traitement.

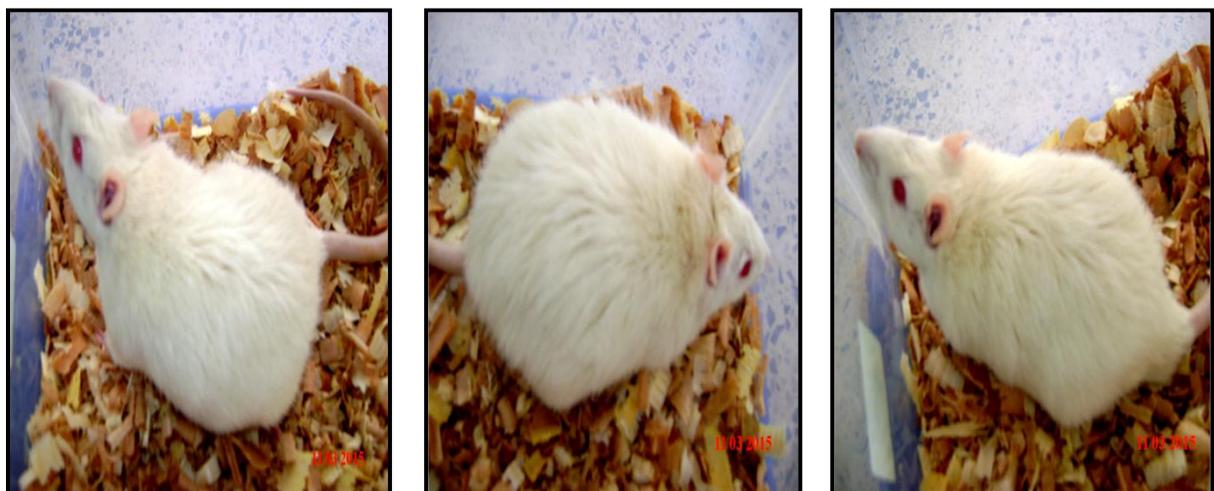


Figure n°4 : Rats des trois groupes après 16 semaines de traitement.

II.1. Composition de régime hypergras

Régime hypergras	Poids sec en%
Tourteau de soja	31
Son de blé	13
calcaire	0.5
CMV	1
'huile végétale	5.5
Phosphate bicalcique	0.5
Matiere grasse	48

II.2. Régimes étudiés**Figure n°5: Aspect du régime standard.****Figure n°6 : Aspect du régime hypergras (HF).**

III.1. Valeurs nutritives de son de blé (Sauvant et al., 2004)**Son de blé dur**

Coproduit de la transformation de grains de blé dur (*Triticum durum* L.), constitué principalement de fragments d'enveloppes et particules de grains dont la plus grande partie de l'albumen a été enlevée (N=142).

Toutes les valeurs sont exprimées par rapport au produit brut sauf indication contraire.

Composition élémentaire		Acide gras	
	Moy	ET	
Matière sèche (%)	86.6	1.1	AG totaux /matières grasses (%)
Protéine brute (%)	14.6	1.1	80
Cellulose brute (%)	10.1	1.1	
Matière grasses brutes (%)	4.4	0.4	
Cendres brutes (%)	4.9	0.4	
Cendre insolubles (%)	0.1		
NDF (%)	43.2		
ADE(%)	13.0		
ADL(%)	3.7		
Poids végétales (%)	41.8		
Amidon (%)	19.9	3.3	
Sucres totaux (%)	6.6		
Energie brute (Kcal /Kg)	3970		

Minéraux

	Moy	ET
Calcium (g/Kg)	1.4	
Phosphore (g/Kg)	9.7	
Magnésium (g/Kg)	2.7	
Potassium (g/Kg)	11.9	
Sodium (g/Kg)	0.1	
Chlore (g/Kg)	0.8	
Bilan électrolytique(mEq/Kg)	290	

III .2. Valeurs nutritives de tourteau de soja (Sauvant et al., 2004)

Tourteau de soja

Coproduit d'huilerie obtenu par pression, extraction au solvant et traitement thermique de graines de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) avec réincorporation partielle des coques. « 48 » indique que la teneur garantie en protéines +matières grasses est de 48% sur brut (N=10409). Toute les valeurs sont exprimées par rapport au produit brut sauf indication contraire.

Composition élémentaire			Acide gras		
	Moy	ET		%AG	g/Kg
Matière sèche (%)	87.8	0.6	Acide myristique C14:0	0.1	0.0
Protéine brute (%)	45.3	1.0	Acide palmitique C16:0	10.5	1.5
Cellulose brute (%)	6.0	0.5	Acide palmitoléique C16:1	0.2	0.0
Matière grasses brutes (%)	1.9	0.4	Acide stéarique C18:0	3.8	0.5
Cendres brutes (%)	6.4	0.5	Acide oléique C18:1	21.7	3.0
Cendre insolubles (%)	0.3	0.3	Acide linoléique C18:2	53.1	7.4
NDF (%)	12.2	1.7	Acide linoléique C18:3	7.4	1.0
ADE(%)	7.3	1.9	AG totaux /matières grasses (%)	75	
ADL(%)	0.7	0.4			
Poids végétales (%)	19.1	2.3			
Amidon (%)	0.0				
Sucres totaux (%)	8.3	1.1			
Energie brute (Kcal /Kg)	4130	130			
minéraux			Vitamines		
	Moy	ET		Moy	
Calcium (g/Kg)	3.4	0.9	Vitamine E(mg/Kg)	4	
Phosphore (g/Kg)	6.2	0.5	Vitamine B1-Thiamine (mg/Kg)	6	
P phytique /p total (%)	60		Vitamine B2-riboflavine (mg/Kg)	3	
Magnésium (g/Kg)	2.9	0.3	Vitamine B6-pyridoxine (mg/Kg)	6	
Potassium (g/Kg)	21.1	1.5	Niacine (mg/Kg)	39	
Sodium (g/Kg)	0.3	0.5	Acide pantothénique (mg/Kg)	16	
Chlore (g/Kg)	0.5	0.9	Acide folique (mg/Kg)	0.59	
Soufre (g/Kg)	4.0		Biotine (mg/Kg)	0.27	
Bilan cations-anion (mEq/Kg)	289		Choline (mg/Kg)	2545	
Bilan électrolytique (mEq/Kg)	539				
Manganèse (mg/Kg)	38	11			
Zinc (mg/Kg)	47	8			
Cuivre (mg/Kg)	18	7			
Fer (mg/Kg)	283	145			
Sélénium (mg/Kg)	0.20		Autres		
Cobalt (mg/Kg)	0.26			Moy	
Molybdène (mg/Kg)	4		Activité phytasique (IU/Kg)	20	
Iode (mg/Kg)	0.15				

III.3. Valeurs nutritives de l'huile végétale (Sauvant et al., 2004).

Huiles Végétales

	Tournesol
Acides gras (% AG totaux)	
C6+C8+C10	
C12:O	0.2
C14:O	0.2
C16:O	6.3
C16:1	0.4
C18:O	4.3
C18:1	20.3
C18:2 ω-6	64.9
C18:3 ω-3	0.3
C20:O	
C20:1	
C22:1	
Vitamines	
A (1000UI/Kg)	0.3
D (1000UI/Kg)	0
E (mg/Kg)	625
K (mg/Kg)	0
Énergie brute EB (Kcal/Kg)	9380



Figure n° 7 : Matériel utilisé



Figure n° 8 : Ponction cardiaque



Figure n° 9 : Dissection des rats

Préparation de 1 litre de solution PBS (1X) :KH₂PO₄0,51 g

NaCl7,3 g

Na₂HPO₄1,6 g

La solution est ajustée à pH 7,4 avec la solution de HCl ou KOH.

Préparation de solution SDS :

SDS 1 g

L'eau distillée 100 ml

L'agitation de la solution.

Préparation du Tampon phosphate à 0,05 :**Solution A:**KH₂PO₄ 3,4 g

L'eau distillée 500 ml

La solution A est ajustée à PH 8,00 avec la solution de HCl ou KOH.

Solution B :Na₂HPO₄3,5 g

L'eau distillée 500 ml

La solution B est ajustée à pH 8,00 avec la solution de HCl ou KOH.

Solution AB pour 100 ml :

Solution A 5,5 ml

Solution B 94,5 ml

La solution AB est ajustée à pH 8,00 avec la solution de HCl ou KOH.

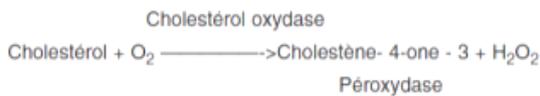
PRESENTATION

Ref. 20111 (360 Tests) R1: 3 x 120 ml R2: 3 flacons (lyoph) R3: 1 x 5 ml	Ref. 20115 (600 Tests) R1 : 6 x 100 ml R2 : 6 flacons (lyoph) R3 : 2 x 5 ml	Ref. 20112 (120 Tests) R1 : 4 x 30 ml R2 : 4 flacons (lyoph) R3 : 1x 4ml	Ref. 20118 (600 Tests) R1 : 5 x 120 ml R2 : 5 flacons (lyoph) R3 : 2x 5ml
---	--	---	--

PRINCIPE

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation. L'indicateur quinoneimine est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du amino 4 antipyrine en présence de phenol et de peroxydase.

Détermination enzymatique selon les réactions suivantes :



La quantité de quinoneimine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol.

REACTIFS

Réactif 1	Pipes pH 6.9	90 mmol/l
Solution tampon	Phenol	26 mmol/l
Réactif 2	Cholesterol oxydase	300 U/l
	Peroxydase	1250 U/l
	Cholesterol esterase	300 U/l
	Amino-4-antipyrine	0.4 mmol/l
Réactif 3		200 mg/dl
Standard		2 g/l
		5.17 mmol/l

PREPARATION ET STABILITE

Dissoudre le contenu d'un flacon de R2 avec un flacon de tampon R1.

Le réactif de travail est stable : 1 mois à 20 - 25°C
4 mois à 2 - 8°C

ECHANTILLONS

Sérum

Plasma recueilli sur héparine

MODE OPERATOIRE

Longueur d'onde :505 nm (500 - 550)

Température :37°C

Cuve :1 cm d'épaisseur

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

CHOLESTEROL

Test enzymatic colorimetric (CHOD- PAP)

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10 µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger, lire les densités optiques après une incubation de 5 min. à 37° C.
La coloration est stable 30 minutes.

CALCUL

$$\text{Cholesterol} = \frac{\text{D.O. Echantillon}}{\text{D.O. Standard}} \times n$$

mg/dl : n = 200

g/l : n = 2

mmol/l : n = 5,17

LINÉARITÉ

La méthode est linéaire jusqu'à 6 g/l (600 mg/dl - 15.4 mmol/l). Si la concentration en cholestérol est supérieure à 6 g/l, diluer l'échantillon au 1/2 avec une solution de NaCl à 9 g/l et refaire le test. Multiplier le résultat par 2.

VALEURS USUELLES

Sérum, plasma	3,6 à 5,7 mmol/l
	1,4 à 2,2 g/l
	140 à 220 mg/dl

BIBLIOGRAPHIE

Trinder P., Ann. Clin. Biochem. 6, 24 (1969)

Richmond, Clin. Chem. 19, 1350 (1973)

Fasce C.F., Clin. Chem. 18901 (1982)



CHOLESTEROL-HDL (PTA) Précipitant

Réactif précipitant pour le traitement des spécimens en vue du dosage quantitatif du Cholestérol-HDL dans le sérum et le plasma humains

REF 86516	1 x 125 mL	Précipitant
	1 x 5 mL	Etalon 1,00 g/L
REF 86536	1 x 30 mL	Précipitant
	1 x 5 mL	Etalon 1,00 g/L

CODE CNQ : MX

SUPPORT TECHNIQUE et COMMANDES

Tel : (33) 03 23 25 15 50

Fax : (33) 03 23 256 256



USAGE IN VITRO

INTERET CLINIQUE (1) (7)

On considère que le rôle majeur des lipoprotéines de haute densité (HDL) est le transfert du cholestérol depuis les tissus périphériques vers le foie. Les HDL exercent un effet protecteur vis à vis de l'athérosclérose en général et en particulier de l'athérosclérose coronarienne. La diminution du taux de Cholestérol-HDL est donc un indicateur de risque athérogène. L'augmentation du rapport Cholestérol Total/Cholestérol-HDL, est significatif d'une augmentation du risque athérogène.

PRINCIPE (8)

Ce réactif est destiné uniquement au traitement des spécimens avant le dosage du Cholestérol-HDL avec un réactif de dosage du cholestérol total.

Les lipoprotéines de faible densité (LDL), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et chylomicrons du spécimen sont précipités par l'acide phosphotungstique (PTA) et le chlorure de magnésium. Le Cholestérol-HDL obtenu dans le surnageant après centrifugation est ensuite dosé par un réactif pour le dosage du cholestérol total (exemple : CHOLESTEROL CHOD-PAP BIOLABO REF 80106).

REACTIFS

flacon R1 PRÉCIPITANT

Acide Phosphotungstique (PTA) 13,9 mmol/L

Chlorure de Magnésium 570 mmol/L

flacon R2 ETALON

Cholestérol 1,00 g/L (2,58 mmol/L)

PRECAUTIONS

Les réactifs BIOLABO sont destinés à du personnel qualifié, pour un usage in vitro.

- Vérifier l'intégrité des réactifs avant leur utilisation.
- Utiliser des équipements de protection (blouse, gants, lunettes).
- Ne pas pipetter avec la bouche.
- En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.
- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (concentration < 0,1%) qui peut réagir avec les métaux tel que le cuivre ou le plomb des canalisations. Rincer abondamment.
- La fiche de données de sécurité peut être obtenue sur simple demande.
- Elimination des déchets : respecter la législation en vigueur. Par mesure de sécurité, traiter tout spécimen comme potentiellement infectieux. Respecter la législation en vigueur.

PREPARATION DES REACTIFS

Le réactif est prêt à l'emploi.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN (6)

Le patient doit être prélevé après 12 h à 14 h de jeûne.

Plasma : collecté sur EDTA. Séparer par centrifugation le plasma des cellules sanguines dans les 3 heures après prélèvement.

Sérum : Séparer par centrifugation le sérum des cellules sanguines dans les 3 heures après prélèvement.

L'oxalate, le fluorure, le citrate ou l'héparine ne conviennent pas.

Le cholestérol-HDL est stable :

- 1 à 3 jours à 2-8° C.
- 1 mois à -20° C.

STABILITE ET CONSERVATION

Stocker à 2-8°C dans le flacon d'origine, bien bouché et à l'abri de la lumière.

- Etalon (flacon R2) : Transvaser la quantité nécessaire, bien
- En l'absence de contamination, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret, s'ils sont utilisés et conservés dans les conditions préconisées.
- La présence d'un dépôt dans le flacon R1 n'est pas un signe d'altération, il sera précipité pendant la phase de centrifugation.

INTERFERENCES (3) (5) (6)

La technique Acide phosphotungstique/Mg²⁺ est moins sujette à l'interférence de l'hyperlipémie que la méthode CDC héparine/Mn²⁺. La méthode est surtout sensible aux conditions de la réaction. Elle peut être affectée par la température ou le temps de séparation « surnageant-précipité ».

Young D.S. a publié une liste des substances interférant avec le dosage

REACTIFS ET MATERIEL COMPLEMENTAIRES

1. Equipement de base du laboratoire d'analyses médicales.
2. Calibrateur HDL / LDL / CK-MB REF 95506 (2 x 2 mL)
3. Sérums de contrôle HDL / LDL / CK-MB (origine humaine)
 - REF 95516 Contrôle HDL / LDL / CK-MB Taux 1 (2 x 2 mL)
 - REF 95526 Contrôle HDL / LDL / CK-MB Taux 2 (2 x 2 mL)
4. Réactif pour le dosage du cholestérol total (exemple : CHOLESTEROL CHOD-PAP BIOLABO REF 80106)..



Made in France

Dernière version : www.biolabo.fr

Version : 27/07/2011

CALIBRATION (10)

- Utiliser l'Étalon du coffret (flacon R2) traçable sur SRM909b, ou équivalent. Ne pas traiter l'étalon et multiplier les résultats par 1,1.
- Ou utiliser le Calibrateur HDL / LDL / CK-MB REF 95506 (sérum humain traçable sur SRM 1951b). Traiter le calibrateur comme un spécimen et ne pas multiplier les résultats par 1,1.
- Volume spécimen : voir le tableau « Technique Manuelle » du § MODE OPERATOIRE

CONTRÔLE DE QUALITE CODE CNQ : MX

- REF 95516 Contrôle HDL / LDL / CK-MB Taux 1 (2 x 2 mL)
- REF 95526 Contrôle HDL / LDL / CK-MB Taux 2 (2 x 2 mL)
- Tout autre sérum de contrôle humain titré pour cette méthode (précipitation avec PTA).
- Programme externe de contrôle de la qualité.
- Il est recommandé de contrôler dans les cas suivants :
 - Au moins un contrôle par série.
 - Au moins un contrôle par 24 heures.
 - Changement de flacon de réactif.
 - Après opérations de maintenance sur l'analyseur.

Lorsqu'une valeur de contrôle se trouve en dehors des limites de confiance indiquées, appliquer les actions suivantes :

1. Répéter le test en utilisant le même contrôle.
2. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, préparer un sérum de contrôle fraîchement reconstitué et répéter le test.
3. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, utiliser un autre flacon d'étalon ou équivalent et répéter le test.
4. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, calibrer à nouveau en utilisant un autre flacon de réactif de dosage du cholestérol total.
5. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, contacter le service technique BIOLABO ou le revendeur local.

INTERVALLES DE REFERENCE (9)

Cholestérol-HDL	g/L	[mmol/L]
Taux faible (facteur de risque)	< 0,40	< 1,04
Taux élevé (facteur protecteur)	≥ 0,60	≥ 1,55

Il est recommandé à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs de référence pour la population concernée.

PERFORMANCES

Avec réactif de dosage du Cholestérol Total (CHOD-PAP) REF 80106 :

Intra-série N = 10	Taux moyen	Taux élevé	Inter-série N = 20	Taux faible	Taux élevé
Moyenne g/L	0,73	1,25	Moyenne g/L	0,41	1,18
S.D. g/L	0,021	0,026	S.D. g/L	0,022	0,064
C.V. %	2,9	2,08	C.V. %	5,3	5,4

Limite de détection : 0,02 g/L.

Sensibilité : environ 0,579 Abs pour 1 g/L.

Comparaison avec méthode de référence :

$$y = 1,01x - 0,01 \quad r = 0,9948$$

LIMITE DE LINEARITE

Avec le réactif BIOLABO Cholestérol Total (CHOD PAP) REF 80106, la réaction est linéaire jusqu'à 2,00 g/L (5,17 mmol/L).

Au-delà, diluer le surnageant avec une solution NaCl à 9 g/L et refaire le dosage en tenant compte de la dilution dans le calcul du résultat.

La limite de linéarité dépend du rapport de dilution spécimen/réactif.

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)**(*) Préparation du Spécimen, Calibrateur et Contrôles sériques :**

Ne pas traiter l'étalon à 1,00 g/L du coffret.

Mesurer dans un tube à centrifuger :	Macro-méthode	Micro-méthode
Spécimen (*)	1 mL	0,5 mL
Réactif précipitant	100 µL	50 µL

Bien mélanger, laisser reposer 10 minutes à température ambiante.
Centrifuger 15 minutes à 3500-4000 TPM. (1500 g)

Appliquer ensuite la procédure ci-dessous.

Dosage :

Avec réactif de dosage du Cholestérol Total BIOLABO (CHOD-PAP) REF 80106 ou équivalent :

Ramener les réactifs et sumageants à température ambiante.

Calibrer avec l'étalon du coffret ou un calibrateur sérique prétraité.

Mesurer dans des tubes à essais bien identifiés :	Blanc	Etalon	Dosage
Réactif	1 mL	1 mL	1 mL
Eau déminéralisée	25 µL		
Etalon 1,00 g/L		25 µL	
Surnageant (*)			25 µL

Mélanger. Laisser reposer 5 minutes à 37° C ou 10 minutes à température ambiante. Lire les absorbances à 500 nm (480-520) contre le blanc réactif. La coloration est stable une heure.

Remarques :

- ✓ (*) Sumageant : Spécimen, Contrôles REF 95516, REF 95526 ou Calibrateur REF 95506 (sérum humain).
- ✓ des procédures spécifiques sont disponibles pour les analyseurs automatiques. Contacter le service technique BIOLABO.

✓ Si après centrifugation, le surnageant reste trouble, répéter l'étape de précipitation sur spécimen dilué (1 + 1) dans NaCl 9 g/L et multiplier le résultat par 2.

CALCUL

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

$$\text{Cas n°1 : Avec Etalon 1,00 g/L du coffret}$$

$$\text{Résultat} = \frac{\text{Abs (Dosage)}}{\text{Abs (Etalon)}} \times \text{Concentration de l'Etalon} \times 1,1$$

L'étalon 1,00 g/L n'étant pas dilué, le facteur 1,1 tient compte de la dilution du spécimen lors de l'étape de précipitation.

$$\text{Cas n°2 : Avec Calibrateur REF 95506}$$

$$\text{Résultat} = \frac{\text{Abs (Dosage)}}{\text{Abs (Calibrateur)}} \times \text{Concentration du calibrateur}$$

La calibrateur étant traité comme les spécimens, il n'est pas nécessaire de multiplier les résultats par 1,1

REFERENCES

- (1) Badimon J. J., Badimon L., Fuster V., Regression of atherosclerotic lesions by HDL plasma fraction in the Cholesterol-fed rabbit. *Journal of clinical investigation*, (1990), 85, p.1234-1241.
- (2) *Clinical Guide to Laboratory Test*, 4^e Ed., N.W. TIETZ (2006) p. 564-569
- (3) YOUNG D.S., *Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests*, 4^e Ed. (1995) p.3-308 à 3-317
- (4) BURNSTEIN M. et Al., *Journal of Lipid Research*, 11, (1970), p.583-595
- (5) LOPES-VIRELLA M. F. et Al., *Clin. Chem.*, (1977), 23/5, p.882-884
- (6) NCEP-NIH Publication N°95-3044 (Sept. 1995)
- (7) Gotto, A.M., *Lipoprotein metabolism and the etiology of hyperlipidemia*, *Hospital Practice*, 23 ; Suppl. 1, 4 (1988)
- (8) TIETZ N.W. *Text book of clinical chemistry*, 3^e Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 819-861.
- (9) *Recommandations de l'AFSSAPS sur la prise en charge thérapeutique du patient dyslipémique*, p.9 (Mars 2005)
- (10) SRM : Standard Reference Material ®

**TECO DIAGNOSTICS**

1268 N. Lakeview Ave.
Anaheim, CA 92807
1-800-222-9880

**AST (SGOT)
KINETIC METHOD
TC MATRIX**

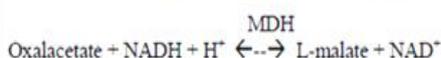
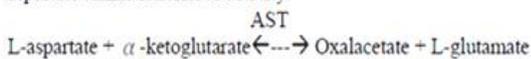
INTENDED USE

For the quantitative determination of aspartate aminotransferase activity in serum or plasma on TC Matrix analyzers.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Aspartate aminotransferase (AST) catalyzes the transfer of the amino group from aspartic acid to α -ketoglutaric acid. This enzyme is found in practically every tissue of the body, including red blood cells. It is in particularly high concentration in the liver, heart and skeletal muscles. Acute destruction of tissue results in the release of AST into the blood stream. Following myocardial infarction there is a significant increase in serum AST activity in about 6 to 8 hours with peak values reached after 48 to 60 hours, however, serum ALT activity remains within normal limits or only marginally increased. In hepatitis and other forms of liver disease associated with hepatic necrosis, both AST and ALT are elevated. Elevated levels of serum AST activity are also observed in infectious mononucleosis, muscular dystrophy, dermatomyositis, and in other forms of muscle and liver injury.

The method presented here is an UV-Kinetic method based on the rate of NADH oxidation in a coupled malic dehydrogenase reaction. The TC Matrix System automatically proportions the appropriate sample and reagent volumes into the cuvette. The system monitors the change in absorbance at 340 nanometers. This change in absorbance is directly proportional to the activity of aspartate aminotransferase in the sample and is used by the TC Matrix System to calculate and express aspartate aminotransferase activity.

**REAGENT CONTENTS:**

Each kit contains: Four Aspartate Aminotransferase reagent 1 (4 x 40 ml)
Four Aspartate Aminotransferase reagent 2 (4 x 8 ml)

Instruction Insert.

REAGENT PREPARATION

No preparation is required.

REAGENT COMPOSITION

α -Ketoglutarate: 16 mmol/L

Malate dehydrogenase (MDH): >600 IU/L

L-Aspartate: 218 mmol/L

NADH: 0.18mmol/L

Also non-reactive chemicals for optimal system performance.

REAGENT STORAGE AND STABILITY

Aspartate Aminotransferase Reagent stored unopened at 2°C to 8°C is stable until the expiration date showed on the bottle label. Once opened, Aspartate Aminotransferase Reagent is stable for 14 days, unless the expiration date is exceeded.

DO NOT FREEZE.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

1. The test can be performed on serum, plasma. For serum, blood is drawn into a tube which does not contain anticoagulant and allow clotting. The serum is then separated from the clot. A maximum limit of two hours from the time of collection is recommended.
2. Separated serum or plasma should not remain at room temperature longer than 8 hours. If assays are not completed within 8 hours, serum and plasma should be stored at 2°C to 8°C. If assays are not completed within 48 hours, or the separated sample is to be stored beyond 48 hours, samples should be frozen at -15°C to -20°C. Frozen samples should be thawed only once. Analyte deterioration may occur in samples that are repeatedly frozen and thawed.
3. For plasma, add whole blood directly into a tube containing anticoagulant. Acceptable anticoagulants are listed in the "LIMITATIONS" section.

CALIBRATION

Calibration is not required.

MATERIALS NEEDED BUT NOT SUPPLIED WITH REAGENT KIT

At least two levels of control material.

LIMITATIONS

1. The anticoagulants Potassium Oxalate, Sodium Fluoride and Sodium Citrate were found to be incompatible with this method.
2. The anticoagulants Ammonium Heparin, EDTA, Lithium Heparin and Sodium Heparin were found to be compatible with this method.

INTERFERENCE

1. Samples showing evidence of hemolysis should not be used.
2. Pyruvate may cause elevated results at a level of 4 mg/dL.
3. Lipemic samples >3+ should be ultra-centrifuged and the analysis performed on the infranate.
4. On this method, refer to the work of Young for a review of drug and comprehensive list of substances effects on Aspartate Aminotransferase level.

EXPECTED VALUE

10 - 42 IU/L or 0.2 to 0.7 μ kat/L

PRECAUTIONS:

1. For in vitro diagnostic use only.
2. Since all specimens are potentially infectious, they should be handled with appropriate precautions and practices in accordance with Biosafety level 2 as recommended by USA NIH manual Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, and in accordance with National or local regulations related to the safety precautions of such materials.
3. Each laboratory has to perform the quality control test to assure the results being reliable before running the specimen tests.

PROCEDURES

TEST NAME:	AST	R1:	200
TEST NO.		R2:	40
FULL NAME:	Aspartate aminotransferase	SAMPLE VOLUME:	24
REFERENCE NO.:		R1 BLANK:	/
ANALY TYPE:	Kinetic	MIX REAG. BLANK:	
PRI WAVE :	340nm	CONCENTRATION:	/
SECON. WAVE:	/	LINEARITY LIMIT:	5 - 400
TREND:	Descending	SUBSTRATE LIMIT:	/
REACT. TIME:	4 - 12	FACTOR:	1768
INCUBATE TIME:	3	PROZONE CHECK:	/
UNIT:	U/L	Q1: / Q2: / Q3: / Q4: /	
PRECISION:	Integer	PC: / ABS: /	

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Range: 5-400 IU/L

For Aspartate Aminotransferase analyte by Aspartate Aminotransferase Reagent on TC Matrix System, this method has been demonstrated to be linear from 5-400 IU/L

Accuracy: Comparison study was performed on TC Matrix System from 40 samples. Beckman Coulter Aspartate Aminotransferase Reagent was used to compare with Aspartate Aminotransferase Reagent. The results of this study in yield a correlation coefficient of 0.99 with a regression equation of $y=0.99X - 2.1$.

Precision: Within Run precision for Aspartate Aminotransferase Reagent Set was determined following a modification of NCCLS EP5-A. Two commercial human serum were assayed on TC Matrix System for 25 times.

Sample	Sample 1	Sample 2
N	25	25
Mean (mg/dl)	42	197
Standard Deviation (mg/dl)	2.2	8.1
Coefficient of Variation (%)	5.9	4.7

Run-Day precision for Aspartate Aminotransferase Reagent was determined following a modification of NCCLS EP5-A. Two commercial human serum were assayed on TC Matrix Systems five times per day for five days for the total of 25 values.

Sample	Sample 1	Sample 2
N	25	25
Mean (mg/dl)	42	196
Standard Deviation (mg/dl)	2.4	8.3
Coefficient of Variation (%)	6.0	4.7

REFERENCES:

1. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. 1974. Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. Scand J. Clin. Lab. Invest. 32:291
2. Expert Panel on Enzymes of the International Federation of Clin. Chem. 1976. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. Clin. Chem. Acts. 70: F19.

3. Tietz, N.W., " Speciman Collection and Processing; Sources of Biological Variation," Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, PA (1994)
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Guideline, NCCLS publication C28-A, Villanova, PA (1994).
5. Henry, J. B., ed., Clinical Diagnostics and Management by Laboratory Methods, 18th Edition, W.B. Saunders, Philadelphia.
6. Tietz, N.W., ed., Clinical Guide to Laboratory Tests, 2nd Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, PA (1990)
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Tentative Guideline, NCCLS Publication EP9-T, Villanova, PA (1993)
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Tentative Guideline, 2nd Edition, NCCLS publication EP5-T2, Villanova, PA (1992)
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation Protocol Number 7, Vol. 4, No. June 1984.
10. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd Ed., AACC Press, Washington DC, 1990, 3-104 thru 3-106.

A559-780TM: 01/07



TECO DIAGNOSTICS
1268 N. Lakeview Ave.
Anaheim, CA 92807
1-800-222-9880

**ALT (SGPT)
KINETIC METHOD
TC MATRIX**

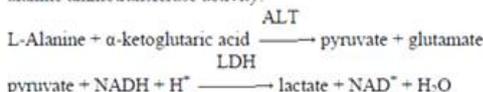
INTENDED USE

For the quantitative determination of alanine aminotransferase activity in serum or plasma on TC Matrix analyzers.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Alanine aminotransferase (ALT) is widely distributed in animal tissue, with the highest concentration present in liver and kidney. Acute destruction of tissue results in the release of ALT into the blood. Serum ALT levels up to 1000 times normal have been observed in cases of acute hepatitis. Less elevated values have been associated with infectious mononucleosis, extra-hepatic, obstructive jaundice and cirrhosis.

The TC Matrix System automatically proportions the appropriate sample and reagent volumes into the cuvette. The system monitors the change in absorbance at 340 nanometers. This change in absorbance is directly proportional to the activity of alanine aminotransferase in the sample and is used by the TC Matrix System to calculate and express alanine aminotransferase activity.



REAGENT CONTENTS:

Each kit contains: Four Alanine aminotransferase reagent 1(4 x 40 ml)
Four Alanine aminotransferase reagent 2(4 x 8 ml)

Instruction Insert.

REAGENT PREPARATION

No preparation is required.

REAGENT COMPOSITION

a-Ketoglutarate: 16 mmol/L
Lactate dehydrogenase (LD): >2300 IU/L
L-Alanine: 500 mmol/L
Tris Buffer: 97 mmol/L
NADH: 0.18mmol/L
Also non-reactive chemicals for optimal system performance.

REAGENT STORAGE AND STABILITY

Alanine Aminotransferase Reagent stored unopened at 2°C to 8°C is stable until the expiration date showed on the bottle label. Once opened, Alanine Aminotransferase Reagent is stable for 14 days, unless the expiration date is exceeded.

DO NOT FREEZE.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

1. The test can be performed on serum, plasma. For serum, blood is drawn into a tube which does not contain anticoagulant and allow clotting. The serum is then separated from the clot. A maximum limit of two hours from the time of collection is recommended.
2. Separated serum or plasma should not remain at room temperature longer than 8 hours. If assays are not completed within 8 hours, serum and plasma should be stored at 2°C to 8°C. If assays are not completed within 48 hours, or the separated sample is to be stored

beyond 48 hours, samples should be frozen at -15°C to -20°C. Frozen samples should be thawed only once. Analyte deterioration may occur in samples that are repeatedly frozen and thawed.

3. For plasma, add whole blood directly into a tube containing anticoagulant. Acceptable anticoagulants are listed in the "LIMITATIONS" section.

CALIBRATION

Calibration is not required.

MATERIALS NEEDED BUT NOT SUPPLIED WITH REAGENT KIT

At least two levels of control material.

LIMITATIONS

1. The anticoagulants Potassium Oxalate, Sodium Fluoride, Sodium Citrate, Sodium Heparin and Lithium Heparin were found to be incompatible with this method.
2. The anticoagulants Ammonium Heparin and EDTA were found to be compatible with this method.

INTERFERENCE

1. Samples showing evidence of hemolysis should not be used.
2. Lipemic samples >3+ should be ultra-centrifuged and the analysis performed on the infranate.
3. On this method, refer to the work of Young for a review of drug and comprehensive list of substances effect on Alanine Aminotransferase level.

EXPECTED VALUE

10 - 40 IU/L or 0.2 to 0.7 µkat/L

PRECAUTIONS:

1. For in vitro diagnostic use only.
2. Since all specimens are potentially infectious, they should be handled with appropriate precautions and practices in accordance with Biosafety level 2 as recommended by USA NIH manual Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, and in accordance with National or local regulations related to the safety precautions of such materials.
3. Each laboratory has to perform the quality control test to assure the results being reliable before running the specimen tests.

PROCEDURES

TEST NAME:	ALT	R1:	200
TEST NO.		R2:	40
FULL NAME: Alanine Aminotransferase		SAMPLE VOLUME:	24
REFERENCE NO.:		R1 BLANK:	/
ANALY TYPE:	Kinetic	MIX REAG. BLANK:	
PRI. WAVE :	340nm	CONCENTRATION:	/
SECON. WAVE:	/	LINEARITY LIMIT:	5 - 400
TREND:	Descending	SUBSTRATE LIMIT:	/
REACT. TIME:	1 - 10	FACTOR:	1768

INCUBATE TIME:	3	PROZONE CHECK:	/
UNIT:	U/L	Q1: / Q2: / Q3: / Q4: /	
PRECISION:	Integer	PC: /	ABS: /

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Range: 5-400 IU/L

For Alanine Aminotransferase analyte by Alanine Aminotransferase Reagent on TC Matrix System, this method has been demonstrated to be linear from 5-400 IU/L

Accuracy: Comparison study was performed on TC Matrix System from 40 samples. Beckman Coulter Alanine Aminotransferase Reagent was used to compare with Alanine Aminotransferase Reagent. The results of this study in yield a correlation coefficient of 0.98 with a regression equation of $y=0.98X -1.2$.

Precision: Within Run precision for Alanine Aminotransferase Reagent Set was determined following a modification of NCCLS EP5-A. Two commercial human serum were assayed on TC Matrix System for 25 times.

Sample	Sample 1	Sample 2
N	25	25
Mean (mg/dl)	39	97
Standard Deviation (mg/dl)	1.7	2.8
Coefficient of Variation (%)	3.7	3.3

Run-Day precision for Alanine Aminotransferase Reagent was determined following a modification of NCCLS EP5-A. Two commercial human serum were assayed on TC Matrix Systems five times per day for five days for the total of 25 values.

Sample	Sample 1	Sample 2
N	25	25
Mean (mg/dl)	38	97
Standard Deviation (mg/dl)	1.5	2.6
Coefficient of Variation (%)	3.7	2.7

REFERENCES:

1. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology, 1974. Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. Scand J.Clin. Lab. Invest. 32:291.
2. Demetio JA, Drewes pA, Gin JB, 1974. Enzymes. In Clin. Chem., Principles and Technics. 2 nd ed. RJ Henry, DC Cannon, JW Winkelman, Editors, Harper & Row, Hagerstown, Maryland. p. 879-888
3. Tietz, N.W., " Speciman Collection and Processing: Sources of Biological Variation," Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, PA (1994)
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Guidline, NCCLS publication C28-A, Villanova, PA (1994).
5. Henry, J. B., ed., Clinical Diagnostics and Management by Laboratory Methods, 18th Edition, W.B. Saunders, Philadelphia.
6. Tietz, N.W., ed., Clinical Guide to Laboratory Tests, 2 nd Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, PA (1990)
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Tentative Guideline, NCCLS Publication EP9-T, Villanova, PA (1993)
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Tentative Guideline, 2nd Edition, NCCLS publication EP5-T2, Villanova, PA (1992)
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation Protocol Number 7, Vol. 4, No. June 1984.
10. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd. Ed., AACC Press, Washington DC, 1990, 3-104 thru 3-106.

A524-780TM : 01/07

X.1. Courbe d'étalonnage Bradford dans le Foie.

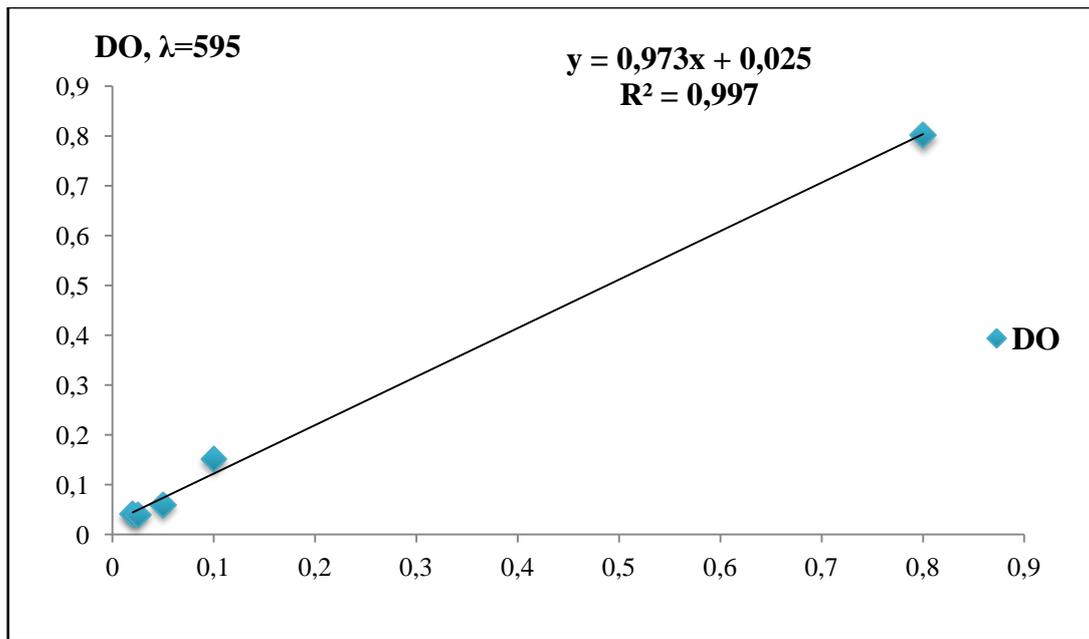


Figure n° 10 : Courbe d'étalonnage de BSA.

X.2. Courbe d'étalonnage Bradford dans le Côlon.

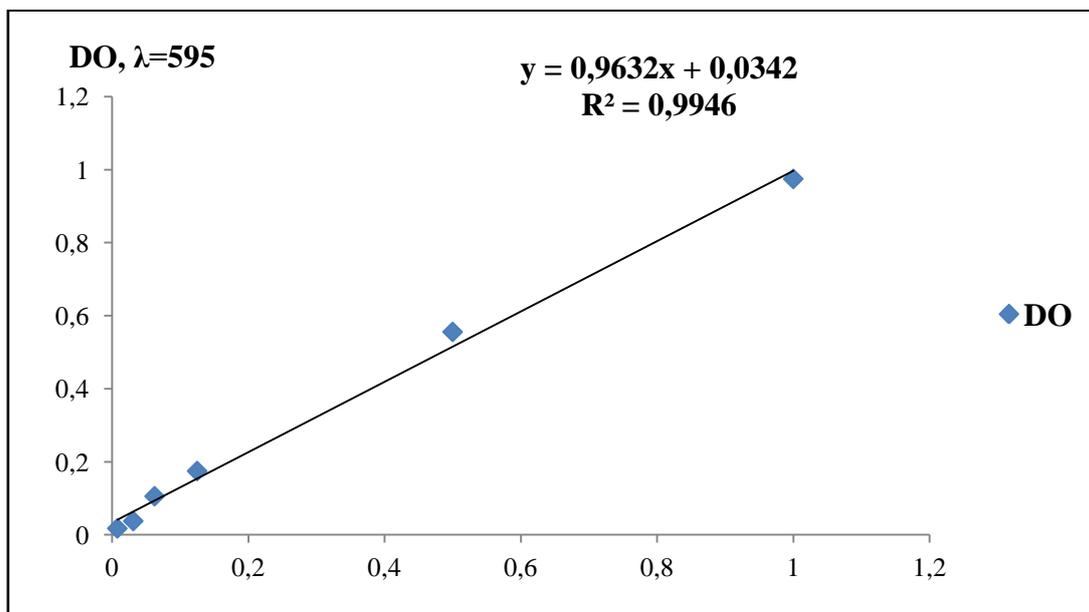
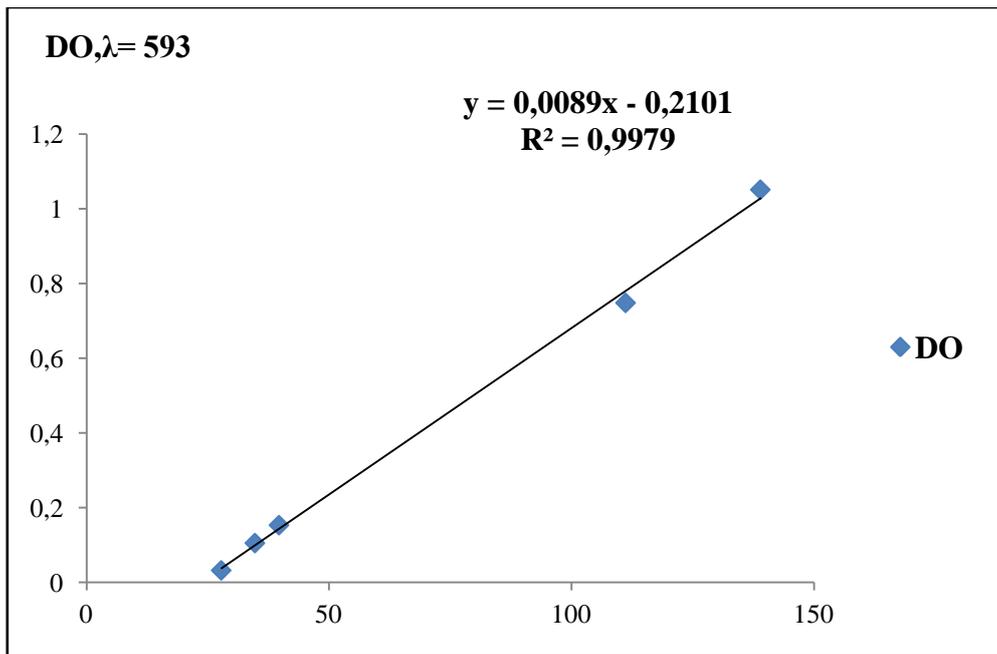
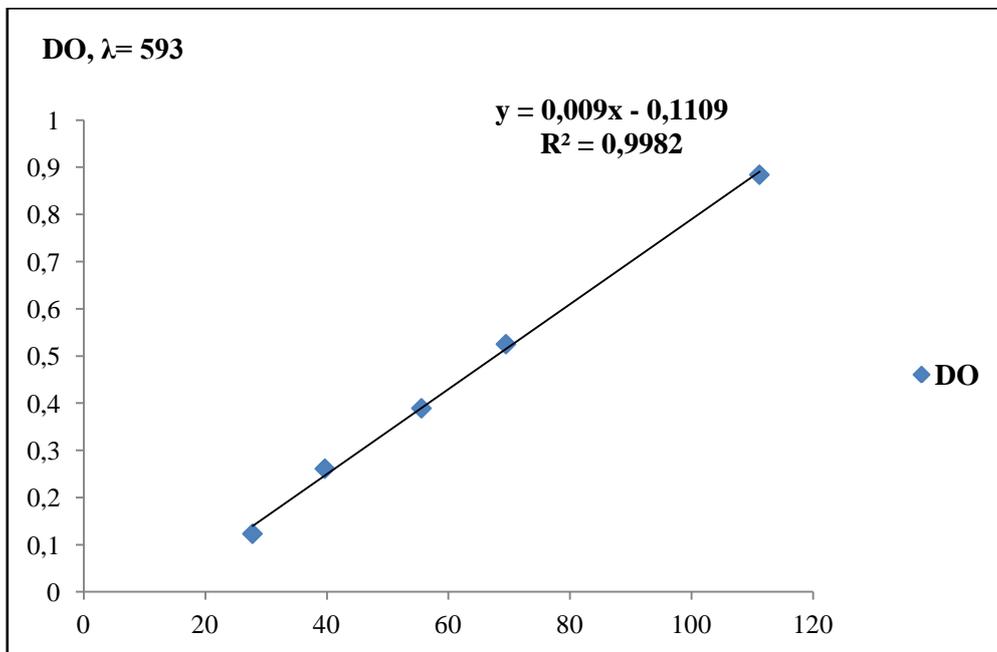


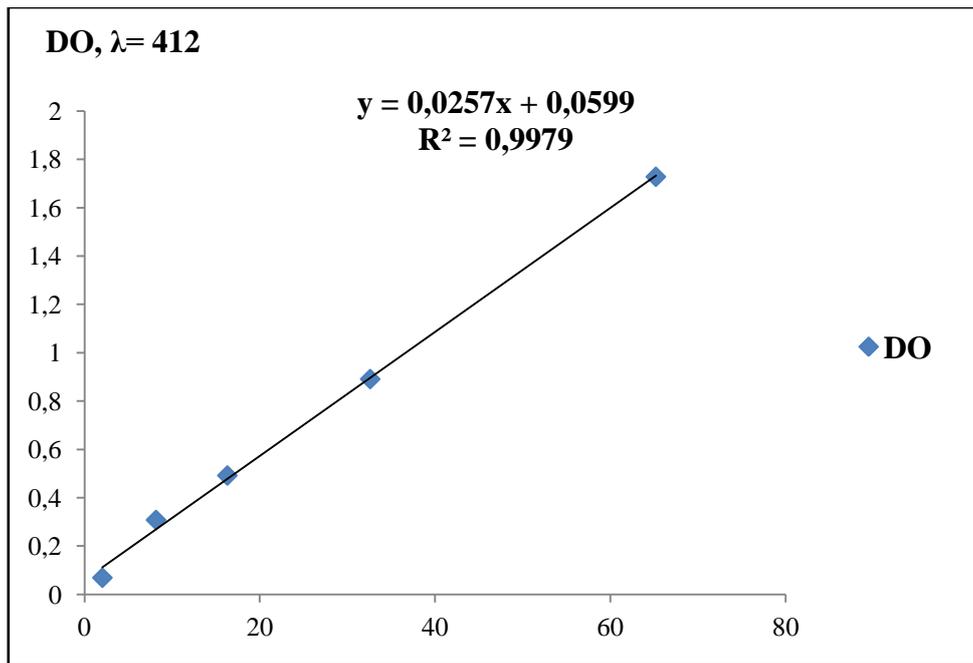
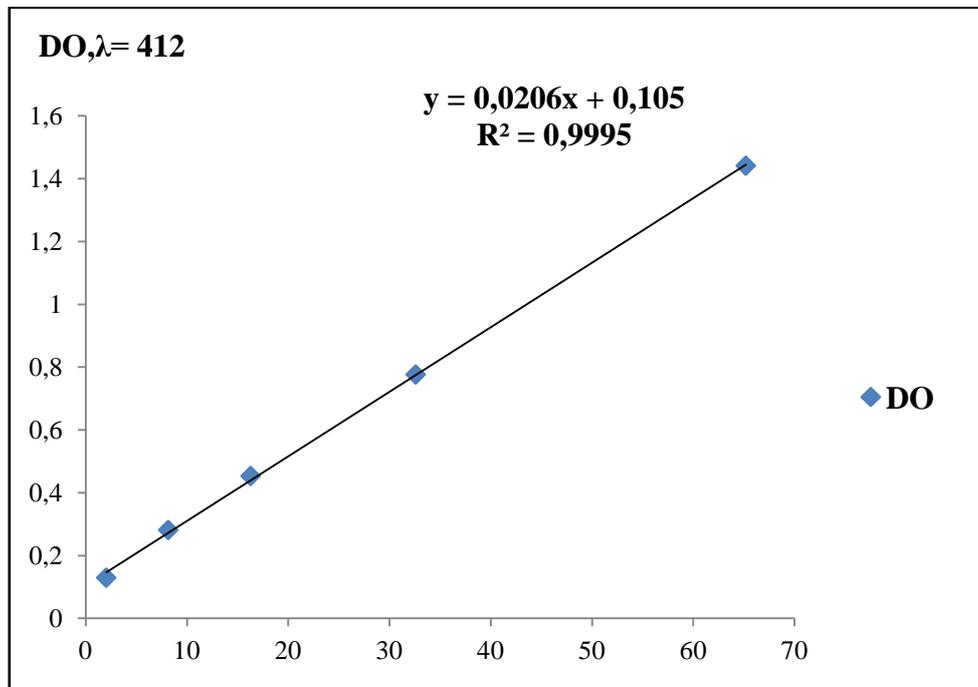
Figure n° 11 : Courbe d'étalonnage de BSA.

XI.1. Courbe d'étalonnage FRAP dans le Plasma.

Figure n° 12 : Courbe d'étalonnage de (FeSO₄).

XI.2. Courbe d'étalonnage FRAP dans le Foie et Colon.

Figure n° 13 : Courbe d'étalonnage de (FeSO₄).

XII.1. Courbe d'étalonnage des groupements SH dans le plasma.**Figure n° 14 : Courbe d'étalonnage de NAC.****XII.2. Courbe d'étalonnage des groupements SH dans le Foie et le Colon.****Figure n° 15 : Courbe d'étalonnage de NAC.**

Résumé

Résumé

De nos jours, l'augmentation de l'incidence du cancer du colon dans les pays développés et en voie de développements constitue un véritable problème de santé majeur. En effet, l'alimentation est l'un des facteurs exogènes majeurs impliqués dans le risque de cancer chez l'homme, et en particulier dans le risque de développer le cancer colorectal. Dans ce contexte, l'objectif de cette présente étude consiste à induire un cancer colorectal par une voie chimique et nutritionnelle et de confirmer l'effet promoteur du régime hypergras chez le rat *Wistar*. Les résultats obtenus après 16 semaines de traitement simultané par un régime hypergras et par la plus forte dose de DMH à 30mg/kg, indiquent une augmentation significative des teneurs plasmatiques en cholestérol (25,92%) et en LDL (26,78%) et des teneurs plasmatique et hépatique en TGO et TGP (49,06%, 55,91% respectivement). En revanche, ils influencent le statut antioxydant des rats en provoquant une diminution hautement significative du pouvoir réducteur plasmatique estimé à 15,13% et en groupement thiol évalué à 19,03%, et ce en comparaison avec les rats témoins. Parallèlement, les résultats des coupes histologiques des rats traités de manière simultané par le régime HF et la DMH montrent des altérations importantes caractérisés par une dysplasie légère et moyenne en comparaison avec les rats du groupe HGD1 (régime HF /15mg /kg de DMH). L'ensemble de nos résultats dévoilent que le régime hypergras a un effet promoteur sur le cancer du colon et peut être par conséquent proposé comme un régime impliqué dans le développement du cancer colorectal chez le rat chimio induit par la DMH à 30mg/kg.

Mots clés: Cancer colorectal, 1,2-dimethylhydrazine (DMH), Régime « High fat », Rat *Wistar*, Stress oxydant, FCA.

ملخص

يمثل سرطان القولون و المستقيم في وقتنا الراهن اكبر مشكلة صحية تواجه العالم المتقدم و النامي ,حيث تمثل التغذية احدى اكبر العوامل الخارجية المساهمة في حدوثه .لغرض دراسة تأثير هذا العامل المهم قمنا بتجربة حية على الفئران ويستار (*wistar*) من خلال حقنهم بمادة كيميائية " DMH " تسبب لهم حدوث سرطان القولون مقرونة بحمية غذائية غنية بالدهون .

بعد 16 اسبوعا من التجربة كانت النتائج المحصل عليها كالآتي : تزايد معتبر في نسبة الكولسترول و(25,92%) و LDL (26,78%) في الدم و كذا في نسبة الانزيمات الكبدية (TGO و TGP) و(TGO=49,06%, TGP=55,91%) سواء في الدم او الكبد و هو ما اثر سلبا على نسبة مضادات الاكسدة حيث لوحظ انخفاض كبير في نسبة القدرة الارجاعية (15,13%) و الثيول (19,03%) مقارنة بالفئران الشاهدة كما لوحظ ايضا من خلال المقاطع الاستولوجية للفئران المحقونة بجرعة DMH(30mg /kg) تشوهات مرفولوجية اكبر بكثير من تلك المسجلة عند فئران الجرعة (15mg/kg).

مجموع النتائج المحصل عليها اكدت بما لا يدع مجالا للشك مدى فاعلية النظام الغذائي الغني بالدهون كمساعد على حدوث سرطان القولون والذي يمكن اعتباره على هذا الاساس النظام الغذائي المثالي لتطور سرطان القولون و المستقيم عند الفئران المحقونة بمادة مسببة للسرطان .

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون والمستقيم, DMH, النظام الغذائي بالدهون , الفئران ويستار , الإجهاد التأكسدي, بور الاقبية المشوهة