



HAL
open science

β carotène et cancers

Muriel Josse

► **To cite this version:**

| Muriel Josse. β carotène et cancers. Sciences pharmaceutiques. 1994. dumas-01971960

HAL Id: dumas-01971960

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01971960>

Submitted on 7 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

1^{er} exemplaire

UNIVERSITE Joseph FOURIER GRENOBLE I Sciences Technologie Médecine

UFR DE PHARMACIE
Domaine de la merci - La Tronche

Année : 1993 -1994 .

7021

β CAROTENE ET CANCERS

THESE

Présentée à l'université Joseph Fourier- Grenoble I
Pour obtenir le grade de : **DOCTEUR EN PHARMACIE .**

Par : Mademoiselle Josse Muriel

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le : **24 MAI 1994**

Devant Monsieur le Professeur Alain FAVIER, Président du Jury

Et

Madame le Docteur Jacqueline RIONDEL , Directeur de thèse
Monsieur le Professeur Jean CALOP
Madame le Docteur Micheline JACROT
Monsieur le Docteur Charles COUDRAY



UNIVERSITE Joseph FOURIER · GRENOBLE I · Sciences Technologie Médecine

UFR DE PHARMACIE
Domaine de la merci - La Tronche

Année : 1993 -1994 .

β CAROTENE ET CANCERS

THESE

Présentée à l'université Joseph Fourier- Grenoble I
Pour obtenir le grade de : **DOCTEUR EN PHARMACIE .**

Par : **Mademoiselle Josse Muriel**

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le : **24 MAI 1994**

Devant Monsieur le Professeur Alain FAVIER, Président du Jury

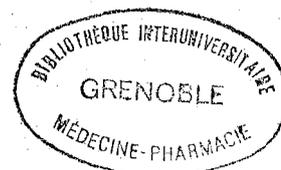
Et

Madame le Docteur Jacqueline RIONDEL , Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Jean CALOP

Madame le Docteur Micheline JACROT

Monsieur le Docteur Charles COUDRAY



ANNEE 1994

THESE N°

JOSSE MURIEL

Née le 9 janvier 1967

β carotène et cancers

Le cancer demeure actuellement dans les pays industrialisés une des causes majeures de mortalité.

Thérapeutique et chirurgie s'efforcent d'enrayer l'évolution tumorale cependant, il semble judicieux de penser qu'une alimentation saine et équilibrée prise de façon régulière dès le plus jeune âge puisse retarder l'apparition de tumeurs.

Des études épidémiologiques ont régulièrement mis en évidence l'effet bénéfique des régimes favorisant un apport alimentaire de vitamines, de polyphénols, flavonoïdes et de β carotène auquel on attribue des propriétés antioxydantes.

Certaines espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans les étapes de la cancérogénèse. A partir de cette hypothèse des études expérimentales ont permis de démontrer l'inhibition par le β carotène de la croissance d'un cancer du poumon transplanté sur souris athymiques.

De plus cet effet bénéfique du β carotène pourrait relever d'une activité immunostimulante vis à vis des cellules tueuses non induites (natural killer cells).

MOTS CLES : β carotène, cancer, antioxydant, radicaux libres, souris athymique.

JURY:

- Président : Monsieur le Professeur A. Favier
- Directeur de thèse : Madame le Docteur J. Riondel
- Membres : Monsieur le Professeur J. Calop
Madame le Docteur M. Jacrot
Monsieur le Docteur C. Coudray

THESE SOUTENUE LE :

24 Mai 1994, salle des Thèses, faculté de Médecine et Pharmacie, GRENOBLE.

A mes parents.

Cet ouvrage, je vous le dédie.

Ce travail je l'ai réalisé, mais vous en êtes les vrais auteurs.

Sans votre aide, votre soutien tout au long de ces années et votre amour, je ne serai pas devenue une femme heureuse et satisfaite.

Si un mot encore plus fort que " merci " existait, je vous l'aurai écrit.

A ma famille.

Il est parfois difficile d'exprimer ces sentiments aux personnes que l'on aime, c'est donc à travers cette thèse et les remerciements qui y sont inéluctablement rattachés que je le fais.
Merci d'être là.

Monsieur Alain Favier.

Pendant des années, on reste enfermé dans un bocal à tourner en rond et à ne rien produire.
Grace à vous, j'ai su évoluer, vous avez ouvert le couvercle, je peux à présent voler de mes propres ailes.
Je vous en remercie.

Madame Jacqueline Riondel.

Les mots me manquent pour vous remercier de toute votre gentillesse à mon égard.
D'une relation professeur élève est né un sentiment d'amitié.
Votre savoir, vous me l'avez communiqué avec une grande facilité.
Vous appréciez le monde des étudiants et c'est sans aucun problème qu'ils vous le rendent.
Vous êtes une personne inestimable. Merci.

Monsieur Jean Calop.

Lorsque nous recherchons le conseil, l'aide et la sérénité, c'est dans votre service que nous l'obtenons.
Ce fût et cela restera un grand plaisir de travailler en votre compagnie.
Je vous en remercie.

Madame Micheline Jacrot.

Vos parfaites connaissances dans le domaine de l'histologie, et de ce petit monde animal qu'est " la souris athymique" ont été nécessaires à l'aboutissement de ce travail, travail que vous appliquez avec rigueur et enthousiasme. Permettez moi d'exprimer ici le témoignage de ma gratitude et de ma grande admiration.

Monsieur Charles Coudray.

Disponibilité, rigueur et enthousiasme sont parmi les mots qui vous caractérisent.
J'ai su apprécier durant ces deux années votre précieuse aide à toutes mes manipulations.
Je vous en remercie.

Au laboratoire de biochimie C, hopital Michallon.

Je tiens à remercier toutes les personnes travaillant au laboratoire. Vous êtes toutes des personnes remarquables quelles que soient vos fonctions (service de l'administration, de l'entretien, "petits et grands"), et surtout les techniciennes qui ont bien voulu consacrer de leur temps à la mise en place de mes dosages et à l'apprentissage des techniques.
Merci Sophia, Catherine, Charlotte, Angèle et Sandra

A la CAMSP (Centrale d'Approvisionnement en Matériel Stérile et en Pansement)

Il s'agit d'un service où l'on retrouve beaucoup de chaleur humaine. Ce fût très agréable de travailler avec tous les externes, internes, praticiens hospitaliers et Claudine au secrétariat. La disponibilité est votre mot d'ordre, ne changez rien . Bravo et merci à tous.

PLAN

PLAN

INTRODUCTION : Les antioxydants (non enzymatiques) et la prévention des cancers. p4

I - INITIATEURS ET PROMOTEURS DES CANCERS

- 1- Relation cancers et agents de l'environnement p7
- 2- Relation cancers et facteurs de risques p7
- La cancérogénèse : initiation et promotion p7

II - LES RADICAUX LIBRES

- 1- Définition p13
- 2- Réaction des radicaux libres p13
- 3- Initiation, propagation, et terminaison p14
- 4- Le radical hydroxyl p18
- 5- Le radical superoxyde p18
- 6- Le stress oxydatif p19

III - LE β CAROTENE ET LA VITAMINE A

- Introduction p21

- A- Structure p24
- B- Sources alimentaires p27
- C- Besoins p27
- D- Unités p29
- E- Métabolisme p30
- F- Fonctions biologiques, rôles p35
- G- Dosage sanguin p37
- H- Pharmacocinétique p41

- I- Prévention des cancers p42
 - a. Introduction p42
 - b. Etudes rétrospectives et prospectives p42
 - c. Etudes expérimentales p44
 - d. Relation cancer et taux de β carotène p45
- J- Mécanisme d'action
 - I- Mécanisme d'action en chimioprévention de la vitamine A et ses dérivés p51

a) effets sur la synthèse enzymatique	p52
b) effets sur les propriétés membranaires	p54
c) effets sur les mitogènes et sur les facteurs de croissance	p54
d) effets sur l'expression génomique et postgénomique	p55
e) effets sur les oncogènes	p56
f) effets sur les processus immunitaires	p57
g) effets sur le système de cascade de la protéine Kinase Calcium	p58
h) effets divers	p58

II- Mécanisme d'action en chimioprévention de β carotène

a) antioxydant	p59
b) capteur de l'oxygène singulet	p63
c) effet sur le système immunitaire	p65

K- Toxicité p67

L- Thérapeutique des cancers p69

IV - PARTIE EXPERIMENTALE

A- Expérimentation 1 : Essais de tolérance et absorption du β carotène p72

* Protocole

* Résultats

* Interprétations

B- Expérimentation 2 ; 3 et 4 : - Essai de tolérance de l'acide rétinoïque sur
des souris athymiques xénogreffées p75

- Effet du β carotène sur des souris athymiques
xénogreffées

* Protocole

* Dosages

* Résultats

* Interprétations

C- Expérimentation 5 : Effet du β carotène sur des souris athymiques non xénogreffées

* Protocole

* Résultats

* Interprétations

Conclusion

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

Dans les pays de haut niveau socio économique, le cancer est une cause majeure de mortalité. Il est responsable de 20% des décès venant donc en 2ème position derrière les maladies cardiovasculaires.

Grace à de nombreuses enquêtes épidémiologiques, facteurs génétiques et environnement sont maintenant devenus des notions importantes à considérer dans l'induction tumorale. En ce qui concerne l'environnement, on estime qu'environ 90% des cancers y sont étroitement liés. *Salhed R.M, 1991, (85).*

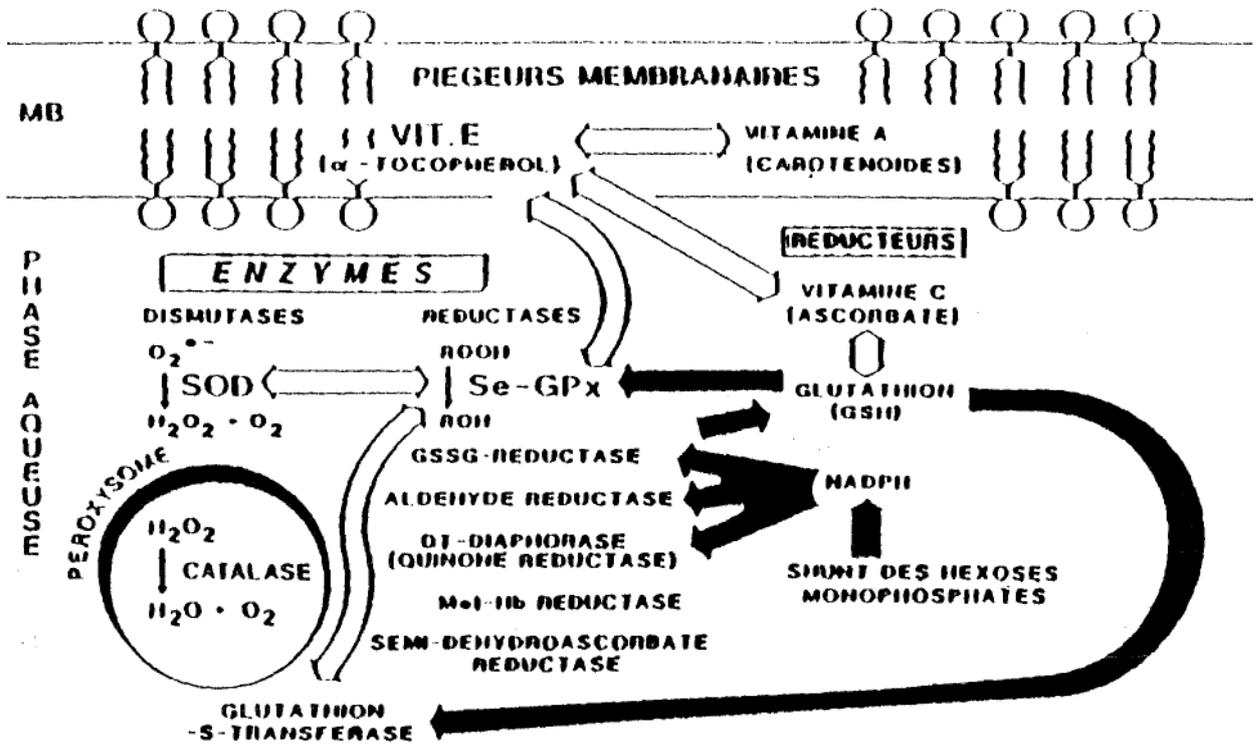
On suppose de nos jours que certains facteurs ont des effets promoteurs et antipromoteurs des cancers , à titre d'exemples parmi les facteurs nutritionnels:

- Un excès de calories , probablement par mécanisme énergétique.
- Les graisses et l'alcool seraient les promoteurs les plus connus.
- La conservation des aliments par salaison a été incriminée formellement dans l'incidence des cancers gastriques (formation de nitrosamines).
- Les antipromoteurs seraient représentés par la vitamine A, le β carotène, l' α tocophérol, l' acide ascorbique, le sélénium etc..... *Salhed R.M., 1991, (85) et Hattchouel JM.,1992, (41).*

Dans cette thèse, nous allons nous intéresser à ces antipromoteurs plus couramment dénommés "antioxydants".

Ils vont s'attaquer à la dernière étape de la formation des radicaux libres c'est à dire à la phase de propagation et ceci après action biologique d'enzymes naturellement présentes dans notre organisme: la SOD (Superoxyde dismutase), la CAT (la catalase) et la GPX (glutathion peroxydase).

SYSTEMES DE PROTECTION DE LA CELLULE



Représentation simplifiée des systèmes de protection cellulaires contre les peroxydes. Les flèches vides matérialisent les effets de synergie et de protections mutuelles, tandis que les traits pleins matérialisent les contraintes métaboliques ou de compartimentation.

**INITIATEURS ET
PROMOTEURS
DES CANCERS DANS
L'ALIMENTATION**

I - INITIATEURS ET PROMOTEURS DES CANCERS DANS L'ALIMENTATION.

Les chercheurs ont étudié les causes d'apparition des cancers selon deux approches. *Cohen.L., 1988, (12).*

1. Relation cancers et agents de l'environnement

Cette approche est née d'une observation faite par Mr. Percival Pott en 1775 qui avait remarqué que les cancers du scrotum et de la cavité nasale étaient fréquents chez les ramoneurs anglais. Il en déduisait que ces cancers étaient liés à une exposition excessive à la suie.

Des années plus tard, des expériences de laboratoire montrèrent que certains hydrocarbures polycycliques formés lors de la combustion sont en effet cancérigènes chez l'animal. Puis d'autres produits chimiques, certains virus et les rayons X ont été également mis en cause dans l'apparition de cancers animaux.

2. Relation cancers et facteurs de risques

Par exemple, le rôle de la prolactine dans l'apparition des cancers du sein a été mis en évidence grâce à l'étude de deux populations bien différentes : femmes avec et sans enfants. En effet avec les oestrogènes, la prolactine favorise le plein développement de la glande mammaire et entraîne ainsi l'effet protecteur.

De même pour les fumeurs, le tabagisme constitue un facteur de risque reconnu pour le cancer des poumons.

Le processus cancérigène comprend au moins 2 phases :

- initiation
- promotion

Les phases sont séparées dans le temps et contrôlées par des agents différents.

L'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; celles-ci deviennent anormales sans qu'aucune tumeur ne soit encore cliniquement observable tant que d'autres agents appelés promoteurs n'interviennent pas.

La promotion : encore appelée facilitation . Lors de cette phase, peuvent intervenir conjointement de multiples cofacteurs .

La promotion fait proliférer des cellules transformées qui forment des tumeurs mais les promoteurs ne sont pas eux-même des agents mutagènes ou cancérogènes.

En outre ces promoteurs n'ont d'effets biologiques que s'ils sont appliqués en permanence ou de façon répétitive, quand l'action du stimulus promoteur est supprimée ses effets disparaissent.

Ce n'est pas le cas des agents cancérogènes et la différence entre les 2 types de facteurs prend son importance quand on doit aborder les stratégies de prévention.

L'identification et l'élimination des initiateurs présents à faible concentration dans l'environnement semblent primordiales mais ne sont pas toujours facilement réalisables pratiquement , en revanche deux stratégies sont plus efficaces :

* l'identification dans l'environnement des promoteurs de ces cancers ainsi que certains carcinogènes et leur élimination de l'atmosphère et de l'alimentation.

Ex : - Benzopyrène, nitrosamines, benzidine , β naphtylamine etc...

- Graisses en surconsommation aux détriment des fibres .

- Alcool , tabac .

* l'identification des éléments de l'environnement qui agissent comme des antipromoteurs et l'augmentation à l'exposition de ces derniers produits.

Ex : Vitamine A , β carotène

Vitamine C

Vitamine E

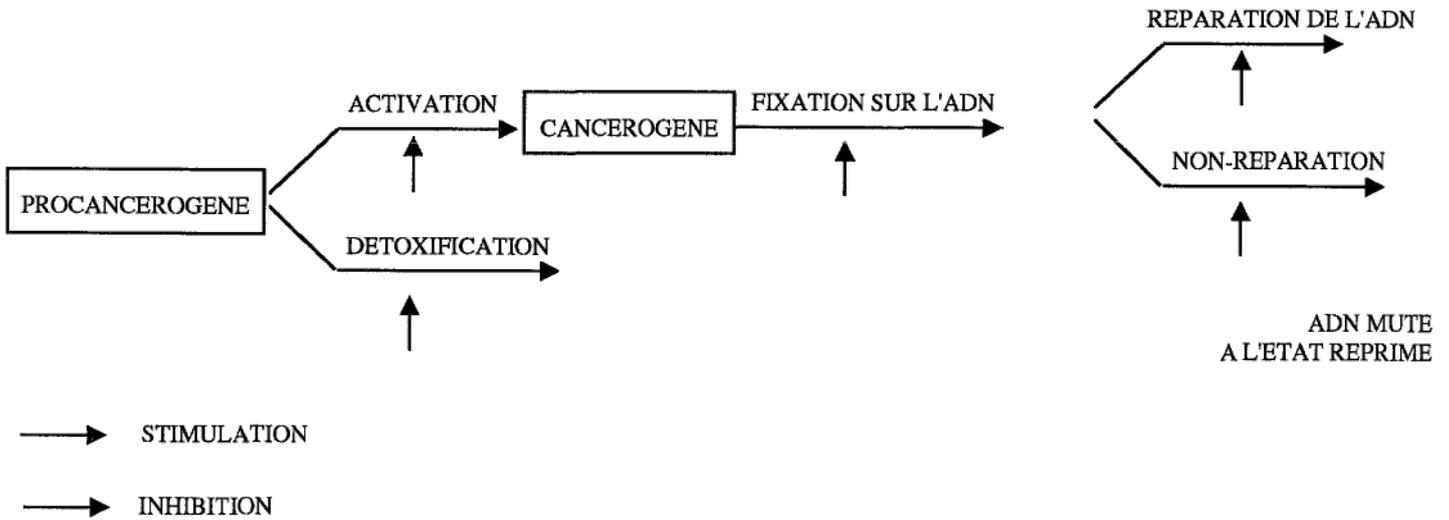
Sélénium

Flavonoïdes

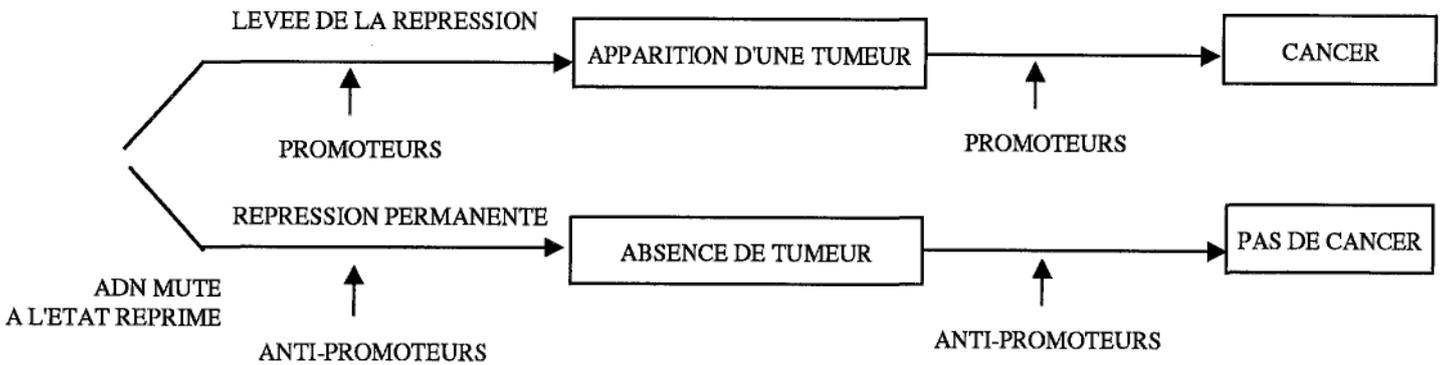
En effet lorsque l'on parvient à supprimer le promoteur ou à le modifier pendant une longue période, dans ce cas les lésions déjà créées restent souvent à l'état latent ou se transforment en tumeur bien plus lentement qu'elles ne le feraient normalement.

De ce fait, on peut considérer que le régime alimentaire est un des éléments déterminants dans la genèse des cancers. *Cohen L., 1988, (12).*

INITIATION



PROMOTION

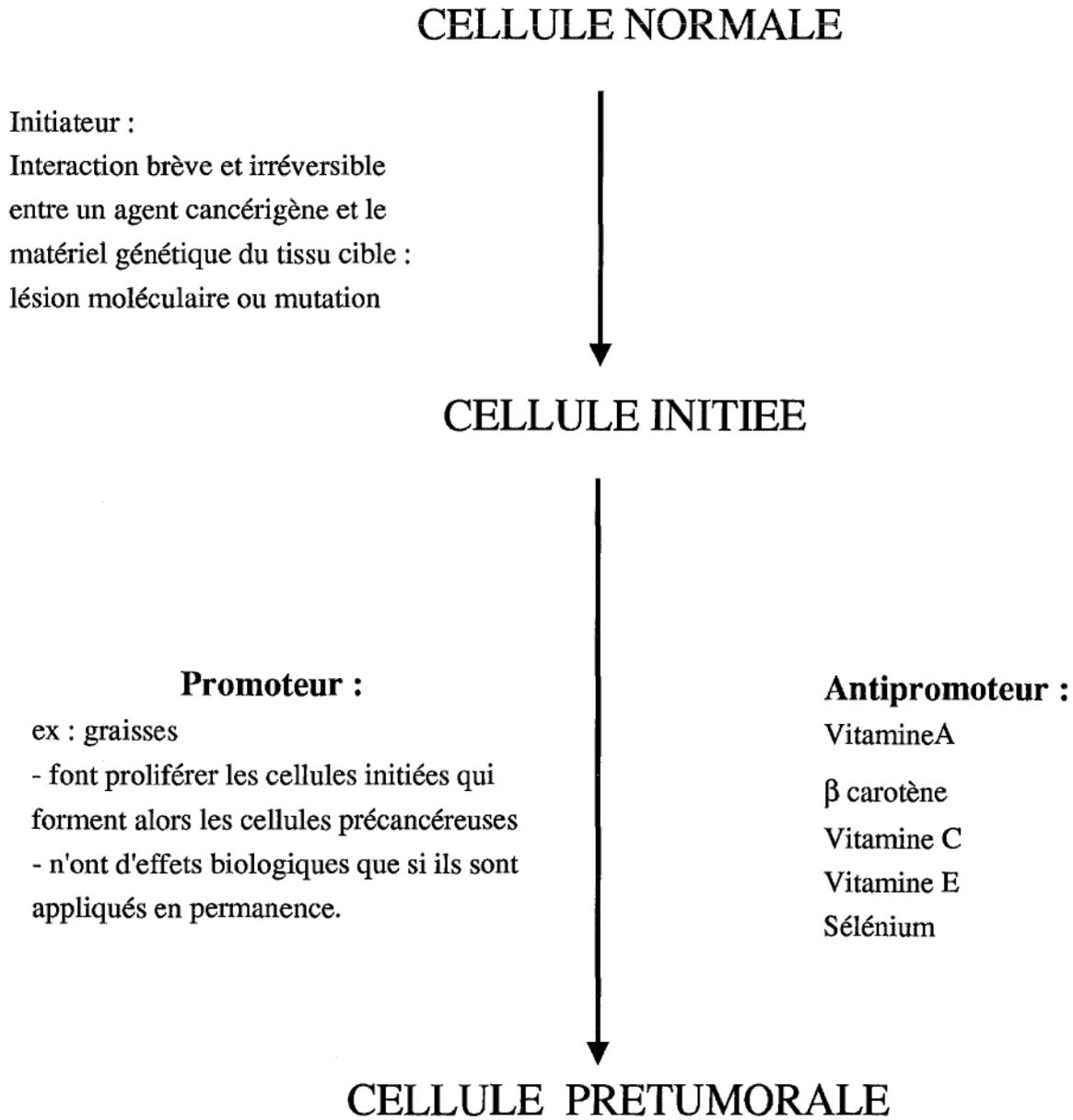


2. EFFETS DES FACTEURS ALIMENTAIRES sur l'initiation et la promotion des cancers. Un cancer est initié quand un procancérogène (alimentaire ou autre) est activé et se lie à l'ADN, ce qui engendre une mutation dans l'ADN (atteignant souvent ce que l'on appelle un oncogène). La mutation n'est pas toujours réparée. Certaines étapes de l'activation, de la fixation et de la réparation de l'ADN peuvent être stimulées ou inhibées par des substances présentes dans l'alimentation

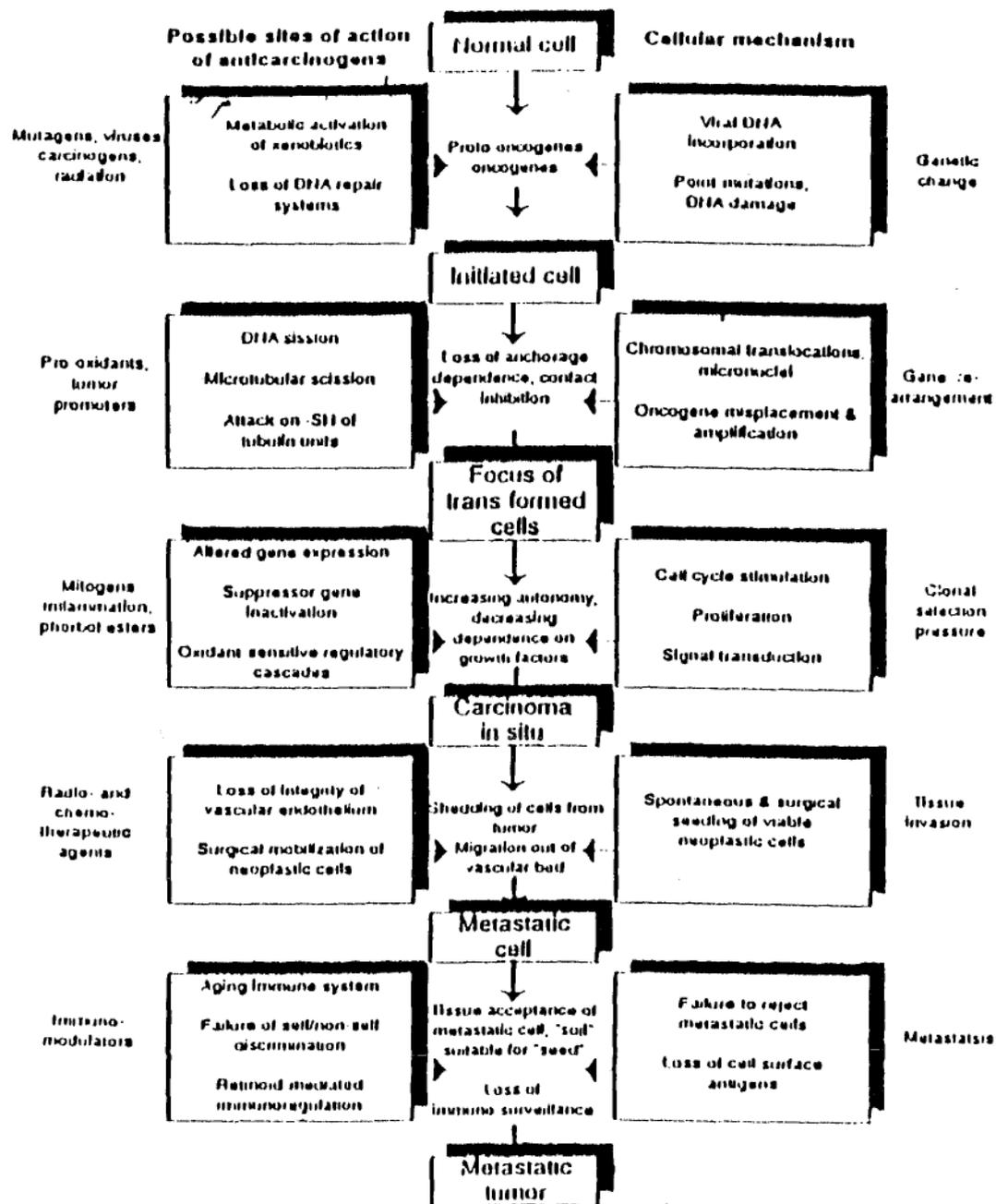
comme les vitamines A, C et E, les indoles des légumes crucifères et des traces de sélénium. Une mutation qui n'est pas réparée induit un état cellulaire anormal, mais cet état reste déprimé - aucune tumeur n'apparaît - tant qu'aucun promoteur n'agit (on trouve de tels promoteurs dans les régimes riches en graisses). Les antipromoteurs comme la vitamine A favorisent le maintien de la répression et inhibent la croissance des cancers.

Cohen L., 1988, (12)

Initiateurs et promoteurs des cancers (dans l'alimentation)



Gaucher A.S., 1993, (33)



Processes in carcinogenesis and anticarcinogenesis.

**LES RADICAUX
LIBRES**

II - LES RADICAUX LIBRES

1. Définition

Les électrons des atomes occupent une région dans l'espace appelée orbitale. Chaque orbitale peut avoir au maximum 2 électrons situés dans deux directions opposées (spin).

Un radical libre peut être simplement défini comme étant une espèce capable d'exister tout en ayant un nombre impair d'électrons. *O'Brien J. (75)*.

La plupart des molécules biologiques ne sont pas des radicaux et contiennent seulement une paire d'électrons.

L'électron étant seul sur l'orbitale a 2 états de spin. Cet électron "impair" peut être détecté aisément par la technique de RMN.

Les radicaux libres sont en général plus réactifs que les molécules simples, stables qui ont une paire d'électrons.

2. Réaction

Les radicaux libres peuvent réagir avec d'autres molécules de différentes façons :

a. **Rencontre de 2 radicaux** = ils peuvent combiner leur électron impair et former une liaison covalente :



b. **Rencontre entre un radical et une molécule biologique**

En effet, le radical peut donner son électron impair ou il peut accepter un électron seul d'une molécule biologique et ceci dans le but de créer un doublet d'électrons stables.

Cependant si le radical donne son électron ou prend un électron à une molécule cette dernière va se transformer à son tour en un radical et ainsi de suite.

La particularité des réactions radicalaires faisant intervenir des non radicaux est l'apparition d'une chaîne de réaction en cascade. Cette cascade ne peut prendre fin qu'en présence d'une réaction entre 2 radicaux .

3. Initiation, propagation et terminaison

a) - **L'initiation** : commence lorsque l'on est en présence de molécules capables de céder ou accepter un électron, ex : corps gras.

b) - **La propagation** : la réaction d'un radical libre vis à vis d'une molécule biologique va donc résulter en la formation de nouveaux radicaux libres. Cette caractéristique permet aux radicaux de participer aux chaînes de réaction (parfois une 100ème voire 1000ème fois).

Ex : La peroxydation des acides gras insaturés . *O' Brien J. (75) et Burton G.W., 1989, (8).*

- Les réactions avec l'oxygène peuvent résulter en la formation du radical peroxy, le plus réactif des radicaux et ceci par réaction d'addition. Ce radical peroxy peut alors réagir avec d'autres molécules pour former d'autres radicaux.

- Les réactions avec l'oxygène peuvent aussi résulter en la formation du radical superoxy et ceci par réaction de transfert d'un électron.

- Le radical hydroxyl peut alors apparaître, il est issu de la réaction entre Fe^{++} et H_2O_2 ; il s'agit d'un produit du à la dismutation du radical superoxy.

On peut constater qu'un radical libre peu réactif peut engendrer le radical le plus cytotoxique et génotoxique : le radical hydroxyl.

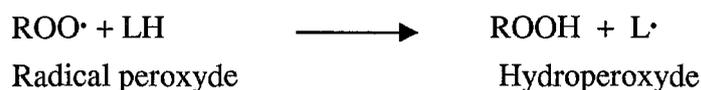
Dans les cellules, ces effets toxiques de l'oxygène sont appelés "Stress oxydatif".

Les radicaux sont volontiers différents dans leur réactivité. Ex : Certains comme l'atome chlore $Cl\cdot$ ou le radical hydroxyl $OH\cdot$ sont si énergétiques qu'ils réagissent autant de fois qu'ils percutent une molécule.

Mais en général les réactions d'addition des radicaux sont plus lentes que les transferts d'électrons.

Ex : Un radical assez réactif pour engendrer la peroxydation des lipides est le radical peroxy $C Cl_3 O_2\cdot$. Il est formé par l'addition de O_2 et du radical trichloro-méthyl lui même formé in vivo par réduction de Cl (chlore) avec la réductase.

Ce radical peroxy $C Cl_3 O_2\cdot$ va soustraire volontiers un hydrogène allylique des acides gras polyinsaturés pour produire un hydroperoxyde et un radical diényl conjugué $L\cdot$.



L'hydroperoxyde peut subir une scission en donnant des aldéhydes; acides, cétones et $RO\cdot + OH\cdot$ réactifs etc...

Le radical diénylconjugué $L\cdot$ peut alors initier la peroxydation des lipides. Puis la réaction de propagation va faire intervenir O_2 avec le carbone central du radical $L\cdot$:

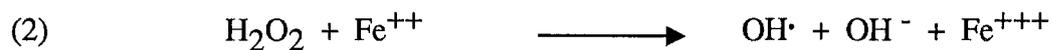
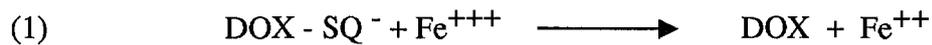


Ce radical $LOO\cdot$ va à nouveau former un autre radical peroxy qui va s'attaquer à d'autres molécules de l'acide gras polyinsaturé et ainsi de suite.



La peroxydation des lipides peut avoir pour autre origine le radical hydroxyl OH° .

Ex : Doxorubicine



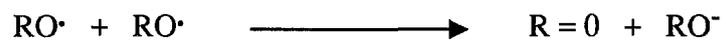
La terminaison :

Lorsque les 2 radicaux réagissent ensemble ils sont tous les 2 éliminés.



Parfois , il en est autrement :

Ex : avec les hydroquinones où une disproportion des produits a lieu :



Une autre réaction biologique de terminaison est :

- L'oxydation de l'électron par les peroxydases, les prostaglandines synthétases ou cytochromes oxydés.
- La réduction de l'électron par les réductases ou cytochromes réduits. *O' Brien*

J., (75).

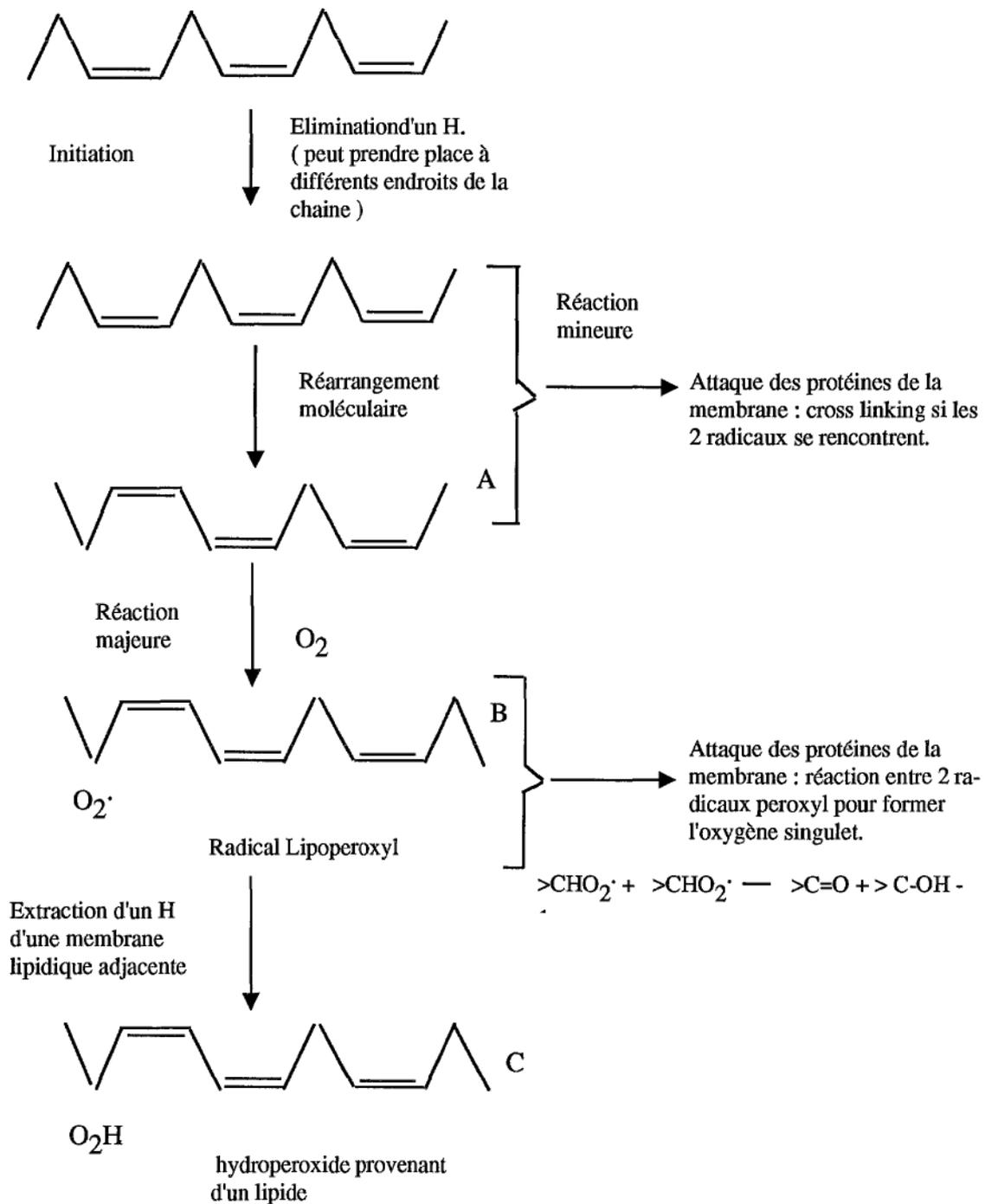
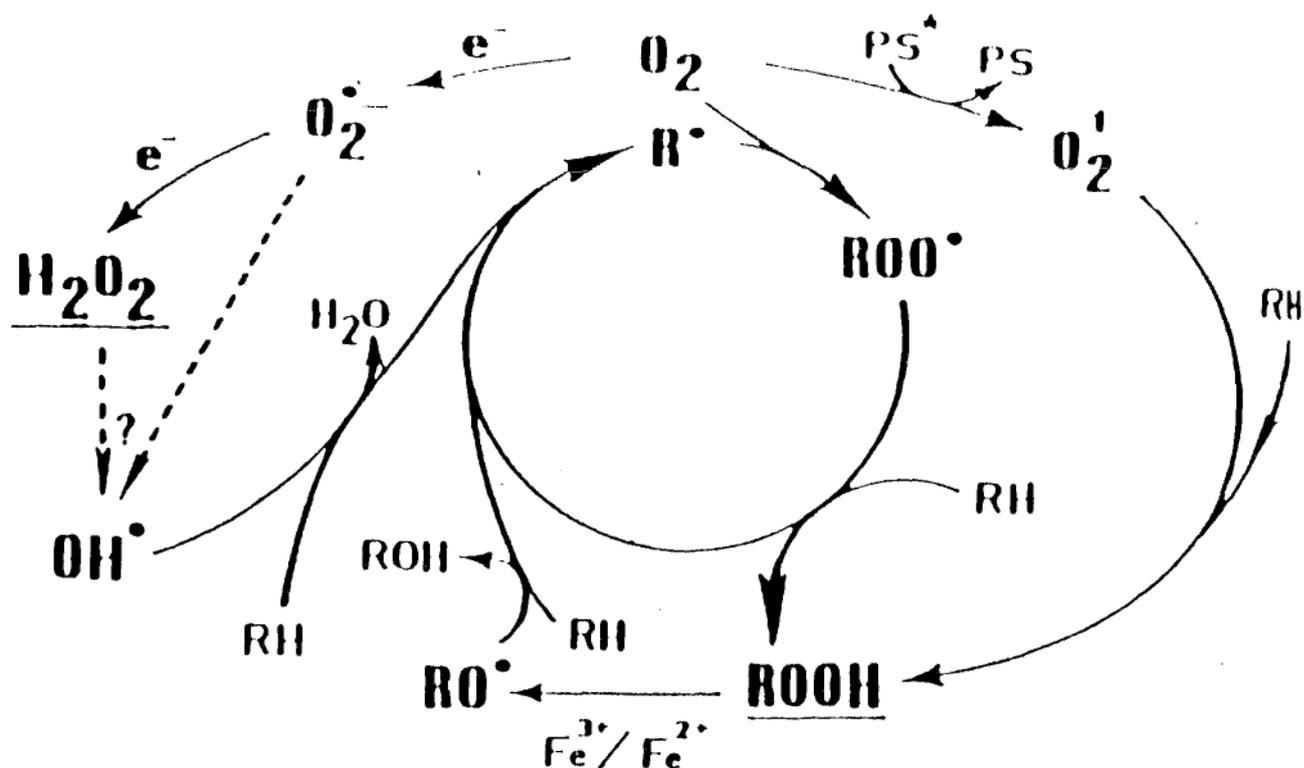


Fig. 1-La chaîne de réaction des radicaux libres lors de la lipoperoxydation. L'attaque d'espèces réactives de l'oxygène telle que OH° sur une chaîne d'acide gras insaturé provoque l'extraction d'un atome hydrogène H. Les conséquences d'une telle attaque sur la chaîne de l'acide gras contenant 3 doubles liaisons est montrée. L'hydrogène éliminé peut être extrait à différents endroits de la chaîne par conséquent il y a formation de plusieurs hydroperoxydes isomériques. Des peroxydes cycliques peuvent être également formés.



Représentation simplifiée de l'activation de l'oxygène, des voies d'altération pro-oxydante et des besoins en protection antioxydante.
 La figure montre que la voie d'activation réductrice de l'oxygène est la source la plus fréquente d'initiateurs de réactions radicalaires.
 Les nombreuses protections que la Nature a développées au cours de l'évolution pour permettre aux organismes aérobies de faire face aux radicaux libres et aux peroxydes, peuvent se décomposer en 3 stratégies complémentaires:

1. **Dégradation enzymatique des principales sources d'initiateurs:**
 - L'ion superoxyde $O_2^{\bullet -}$: SOD-Cu/Zn, SOD Mn;
 - Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 : GSH et Glutathion peroxydase (Se GPx), Catalase;
 - Les hydroperoxydes organiques ROOH: GSH et Glutathion peroxydase (Se GPx);
2. **Inhibition de la peroxydation lipidique par piègeage des radicaux peroxy ROO^{\bullet} :** Vit E, recyclée en partie par l'ascorbate (Vit. C);
3. **Inactivation des sels de fer par chélation et maintien sous la forme ferrique, pour minimiser la décomposition des peroxydes pré formés en radicaux libres:** ferritine, cénuloplasmine.

4. Le radical hydroxyl OH·

C'est le radical le plus réactif connu et sa formation joue un rôle clef dans les dommages créés dans les tissus exposés à des radiations de hautes énergies (radiations entraînant la formation des radicaux H· et OH· à partir de l'eau des tissus).

OH· se combine très vite à une molécule biologique et il se produit alors la chaîne de propagation.

En effet si OH· attaque l'ADN, la chaîne de réaction a lieu et cause la cassure du brin d'ADN, la fragmentation du désoxyribose et l'altération chimique de la purine et pyrimidine.

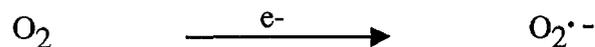
Ces dégâts de l'ADN par OH· vont entraîner l'activation des proto-oncogènes et la carcinogénèse. Par conséquent, les radiations de hautes énergies peuvent être à l'origine des cancers par intermédiaire des radicaux libres.

Lors de la peroxydation des lipides par OH·, les hydroperoxydes formés peuvent se décomposer pour produire des composants très cytotoxiques, les plus étudiés étant les aldéhydes; notamment le malondialdéhyde (-) réactif que les autres).

Les radicaux peroxy et les aldéhydes formés peuvent causer de sévères dégâts aux membranes protéiques en inactivant les récepteurs et les points d'attaches membranaires de certaines enzymes.

5. Le radical superoxyde O₂·-

Il se produit suivant la réaction :



Mais la superoxyde dismutase SOD va supprimer ce O₂·- par une réaction de dismutation :

Un O₂·- est oxydé en O₂ et un autre O₂·- est réduit en H₂O₂.



En l'absence de SOD, la dismutation spontanée de O₂·- a quand même lieu mais en nombre 10⁴ fois inférieur au pH physiologique.

Le radical oxygène $O_2^{\cdot -}$ - est formé normalement dans les organismes vivants.

Mais quelques fois $O_2^{\cdot -}$ - est produit par accident(s) chimique(s).

Ex : Lorsque les mitochondries s'activent, quelques électrons passent à travers la chaîne respiratoire (fuite venant des transporteurs d'électrons) et passent directement à l'oxygène, le réduisant et formant $O_2^{\cdot -}$

Bien que l'on puisse avoir formation d' $O_2^{\cdot -}$ - par accident, l'apparition d' $O_2^{\cdot -}$ - est tout de même physiologique. En effet, l'activation des cellules phagocytaires génère de l' $O_2^{\cdot -}$

Ex : -Monocytes , macrophages
- Polynucléaires neutrophiles
- Polynucléaires éosinophiles

La production des radicaux est importante lors des phénomènes de phagocytose de certaines souches de bactéries.

Ceci est démontré lors des déficits de production de $O_2^{\cdot -}$ - (maladies chroniques des granulocytes) par mauvais fonctionnement des systèmes NADPH oxydase.

Un autre rôle physiologique de $O_2^{\cdot -}$ - est son implication dans la prolifération fibroblastique et dans la vasorégulation .

6. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se traduit par l'altération des fonctions cellulaires de certains composants tels que les enzymes, acides nucléiques et protéines activés eux-mêmes par les espèces oxygénées telles que le radical hydroxyl OH^{\cdot} ou le radical peroxyde ROO^{\cdot} .

Par exemple, la modification de l'intégrité cellulaire, résultant de la peroxydation lipidique amène:

- la libération de produits toxiques
- le changement de conformation protéique
- l' inactivation enzymatique
- la cassure de brins d'ADN
- l' oxydation de bases amenant à la mutagénicité, la cytotoxicité et la carcinogénèse.

VITAMINE A

β CAROTENE

ET DERIVES

III - VITAMINE A , β CAROTENE ET DERIVES

La vitamine A et le β carotène sont indissociables, ce dernier en effet est une source de pro vitamine A.

Il faut cependant déterminer leur rôle préventif dans les divers cancers et surtout savoir si l'action préventive du β carotène est liée ou non à sa fonction provitamine A.

La vitamine A est une vitamine liposoluble qui joue dans l'organisme des rôles variés et participe au contrôle, par des mécanismes complexes, de la différenciation et de la prolifération cellulaire.

Le terme de vitamine A est utilisé pour les dérivés β ionone (autres que les caroténoïdes qui possèdent une structure ou une activité biologique comparable à celle de la molécule de base qui est le trans rétinol). C'est le chef de file d'une série de composés naturels ou synthétiques (rétinoïdes) dont les applications désormais courantes en dermatologie sont également étendues au domaine du cancer. *Grosleron N., 1985, (36) ; Manesme O., 1985, (59) ; Moon C., 1989, (68)*

Les structures; le nom de référence et les synonymes des composés principaux du groupe A sont indiqués dans le tableau 1 .

Quatre rétinoïdes sont connus :

- vitamine A
- β all trans rétinoïc acid (trétinoïn)
- 13 cis rétinoïc acid (isotrétinoïn)
- un dérivé éthylester aromatique de l'acide rétinoïc (étrétinate) tableau 2

Depuis peu deux autres rétinoïdes ont été synthétisés :

- un rétinamide : N - (4 hydroxyphényl) rétinamide ou 4 HPR
- un dérivé d'acide benzoïque rétinoïdal : TTNPB tableau 2

TABLEAU I. -- Principaux composés du groupe de la vitamine A

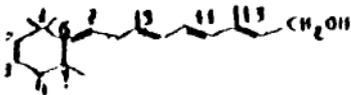
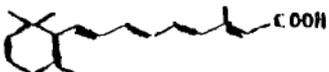
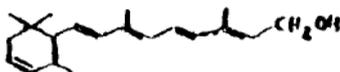
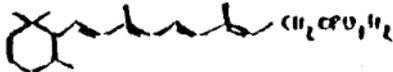
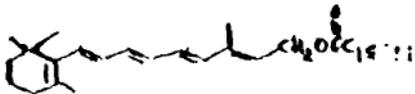
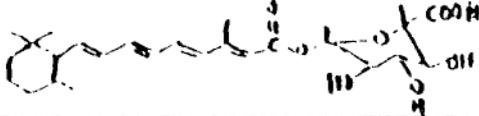
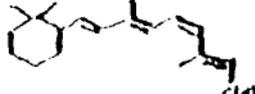
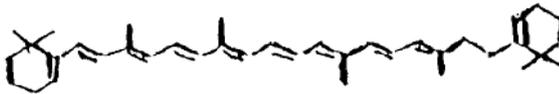
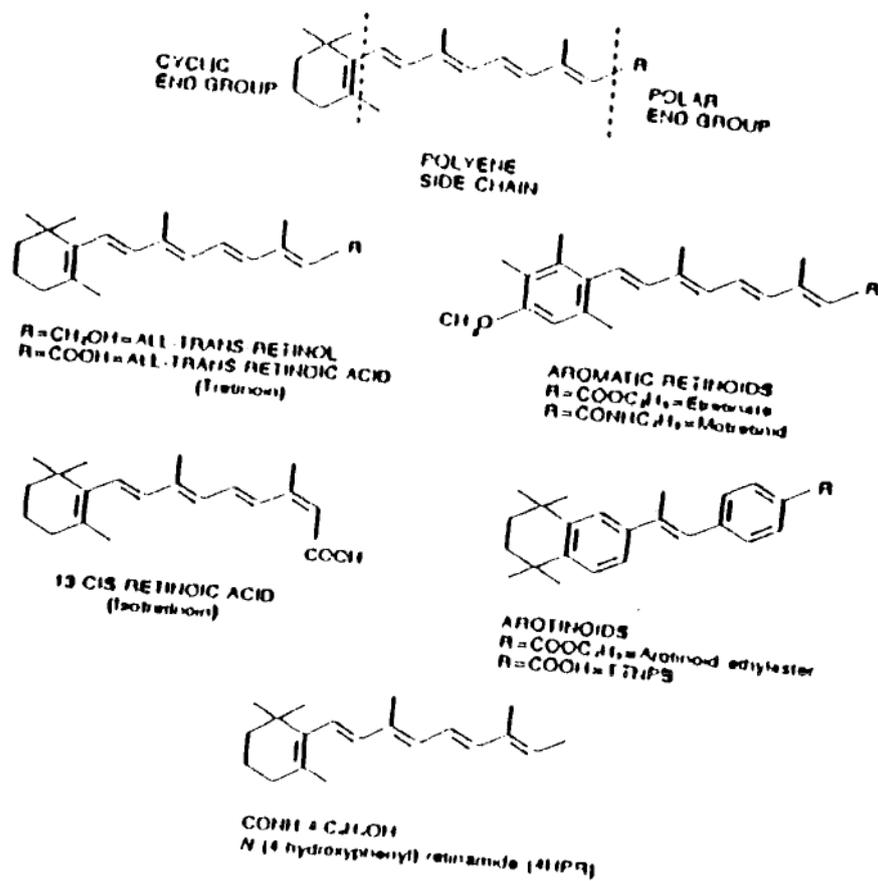
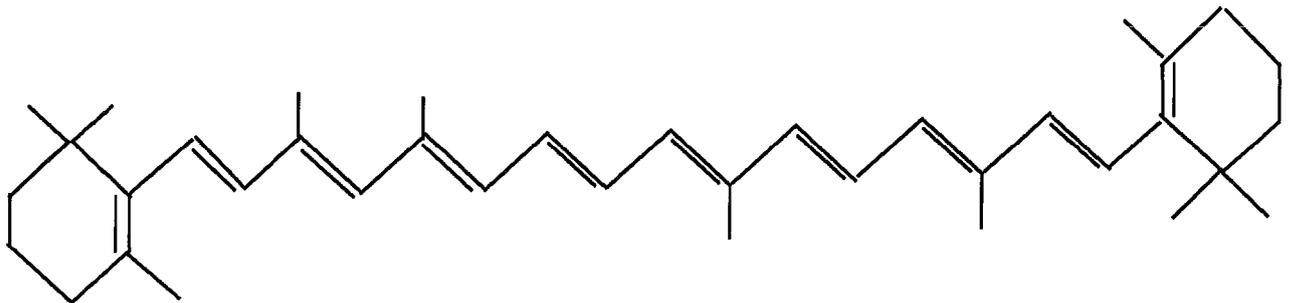
Terme recommandé	Synonymes	Formules
Rétinol	Vitamine A1 alcool	
Rétinal	Vitamine A1 aldéhyde	
Acide rétinique	Vitamine A1 acide	
3 déhydro-rétinol	Vitamine A2	
Rétinyl phosphate	Vitamine A phosphate	
Rétinyl palmitate	Vitamine A palmitate	
Rétinyl β glucuronide	Vitamine A acide β glucuronique	
11 cis rétinol	11 Cis vitamine A	
trans. β carotène		

TABLEAU 2 : STRUCTURE CHIMIQUE DES RETINOIDES



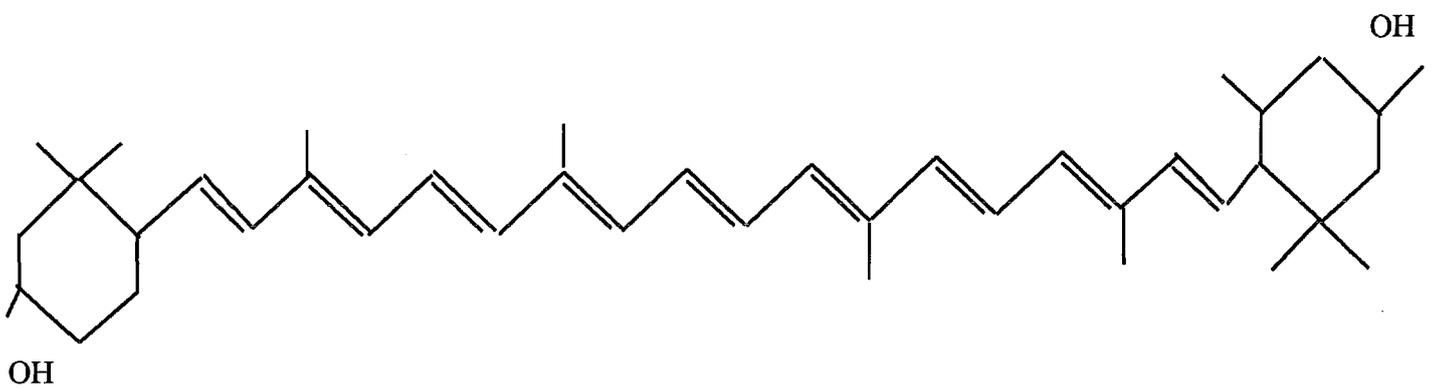
MOON C. ,1989. (68)

b-β CAROTENE

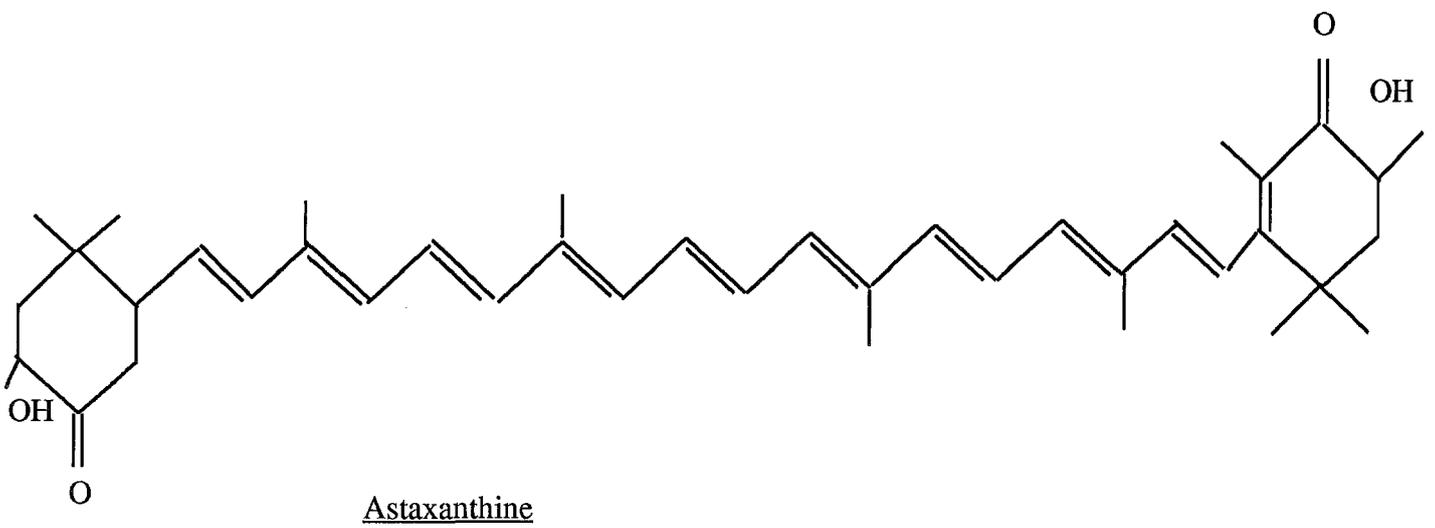
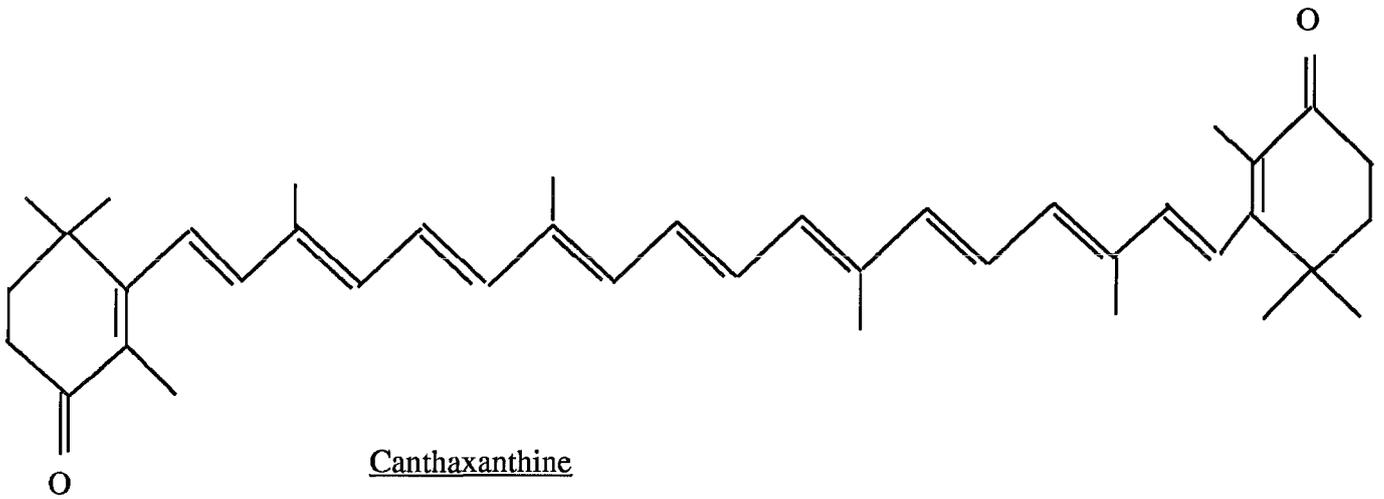


Il est donc formé de 2 molécules de vitamine A.

c-DERIVES



Zéaxanthine



Ces 2 dérivés n'ont pas la structure des provitamines A.

B. LES SOURCES DE VITAMINE A ET β CAROTENE

On ne trouve la vitamine A que dans les produits d'origine animale, les sources les plus importantes étant :

- l'huile de foie de poisson
- la chair des poissons
- le foie de mammifères
- le beurre, le lait, le fromage et les oeufs.

Le β carotène se rencontre surtout dans les végétaux :

- carottes
- épinards
- choux
- salades
- oranges
- abricots
- courges

Mais on en trouve également dans :

- les reins
- le foie
- la rate
- le lait, beurre, fromage

Grosleron N., 1985, (36) ; Manesme O., 1985, (59) ; Lippman S.M., 1987, (51) .

C. LES BESOINS

La vitamine A se trouve dans le foie ainsi que dans la chair des poissons mais l'apport alimentaire principal provient surtout des produits laitiers et des oeufs.

Les besoins quotidiens chez l'homme varient en fonction du sexe, de l'âge, et sans doute aussi de l'activité physique mais ils se situent en moyenne entre 20 et 30 UI de vitamine A/ kg de poids.

Pour assurer un approvisionnement optimal il faut prévoir des quantités 2 à 3 fois plus élevées, c'est pourquoi on admet généralement chez l'homme adulte que les besoins sont de l'ordre de 5000 UI de vitamine A/ Jour soit 1700 μ g d'acétate de vitamine A/ Jour.

Chez les végétariens stricts où les carotènes constituent la seule source de vitamine A l'apport est généralement suffisant pour mettre à l'abri d'une carence.

TABLEAU - Besoins journaliers en vitamine A

	Age (ans)	µg rétinol
Enfants	0 - 1	300
	2 - 3	250
	4 - 6	300
	7 - 10	400
	11 - 12	575
	13 - 15	725
	16 - 19	750
Adultes		750
Femmes enceintes		750
Femmes allaitant		1200

Manesme o. , 1985, (59)

Le β carotène - A l'heure actuelle les consommations recommandées aux Etats-Unis sont de 1,5 mg de β carotène par jour en temps normal ce qui correspond à la quantité effectivement consommée si on en croit une enquête réalisée en 1985 par le ministère américain de l'agriculture.

Une ration idéale devrait se situer dans un rapport de 2/3 de vitamine A pour 1/3 de β carotène.

En ce qui concerne la prévention des cancers, il est recommandé de prendre 5 à 6 mg de β carotène /jour.

En conclusion on peut dire qu'avec les habitudes alimentaires actuelles il manque 4 à 7 mg de β carotène/jour.

Pour prévenir des cancers il faudrait donc :

- Réaliser une véritable éducation diététique pour assurer une consommation suffisante d'aliments riches en β carotène.
- Enrichir les aliments en β carotène
- Assurer un apport supplémentaire en β carotène notamment dans les groupes à haut risque ; exposés à des substances cancérogènes. *Salheld R.M., 1991, (85).*

Grosleron N.,1985, (36) ; Manesme O.,1985, (59) .

D. LES UNITES

- l'unité internationale de vitamine A égale à l'unité de la pharmacopée US correspond à l'activité de :

0,344 μ g d'acétate de vitamine A cristallisé

ou 0,55 μ g de palméate de vitamine A.

- l'unité internationale de β carotène correspond à l'activité de 0,6 μ g de β carotène.

Il n'existe malheureusement pas de relation précise entre ces 2 unités internationales car selon les conditions expérimentales une unité internationale de β carotène n'a pas toujours la même activité vitaminique. *Grosleron N.,1985, (36).*

Depuis 1969 la teneur des aliments et les besoins quotidiens en vitamine A sont exprimés en μg de rétinol ou "rétinol équivalent"

1 équivalent rétinol = $1\mu\text{g}$ ou 3,33 UI de rétinol.

Le dosage de rétinol se fait en poids de substance active.

L'activité des caroténoïdes quand à elle, est évaluée en tenant compte de leur capacité à se transformer en vitamine A dans l'organisme.

1 équivalent rétinol = $6\mu\text{g}$ ou 10 UI de β carotène. *Manesme O., 1985, (59).*

E -LE METABOLISME DE LA VITAMINE A

Manesme O., 1985, (59) ; Lippman S.M., 1987, (51) ; Grosleron N., 1985, (36).

—————→ Absorption

L'alimentation apporte des dérivés de la vitamine A (principalement sous forme d'esters) et des pro vitamines A (principalement sous forme de β carotène).

- les composés du groupe de la vitamine A subissent les actions successives des sécrétions gastriques et intestinales. Les rétinyl - esters sont hydrolysés par la vitamine A - ester hydrolase pancréatique et par une hydrolase du plateau strié de l'entérocyte.

Ces 2 enzymes sont activées par les sels biliaires.

Après hydrolyse, le rétinol est incorporé aux micelles formées sous l'influence des sécrétions biliaires et absorbé par un transport actif.

A l'intérieur de la cellule intestinale le rétinol est réestérifié (en palmitate surtout) incorporé aux chylomicrons, excrété dans la lymphe et rejoint la circulation générale lymphatique par le canal thoracique. (pic de vitamine A 4 h après l'administration).

Une faible quantité de rétinol est absorbée directement et atteint le foie par le système porte.

L'absorption est accélérée en présence d'agents émulsionnants (bile) avant de subir une nouvelle estérification.

Dans les conditions physiologiques, la résorption de la vitamine A dans l'intestin est totale; mais elle est à la fois plus rapide et plus complète lorsqu'elle est administrée sous forme de préparations (dispersions, émulsions ou suspensions colloïdales) qui se comportent dans l'intestin comme des solutions aqueuses et sont absorbées indépendamment des sécrétions biliaires et pancréatiques.

METABOLISME

Vitamine A

alimentation :

ester de vitamine

Vitamine A ester
hydrolase pancréatique

Hydrolase intestinale

rétinol

micelles

Intestin

rétinol + micelles

réestérification

rétinyl ester

passage dans la
circulation générale

Foie

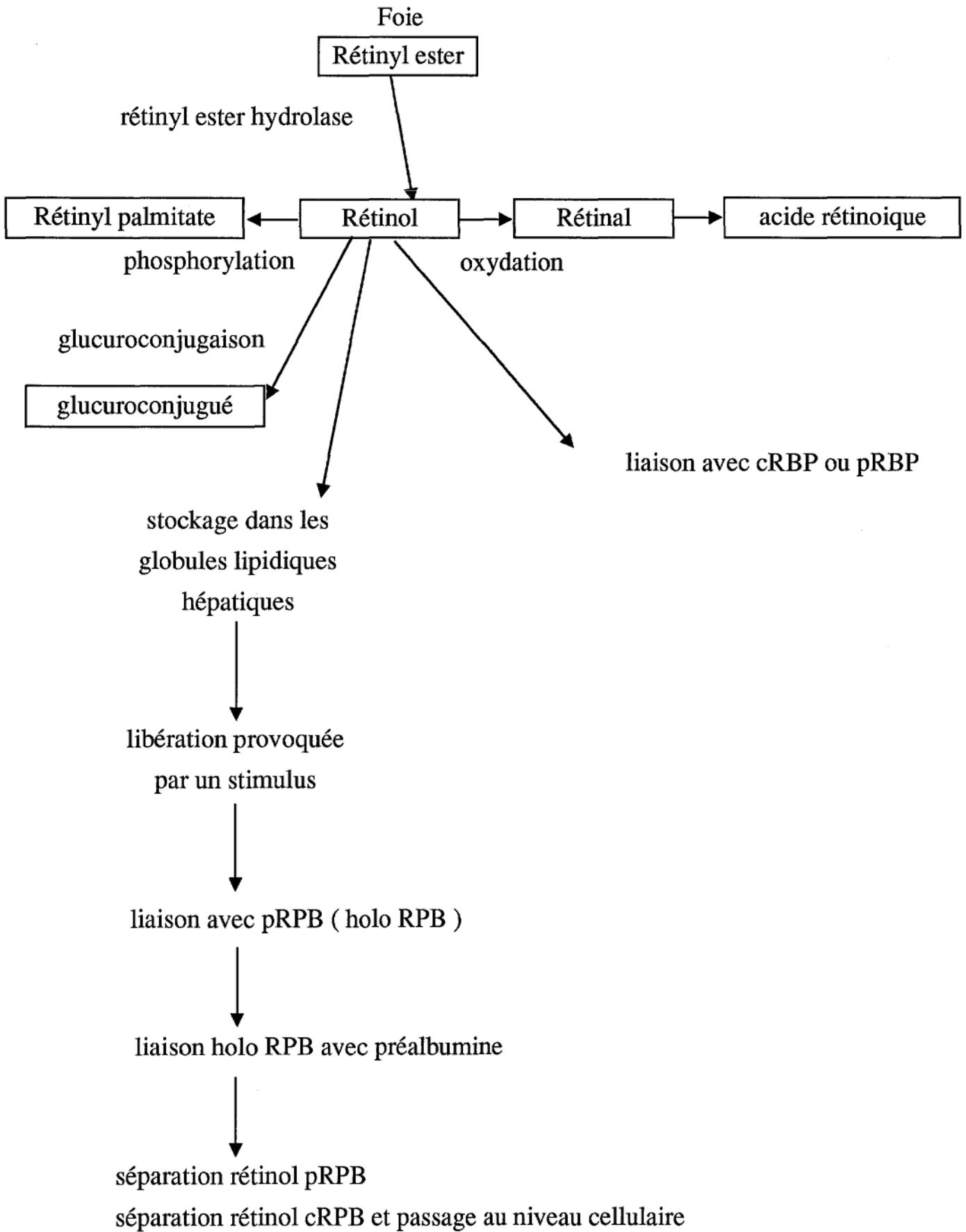
- rétinyl ester
- rétinol
- β carotène

β carotène

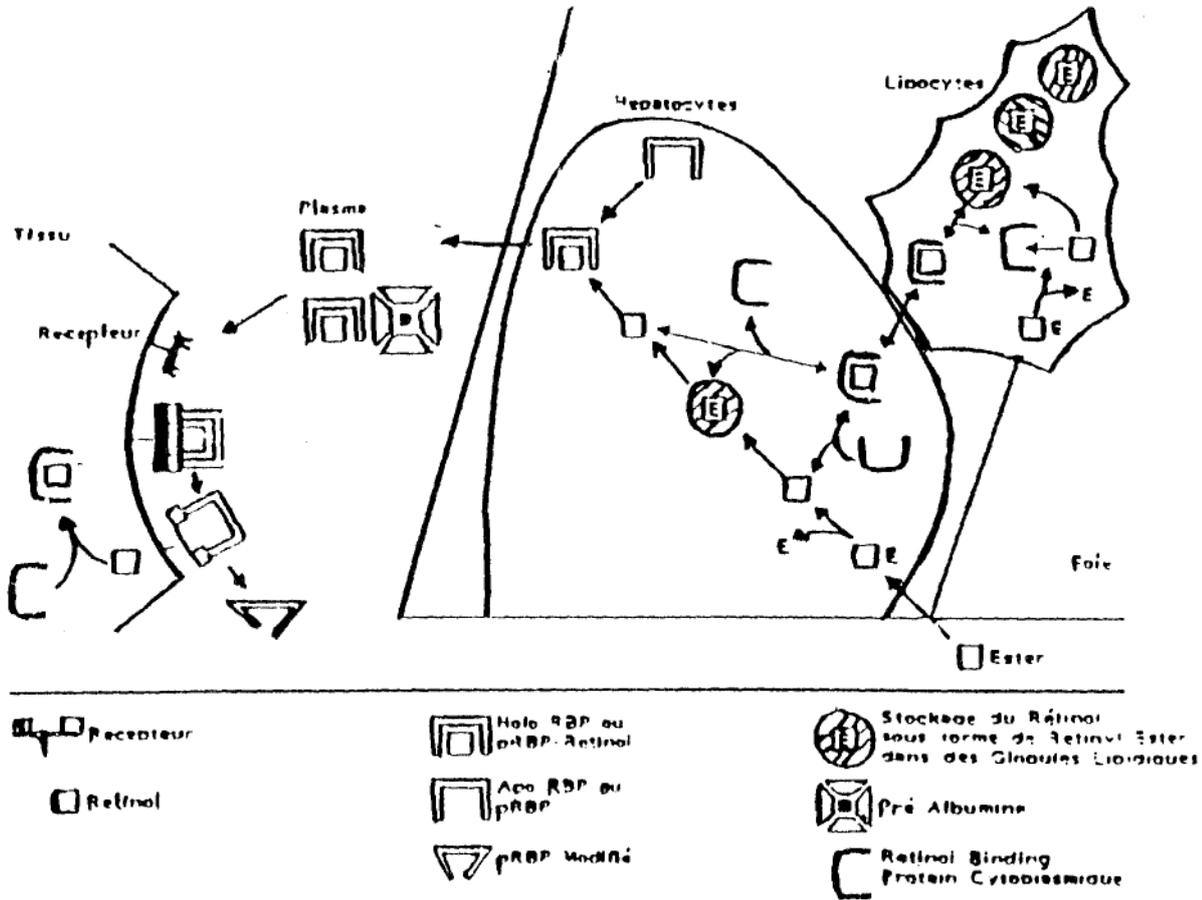
hydrolase

rétinol

rétinol



Metabolisme et fonction de la vitamine A



STOCKAGE HEPATIQUE DE LA VITAMINE A

MANESME O., 1985, (59)

- Les pro Vitamine A sont absorbées sans clivage et hydrolysées en rétinol dans la cellule intestinale; le rétinol peut alors être réduit en rétinol qui est transporté par les chylomicrons.

Une très faible quantité de β carotène ne subit aucune hydrolyse et gagne le foie par le canal thoracique et la circulation générale.

A l'état physiologique les taux plasmatiques de β carotène sont de l'ordre de 0,5 mg / L ; les caroténoïdes participent avec 4 autres pigments (mélanine, mélanocyte, hémoglobine réduite et oxyhémoglobine) à la coloration de la peau.

Lorsque le β carotène est administré à doses élevées, son absorption intestinale sous forme inchangée devient beaucoup plus importante; elle dépend de la présence de lipides et des sels biliaires; le β carotène étant liposoluble, il se lie aux chylomicrons puis aux lipoprotéines. Aussi l'horaire des prises par rapport aux repas et la composition de ceux-ci ont une grande influence sur le taux d'absorption du β carotène.

Les meilleures conditions d'absorption sont réalisées lorsque le β carotène est administré en phase hydrodispersible et accompagné d'un repas lipidique.

Lorsque le β carotène est administré de cette manière en traitement de longue durée, ses taux plasmatiques atteignent 3 à 4 fois les concentrations de base.

De plus, il se concentre dans les glandes sébacées, le sébum et dans la couche cornée de la peau. Il est à l'origine d'une coloration cutanée rouge-orangée prédominant à la paume des mains, la plante des pieds et au visage.

La transformation du β carotène en Vitamine A dans l'organisme fait l'objet d'une régulation dont le mécanisme reste à élucider.

—————> Mise en réserve dans le foie

Le foie contient 90% de la Vitamine A de l'organisme et 30 à 60% de la quantité absorbée par jour sont mis en réserve dans le foie.

La transformation des rétinyl - ester dans le foie est encore mal connue.

En fait, dans le foie, le rétinol est libéré sous l'action d'une rétinyl - ester hydrolase; il peut être alors directement stocké dans les globules lipidiques des hépatocytes et des adipocytes sous forme d'ester après action d'une synthétase; soit lié à un transporteur spécifique cytoplasmique : la "cellular rétinol binding protein"; c. RBP qui transporte le rétinol vers un site de stockage; ou la "rétinol binding protein plasmatique" p. RBP.

En réponse à une stimulation la rétinyl ester hydrolase libère le rétinol des globules lipidiques. Celui ci se lie à la p RBP pour passer dans le plasma. Ce complexe est appelé Holo RBP.

Attention en cas d'altération hépatique (hépatite, cirrhose) la baisse de la rétinolémie peut être beaucoup plus rapide, secondaire alors à des difficultés de stockage de la Vitamine A ou à des perturbations de la synthèse de la p. RBP.

—————> Autres voies métaboliques de la Vitamine A

Dans le foie, le rétinol peut être :

- oxydé en rétinol puis acide rétinoïque .

Cette oxydation est irréversible.

L'acide rétinoïque formé n'est pas mis en réserve et ne possède qu'une partie des actions de la Vitamine A; en particulier il ne possède pas d'action sur la vision et la croissance.

- phosphorylé en rétinyl palmitate avec formation d'un rétinyl phosphomannose qui interviendrait dans la synthèse des glycoprotéines.

- glucuroconjugué et excrété dans la bile.

—————> Le transport plasmatique

Le rétinol est libéré dans le plasma sous forme liée au p RBP. La p RBP libre (apo RBP) est synthétisée dans le foie. C'est un monomère de poids moléculaire 21 000 possédant un site récepteur pour le rétinol.

Dans le plasma; le complexe rétinol p RBP (Holo RBP) se lie à la préalbumine ce qui le protégerait d'une dégradation dans le rein. Au cours des insuffisances rénales chroniques en effet les taux de p RBP et de rétinol sont augmentés en raison de la diminution de cette dégradation rénale. On a également liaison à la thyroxine dans ce complexe.

Après liaison à des récepteurs membranaires, le rétinol entre dans la cellule cible et la p RBP est réémise en circulation puis dégradée.

Après son entrée dans la cellule le rétinol se fixe sur une c RBP qui le transporte jusqu'au site d'action.

F - LES FONCTIONS BIOLOGIQUES

1 - Les fonctions biologiques auxquelles participent la vitamine A et ses dérivés sont les suivantes
Grosleron N., 1985, (36) et Manesme O., 1985, (59).

- Cycle de la rhodopsine : vision de la couleur, vision corpusculaire .

En effet, l'adaptation à l'obscurité est un phénomène physico chimique lié à la présence dans les bâtonnets de la rétine de rhodopsine; pigment photosensible dont la décomposition par une lumière de faible intensité déclenche un influx nerveux.

Sa synthèse se fait à partir du 11 cis rétinol qui est fourni d'une part par la décomposition de la rhodopsine elle même et d'autre part par la transformation du rétinol d'origine plasmatique . Le transrétinol et le 11 cis rétinol seraient transportés par une c RBP spécifique des cellules de la rétine.

- Phénomène de la reproduction; spermatogénèse; développement placentaire
- Sécrétion du mucus

- Les processus de différenciation et la prolifération cellulaire

Le mécanisme de l'intervention de la vitamine A siège en grande partie au niveau nucléaire.

—————> Il a été constaté que le rétinol pris en charge dans la cellule par une protéine spécifique le cRBP est transféré dans le noyau et se fixe sur des récepteurs protéiques particuliers de la chromatine.

—————> Puis les chercheurs ont analysé les conséquences cellulaires de la carence : divers ARNm tendent à disparaître des cellules hépatiques, intestinales, testiculaires.

La teneur en certaines protéines normales baisse tandis qu'apparaissent des protéines anormales de type embryonnaires. Ces phénomènes sont réversibles sous l'action du rétinol ou de l'acide rétinoïque.

Il est donc clair que le rétinol exerce un contrôle sur l'expression de gènes codant pour de nombreuses protéines notamment celles du cytosquelette et de la matrice cellulaire. Ce contrôle rend la vitamine A indispensable au fonctionnement normal du mécanisme responsable de la différenciation et de la multiplication des cellules génératrices des épithéliums.

On discerne dès lors la possibilité de relation entre la vitamine A et la carcinogénèse.

- stabilité des membranes
- induction du cytochrome P450
- biosynthèse et régulation du métabolisme des hormones stéroïdes : mais ces 3 dernières fonctions n'ont pas été démontrées.

2 - Les fonctions biologiques auxquelles participe le β carotène sont :

Eunice J., 1992, (26).

- provitamine A
- anti radicaux libres (ceci indépendamment de son rôle de provitamine A)
- capteur d'oxygène singulet
- prévient les dégâts de photosensibilisation chez les bactéries, animaux et humains.
- prévient la phototoxicité du psoralène
- diminue les échanges entre chromatides - soeurs et les transformations malignes dans les cultures de cellules.
- inhibe les tumeurs induites par les UV et les produits chimiques chez les rongeurs.
- diminue les lésions précancéreuses chez les humains.
- modifie la réponse immune .

G - DOSAGE SANGUIN

Arnaud J., 1991, (1).

Vitamine A et β carotène :

* Principe du dosage

1. Précipitation des protéines par l'alcool.
2. Extraction de la Vitamine A et du β carotène par le cyclohexane
3. Mesure de la fluorescence de la Vitamine A naturellement fluorescente au fluorimètre Aminco.

λ excitation : 340 nm

λ émission : 490 nm

4. Mesure de l'absorbance du β carotène au DBGT (spectrophotomètre) à 450 nm sur le même extrait cyclohexanique à condition de faire les mesures très rapidement.

* Techniques

C'est une méthode fluorimétrique de Brubacher et Vuilleumier (clin. Bioch. principes méthodes - lab Bioch. C).

→ Prélèvements

- 5 ml de sang sur héparine (au minimum 2 ml), le tube est entouré de papier opaque (aluminium).

- Conservation : centrifuger rapidement le prélèvement; séparer le plasma, le mettre au congélateur à - 20°C dans un tube entouré de papier aluminium.

→ Réactifs

- Ethanol (Merck)
- Cyclohexane (Merck - spécial fluorimétrie)
- Solution mère de vitamine A

—————→ Appareillage

- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre DBGT
- Fluorimètre
- Agitateur Vortex
- Tubes Kimax 30 ml
- Tubes à centrifuger

—————→ Préparation et dosage de la solution mère

a) Principe

Le rétinol et son acétate sont très instables et assez difficiles à dissoudre. La solution mère de rétinol ou d'acétate de rétinol se dégrade facilement, par conséquent il faut déterminer lors de chaque manipulation la concentration exacte de la solution de vitamine A, conservée au congélateur. Lorsque la solution mère n'est plus active c'est à dire que son titre est < 1 mg/litre; préparer une nouvelle solution mère à partir d'une ampoule d'acétate de rétinol lyophilisé dans l'alcool éthylique.

Mesurer le taux réel de cette solution en la diluant au $\frac{1}{10\ 000}$ ème

b) Mode opératoire et calculs

- 1 g d'acétate de rétinol dissout dans 50 ml d'éthanol : solution mère
- solution fille : 0,5 ml de solution mère, Ethanol QSP 50 ml
- solution de travail : solution fille 0,5 ml
Ethanol QSP 50 ml.

On passe cette solution au DBGT. Le pic maximum à 326 nm indique une DO de x.

Le coefficient d'extinction $E_{1\text{ cm}}^{\%}$ de l'acétate de rétinol est de 1550.

La loi de BEER LAMBERT donne :

$$\left[\text{solution étalon} \right] = \frac{\text{DO}}{1550} \text{ en g /100 ml}$$

$$\left[\text{solution mère} \right] = (\text{solution étalon}) \cdot 10\ 000$$

—————> Etablissement de la gamme d'étalonnage

On prépare la solution étalon à partir de la solution mère de façon à ce qu'elle contienne entre 1 à 2 mg/litre de Vitamine A soit 3,49 à 6,98 $\mu\text{mole/litre}$ (PM : 286,456).

Solution étalon à 6,42 $\mu\text{mol/l}$	0,5 ml	0,5 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Cyclohexane	19,5 ml	9,5 ml	14 ml	9 ml	6 ml	4 ml
Dilution	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{15}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{7}$	$\frac{1}{5}$
Concentration de chaque échantillon en $\mu\text{mol/l}$	0,16	0,32	0,43	0,64	0,92	1,28

Lire la gamme immédiatement au fluorimètre , faire le zéro sur l'air.

Lire le blanc sur le cyclohexane.

—————> Dosage

Dans un tube à centrifuger mettre :

- Plasma ou sérum 0,5 ml
- Eau distillée 1 ml
- Ethanol 2 ml

- Mélanger :

- Cyclohexane spécial fluorimétrie : 2 ml

- Agiter 1 à 2 mm au Vortex

- Centrifuger brièvement pour séparer les 2 phases.

Recueillir la phase cyclohexanique supérieure à la pipette pasteur. Garder cette phase même après la lecture en fluorimétrie.

NB : Tenir compte de la dilution au 1/4 (la Vitamine A est contenue dans 0,5 ml de plasma et extraite par 2 ml de cyclohexane).

a) Dosage de la VITAMINE A

- Fluorimétrie λ_{ex} : 340 nm

λ_{em} : 490 nm

fentes n° 2 en positions intermédiaires

T = 3.

- Passer la gamme d'étalonnage et le dosage dans les mêmes conditions. Faire le blanc sur le cyclohexane.

- Tracer la courbe % F1 (f(conc.))

- Tenir compte de la dilution au 1/4 pour rendre le résultat

b) Dosage du β carotène

- Spectrophotométrie DBGT (λ_{max} : 273; 453; 481 nm)

- Tracer le spectre de 550 nm à 350 nm après avoir fait le zéro sur le cyclohexane pur.

—————→ Calcul à partir d'une droite d'étalonnage tracée à partir du β carotène

—————→ Calcul en connaissant le $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ qui est 2500.

La concentration en $\mu\text{mol} / \text{l}$ sachant que :

$$DO = \frac{(2 \times DO_{450}) - (DO_{550} + DO_{350})}{2}$$

$$C = \frac{DO \times 4}{2500} \times \frac{10^7}{536,9} \quad \mu\text{mol} / \text{l}$$

$$= DO \times 29,8 \quad \mu\text{mol} / \text{l}$$

c) Valeurs normales

Vitamine A :

Homme adulte 2,9 + ou - 0,6 $\mu\text{mol} / \text{l}$

Femme adulte 2,5 + ou - 0,7 $\mu\text{mol} / \text{l}$

β carotène :

0,93 - 5,6 mmol / l

Variations pathologiques :

Vitamine A : carence si :

< 0,7 $\mu\text{mol} / \text{l}$ au dessus de 6 mois

< 1,0 $\mu\text{mol} / \text{l}$ de 5 à 17 ans

< 0,7 $\mu\text{mol} / \text{l}$ chez l'adulte

β carotène :

Les taux sont très dépendants du régime alimentaire.

Une partie seulement de β carotène est convertie en vitamine A.

H - PHARMACOCINETIQUE DU β CAROTENE

- Administration dose unique :

6 volontaires sains reçoivent un régime alimentaire pauvre en graisses pendant 3 jours.

Le 4ème jour on leur administre en une seule prise 6 mg de β carotène.

Des échantillons de sang sont prélevés après 1h30, 4h, 7h, 24h, 7 jours et 14 jours.

On constate que l'administration d'une dose unique n'a qu'une influence insignifiante sur le taux plasmatique du β carotène. Celui-ci s'élève passagèrement entre la 4ème et la 7ème heure; on ne retrouve pas de différence avec le taux initial après la 24ème heure.

La concentration plasmatique de vitamine A n'est pas modifiée au cours de cet essai.

- Administration de doses répétées

L'administration à 18 volontaires sains de 60 mg de β carotène par jour pendant 4 semaines permet d'enregistrer les données suivantes : les taux plasmatiques de β carotène atteignent leur niveau d'équilibre à la 2ème semaine. Les taux plasmatiques de vitamine A demeurent constants et dans les limites de la normale.

I - PREVENTION DU CANCER

a - Introduction

La chimioprévention est définie par l'instauration d'une diététique à base de produits synthétiques ou naturels sélectionnés d'avance afin de réduire l'incidence des cancers .

Hattchouel J.M., 1992, (41).

Cette définition est basée sur l'accumulation des données en laboratoire et études épidémiologiques qui prouvent que certains agents peuvent arrêter ou freiner la progression des cancers chez l'animal et peuvent réduire les risques de cancers chez l'homme . *Malone E., 1991, (58).*

La prévention de nos jours ne s'applique essentiellement qu'au niveau de la promotion des cancers.

L'utilisation de tels agents pour prévenir le développement des cancers peut impliquer l'utilisation de vitamines, minéraux, produits synthétiques et médicaments.

Pour s'assurer de tels effets chimiopréventifs, de nombreuses études en laboratoires et d'enquêtes épidémiologiques ont été nécessaires. *Malone E., 1991, (58).*

b - Etudes rétrospectives et prospectives

Pour étudier l'influence de la consommation du β carotène sur l'incidence des cancers, on peut recourir à 2 grands types d'études épidémiologiques :

- Etudes prospectives

* habitudes alimentaires

* dosages sériques

- Etudes rétrospectives

* habitudes alimentaires

Explication :

a- Au début d'une étude prospective fondée sur les taux sériques (année 0); on prélève un échantillon de sérum dans une vaste population cliniquement exempte de cancer.

On congèle l'échantillon à - 20°C au mieux à -80°C. Puis on suit tout le groupe pendant plusieurs années. Les sujets chez qui l'on pose le diagnostic de cancer au cours des 3 années suivantes sont exclus de l'étude; on estime en effet que leur cancer était probablement déjà présent à l'année 0.

Dans les échantillons de sérum des sujets qui développent un cancer par la suite, on dose le β carotène. Pour chaque cas de cancer on réalise en même temps les mêmes témoins exempts de cancer et appariés sur le plan de l'âge, du sexe, des habitudes tabagiques, du niveau socio-économique et de la durée de stockage de l'échantillon.

On compare alors l'incidence des cancers chez les sujets ayant un taux sérique peu élevé de β carotène à l'incidence chez les sujets ayant un taux sérique élevé.

b-Les études prospectives et rétrospectives fondées sur l'analyse des habitudes alimentaires sont menées selon les mêmes principes mais dans ces cas le dosage sérique est remplacé par un questionnaire et un entretien concernant la fréquence de consommation de divers aliments contenant du β carotène. *Salheld R.M.,1991, (85)*.

Plusieurs études vont vous être décrites dans ce mémoire et toutes se rejoindront afin de prouver que l'incidence de cancer est plus faible parmi les sujets à consommation alimentaire ou taux sérique élevé en β carotène.

Il y a une diversité de localisation des cancers pour lesquelles on a constaté cette corrélation inverse = estomac, côlon, oesophage, cavité buccale, vessie, larynx, col utérin, et sein.

Mais c'est surtout pour le cancer du poumon que les arguments plaident en faveur d'un effet protecteur du β carotène.

Etudes rétrospectives (habitudes alimentaires)

L'incidence du cancer du poumon est plus faible chez les sujets qui consomment beaucoup de β carotène.

L'étude de *Mettlin,1973, (67)* a montré une réduction progressive du risque relatif de 1,7 à 1 parallèlement à l'amélioration de l'indice de β carotène passant de (-) de 75 000 UI/mois à (+) de 124 000 UI / mois .

Etudes prospectives (habitudes alimentaires et dosage sérique)

Les résultats sont les mêmes que ceux obtenus pour les études rétrospectives c'est à dire une incidence du cancer du poumon plus faible chez les sujets consommant beaucoup de β carotène.

Dans cette étude on a même tenu compte du fait que les individus étudiés soient fumeurs ou non et les études de *Schekelle,1981, (87)* ont prouvé que le risque relatif de cancer du poumon a progressivement diminué passant de 8,1 à 1 quand la consommation de β carotène a augmenté.

De plus les dosages sériques ont également prouvé que les malades atteints de cancer du poumon étaient ceux qui consommaient très peu de β carotène.

c - Etudes expérimentales

Suite à ces études épidémiologiques en faveur d'un effet protecteur du β carotène les chercheurs ont entrepris des études expérimentales.

Les premières ont concerné l'expérimentation animale.

Ex : Ces études ont porté sur diverses espèces animales et ont concerné des tumeurs de diverses localisations, qu'il s'agisse de tumeurs spontanées, transplantées ou induites expérimentalement par divers agents.

Les animaux choisis sont le rat, la souris, et le hamster porteurs de tumeurs induites par le diméthyl benzanthracène ou porteurs de tumeurs transplantées.

Ces animaux ont reçu une alimentation faiblement supplémentée en β carotène (150 à 300 g de carottes pour 3000 Kcalories).

—————→ au bout de 31 semaines on a noté une diminution d'environ 50% sur le plan de la multiplicité et de l'incidence des tumeurs, une diminution de 40% des adénomes et une diminution de 85 à 90% des adénocarcinomes.

—————→ au bout de 44 semaines la mortalité a été diminuée de moitié.

De plus les études menées par le *Pr Santamaria (Pavie , Italie)* sur les animaux porteurs de cancer de l'estomac ont montré une activité positive du β carotène aux stades tardifs de la cancérogénèse c'est à dire la promotion et progression. *Salheld R.M., 1991, (85).*

Puis les méthodes expérimentales se sont adressées à l'homme.

Le *Pr Hans Stich* (Département de cancérogénèse liée à l'environnement, centre de recherche anticancéreux de Vancouver ; Canada) a montré que le β carotène provoquait la disparition d'un marqueur précancéreux à savoir les micronoyaux des cellules de la muqueuse buccale. Ces micronoyaux sont en effet un signe de cassure chromosomique.

Ex : les asiatiques qui chiquent le tabac avec du bétel et qui ont souvent des cancers de la bouche.

Au bout de 3 mois de traitement par le rétinol (100 000 UI/ semaine) et β carotène (300 000 UI/semaine) on a enregistré une diminution de la proportion de micronoyaux (4% → 1,5 %). Utilisé seul, le β carotène s'est avéré efficace pour prévenir une récurrence.

D'autres études sont en cours actuellement pour confirmer ce résultat. (ex : Etude sur 280 pêcheurs au Kérala sud ouest de l'Inde avec la collaboration des laboratoires Roche Bâle).

d - Relation cancer et taux de β carotène

Dans de nombreuses études épidémiologiques, on a noté une corrélation inverse entre la prise de fruits et légumes et les risques de cancer.

Les personnes dont la tradition est de consommer régulièrement et fréquemment les légumes verts et fruits ont une faible incidence de cancer par rapport aux personnes n'en consommant pas du tout ou très peu.

Ce rapport est démontré par diverses expériences s'appliquant à des cancers différents :

Weibsburger J., 1991, (100).

1 - Cancer des cavités orales, nasopharynx et oesophage

Ce type de cancers est souvent rencontré chez les personnes qui mâchent du tabac ou qui fument beaucoup de cigarettes et qui consomment de l'alcool.

2 - Cancer de l'estomac

Ce cancer se trouve plus particulièrement dans les populations dont les habitudes alimentaires sont de consommer des produits salés, marinés ou fumés et peu de légumes verts et fruits .

Cette situation était surtout localisée en Amérique du nord. A présent ce type de cancer tend à diminuer du fait des progrès considérables pour la conservation des aliments et l'arrêt des procédés artisanaux (salage, marinage etc...) et surtout la consommation de produits verts frais. Certains pays pourtant, du fait des problèmes économiques (l'ex Union Soviétique par exemple) se voient encore attribuer des taux élevés de cancer de l'estomac (pas de réfrigérateur et peu de consommation de légumes verts frais).

3 - Cancers du poumon .

Cette maladie est clairement associée au tabagisme. Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence la relation entre des taux élevés de vitamine A dans le sang et un effet protecteur du β carotène vis à vis des cancers du poumon (préférentiellement carcinomes épidermoïdes).

Les études sur animaux ont confirmé ce résultat.

La première recommandation que l'on puisse faire aux fumeurs serait de stopper cette habitude de fumer mais dans bien des cas ceci leur semble impossible par conséquent la deuxième recommandation serait de consommer plus de légumes verts et fruits notamment ceux qui sont riches en β carotène et vitamine A.

De plus, dans certaines régions de Chine on a observé que des femmes non fumeurs avaient de hauts risques de cancers des poumons, la relation cancer-cigarettes se révélant faible, il a été mis en évidence alors la relation cancer et faible consommation de légumes verts et fruits .

4 - Cancer du pancréas .

Les facteurs de risque pour ces cancers sont liés au tabagisme et à une faible consommation en légumes verts et fruits, les études faites n'ont pas encore prouvé l'action préventive du β carotène.

Il en est de même pour les cancers du foie, du gros intestin, de la vessie, des reins, des seins, de l'utérus et de la prostate.

Exemple Comstock W., 1991, (13).

En 1974 et 1975, des sérums furent collectés à partir de 25802 volontaires à Washington, Maryland. Ces sérums furent gardés au froid à -73°C jusqu'au moment des essais.

Ces échantillons étaient divisés en 436 cas de cancer et 765 cas de sujets témoins.

Huit organes ont été étudiés : côlon, rectum, pancréas, poumons, cellules basales de la peau, seins, prostate et vessie ainsi qu'un mélanome.

Les taux élevés de β carotène dans les sérums ont montré une action fortement protectrice vis à vis des carcinomes épidermoïdes. Les taux élevés de vitamine E dans les sérums ont également montré ce même effet protecteur.

Par contre cette action protectrice ne fut pas significative en ce qui concerne les autres types de cancers.

Pour démontrer le fait que le β carotène diminue le risque d'évolution des cancers il faut procéder à des mesures de son taux dans les sérums des patients atteints de cancers avant son stade définitif et comparer ces taux avec ceux des personnes similaires qui n'ont pas développé le cancer.

Il faut donc pour cela des banques de sérums et des registres de cancers dans des populations bien définies.

Les 2 séries d'échantillons sont analysées le même jour, avec les mêmes réactifs dans le même laboratoire. Les taux de caroténoïdes et de Vitamine E sont déterminés par HPLC.

Pour chaque cas de cancer, on prend 1 sujet présentant un cancer et 2 cas de sujet témoins (exception pour le cancer de la prostate), sélectionnant parmi ces sujets témoins l'individu le plus jeune et le plus âgé. **Table 1.**

Ces taux de β carotène dans les différents cas de figure sont reportés dans **la table 2.** Deux endroits, poumon et vessie montrent raisonnablement une grande différence avec les sujets témoins et ceci en faveur d'un effet protecteur du β carotène, chez ces sujets témoins il y a plus de β carotène qui pourrait alors jouer son rôle protecteur et empêcherait la survenue d'un cancer. De plus la **table 3** montre également une relation inversement proportionnelle entre le risque de cancer et le taux de β carotène dans le sang.

Pour plus de précisions les cas de cancers du poumon ont été divisés en 4 types histologiques. La **table 4** nous montre sur quel type de cellules cancéreuses peut agir le β carotène, il s'agit des carcinomes pulmonaires à cellules squameuses.

Plusieurs autres études ont été réalisées dans le monde afin de vérifier ces résultats et la relation inversement proportionnelle entre le taux de β carotène dans le sang et les risques de cancer **Table 5.**

Elles se rejoignent toutes en faveur d'un effet protecteur du β carotène vis à vis du cancer du poumon plus spécifiquement.

**Prédiagnostic de cancers à partir des taux de caroténoïdes dans le sang
dans l'état de Washington, Maryland**

Table 1

nombre de sujet atteints et témoins par localisation			
(CD-8 code)	localisation	sujets atteints	sujets témoins
153	Colon	72	143
154,7	Rectum	34	68
157	Pancreas	22	44
162,1	poumons	99	196
172	mélanome et peau	20	40
173	cellules basales et peau	21	42
174	seins, postmenopausals	30	59
185	Prostate	103	103
188	vessie	35	70
	Total	436	765

Table 2

taux de β carotène dans le sérum chez des sujets atteints et témoins selon la localisation				
(CD-8 code)	localisation	sujets atteints $\mu\text{mol/L}$	sujets témoins $\mu\text{mol/L}$	pourcentage différence %
153	Colon	0,49	0,52	-6
154,7	Rectum	0,44	0,38	16
157	Pancreas	0,73	0,7	4
162,1	poumons	0,37	0,44	-16
172	mélanome et peau	0,33	0,33	0
173	cellules basales et peau	0,30	0,32	-6
174	seins postmenopausals	0,37	0,41	-10
185	Prostate	0,45	0,45	0
188	vessie	0,39	0,52	-25

Table 3

relation dose effet entre le taux de β carotène et le risque de cancers à certains endroits									
Odds ratios									
(CD-8 code)	localisation	élevé	-	-	moyen	-	-	bas	valeur approchée
153	Colon	1,0	1,1		1,5		1,0		
154,7	Rectum	1,0		0,9		0,6			
157	Pancreas	1,0			1,0				
162,1	poumons		1,2		1,8			2,2	0,04
172	mélanome peau	1,0			4,3				
173	cellules basales peau	1,0		0,2		1,6			
174	seins postmenopausals	1,0			0,6				
185	Prostate	1,0		1,6		1,4			
188	vessie	1,0							

Table 4

type de cellule	risque de cancer du poumon associé à un faible taux sanguin de β carotène et de vitamine E selon le type de cellule			
	β carotène		Vitamine E	
	Odds ratio *	limites à 95 %	Odds ratio *	limites à 95 %
cellules squameuses	4,3	1,4 : 13,4	2,3	0,8 : 7,0
petites cellules	1,1	0,4 : 2,9	1,8	0,7 : 7,0
adénocarcinome	1,3	0,5 : 3,3	1,8	0,7 : 4,7
grandes cellules non spécifiques	1,5	0,5 : 5,2	2,0	0,6 : 6,4

Table 5

pourcentage de différence entre des taux de β carotène sanguin dans 4 pays												
	études											
	Basel (7)			BUPA (9)			Hawaii (8)			Washington Country		
	n*	%+	P++	n	%	P	n	%	P	n	%	P
Colon							81	-19		72	-6	0,93
Rectum							32	-4		34	16	0,26
colorectal	14	-21		30	-11							
poumons	35	(-38)		50	(-22)	0,01	74	(-31)	0,04	99	(-16)	0,04
vessie				15	-9		27	0		35	-25	0,35

* nombre de sujets
+ 100 cas de sujets atteints - sujets témoins / sujets témoins
++ P valeur approchée

TABLE I
Factors and possible mechanisms in main epithelial cancer causation and prevention

Disease	Risk factors	Mechanism	Protective elements	Mechanism
Lung cancer	Cigarette smoking	Complex mixture of genotoxic carcinogens polycyclic aromatic hydrocarbons and tobacco specific nitrosamines and risk determining enhancing, promoting agents. Abestos, air pollutants have strong cocarcinogenic effect	Yellow-green vegetables	Retinoids, β carotène inhibit development of lesions through strengthening patency of gap junctions.
	Occupational	Polycyclic hydrocarbons coal gas work, bis (chloromethyl) ether, bis (chloroethyl) sulfide, arsenic, nickel, and chromate ores.		
Oral cancer	Smoking tobacco chewing; betel chewing, smoking and alcohol	Carcinogens from tobacco (mainly tobacco-specific nitrosamines), betel nut, hydroxy radicals	Yellow-green vegetables	Retinoids, β carotène
Kidney cancer	Smoking, pickled fish unknown	Carcinogens from tobacco, unknown mechanisms	?	?
	Obesity	Endocrines : fat cells produce estrogens acting as carcinogens ?	Weight control/loss	Lowers excessive nonphysiologic estrogen levels
Nasopharyngeal cancer	Salted, pickled fish Viral factors Occupational	Contains specific nitrosamine ? Can increase cell cycling Wood and leather workers	? Vaccination ?	?
Esophageal cancer	Salted, pickled food ?	Specific nitrosamine	Yellow green vegetables	Role of vegetables unknown is risk factor present in food
	Alcohol intake + smoking	Alcohol modifies esophageal metabolism of tobacco-specific carcinogens	Yellow green vegetables	(β carotène, protective element)
	Tobacco chewing	Tobacco-specific carcinogens and promoters ?	Vegetables	β carotène, retinoids
Gastric cancer (intestinal)	Salted, pickled food	Nitrosoindoles, phenolic diazotates	Green yellow vegetables	Role of vegetables unknown if risk factor present in food, but may assiste in differentiation
	Geochemical nitrate and salt	Formation of gastric carcinogens, above, in stomach	Green-yellow vegetables, fruits, vitamins C and E	Prevent formation of carcinogen : cellular tissue defenses.

TABLE 1 (continued)

Disease	Risk factors	Mechanism	Protective elements	Mechanism
Bladder cancer	Bilharzia : schistosomiasis	Carcinogens unknow; increases cell proliferation enhances risk	Yellow green vegetables	?
	Smoking Occupational	Unknown Arylamines	Yellow green vegetables ---	Retinoids ---
Endocrine-related cancers, prostate, breast, ovary	Total dictary fat (saturated + w 6 polyunsaturated lipids)	Complex multieffector elements, hormonal balances, membrane and intracellular effectors	Monounsaturated oil (olive); w-3 polyunsaturated oils Medium-chain triglycerides Cercal fiber end pectin, yelow-green vegetables	Neutral or protective action on hormone metabolism Caloric equivalent to carbohydrate affects enteroheptic cycling of hormones
Endometrium	Same as above, excessive body weight	Same as above, fat cells generate estrogen	Same as above, weight control/loss	Same as above; lowers excessive nonphysiologic estrogen levels
Pancreas	Same as endocrine Cigarette smoking	Fat affects physiology Tobacco-specific nitrosamines	Low-fat diets ?	Protects function ?
Colon cancer				
Proximal	?	?	?	?
Distal	Same as endocrine related cancers	Biosynthesis of cholesterol, thence bile acids and colon cancer promotion including higher cell cycling.	Cereal fiber	Increases stool bulk, dilutes promoters, lower intestinal pH.
Rectal cancer	Alcoholic beverages	Increases cell cycling in rectum	Cereal fiber ?	Dilutes effectors by increasing stool bulk
Liver cancer	Mold contaminated foods	Mycotoxins	Avoid moldy, pickled foods, improve nutrition, more protein, fruits and vegetables.	Lower carcinogen intake
	Some plants Pickel foods Chronic virus High level of specific alcoholic beverages Occupational Iatrogenic	Pyrrrolizidin alkaloids Nitrosamines Hepatitis B Damages liver, risk of cirrhosis potentiates effect of carcinogens Vinyl chloride Some oral contraceptives (infrequent occurrence)	Vaccination Decrease intake of alcohol Lower exposure	May lower cell duplication rates

J - MECANISME D'ACTION

I - Mécanisme d'action en chimioprévention de la vitamine A et ses dérivés

Les rétinoïdes synthétiques ou naturels analogues de la Vitamine A :

- bloquent fréquemment l'expression phénotypique des cancers in vitro
- inhibent également la croissance : antiprolifératifs
- induisent une différenciation cellulaire pour certains types de cellules malignes chez les animaux et les humains. *Lippman S.M., 1987, (51).*

Le mécanisme d'action de ces rétinoïdes fait intervenir essentiellement :

- * la cascade de la protéine C (PKc)
- * leurs effets sur l'expression des oncogènes

Avec modification de :

- * la synthèse enzymatique
- * des propriétés membranaires
- * des facteurs de croissance
- * des récepteurs protéiques
- * l'expression génomique et postgénomique
- * la matrice extracellulaire
- * la réponse immunitaire.

En ce qui concerne la prévention des cancers, les rétinoïdes sont plus efficaces pour les cancers de la peau.

La Vitamine A va jouer un rôle en chimioprévention de par ces effets normaux physiologiques : Il faut noter son rôle dans la vision , la reproduction et surtout dans la croissance, la différenciation et la prolifération cellulaire. *Grosleron N., 1985, (36).*

EXPLICATION

Lippman S.M., 1987, (51).

Les états métaplasiques dans les épithéliums sont accompagnés entre autre d'une élévation de la division cellulaire ; par conséquent une synthèse d'ADN ou d'ARN a lieu même en absence de Vitamine A. *Wolbach, 1925, (102).* Cette différence accroît les effets de carcinogènes chimiques sur les tissus épithéliaux. *Nettesheim P., 1979, (72).*

En cas d'une supplémentation en rétinoïdes, cette synthèse n'a plus lieu et ces derniers vont permettre un retour à la normale par régulation de la différenciation.

NB : cette régulation de la différenciation cellulaire et de la prolifération se constatera plus nettement avec les dérivés acides synthétiques qu'avec la Vitamine A.

En général, l'activité antiproliférative des rétinoïdes a lieu pour de nombreuses cellules transformées et ce phénomène est réversible. *Douer D., 1982, (22) ; Lotan R., 1977, (56)*. Il a lieu après 2 à 3 jours d'exposition aux rétinoïdes et demande le même temps pour être inversé d'où l'hypothèse d'une inhibition dépendante du cycle cellulaire. Les rétinoïdes inhibent la prolifération des cellules malignes lorsque celles-ci sont en phase G1 ralentissant ainsi leur entrée en phase S. *Gallacher R.E., 1986, (32)*. On aura finalement une accumulation des cellules bloquées en phase S. Mais il est à noter qu'il n'existe pas de corrélation entre l'inhibition de croissance cellulaire induite par les rétinoïdes et le temps de doublement d'une cellule. *Lotan R., 1977, (56)*.

Certains chercheurs suggèrent que l'arrêt de croissance en phase G1 doit être régulé différemment de la différenciation cellulaire chez les cellules promyélocyaires HL 60 humaines. De même pour pouvoir poursuivre cette idée, *Lotan R., 1977, (56)* a étudié ce phénomène antiprolifératif pour les cellules cancéreuses en utilisant l'acide rétinoïque et le rétinyl acétate (sur 31 types de cellules différentes). Bien que les réponses sur chaque lignée soient différentes, la croissance était inhibée à 60%.

Outre l'effet antiprolifératif ; les rétinoïdes tendent à affecter la différenciation cellulaire pour un groupe de cellules précises et selon un mécanisme irréversible. (expérience sur les carcinomes embryonnaires F9 de la souris et sur les lignées cellulaires HL 60).

Le mécanisme par lequel les rétinoïdes altèrent la différenciation cellulaire diffère de celui utilisé pour l'effet antiprolifératif. *Vitale C., 1986, (99) ; Marcello C., 1984, (60)*. Alternativement, il pourrait y avoir un mécanisme commun des rétinoïdes mais la réponse (inhibition de croissance ou différenciation cellulaire) doit dépendre du type de cellule.

Pour ces 2 paramètres : antiprolifération et différenciation cellulaire, l'acide rétinoïque et ses analogues sont plus actifs que le rétinol, le rétinylester ou le rétinol.

Bollag W., 1979, (4) ; Cunningham W.J., 1983, (15) ; Riscoe M.K., 1986, (79)

Lotan R., 1980, (55) ; Sporn M.B., 1986, (91).

a) effets sur la synthèse enzymatique

Ex : Ornithine décarboxylase (ODC)

Transglutaminase (TG)

AMPC dépendante et AMPC indépendante protéine kinase (PKc)

1) La biosynthèse de polyamines telle que la spermidine ; la spermine ou putrescine qui sont impliquées dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire dépend d'une enzyme : ODC (ornithine décarboxylase). *Riscoe M.K., 1986, (79) ; Russell D.H., 1985, (84)*.

L'inhibition de la synthèse de cette ODC et par conséquent la déplétion des polyamines par l'acide rétinoïque est directement corrélée à l'inhibition de croissance cellulaire, à la différenciation cellulaire ainsi qu'à l'accumulation des cellules en phase G. *Gallacher R.E., 1986, (32) ; Russell D.H., 1985, (84)*. Il n'a pas été montré une inhibition de l'activité de ODC par l'acide rétinoïque mais une inhibition de sa synthèse.

2) L'activité de l'ODC est elle-même régulée par les actions de la TG (transglutaminase) intracellulaire. Cette enzyme calcium dépendante catalyse le cross-linking des protéines membranaires telles que la fibronectine et le cross-linking de certaines amines primaires vers les polypeptides *Davis P.J., 1985, (18) ; Murtaugh M.P., 1984, (70)* . Il peut y avoir un effet des rétinoïdes sur cette TG afin d'obtenir des effets antiprolifératifs. Certains chercheurs ne s'accordent pas sur la même conclusion et prouvent le contraire . *Russell D.H., 1985, (84) ; Luck G.K., 1982, (57) ; Jetten A.M., 1979, (42)* . Pour eux, l'acide rétinoïque jouerait en faveur d'une différenciation des cellules HL60 non pas par inhibition de ODC mais plutôt par augmentation de cette enzyme et des polyamines. Pour le démontrer, ils suppriment une augmentation de ODC en 1er lieu en utilisant le DFMO et vont observer un effet nul en ce qui concerne la différenciation ; par conséquent ils concluent que l'activité de ODC et la biosynthèse des polyamines sont bien impliquées dans tous les processus de différenciation des cellules HL60 . Mais ces résultats sont encore contestés quand on remarque qu'une complète déplétion des polyamines induite par l'acide rétinoïque (ex : spermidine) est la cause d'une non différenciation des cellules HL 60 .*Sugiara M., 1984, (93)*.

3) Les rétinoïdes affectent également le mécanisme de régulation de la protéine kinase AMPc calcium dépendante , *Fontana J.A., 1986, (28)*, ceci par le biais de la phosphorylation de certains substrats nécessaires lors de l'inhibition de la croissance et les processus de différenciation . *Niles R.M., 1986, (73)*. Les rétinoïdes ont un effet sur les agents qui permettent une augmentation du taux de AMPc. *Livesey S.A., 1985, (52)*.

Exemple : un changement de la phosphorylation de la tyrosine est un des évènements responsables de la transformation néoplasique ; il est impliqué dans les phénomènes de contrôle de certains facteurs de croissance. Le rétinyl acétate va pouvoir inhiber cette phosphorylation de la tyrosine chez les cellules HL60 et jouer un effet préventif des cancers . *Martner J.E., 1984, (62)*.

D'autres enzymes sont mises en jeu dans les phénomènes de prévention des cancers en synergie avec l'action des rétinoïdes, il s'agit entre autre :

- activation de la 2', 5' oligoadénylate synthétase qui est une enzyme importante pour les processus antiviraux et antiprolifératifs . *Bourgeade M.F., 1984, (6)*.
- inhibition de la cytochrome P450 isoenzyme qui est responsable de l'activation de procarcinogènes cutanés . *Tsambsaos D., 1985, (98)*.
- inhibition de la glutathion réductase . *Kumer S., 1984, (48)* .
- activation de la synthèse de la sialyltransférase et de la galactosyltransférase *Nakhasi H.L., 1984, (71)*.
- régulation de l'acétylcholine estérase . *Sidell N., 1984, (90)*.

b) Effets sur les propriétés membranaires

Les rétinoïdes ont une influence sur la synthèse et la distribution des glycoprotéines ; glycolipides; protéoglycanes et glycosaminoglycanes membranaires . *Lotan R., 1980, (55) ; Merriman R.L., 1979, (66) ; Felsted R.L., 1983, (27) .*

Ces rétinoïdes vont entre autre :

- inhiber la mobilité des anions de surface dans les sarcomes ou mélanomes .
Lotan ,1984, (54) (ceci en corrélation avec une activation de la sialyl transférase et galactosyltransférase) .
- modifier la synthèse , la distribution et la fixation de la fibronectine (grosse glycoprotéine qui est largement réduite dans les cellules transformées)
Jetten A.M., 1979, (44) ; Meromsky L., 1984, (65) ; Lotan R. ,1984, (54) ; Bolmer S.D., 1982, (5).
- entraîner une augmentation de la libération de cette fibronectine qui pourrait être impliquée lors des phénomènes de promotion et de transformation des tumeurs.
Les rétinoïdes vont donc empêcher ce phénomène de relargage de la fibronectine.
Bolmer S.D., 1982, (5) ; Zerlauth G. ,1985, (104).

Ces altérations membranaires vont modifier les échanges cellule à cellule ou cellule-substratum ce qui perturbe alors l'adhésion des cellules , leur inhibition de contact , leur migration , leur différenciation et leur croissance .*Gercel C., 1984, (34).* Toutes ces interactions peuvent affecter le comportement des tumeurs.

En plus de tous ces effets spécifiques sur la membrane, les rétinoïdes stimulent la synthèse des jonctions " gap " et augmentent par conséquent les échanges intercellulaires. *Gercel C., 1984, (34)*, ils réinstaurent le phénomène d'inhibition de contact , modifient la viscosité membranaire et les propriétés physiologiques électriques de ces membranes . *Maruyama T., 1985, (63).*

Mais à concentration élevée, ils peuvent être responsables de toxicité car ils exercent un effet détergent sur les membranes.

c) Effet sur les mitogènes et sur les facteurs de croissance

Les rétinoïdes vont moduler leurs effets mitogènes et transformer les facteurs de croissance qui agissent sur les structures membranaires tels que : *Lippman S.M., 1987, (51).*

- le facteur de croissance épidermique (EGF)
- le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)
- le facteur stimulant des colonies hématopoiétiques (CSF)
- le facteur de croissance des sarcomes
- certains promoteurs de tumeur (ex : téléocidine)
- certaines hormones (ex: insuline)*Jetten A.M., 1982, (42) ; Earp H.S., 1986, (23)*

(1) Par exemple, l'EGF intervient dans la régulation de la croissance et la différenciation épithéliale et du mésenchyme ainsi que dans l'embryogénèse et les transformations néoplasiques .*Robert A.B., 1983, (83) ; King Le J.R., 1985, (45) .*

En temps normal, l'EGF interagit avec différentes enzymes dont ODC en augmentant son activité et le niveau de putrescine impliquée dans la cascade de la protéine C (PK.C) . *King Le J.R., 1985, (45) ; Russell D.H., 1985, (84)*. L'activation de la PK C permet alors la phosphorylation des récepteurs à EGF et empêche sa fixation. Il s'agit d'un phénomène de rétrocontrôle.

—————→ *Jetten A.M., 1982, (42)* a démontré que les rétinoïdes augmentaient la production des récepteurs à EGF et donc augmentaient la fixation de ce facteur de croissance . Dans le milieu biologique, il n'y aura plus ou très peu d'EGF libre donc actif d'où diminution de l'activité d'ODC.

(2) En ce qui concerne le CSE et les précurseurs hématopoïétiques *Tobler A. et al 1986, (97)* ont trouvé que les rétinoïdes recrutent les précurseurs provenant des souches granulomacrophagiques ou augmentaient leur sensibilité à l'action du GM-CSF.

d) Effet sur l'expression génomique et postgénomique

Lippman S.M., 1987, (51).

° Afin de démontrer l'action des rétinoïdes (action semblable à celle des stéroïdes) *Chytil F., 1976, (11)* sur l'expression génomique, il a fallu en premier démontrer que ces rétinoïdes lors de leur métabolisme se fixaient bien sur des protéines de transport appelées c.R.B.P. (cellular retinol binding protein) et c.RABP (cellular acide rétinoïque binding protein) qui leur permettaient d'atteindre le noyau.

Cependant la fixation de ces c RBP a lieu sur les membranes nucléaires et non au niveau de l'ADN lui-même d'où certains problèmes de compréhension et des différences par rapport au mécanisme d'action des stéroïdes. *Sherman M.I.,1985, (88).*

Les fixations de c RBP et de c RABP étant contrôlées de façon différente indiquent que le rétinol et l'acide rétinoïque vont affecter la régulation de la croissance de différentes manières.

° De plus, il a été démontré que certains cancers répondent plus volontiers à l'action préventive des rétinoïdes lorsque de nombreux sites de fixation du c RBP et c RABP existent sur le noyau et qu'une concentration élevée de c RBP libre est corrélée à la présence de tumeurs.

—————→ Ceci joue bien en faveur d'un rôle des rétinoïdes sur l'expression génomique.

e) Effet sur les oncogènes

Les rétinoïdes empêchent l'action d'oncogènes responsables de la transformation cancéreuse de la cellule . *Lippman J.F., 1987, (51)*.

Ces oncogènes codent pour des protéines et suivant la nature de la protéine, on peut distinguer trois groupes d'oncogènes :

- les oncogènes produisant des protéines kinases phosphorylant les tyrosines

ex : Src

1er : On remarque une augmentation de la phosphorylation des tyrosines dans les cellules transformées.

2ème : De plus, les analogies entre le mécanisme d'action du facteur de croissance EGF et le produit de l'oncogène Src suggère que Src intervient dans les régulations de la croissance cellulaire.

- les oncogènes produisant les protéines du groupe des gènes ras

Elles ont des propriétés immunologiques communes

- les oncogènes produisant les protéines proches des facteurs de croissance

ex : l'oncogène sis code pour une protéine p28 - Sis dont la structure est très proche du facteur de croissance PDGF.

D'ailleurs PDGF possède d'importantes analogies avec d'autres facteurs de croissance tels que EGF produit par les cellules normales et TGF produit par les cellules cancéreuses.

ex: l'oncogène myc élabore une protéine p48 qui possède une aptitude particulière à se lier à l'ADN suggérant un rôle direct sur la division cellulaire.

Les sites d'actions de ces oncogènes sont multiples et permettent de distinguer plusieurs groupes :

* au niveau du noyau :

ex : l'oncogène myc au niveau de l'ADN

Par conséquent son rôle dans la régulation de la division cellulaire est probable.

Une anomalie d'expression de ce gène semble intervenir de façon générale dans la cancérogénèse.

* au niveau de la membrane cellulaire :

ex : Src

ras

* par autocrinie en libérant des protéines qui agissent à distance

Les rétinoïdes vont donc agir à différents niveaux d'activité des oncogènes et en différents lieux - *Westin E.H. et Al*, 1982, (101) démontrent l'action de l'acide rétinoïque sur la transcription du gène C- myc qui n'aura plus son rôle dans les phénomènes de cancérogénèse .

Il a été montré que cet acide rétinoïque modifiait l'action de ce gène c-myc surtout pour la régulation des cellules HL 60 en phase d'élongation et non lors de l'initiation . *Bentley D.L.*, 1986, (3). Mais il faut tout de même souligner que ces transformations au niveau moléculaire dues à l'acide rétinoïque sont hétérogènes et dépendent bien du type de cellules utilisées et de l'agent transformant également.

De même *Jetten et Al*, 1982, (42) ont démontré que l'acide rétinoïque doit avoir une influence sur l'activité des oncogènes V-src et V ha-ras en jouant un rôle critique sur la synthèse et la réponse aux facteurs de croissance qui sont régulés par ces oncogènes.

f) Effets sur les processus immunitaires

Les rétinoïdes ont une action sur le système immunitaire soit en l'activant (faibles doses de rétinoïdes) soit en l'inhibant (fortes doses).*Lotan R.*, 1986, (53) ; *Eccles S.*,1985, (24) ; *Shapiro P.E.*, 1985, (86).

- Par exemple la vitamine A potentialise la formation des anticorps chez la souris à laquelle on a injecté en sous cutané une protéine non immunologique de boeuf.

- Le rétinol et l'acide rétinoïque augmentent le phénomène de phagocytose et l'activité antitumorale des macrophages ainsi que la production des leucocytes polynucléaires .*Shapiro P.E.*, 1985, (86) ;*Tachibana K.*, 1984, (94) ; *Badwey J.A.*, 1986, (2) ; *Hemila H.*, 1986, (39) .

- On constate un effet des rétinoïdes sur l'interleukine IL 2. *Dennert G.*, 1985, (20) .

Ces rétinoïdes stimulent la production d' IL 2 par les cellules LT helper ce qui résulte en une prolifération des cellules LT Killer. Les souris auxquelles on a injecté les rétinoïdes montrent une augmentation de la capacité à produire des IL1 et ceci par stimulation de leurs splénocytes (macrophages essentiellement)

Indépendamment de l'hyperproduction d' IL 2, l'acide rétinoïque augmente aussi directement la prolifération des thymocytes matures. *Sidell N.*, 1985, (89).

Cependant certains rétinoïdes semblent présenter une toxicité vis à vis des lymphocytes in vitro et induisent une diminution de la formation des rosettes E.

Il est à noter que dans tous les cas l'inhibition d'une tumeur primitive est sous la dépendance des thymocytes et la fonction accessoire des macrophages est très importante pour prévenir des métastases.

Dans un organisme incapable de provoquer une réponse "T cell dépendante" ; les rétinoïdes seraient incapables d'agir et d'influencer la croissance de la tumeur.

ex : les souris ayant subi une thymectomie avec irradiation.

- L'acide rétinoïque joue également un rôle sur l'induction des cellules tueuses non induites (natural killer cells) *Dennert G., 1985, (2)*

g) effet sur le système de cascade de la Protéine Kinase Calcium (PKC)

Récemment *Cope F.O. et al, 1986, (14)*, ont trouvé une relation entre la protéine kinase calcium dépendante (PKc) ; l'induction de l'ornithine décarboxylase (ODC) et la régulation du récepteur EGF *Jetten A.M., 1986, (43)*.

Ex : Par contraste, le contrôle de EGF par la PKc se fait directement par phosphorylation du récepteur EGF et peut être par inhibition de l'internalisation de EGF.

—————> Les rétinoïdes devraient moduler l'activité de PKc.

Le récepteur de la PKc en étant activé va transmettre un signal au noyau pour augmenter la transcription des gènes codant pour ODC. Cette PKc peut réguler l'expression génomique par phosphorylation de protéines telles que les histones et par conséquent elle peut altérer l'expression d'oncogènes tel que C-myc. Si les rétinoïdes peuvent agir sur la PKc ceci ne serait que bénéfique.

h) Effets divers

Les rétinoïdes ont des effets majeurs au niveau extracellulaire et notamment une altération de la synthèse de l'activateur du plasminogène , de la collagénase et de certaines prostaglandines.

En effet, normalement les cellules primitives endothéliales produisent l'activateur du plasminogène qui est un marqueur spécifique pour la différenciation des cellules F 9 d'un tératocarcinome traité par les rétinoïdes. Cet activateur est diminué en cas de traitement par les rétinoïdes.

Les rétinoïdes inhibent la synthèse de la collagénase au niveau synovial et de la peau. (action en synergie avec celle des stéroïdes). Ce mécanisme fait appel à l'inhibition de la synthèse des ARNm de la collagénase ou à l'augmentation d'une protéine régulatrice.

En dernier lieu, l'incidence des cancers de la peau peut être augmentée par certaines prostaglandines. Les rétinoïdes vont donc s'attaquer à ces dernières et les bloquer. (De la même façon que les inhibiteurs de prostaglandines).

II- Mécanisme d'action en chimioprévention du β carotène

Les chercheurs ont pu démontrer que le β carotène présente diverses propriétés qui pourraient intervenir dans son effet anticarcinogène.

- 1 - est une pro vitamine A ; l'utilisation de cette propriété du β carotène est controversée comme nous allons le voir plus loin ; néanmoins il ne faut pas la négliger sachant que la Vitamine A joue un rôle dans l'intégrité des tissus épithéliaux.
- 2 - est un antioxydant ; inactive les radicaux libres
- 3 - neutralise l'oxygène singulet
- 4 - renforce les défenses immunitaires : il stimule la réponse des lymphocytes T aux agents mitogènes.
- 5 - neutralise l'inhibition de l'interféron par des facteurs libérés par des cellules malignes.

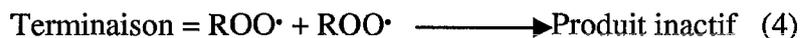
Le β carotène peut donc agir au niveau d'une ou plusieurs des 4 étapes du processus de la cancérogénèse.

- ° L'activation d'un cancérogène chimique indirect
- ° L'initiation qui provoque des anomalies irréversibles de l'information génétique (mutations)
- ° La promotion c'est à dire les modifications de l'expression de l'information génétique.
- ° La progression c'est à dire la prolifération de cellules à phénotype malin.

a) Antioxydant *Burton G.W., 1989, (8);*

Le β carotène semble-t-il va désactiver les espèces chimiques réactives telle que l'oxygène singulet, les sensibilisateurs à l'état triplet et les radicaux libres que l'on retrouve dans les phénomènes de lipoperoxydation et lors des processus de cancérogénèse. *Krinsky N., 1968, (46).*

Rappel sur les radicaux libres :



3a \longrightarrow Soustraction d'un atome d'hydrogène

3b \longrightarrow Formation d'une double liaison

Cette chaîne de réaction peut être fortement stoppée par addition d'une faible quantité d'antioxydant. Dans les milieux biologiques il s'agit de l' α tocophérol liposoluble *Burton G.W., 1982, (9)*. En effet, ces phénols Ar OH sont capables d'une telle réaction vis à vis du radical peroxy car leur hydrogène phénolique se soustrait facilement. Le radical phénoxy formé est de la forme Ar O \cdot ; il est stable et ne réagit pas vis à vis d'autres substances et vis à vis de l'O₂ donc il y a arrêt de la chaîne de propagation. $\text{Ar OH} + \text{ROO}\cdot \longrightarrow \text{ArO}\cdot + \text{ROOH} \quad (5)$

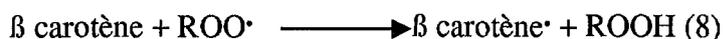
Eventuellement ce radical phénoxy peut être détruit par réaction avec une 2ème radical peroxy :



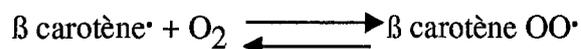
Parfois il est réduit et reforme le phénol de départ ceci grâce à l'action d'un agent soluble tel que la vitamine C.



En ce qui concerne le β carotène, ce dernier n'a pas vraiment les caractéristiques structurales communes aux antioxydants car le système de doubles liaisons conjuguées dans la molécule lui confère des caractères pro oxydant et d'attaque par addition des radicaux peroxy. *Packer J.E., 1981, (76) ; Eunice J., 1992, (26)*.



Le carbone central β carotène \cdot va réagir très rapidement de façon réversible avec l'oxygène afin de former un nouveau radical β carotèneOO \cdot .



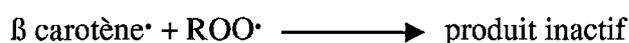
Il s'agit du phénomène d'autoxydation du β carotène.

Il est à noter que cette oxydation est dépendante de la pression en oxygène d'où la possibilité de réversibilité, *Burton N., 1984, (7) et Fig 1*. Lorsque la pression en O₂ diminue ; l'équilibre de la réaction est perturbé et cette dernière tend à aller vers la gauche. *Eunice J., 1992, (26)*. On couple très souvent ce β carotène à la vitamine E ou α tocophérol qui agit, elle, avec de fortes pressions en O₂. Il faut environ une pression de 150 torrs ou moins pour le β carotène. *Burton G.W., 1984, (7)*.

Par conséquent la réactivité du β carotène à l'égard du radical peroxy et la stabilité du carbone central β carotène[•] sont 2 points importants :

- ° Réactivité du β carotène, ceci signifie que ce dernier a un potentiel pour concurrencer d'autres antioxydants même s'il est en concentration minime.
- ° Stabilité du carbone central β carotène[•], ceci signifie qu'à faible pression d'O₂ ce dernier se forme de façon prédominante.

En dernier lieu, le radical β carotène[•] peut s'additionner avec d'autres radicaux afin de former des produits inactifs.



Ce qui est important c'est que cette réaction a lieu de façon beaucoup plus rapide que la réaction de terminaison normale $\text{ROO}^{\bullet} + \text{ROO}^{\bullet}$.

D'après la figure 2 on note que la présence d'une petite quantité de β carotène lors de l'autoxydation du méthyl linéol retarde ce phénomène d'oxydation spécialement à basse pression d'O₂.

Une comparaison s'est faite entre le β carotène et la zéaxanthine qui n'ont pas de groupe oxo et la canthaxanthine et l'astaxanthine qui eux possèdent un groupe supplémentaire oxo. Le résultat est le suivant : le groupement oxo placé en position 4 ou 4' sur l'anneau β ionone confère une activité antioxydante plus efficace, l'autoxydation de la canthaxanthine et astaxanthine se fait de façon plus lente que celle du β carotène et zéaxanthine. *Terao J., 1989, (95)*.

Il est toutefois important de signaler que les concentrations de β carotène utilisées dans ces expériences sont très supérieures aux concentrations physiologiques.

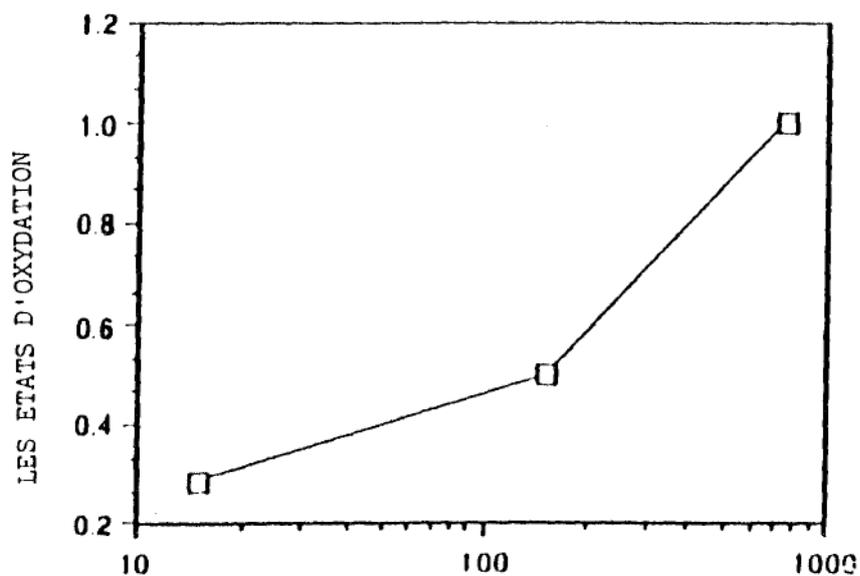


FIGURE 1 : LES EFFETS DU PRESSION PARTIELLE D'OXYGENE SUR L'ETAT D'OXYDATION DE 5mM DE BETA CAROTENE DANS LE CHLOROBENZENE , REACTION INITIEE PAR ADDITION DE 45mM D'AZO BIS ISOBUTYRONITRIE A 30°C.

BURTON N., 1984, (7)

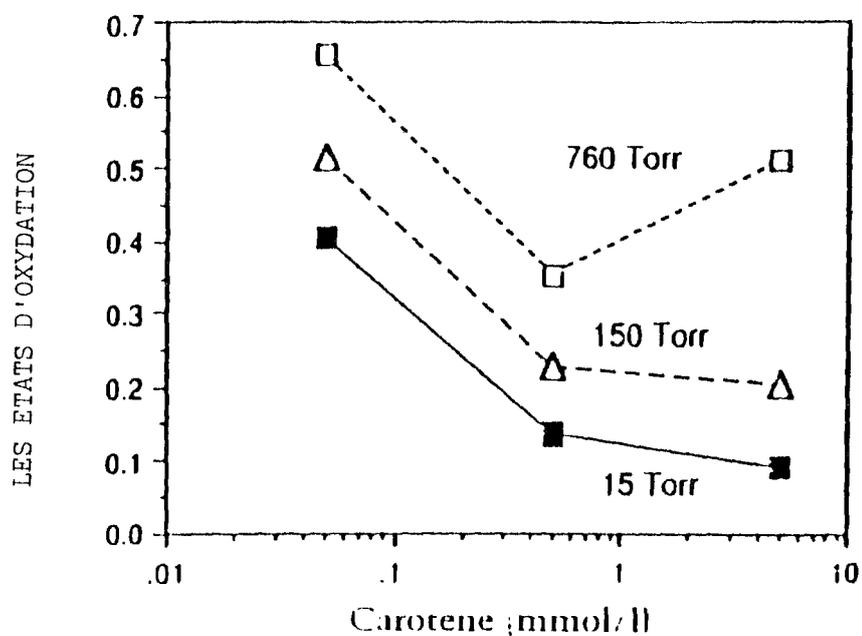


FIGURE 2 : LES EFFETS D'UNE PRESSION PARTIELLE DE L'OXYGENE SUR L'ETAT D'OXYDATION DE 1,51M DE METHYL LINOLEATE DANS LE CHLOROBENZENE A 30°C, MONTRANT AINSI L'INFLUENCE DU BETA CAROTENE (0,05; 0,5 ET 5mM) LA REACTION EST MISE EN ROUTE PAR ADDITION DE 45 mM DE AZO BIS ISOBUTYRONITRILE

BURTON N., 1984, (7)

b) Neutralise l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$

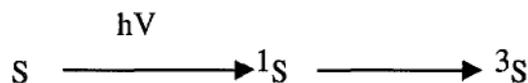
Le β carotène joue un rôle important comme protecteur des cellules et organismes en général contre les effets néfastes de la lumière, de l'air ou des pigments photosensibles. Le mécanisme primaire de défense est sa capacité à capturer les molécules sensibles excitées telle que l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. Cette découverte fut réalisée en 1968 par Foote C.S. et Al, 1968, (29).

Quatre mécanismes d'action ont été proposés pour démontrer l'activité du β carotène contre l'oxygène singulet :

- 1 - Permet de filtrer les rayonnements UV lointains
- 2 - Peut capter l'oxygène singulet ou les états triplet des sensibilisateurs
- 3 - Permet une substitution au niveau des constituants de la cellule pour prolonger sa durée de vie.
- 4 - Peut réparer ou stabiliser les membranes.

On ne retiendra que le 2ème mécanisme d'action. Eunice J., 1992, (26).

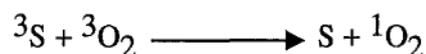
Lorsque la lumière affecte le système biologique qui possède un sensibilisateur, ce dernier passe à l'état excité qui peut alors subir l'interaction d'autres systèmes afin d'obtenir l'état de triplet.



Ce sensibilisateur à l'état de triplet peut initier 2 types de réaction I et II

—————> Type I : Le sensibilisateur à l'état triplet initie des réactions radicalaires par capture d'électrons ou d'hydrogènes à partir de molécules qui lui sont très proches. on a création d'espèces chimiques réactives.

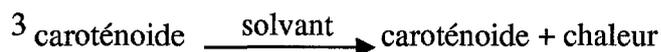
—————> Type II : Le sensibilisateur à l'état triplet va réagir avec l'oxygène simple qui est sous forme triplet afin de former l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ très réactif.



La réaction de capture se réalise par un transfert d'énergie de O_2 vers les caroténoïdes résultant en la formation d'un caroténoïde sous forme triplet



Par la suite cette énergie est dissipée par des phénomènes de rotation ou vibration entre le caroténoïde à l'état triplet et le solvant, régénérant ainsi le caroténoïde de départ



De cette façon les caroténoïdes peuvent agir d'une manière catalytique afin de neutraliser cette molécule $^1\text{O}_2$ nuisible pour l'organisme . Foote C.S., 1970, (30) ; Krinsky N., 1979, (47).

Les limites d'action de ces caroténoïdes dépendent du nombre de doubles liaisons conjuguées présentes dans la molécule avec un maximum de protection si ces dernières possèdent 9 doubles liaisons ou plus . Foote C.S., 1970, (31) ; Eunice J., 1992, (26).

La présence de groupes fonctionnels sur ces caroténoïdes tels que les groupes hydroxyl allyliques ou non allyliques n'affecte pas cette propriété de capteur.

Il est à noter que le β carotène n'est pas le meilleur capteur de l'oxygène singulet. En effet, le lycopène va agir plus rapidement : β carotène : $K_q = 1,4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$

Lycopène : $K_q = 3,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ Di Mascio P., 1989, (21).

c) Renforce les défenses immunitaires . Harinder S., 1991, (38).

° Il a été constaté une augmentation de l'expression des facteurs de nécrose des tumeurs par les macrophages infiltrant la tumeur après le traitement par le β carotène .

En effet les macrophages des animaux traités par le β carotène montrent une augmentation de leur capacité de lyse des cellules cancéreuses épidermoïdes in vitro.

° Une augmentation des cellules cytotoxiques T a également été notée (LT Helper).

° In vivo, il a été démontré une augmentation significative du pourcentage des cellules tueuses non induites (natural killer cells) consécutive à une supplémentation en β carotène (30 mg de β carotène par jour pendant 3 à 6 mois).

d) Provitamine A

Les activités du β carotène dans la prévention des cancers sont naturellement liées à celle de la vitamine A puisque ce β carotène agit comme provitamine A.

On retrouvera donc l'action sur :

- la synthèse enzymatique

- les propriétés membranaires
- les facteurs de croissance
- les récepteurs protéiques
- l'expression génomique et postgénomique
- la matrice extracellulaire
- la réponse immunitaire

.On peut également retrouver les actions suivantes :

- * antioxydante
- * capteur de l'oxygène singulet
- * sur les phénomènes de l'immunité
- * neutralisation de l'inhibition de l'interféron.

De plus, il a été rapporté que la Vitamine A n'est pas aussi active que le β carotène dans la prévention des cancers du poumon.

Les chercheurs utilisant la canthaxanthine et l'asthaxanthine qui sont des caroténoïdes n'ayant pas la fonction provitamine A ont démontré que ces dernières avaient une action préventive dans les cancers et qu'elles inhibaient l'induction de tumeur chez l'animal.

Cette canthaxanthine se trouve notamment dans certains champignons comestibles et dans des algues.

K- TOXICITE DE LA VITAMINE A ET DU β CAROTENE

β carotène : Zbinden G., 1960, (105).

Les études de toxicité ont été menées sur diverses espèces animales dont le rat et le chien qui présente un métabolisme des caroténoïdes voisin de celui de l'homme.

Toxicité aiguë :

DL 50	rat	IM	1 g/kg
	chien	Per os	8 g/kg

Toxicité à moyen et long termes

rat	0,1 g/kg/j po. pendant 18 mois
chien	0,2 g/kg/j per os pendant 21 jours.
	1,10,100 mg/kg/j per os pendant 13 semaines
	100 mg/kg/j per os pendant 6 ans

Un test de croissance a été réalisé chez le rat (20 mg / kg / jour pendant 6 mois)

Une étude de la fertilité a été faite chez le rat mâle (100 mg et 500 mg / kg / j) pendant 238 jours.

Les conclusions sont les suivantes :

- Aucun signe de toxicité ni d'hypervitaminose A n'a été décélé quelle que soit l'espèce étudiée, la dose administrée et la durée de l'essai.
- Aucune incidence de β carotène n'a été relevée au point de vue hématologique, ni sur la croissance, ni sur la fertilité.
- Les examens histologiques ont confirmé que le β carotène en administration chronique n'entraîne aucune modification pathologique des organes digestifs, des reins, de l'appareil génito-urinaire, de l'appareil cardiovasculaire, du système hématopoiétique, du système nerveux central et des glandes endocrines.

La tolérance à un traitement par le β carotène est satisfaisante à l'exception d'une coloration cutanée rouge-orangé.

Il en est de même avec d'autres caroténoïdes tel que la canthaxanthine qui entraîne une coloration cutanée brun rouge.

L'association de ces 2 caroténoïdes pour une prévention des cancers est souhaitable dans la mesure où leurs actions conjuguées permet d'obtenir une coloration cutanée plus nuancée qui se rapproche d'un hâle naturel.

Vitamine A :

La vitamine A est toxique à forte dose :

-l'hypervitaminose A entraîne :

Fatigue
Irritabilité
Anorexie
Perte de poids
Vomissements
Troubles gastro intestinaux
Légère fièvre
Hépatosplénomégalie
Troubles cutanés
Alopécie
Sécheresse de la peau, des lèvres, des cheveux,
des phanères
Mal de tête
Hypercalcémie
Anémie
Oedème sous-cutané et douleur au niveau des os et
articulations

- Chez l'enfant :

- Augmentation de la pression intracrânienne
- Troubles visuels
- Oedème douloureux au niveau des os longs

- Effets sur le sang :

- Neutropénie
- Anémie normochrome macrocytaire

- Effets sur le foie :

- Fibrose au niveau de l'espace de Disse et obstruction
du flux sanguin sinusoidal, causant une hypertension
non cirrhotique et un dysfonctionnement hépatocellu-
laire.

- Effet au niveau de la peau :

- Pigmentation jaune (différent d'une jaunisse)

J- THERAPEUTIQUE DES CANCERS. Cornic M., 1992, (17).

La vitamine A et ses dérivés ont une action préventive à l'égard des cancers mais également thérapeutique. Ces cancers peuvent toucher la peau ou non ; il s'agit entre autre :

- Carcinomes vasocellulaires
- Carcinomes spinocellulaires
- Mélanome
- Leucémies
- Epithéliomas malpighiens de la tête et du cou
- Cancers des poumons (carcinomes épidermoïdes et à petites cellules).

Ex : Leucémies aiguës promyélocytaire

Le rapprochement entre l'aspect histologique des tissus épithéliaux des rats carencés en vitamine A et celui de certaines métaplasies chez l'homme a fait rechercher un effet de la vitamine A sur les tissus malins.

La leucémie aiguë promyélocytaire LAM3 représente 15% des leucémies aiguës non lymphoblastiques chez l'adulte et peut se déclarer à n'importe quel âge. La LAM3 se distingue des autres types de leucémies aiguës myéloïdes par une prolifération médullaire de promyélocytes immatures et une morphologie différente mise en évidence sur la moelle et le sang (des granulations azurophiles dans le cytoplasme ; noyau bi ou polylobé et présence d'éléments en forme de fagots ou corps d'Auer). *Delva L., 1991, (19).*

Aux signes cliniques de la leucémie s'ajoutent une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD); une thrombopénie et une neutropénie. De plus une hyperleucocytose y est souvent associée. Par ailleurs, la LAM3 est caractérisé cytogénétiquement, *Golomb H.M., 1976, (35)*, par une translocation réciproque et spécifique (15;17) (q 22; q 21) entraînant la cassure du chromosome 17 au niveau du gène du récepteur X de l'acide rétinoïque(17;q21) et la formation d'un gène hybride avec une partie du gène PML (promyelocytic myeloid leukemia) localisé sur le chromosome 15. *Thé H., 1990, (96) ; Chang K.S., 1992, (10).*

La cassure au niveau du chromosome 15 juxtapose le gène RAR X au gène PML.

Seule la leucémie aiguë promyélocytaire est sensible à l'action de l'acide rétinoïque tout trans. D'après les recherches 95% des rémissions sont observées lorsque les maladies sont traitées en 1ère intention.

Pour cette leucémie à mauvais pronostic, le traitement par l'acide rétinoïque trans permet l'obtention d'une rémission sans entraîner la phase d'aplasie toujours observée après chimiothérapie.

De ce fait le temps d'hospitalisation est raccourci sans le support de la récupération hématologique et des antibiotiques.

Les effets secondaires sont mineurs :

- peau sèche
- élévation transitoire des triglycérides
- Elévation transitoire des transaminases

Cependant on retrouve parfois une hyperleucocytose dans les 3 premières semaines du traitement qui nécessite alors le recours à la chimiothérapie ou à la corticothérapie.

La translocation t (15, 17) associée à la LAM3 induit un clône leucémogène qui prolifère et qui ne peut plus se différencier. Cette translocation conduit à la synthèse de protéines de fusion isoforme PML/RAR x ; la séquence aminoterminal de RAR x est remplacée par la quasi totalité de la protéine PML.

Les protéines PML/RAR x agiraient comme facteur de transcription inductible par l'acide rétinoïque; ce sont des protéines oncogéniques inhibant l'expression des gènes sensibles à l'action de l'acide rétinoïque et bloquant la différenciation des cellules myéloïdes.

Lors du traitement par l'acide rétinoïque la concentration élevée d'acide rétinoïque intranucléaire pourrait compenser la déficience du récepteur RAR x, on agirait par action négative sur l'activité oncogénique de PML/RAR x favorisant la différenciation et inhibant la prolifération du clône leucémogène de promyélocytes anormaux.

PARTIE
EXPERIMENTALE

IV - PARTIE EXPERIMENTALE

A - Expérimentation 1: Essais de tolérance et d'absorption du β carotène

Avant de commencer un long travail de recherche sur l'activité du β carotène au niveau des tumeurs, il nous fallait obtenir des données précises concernant la dose d'antioxydant à utiliser lors des manipulations. Toute la bibliographie rassemblée n'indiquait pas d'essais avec le β carotène administré par voie parentérale. Par conséquent, il semblait préférable d'essayer au préalable d'administrer la molécule sur les souris swiss albinos et de trouver le système solvant adéquat.

Protocole :

- caroténoïdes : β carotène cristallisé type III, extrait de carottes (SIGMA référence C9875)

- Espèce et souche animale : Souris SWISS ALBINOS ; femelles âgées de 4 mois

- témoins : 6

- traitées β carotène : 6

- Traitement : β carotène administré par voie intrapéritonéale

dose : 30 mg/kg du poids corporel de souris

rythme d'injection : tous les jours pendant 8 jours

Système solvant :

Ethanol	1 partie
Emulphor	1 partie
Eau distillée	18 parties

Dosages : Les taux sanguins de β carotène sont déterminés sur prises d'essai de 100 μ l .

La solution de β carotène est administrée à raison de 0,10 ml pour 10 g de poids corporel de souris. Les souris témoins reçoivent le système solvant seul selon le même rythme d'injection que le groupe qui reçoit le β carotène.

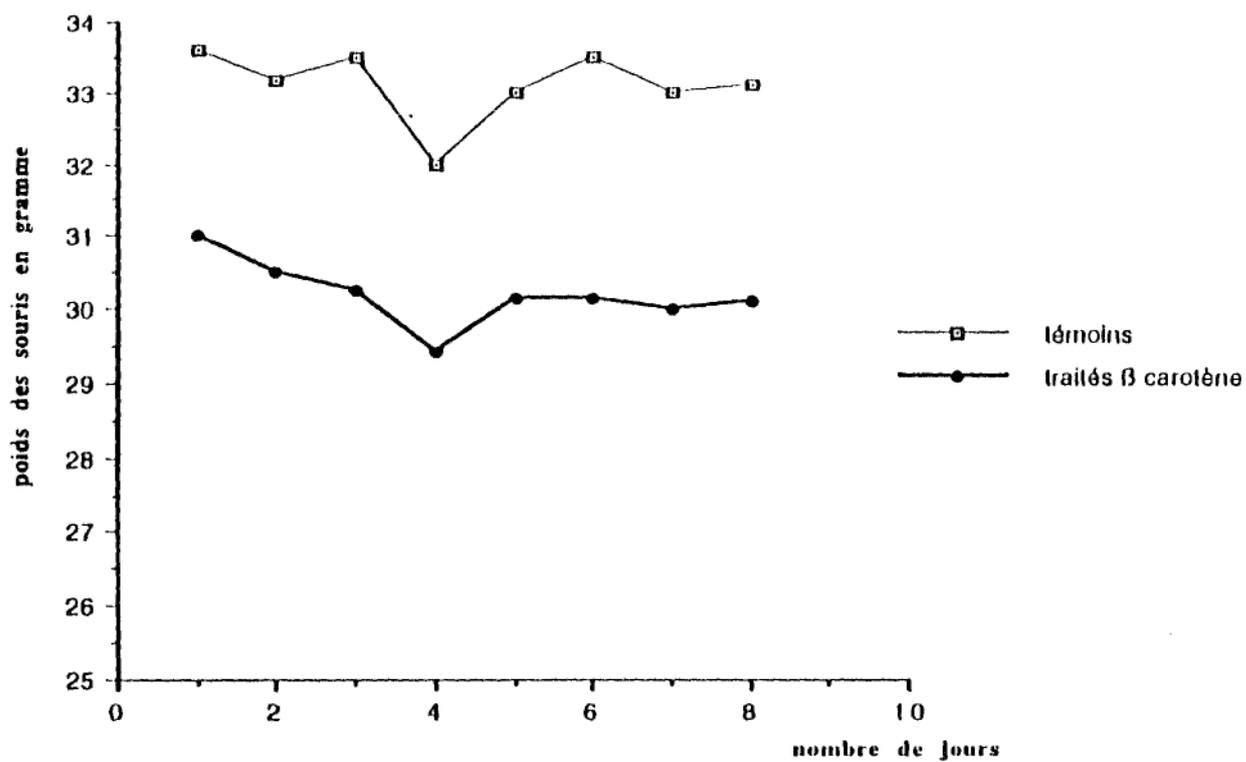
Les animaux sont suivis au jour le jour durant l'essai de tolérance ; leur état général est observé et leur courbe pondérale est établie.

Résultats : Tableau et courbe pondérale.

Expérimentation N° 1

	Poids de la souris		différence	Taux caroténoïdes sanguins en $\mu\text{mol/litre}$
	en gramme			
	1er jour	8 ème jour		
Témoins				
T β 0	35	33	-2	- 0,857
T β 1	34	32	-2	- 0,159
T β 2	33	34,5	+ 1,5	- 0,110
T β 3	35	35	0	- 0,252
T β 4	33	32	-1	- 0,195
T β 5	32	32	0	- 0,628
moyenne	33,66	33,08	- 0,56	
écart type	1,21	1,35		
traitées				
β 6	30	28	-2	0,156
β 7	32	35	3	1,744
β 8	30,5	28	-1,5	1,778
β 9	32	32	0	1,264
β 10	29,5	29	-0,5	2,258
β 11	32	28,5	-3,5	X
moyenne	31	30,08	- 0,75	1,512 $\mu\text{mol/litre}$
écart type	1,14	2,83		

résultats non exploitables



courbe pondérale des souris SWISS ALBINOS

perte de poids relative :

souris témoins : $100 \times \frac{33,66 - 33,08}{33,66} = 1,72 \%$

souris traitées : $100 \times \frac{31,00 - 30,08}{31,00} = 2,96 \%$

Interprétation

Essai d'absorption

Une absorption du β carotène par voie intrapéritonéale a été tentée chez la souris SWISS ALBINOS

Les dosages du β carotène ont été réalisés après 8 jours consécutifs d'administration par voie parentérale à la dose de 30 mg/ kg.

—► On retrouve des traces de caroténoïdes chez les souris traitées par le β carotène. Toutefois, il est à noter que les teneurs en β carotène à l'état physiologique chez les souris témoins sont négatives car la méthode existante semble insensible à des taux si faibles.

On constate néanmoins des taux variant de 0,156 à 2,258 μmol /litre chez les souris traitées traduisant l'absorption du β carotène après administration intrapéritonéale (grandes variations individuelles dans l'absorption du β carotène).

Ces taux sont faibles car le β carotène a un métabolisme très rapide et se dégrade vite en acide rétinolique et en rétinol.

Notons toutefois une variabilité des taux individuels déjà notée après administration chez l'homme et liée à des facteurs divers dont le taux de lipoprotéines sériques.

Une accumulation du β carotène ne peut apparaître qu'après 1 mois, voire 2 mois d'administration quotidienne en supplémentation alimentaire ou par voie parentérale.

Le système solvant bien toléré est donc adopté pour les expérimentations 2, 3, 4 et 5.

Essai de tolérance

Afin d'étudier la tolérance à cette dose et à cette voie d'administration du β carotène; plusieurs examens ont été pratiqués. D'une part une observation directe de l'état général des souris : existence d'une asthénie, de troubles gastrointestinaux, poils hérissés. D'autre part une étude comparative du comportement avant et après injection : excitation ou sédation traduisant un effet au niveau système nerveux central, effet sur la curiosité et la motilité. Sont également étudiés l'existence de contractions abdominales traduisant une douleur liée à l'administration, la couleur de la peau et son aspect. Une mesure de leur poids est effectuée chaque jour de l'expérimentation. Une courbe pondérale est réalisée portant sur les 8 jours d'administration à la fois pour les souris traitées et les souris témoins. On peut constater une diminution nette du poids vers le 4^{ème} jour dans les 2 lots et dans les mêmes proportions; le système solvant pourrait donc être incriminé. Le β carotène ne semblerait pas accentuer cette diminution.

Toutefois, les souris reprennent du poids au 5^{ème} jour puis se stabilisent. De plus, leur comportement (alimentaire et psychique) n'est pas modifié pendant la semaine d'injection, leur état général n'est aucunement altéré.

La peau prend une couleur légèrement orangée et devient plus douce pour les souris du lot traité au β carotène.

Les tests des moyennes sur des séries appariées au 1^{er} et 8^{ème} jour sont significatifs au risque d'erreur 5 % : les poids des souris ne sont pas ou très peu modifiés au cours de l'injection que ce soit pour les souris témoins ou les souris traitées

* traitement et système solvant

- Acide rétinolique : solution hydroalcoolique (1 volume d'éthanol; 19 volumes eau)

Il est administré à une dose de 3 mg/ kg pour les essais de tolérance, de J 14 à J 22 soit 5 injections (expérimentation 2)

Il est administré à trois doses: 3, 6, 9 mg / kg; par voie intrapéritonéale ;1 jour sur 2 ; de J 8 à J 20 soit 7 injections (expérimentation 3)

- β carotène : système solvant idem précédemment .

Il est administré à la dose de 30 mg / kg ;par voie intrapéritonéale ; 1 jour sur 2 ; de J 8 à J 20 après la greffe soit 7 injections (expérimentation 3) et de J 7 à J 21 soit 8 injections (expérimentation 4).

* Evaluation de l'effet thérapeutique .

Le traitement par β carotène est démarré 8 jours après la greffe(expérimentation 3) et 7 jours après la greffe (expérimentation 4), à cette date la croissance a débuté, les greffons sont vascularisés. Les tumeurs sont mesurées individuellement à intervalles réguliers en 3 dimensions perpendiculaires. Le volume tumoral est calculé par la formule ci après qui donne le volume de l'ellipse. *Riondel J., 1986, (80) ; 1992, (81) ; 1988, (82) .*

$$V = \frac{\pi}{6} \times \text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{hauteur}$$

Les souris témoins maintenues dans les mêmes conditions que les souris traitées reçoivent le système solvant au même rythme d'injection que les souris traitées.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne + ou - SEM (écart standard à la moyenne)

La période d'observation de la croissance tumorale est de 20 à 21 jours. A la fin de cette période, les souris sont sacrifiées, les tumeurs prélevées et pesées.

Outre l'étude comparative des courbes de croissance témoins et traités, on étudie si les différences des poids en fin d'essai sont statistiquement significatives, puis par la suite, on évalue les modifications du statut antioxydant (dosage de la SOD ; GPX ; et MDA).

Les dosages

* **Décapitation des souris**: le sang ainsi récupéré (environ 1 ml) sur anticoagulant (héparinate de sodium) est homogénéisé puis centrifugé à 3500 tours /minute, ceci pendant 10 minutes.

Après séparation des deux phases, le plasma est récupéré dans des tubes à oligoéléments afin de réaliser des dosages de malondialdéhyde (MDA); de rétinol; d'acide rétinolique et de β carotène.

Le culot quand à lui est très rapidement conservé dans un congélateur à -80 °C afin de permettre ultérieurement des dosages des activités enzymatiques de superoxyde dismutase (SOD) et de glutathion peroxydase (GPx).

D'autre part lors du sacrifice de l' animal, certains organes ont été prélevés tel que le foie; la rate; les surrénales ainsi que de la peau et des fragments tumoraux; tous ont été très rapidement conservés dans l'azote liquide(-170 °C).

Le même problème que celui de *Melle Anne Sophie Gauchez,1993, (33)* se présentait à nous du fait du faible volume de sang disponible: fallait-il pooler ou réaliser des dosages sur chaque prélèvement ?

Le raisonnement fût le même; il valait mieux éviter les variations individuelles et le nombre excessif de souris nues d'un coût élevé; nous avons donc choisi de suivre le plan d'expérience de Melle Gauchez c'est à dire le dosage souris par souris. (exception pour le dosage de l'acide rétinolique où nous avons dû pooler)

* Les dosages sanguins

-----> Dosage du malondialdéhyde :

Deux techniques sont couramment utilisées; l'une se référant à une technique par fluorimétrie; l'autre par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

- dosage fluorimétrique : *Richard M.J. et Al , 1992 , (77)*

1- Principe:

Lors de l'hydrolyse des lipoperoxydes se forme le MDA qui est donc un marqueur de la peroxydation lipidique. Ce MDA va alors réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA) afin de donner des adduits TBA-MDA. La mesure est faite par fluorimétrie aux longueur d'ondes $\lambda_{\text{excitation}} = 532 \text{ nm}$ après extraction par le n-butanol. $\lambda_{\text{émission}} = 553 \text{ nm}$

2 - Prélèvements:

- anticoagulant : Héparine ou EDTA
- centrifugation 3000 tours / 10 minutes
- congeler le plasma à -20°C le plus rapidement possible après le prélèvement.

3 - Réactifs:

- A- Solution d'acide thiobarbiturique dilué; pH 7,4
- B- Solution d'acide perchlorique à 7 %
- C- Solution de travail TBA- ACIDE (mélange de 2 volumes de la solution A avec 1 volume de la solution B)

4 - Etalonnage:

La courbe de calibration (1 à 8 μmol MDA/ litre) est obtenue à partir d'une solution mère de 1.1.3.3 tétraéthoxypropane (TEP) 20 mM.

- a- solution mère à 20 μmol /ml de TEP
- b- solution fille à 10 nmol /ml : diluer extemporanément la solution mère dans l'eau en effectuant 2 dilutions successives : 1/100 puis 1/20^{ème}
- c- gamme d'étalonnage

MDA	1	2	3	4	5	6	8
nmol /ml							
μl MDA 10 $\mu\text{mol/l}$	100	200	300	400	500	600	800
μl d'eau	900	800	700	600	500	400	200

5- Mode opératoire

A 100 μl de plasma sont ajoutés 750 μl d'un mélange TBA - acide perchlorique (réactif C). Le mélange est porté au bain marie - 95°C pendant 60 minutes puis refroidi dans un bain glacé.

Une extraction du composé fluorescent est réalisée par agitation pendant 2 minutes avec 2ml de n butanol. Après centrifugation, la fluorescence de la phase n butanolique est lue à l'aide d'un fluorimètre AMINCO-BOWMAN. Pour chaque plasma, le blanc est réalisé en ne portant pas le mélange réactionnel au bain marie.

- dosage par HPLC : *Richard M.J. , 1992, (78)*

1- Principe:

Le principe de base reste le même que précédemment à la différence que le TBA peut quelquefois réagir avec l'acide de composés plasmatiques exo ou endogènes ; la séparation HPLC va pouvoir supprimer ces interférences et fournir des résultats plus précis (individualisation sélective du MDA des autres aldéhydes).

2- Réactifs:

- A- Solution d'acide thiobarbiturique (TBA) (MERCK Réf. 8180), soit 800 mg dans quelques gouttes de soude concentrée ; rajouter 80 ml d'eau distillée; ajuster à pH 7,4 avec HClO_4 7 % .
QSP 100 ml . Conservation à 4°C pendant 5 jours maximum.
- B- Solution d'acide perchlorique à 7%. Il s'agit d'une dilution au 1/10^{ème} de l'acide perchlorique à 70 % MERCK suprapur
- C- Tampon phosphate, soit 6,80 g pour 1 litre d'eau distillée ; ajuster à pH 6 avec de la soude.
QSP 1litre. Bien penser à filtrer le tampon avant utilisation. Conservation à 4°C.
- D- Tampon de neutralisation soit 200 mmol/ l de phosphate disodique NaHPO_4 , 12 H_2O
c'est à dire 14,32 g dans 200 ml d'eau distillée ; ajuster à pH 11,5 avec KOH.
- E- Phase mobile : Elle est constituée par le mélange tampon phosphate et méthanol 58: 42 v/v.

3- Matériel:

- colonne (250 x4,6 mm); ultrasphère ODS 5 μm .
- précolonne sphéri. 10 RP-18 ; 10 μm (30 x 4,6 mm).

Le débit est de 1 ml / min ; la détection est 532 nm et la phase mobile est composée de 58 % de tampon phosphate dégazé à concentration de 50 mM et de 42 % de méthanol

4- Etalonnage

La gamme d'étalonnage est obtenue à partir d'une solution mère de 1.1.3.3 tétraéthoxypropane (TEP) La solution mère de ce TEP est aliquotée au congélateur à 20 mmol/litre. On réalise une solution fille au 1/100^{ème} de la solution mère (fille 1) = 200 μmol /litre ; à partir de cette solution fille 1 on réalise de nouveau une dilution au 1/20 (fille 2) à 10 μmol /litre .

point 8 = 800 μl de sol fille 2 + 200 μl eau

point 4 = 500 μl du point 8 + 500 μl eau

point 2 = 500 μl du point 4 + 500 μl eau

point 1 = 500 μl du point 2 + 500 μl eau

point 0,25 = 500 µl du point 0,5 + 500 µl eau

point 0 = 1000 µl eau

5- Mode opératoire:

A 100 µl de plasma sont ajoutés 750 µl d'un mélange TBA-acide perchlorique dans le rapport 2 volumes 1 volume. Le mélange est porté au bain marie 95°C pendant 60 minutes puis refroidi dans un bain glacé. Les tubes sont ensuite centrifugés 4 par 4 pendant 10 minutes à 3000 tours (ne pas les centrifuger tous à la fois car en dehors du froid le complexe MDA-TBA se modifie). Puis 100 µl de surnageant sont neutralisés par 150 µl du tampon de neutralisation afin d'obtenir un pH neutre (6 à 7). Agitation ; centrifugation et récupération de 150 µl du surnageant dans les tubes du passeur d'échantillon HPLC (injection de 50 µl par injecteur automatique).

-----> **Dosage du β carotène** : *Arnaud J. , 1991, (1)*

Ce dosage peut être effectué par HPLC en tenant compte de la méthode de l'étalon interne (acétate d'α tocophérol) et à l'aide de solutions d'étalons de β carotène. De même, il peut être réalisé par simple fluorimétrie comme je l'ai décrit dans la partie "Vitamine A , β carotène et dérivés."

- dosage par HPLC

1- Matériel :

- Colonne : ultrashère ODS (5 µm) ; 250 x 4,6 mm Beckman , commercialisée par TOUZARD et MATIGNON réf. 01625606.
- Précolonne sphéri 10RP18 (10µm) ; 30 x 4,6 mm TOUZARD et MATIGNON.

2- Réactifs:

A- phase mobile

Dichlorométhane (PROLABO réf; 23351292) + méthanol (PROLABO réf. 20834291) + acétonitrile (PROLABO réf; 20059292) dans un rapport de 20/10/70 . Il ne faut utiliser que des solvants spéciaux pour HPLC. La préparation doit se faire tous les jours. Il faut dégazer cette phase aux ultrasons avant l'utilisation durant 40 minutes.

B- Solutions étalons

-----> Vitamine A réf. SIGMA R2750 :solution mère à 7 mmol /l ; solution fille à 15 µmol L

-----> β carotène SIGMA référence CO126 : solution mère à 1mg/ml (2 mmol /litre) soit 5 mg dans du chloroforme HPLC, PROLABO réf. 22716296 QSP 5 ml.

Aliquoter cette solution en fraction de 100 µl. Conserver ces fractions à l'abri de la lumière au congélateur - 80°C.

La solution fille est à environ 5 µmol /litre c'est à dire qu'il faut reprendre une fraction de la solution mère par 39,9 ml d'éthanol absolu.

Aliquoter cette solution fille en fractions de 1 ml. Conserver ces fractions à - 20°C à l'abri de la lumière .

Mesurer l'absorbance tous les matins du dosage à 452 nm. Le coefficient d'extinction est de 137434 et le poids moléculaire est de 536,85. Il faut déterminer la concentration à l'aide du coefficient d'extinction molaire : ABS lue à 452 nm / 0,137. Cette concentration doit être comprise entre 4 et 6 µmol / litre.

C- Solution étalon interne

-----> Acétate d'α tocophérol U5 BIOCHEMICAL CORPORATION réf. 4338 : à 15 mmol /litre soit 177 mg dans de l'éthanol. QSP 25 ml.

Cette solution se conserve 6 mois à l'abri de la lumière et au congélateur à - 20°C.

La solution fille est à 2500 μmol / litre ; elle est réalisée à partir de 3 ml de la solution mère à 15 mmol / litre dans une fiole jaugée de 20 ml. Ajuster le volume à l'aide de l'éthanol.

Aliquoter la solution fille dans des tubes de 5 ml en verre. Conserver à -20°C à l'abri de la lumière. Vérifier avant chaque dosage sa concentration en mesurant l'absorbance à 285 nm. Le coefficient d'extinction est de 2061, le poids moléculaire est de 472,7.

Utiliser la concentration calculée pour le dosage en HPLC : $\frac{1000 \times \text{ABS}}{2,061} = x \text{ } \mu\text{mol /l.}$
Diluer pour un passage sur UVIKON et le dosage.

5- Mode opératoire:

En ce qui concerne les solutions d'étalons de travail, il faut mélanger à volume égal chacune des solutions filles (vitamine A et B carotène)

Pour les dosages on utilise des tubes en verre de 10ml entourés de papier aluminium, on introduit en μl :

	Blanc	Gamme	Dosage
Sérum	-	-	500
Eau	500	500	-
Ethanol	500	-	500
Etalon	-	500	-
Etalon interne	100	100	100

Bien agiter

Hexane	1 ml	1 ml	1 ml
--------	------	------	------

Agiter pendant 2 minutes, centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 2000 tours / minute et prélever 0,5 ml de la phase hexanique dans un flacon passeur d'échantillon HPLC.

Après évaporation sous courant d'azote dans les flacons, reprendre le résidu sec par 150 μl de phase mobile et les placer dans l'ordre :

- 1- phase
- 2- point élevé de la gamme
- 3- 2ème point
- 4- blanc contenant uniquement l'étalon interne
- 5- dosages

-----> Dosage de l'activité de la SOD globulaire ; Marklund S. et Marklund G., 1974 , (61).

1- Principe

Réalisation à partir de la technique au pyrogallol : l'auto-oxydation du pyrogallol en présence d'EDTA est inhibée par la SOD ; de pH 7,9 à pH 9,1 .

La réaction est inhibée jusqu'à 90 % par la SOD ce qui indique une totale dépendance de l'anion $O_2^{\cdot -}$ dans cette auto-oxydation

Le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par les radicaux $O_2^{\cdot -}$ et la dismutation de ces radicaux par la SOD.

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de mélange réactionnel capable d'inhiber 50 % de l'oxydation du pyrogallol dans les conditions du dosage.

Aucune relation ne peut être établie entre les $\mu\text{mol d}'O_2^{\cdot -}$ et la quantité d'enzyme présente dans la prise d'essai. Aussi serait-il préférable de travailler en unité arbitraire plutôt qu'en masse d'enzyme. Cette méthode simple et relativement rapide n'est pas applicable sur les tissus et globules rouges sans précipitation préalable de l'hémoglobine.

2- Réactifs

A- Tampon Tris-acide cacodylique 50 mM + 1 mM DTPA à pH 8,2

B- Pyrogallol 10 mM de conservation 1 mois à 4°C soit 0,252 g dans 200 ml de HCl à 0,01N

C- SOD bovine SIGMA étalon

3- Mode opératoire

-----> Recherche du volume de pyrogallol donnant une variation de DO max de 0,02 Abs / mn.

Dans une cuve plastique mettre 1,95 ml de tampon

Homogénéiser

Ajouter les X μl de pyrogallol correspondant à une variation de DO de 0,02 Abs / mn

Homogénéiser et lancer le programme de lecture 45 secondes après l'addition du pyrogallol

Lire la variation d'absorbance sur une minute

Cette Abs max correspond à 0 % d'inhibition (X doit varier entre 40 à 50 μl)

-----> Gamme de SOD bovine

Dans un tube en verre mettre dans l'ordre : 1 ml de la solution de SOD diluée + 0,4 ml d'éthanol froid + 0,4 ml de chloroforme froid

Agiter au vortex

Centrifuger 20 mn à 4000 tours / minute à 0°C

A la fin de la centrifugation, décanter la phase éthanolique : solution S

Conserver cette solution dans la glace

Au moment du dosage, préparer les dilutions suivantes: 1/2 ; 1/4 ; 1/8 ; 1/20 dans le tampon

-----> Erythrocytes

Préparer un lysat de globules rouges : 0,2 ml de globules rouges laqués par congélation-décongélation et 1,8 ml d'eau déminéralisée glacée.

Mélanger, puis centrifuger.

Travailler sur le même lysat pour la détermination de la SOD et de l'hémoglobine

Précipiter l'hémoglobine : 1 ml de lysat + 0,4 ml d'éthanol froid + 0,4 ml de chloroforme froid

Agiter au vortex

Centrifuger 20 mn à 4000 tours / minute à 0°C.

A la fin de la centrifugation, décanter la phase éthanolique : solution P.

Conserver cette solution dans la glace.

Au moment du dosage, préparer les dilutions suivantes : 3/4 ; 1/2 ; 1/4 dans le tampon.

-----> Dosage

Dans une cuve plastique mettre : 1,9 ml de tampon + 50 µl de prise d'essai.

Homogénéiser.

Ajouter les X µl de pyrogallol correspondant à une variation de DO de 0,02 Abs / mn.

Homogénéiser et lancer le programme de lecture après l'addition du pyrogallol.

Lire la variation d'absorbance sur une minute soit : Abs 1 = Abs lue.

Calculs : Le % d'inhibition est :
$$\frac{\text{Abs max} - \text{Abs 1}}{\text{Abs max}}$$

La gamme est linéaire jusqu'à 65-75 % d'inhibition

Il est impératif de faire un minimum de 5 points de dosage.

Ensuite on trace la droite d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol en fonction des quantités de SOD présentes dans la prise d'essai dans des conditions définies ici.

Définir l'activité arbitraire de l'enzyme utilisée soit 1000 / X U / µg d'enzyme avec X la quantité en ng de SOD dans 50 µl de prise d'essai capable d'inhiber 50 % de la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol.

L'activité arbitraire de la SOD utilisée correspond à la quantité de SOD présente dans 1 ml , capable d'inhiber 50 % de l'auto-oxydation du pyrogallol dans des conditions du dosage.

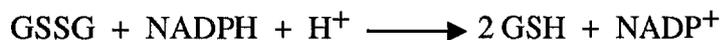
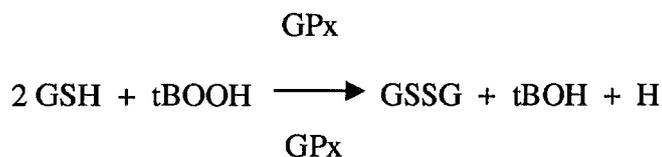
Pour les globules rouges : suivre la même procédure que celle décrite pour les points de gamme.

Définir le % d'inhibition pour chacune de ces dilutions . Par la lecture sur la courbe de SOD standard définir la quantité X de SOD présente dans la prise d'essai. Les résultats sont exprimés en U de SOD/g d'hémoglobine.

-----> Dosage de l'activité de la GPx globulaire sélénodépendante: Günzler , 1974, (37)

1- principe

Le principe du dosage repose sur le couplage de réactions enzymatiques faisant intervenir la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GSSG-R).



Nous mesurons la quantité de glutathion oxydé (GSSG) par le terbutylhydroperoxyde en suivant la décroissance d'absorption du NADPH₂ à 340 nm. Les résultats sont exprimés en mmoles de NADPH₂ par minute par gramme d'hémoglobine pour la GPx érythrocytaire , en unité / litre pour la GPx plasmatique.

2- Réactifs :

- A- Tampon Tris 50 mM (6,05) à pH 7,6; EDTA Na₂ 1 mM (0,336 g/l); NaN₂ 4 mM (1,29 g/l de la solution à 20%); la manipulation se réalise sous la hotte.
- B- Solution de DRABKIN doublement concentrée: KCN 0,0016 M (0,104 g/l); NaHCO₃ 0,0238 M (2g/l); K₃ Fe (CN) 60,0012M (0,4g/l)
- C- Glutathion réductase 250U/ml (diluer extemporanément la solution mère dans le tampon Tris)
- D- Glutathion réduit 0,15M /l (0,046 g/ml dans le tampon Tris)
- E- Terbutylhydroperoxyde 30 mM (200 µl de la solution mère dans 50 ml)

3- Mode opératoire :

-----> Erythrocytes

* Lysat globulaire: Les globules rouges, congelés, décongelés, sont dilués au 1/10^{ème} dans l'eau désionisée au moment du dosage puis au 1/2 dans la solution de DRABKIN.

* Procédure: A 25 µl de prise d'essai (hémolysat) rajouter 900 µl de tampon Tris puis dans l'ordre indiqué 20 µl de glutathion + 20 µl de glutathion réductase + 20 µl de NADPH₂

Faire un blanc d'eau afin de déterminer l'oxydation non enzymatique du glutathion.

Attendre que l'équilibre du mélange réactionnel soit atteint (1 mn environ).

Ajouter 20 µl de tBOOH et suivre la décroissance de DO du NADPH₂ à 340 nm dans un spectrophotomètre thermostaté à 25 °C.

-----> GPx plasmatique

Même mode opératoire

Le volume de la prise d'essai est de 50 µl

* Les dosages tissulaires

A- Etude des divers organes: fragments de peau et tumeurs.

-----> Méthode de non saponification pour la détermination des caroténoïdes , rétinoides et de l'α tocophérol dans des fragments d'organes.yei-Mei et Al , 1993 , (103)

1- Principe

Certains organes ne peuvent être broyés de façon classique à l'aide du potter; ils vont, par conséquent nécessiter un traitement préalable. Ce traitement au départ reposait sur une saponification en milieu KOH alcoolique mais cette saponification causait souvent une destruction de certains micronutriments. Par conséquent il a été mis au point une nouvelle technique permettant d'éviter cette étape de saponification et il a été réalisé un broyat en utilisant auparavant une procédure de non-saponification

à l'aide d'une collagénase pour faciliter l'homogénéisation et une protéase, à la fois pour précipiter les protéines et pour augmenter les quantités extractibles des micronutriments. L'extraction des caroténoïdes se fait par l'hexane.

2- Réactifs :

A- Solutions étalons :

β carotène (type IV), rétinol, rétinyl palmitate. SIGMA

α tocophérol, γ tocophérol. EASTMAN KODAK

Lutéine, zéaxanthine, et lycopène. AMOCO

B- Enzymes: collagénase (type IV), et protéase (type XXV). SIGMA

-----> collagénase de clostridium histolyticum à 460 units / mg de digestion de collagène

-----> protéase (ou pronase) de streptomyces griseus à 5 units /mg de digestion de caséine

Les solutions de collagénase et protéase sont préparées par addition de 10 ml de PBS froid à 500 mg de poudre de collagénase et à 200 mg de protéase. Ces solutions sont agitées au vortex jusqu'à dissolution et sont stockées à - 20°C.

C- Solvants :

* Solution de KOH-Méthanol-BHT préparée en ajoutant 100 ml de méthanol, 5g de KOH et du BHT à 0,1% (poids /volume)

3- Mode opératoire:

Les tissus congelés sont mis à température ambiante. Pour l'homogénéisation, 100 à 200 mg de tissu sont mis dans des tubes de 17 x100 nm en polypropylène. A 100 mg de tissu est ajouté 1 à 2 mg de BHT, 560 μ l de PBS et 70 μ l de collagénase. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 1 heure.

Après incubation, les échantillons sont homogénéisés sur la glace avec un homogénéiseur polytron pour tissus. A cet homogénat, on ajoute 70 μ l de protéase puis on agite. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30 minutes.

Pour l'extraction, on prélève 250 μ l de la solution digérée auquel on ajoute 250 μ l de solution KOH-Méthanol-BHT. L'échantillon est extrait 2 fois avec 500 μ l d'hexane contenant 0,1% de BHT.

Centrifugation. Conservation des extractions à -20°C.

-----> La méthode classique

il s'agit d'une méthode au potter (pleine vitesse pendant 2 fois 45 secondes) dans un tampon tris 50 mM; EDTA 0,2 mM à pH 7,8; en présence d'un antioxydant le butylhydroxytoluène (BHT) à 0,2 % dans l'éthanol absolu . Le rapport tumeur / tampon est de 1/10 (P/V) .

Une fois l'homogénat réalisé, il est centrifugé à 3500 tours / min pendant 10 minutes. Sur le surnageant, on prélève un aliquot pour le dosage des protéines d'après la méthode de Lowry et deux autres aliquots pour le dosage par chromatographie liquide haute performance du MDA et du β carotène.

Les résultats seront exprimés en μ mol / g de protéines.

B- dosage du malondialdéhyde dans les tissus par HPLC :

idem MDA sanguin

C- Dosage du β carotène dans les tissus :

idem au niveau sanguin

1 jour / 2 pendant 9 jours soit 5 injections

23^{ème} passage tumoral

Code	Témoins	Poids de la souris en gramme	Taille de la tumeur en mm	Poids de la tumeur en gramme
19	AR 10	30,6	34,5 - 20 - 17,5	7,06
16	AR 11	30	22 - 14 - 34	6,6
0	AR 12	29,1	30 - 23 - 17,5	6,95
39	AR 13	27,4	31,5 - 23 - 16,5	6,95
41	AR 14	27,4	23 - 20 - 16	4,32
69	AR 15	26	20 - 17 - 11,5	2,12
91	AR 16	26	23 - 30 - 13	4,28
81	AR 17	24,2	19 - 16 - 12	2,02
	Moyenne	27,5	4,61	5,04
	SEM	0,7	0,65	0,7
	traitées acide rétinolique			
60	AR 1	26,6	22 - 15,5 - 11,5	2,68
10	AR 2	27,4	24 - 18 - 11	3,35
5	AR 3	25,6	16 - 14 - 12	1,37
85	AR 4	26	23,5 - 15 - 13	4,03
4	AR 5	28,2	21,5 - 23 - 14	4
95	AR 6	26	13,5 - 10 - 7	1,05
80	AR 7	27	20 - 18 - 13	3,4
8	AR 8	28,7	32 - 24 - 16	8,32
9	AR 9	27,4	25 - 16 - 9,5	4,11
	Moyenne	26,9	2,5	3,59
	SEM	0,3	0,5	0,7

	Tumeur du poumon	
	Témoins	traitées Acide rétinolique
Moyenne du volume tumoral au début du traitement (cm ³) + SEM	0,532 +/- 0,08	0,327 +/- 0,05
Moyenne du volume tumoral au moment du sacrifice (cm ³) + SEM	4,611 +/- 0,65	2,593 +/- 0,5
Moyenne du poids des tumeurs au moment du sacrifice (gramme) + SEM	5,03 +/- 0,7	3,59 +/- 0,7

1 jour / 2 pendant 10 jours soit 7 injections

24^{ème} passage

Code	Témoins	Poids de la souris en gramme	Taille de la tumeur en mm	Poids de la tumeur en gramme
19	AR 18	28,1	30,5 - 29 - 18	7,68
90	AR 19	29,3	32,5 - 25,5 - 15,5	7,29
60	AR 20	27,9	30 - 25 - 12	5,46
0	AR 21	29,6	35 - 25 - 16	8,4
50	AR 22	31,8	29,5 - 24 - 15	7,08
33	AR 23	30,7	33 - 25 - 17	7,63
10	AR 24	27,9	25 - 14 - 13	2,63
80	AR 25	29	30 - 26 - 17	8,41
18	AR 26	28,4	32 - 26,5 - 18	9,18
30	AR 27	27,8	29 - 26 - 15	7,5
38	AR 28	26,2	23,5 - 23 - 17,5	5,56
	Moyenne	28,8		6,34
	SEM	0,4		0,5
	Traitées β carotène			
8	AR 29	25,6	26 - 19,5 - 12,5	3,64
16	AR 30	28,9	32 - 18,5 - 15,5	5,56
98	AR 31	29,9	33 - 20 - 12	6,34
59	AR 32	26	19 - 15,5 - 10,5	2,2
6	AR 33	25,6	22 - 19 - 10,5	2,96
88	AR 34	26,3	30 - 22,5 - 16,5	7,34
43	AR 35	26,6	30 - 23 - 17	8,13
91	AR 36	28,5	31 - 23 - 15	7,7
39	AR 37	23,6	19 - 15 - 10	2,1
	Moyenne	26,8		5,11
	SEM	1,3		0,8

	Tumeur du poumon	
	Témoins	traitées β carotène
Moyenne du volume tumoral au début du traitement (cm3) + SEM	0,283 +/- 0,02	0,311 +/- 0,02
Moyenne du volume tumoral au moment du sacrifice (cm3) + SEM	5,97 +/- 0,5	3,42 +/- 0,5
Moyenne du poids des tumeurs au moment du sacrifice	6,34 +/- 0,5	5,10 +/- 0,8

**% d'inhibition du volume tumoral après sacrifice
en fin d'expérience**

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Volume témoins} - \text{Volume traités}}{\text{Volume témoins}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibition} = \frac{59,79 - 34,28}{59,79} \times 100 = 42,66 \%$$

du β carotène

**% d'inhibition de la croissance tumorale
consécutif au traitement**

Pour cela , on compare les augmentations relatives du volume tumoral pour les deux lots traités et témoins et ceci pendant toute la durée de l'essai .

$$\text{Augmentation relative} = \frac{\text{Volume final} - \text{Volume initial}}{\text{Volume initial}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibition} = \frac{2012,70 - 1002,25}{2012,70} \times 100 = 50,20 \%$$

β carotène

**% d'inhibition du poids tumoral après sacrifice
en fin d'expérience**

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Poids témoins} - \text{Poids traités}}{\text{Poids témoins}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibition} = \frac{6,34 - 5,10}{6,34} \times 100 = 19,56 \%$$

du β carotène

1 jour / 2 pendant 15 jours soit 8 injections

36^{ème} passage

Traités	Poids de la souris en gramme	Taille de la tumeur en mm	Poids de la tumeur en gramme
AR 89	38,9	34,5 - 29 - 28	18,36
AR 90	29,4	30 - 30 - 29	10,75
AR 91	28,5	71,5 - 23 - 25	7,65
AR 92	34,2	39 - 29 - 29	12,68
AR 93	35,4	40 - 23 - 19	17,69
AR 94	32	31 - 29 - 24	13,16
AR 95	29,5	40 - 33 - 27	14,15
Moyenne	32,5		13,52
SEM	1,4		1,4

Témoins	Poids de la souris en gramme	Taille de la tumeur en mm	Poids de la tumeur en gramme
AR 109	32,7	34 - 29 - 28	15,3
AR 110	34	33 - 29 - 27	8,7
AR 111	35,9	34 - 35 - 29	12,3
AR 112	40,2	32 - 43 - 27	18,5
AR 113	27	30 - 21 - 27	7,22
AR 114	26,7	39 - 28 - 25	14,14
AR 115	31	39 - 27 - 23	10,23
moyenne	32,5		12,34
SEM	1,8		1,50

	Poids de la souris en gramme	Taille de la tumeur en mm	Poids de la tumeur en gramme
AR 96	32	33 - 27 - 23	6,65
AR 97	35	39 - 26 - 22	8,73
AR 98	29,8	39 - 29 - 25	14,75
AR 99	36,5	39 - 30 - 29	13
AR 100	34,3	39 - 33 - 23	14
AR 101	39,1	40 - 33 - 27	14,3
AR 102	30,1	33 - 29 - 29	13,3
Moyenne	33,83		12,1
SEM	1,2		1,1
AR 103	34	33 - 27 - 23	14,29
AR 104	35,8	33 - 27 - 23	7,16
AR 105	29	39 - 27 - 25	14,29
AR 106	34,8	39 - 23 - 21	9
AR 107	34,3	39 - 33 - 23	16,6
AR 108	32	34 - 35 - 31	12,46
AR 109	32	39 - 33 - 28	10,96
moyenne	32,93		11,74
SEM	0,9		1,3

	Tumeur du poumon	
	Témoins	traitées β carotène
Moyenne du volume tumoral au début du traitement (cm3) +SEM	5,55 +/- 0,04	6,13 +/- 0,05
Moyenne du volume tumoral au moment du sacrifice (cm3) +SEM	144,83 +/- 0,6	134,12 +/- 0,7
Moyenne du poids des tumeurs au moment du sacrifice	12,06 +/- 1,3	13,52 +/- 1,4

% d'inhibition du volume tumoral après sacrifice

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Volumes témoins} - \text{Volumes traités}}{\text{Volumes témoins}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibition} = \frac{144,83 - 134,12}{144,83} \times 100 = 7,39 \%$$

β carotène

**% d'inhibition de la croissance tumorale
consécutif au traitement**

$$\% \text{ inhibition} = \frac{2509 - 2087}{2509} \times 100 = 16,81\%$$

β carotène

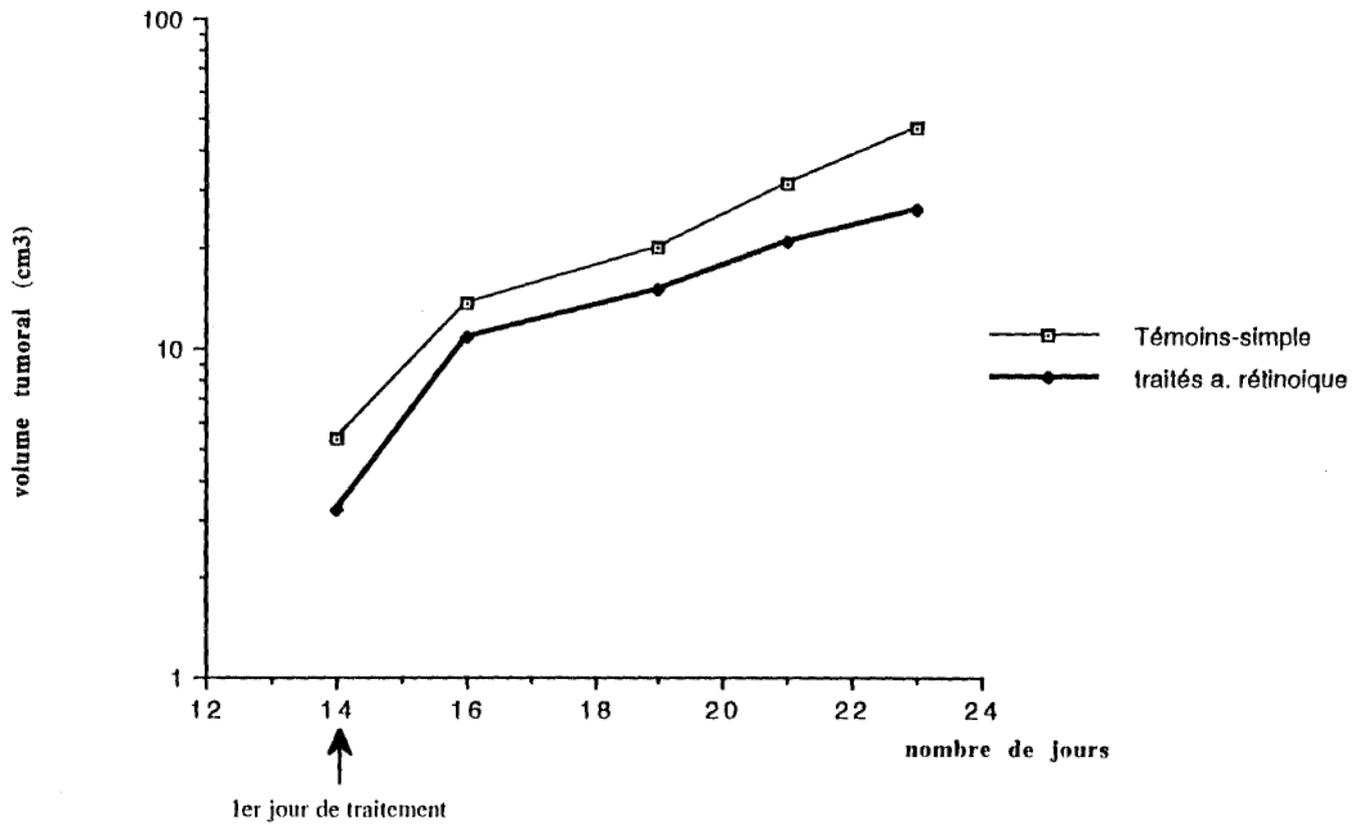
% d'inhibition pour les poids des tumeurs après sacrifice

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Poids témoins} - \text{Poids traités}}{\text{Poids témoins}} \times 100$$

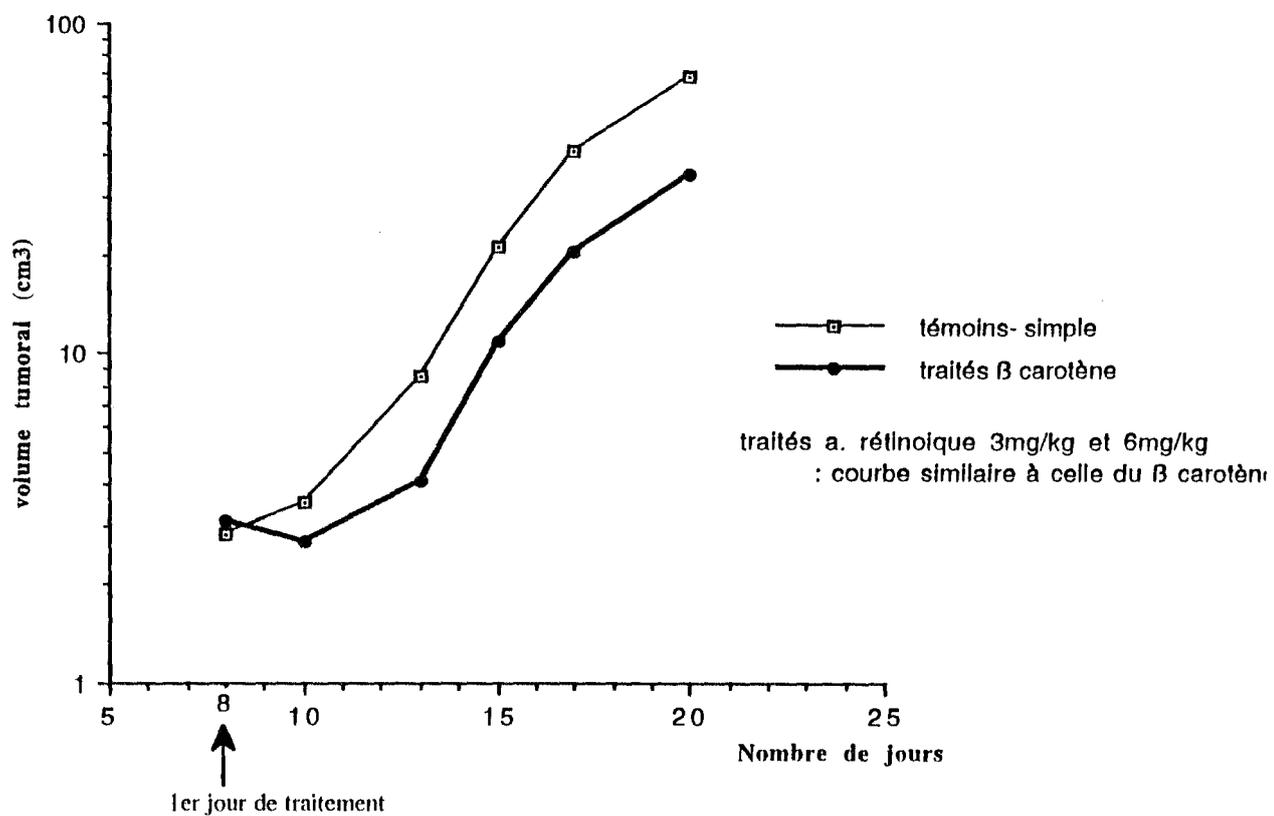
$$\% \text{ inhibition} = \frac{12,06 - 13,52}{12,06} \times 100 = -12,10$$

β carotène

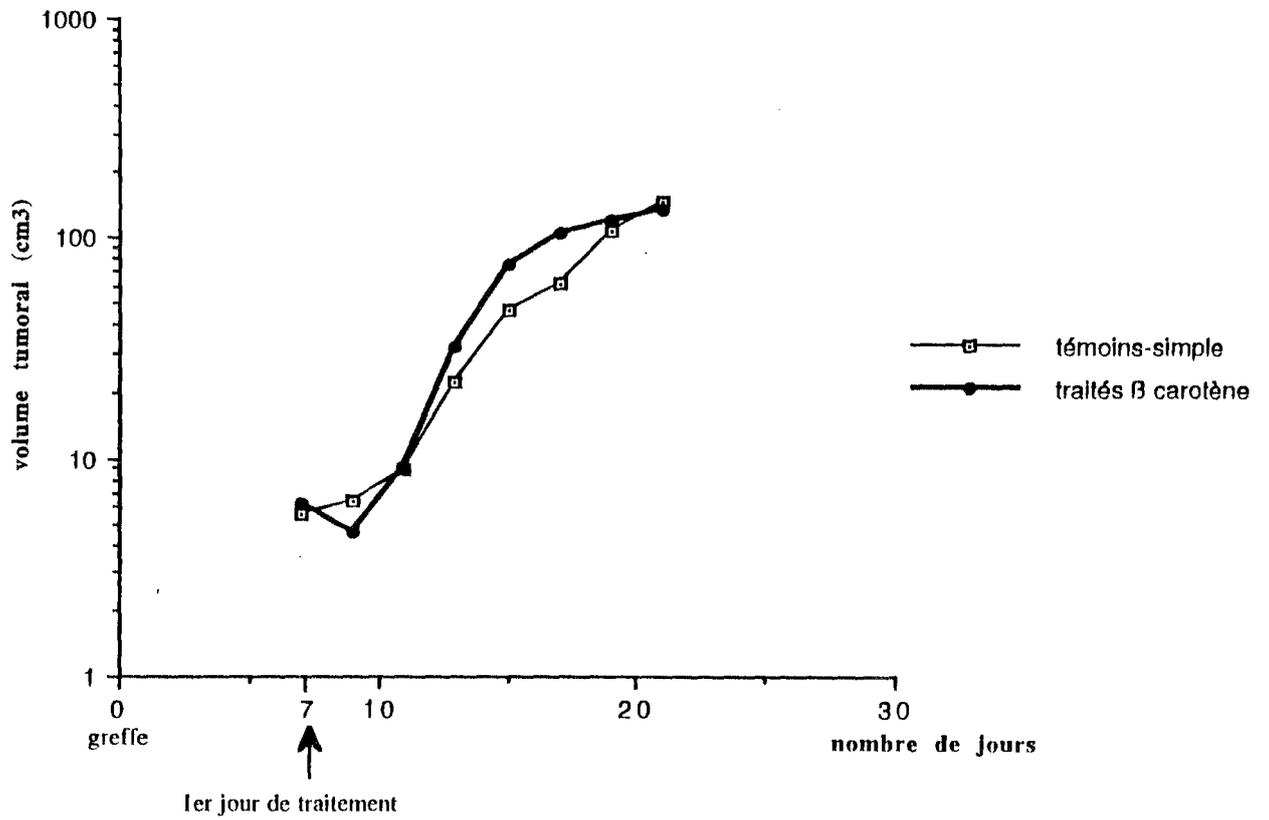
Test de tolérance à l'acide rétinolique chez des souris xénotreffées avec un carcinome pulmonaire à petites cellules (23ème passage)



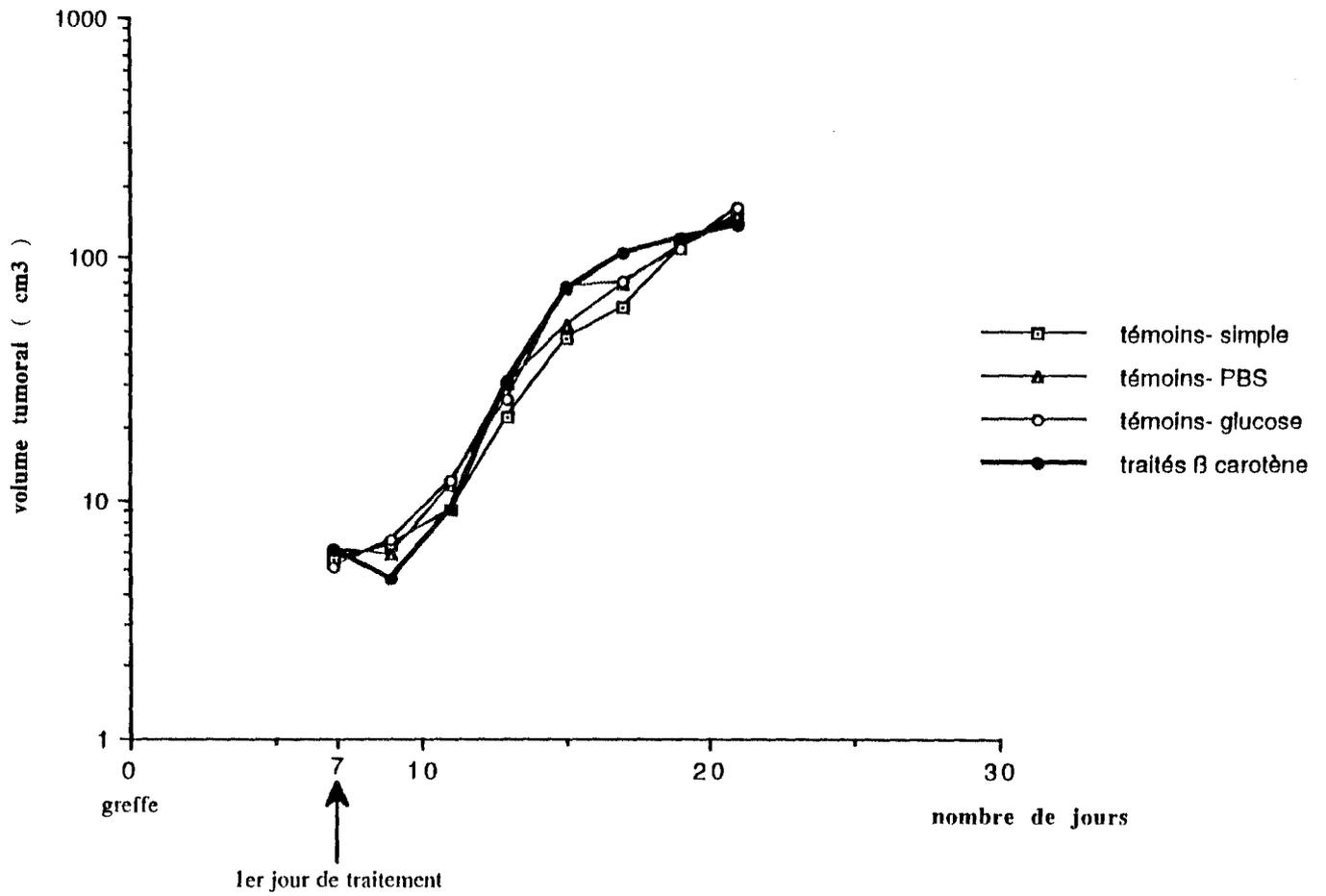
**Réponse au β carotène chez des souris xénogreffées
avec un carcinome pulmonaire à petites cellules (24ème passage)**



**Réponse au β carotène chez des souris nude xéno greffées
avec un carcinome pulmonaire à petites cellules (36ème passage)**



**Réponse au β carotène chez des souris nude xéno greffées
avec un carcinome pulmonaire à petites cellules (36ème passage)**



Interprétation

Afin d'effectuer plusieurs comparaisons concernant des paramètres différents nous avons :

- dans un premier temps ; mesuré le volume tumoral en début d'injection (volume initial) puis à intervalles réguliers jusqu'à la fin de la manipulation (volume final).
- puis dans un deuxième temps ; pesé la tumeur excisée pour les souris témoins et les souris traitées au moment du sacrifice.
- et en dernier lieu, récupéré du sang (1 à 2 ml) sur héparine, au moment du sacrifice des souris, afin de réaliser les dosages des enzymes et marqueurs du stress oxydatif.

Le volume tumoral

Une courbe volume tumoral en fonction du temps est réalisée afin d'observer les variations de la croissance tumorale existant entre les lots des souris traitées et témoins.

Ce que l'on observe c'est une action freinatrice du β carotène sur l'augmentation du volume tumoral. En effet, on peut noter un volume tumoral identique au départ chez témoins et traités puis une inhibition transitoire de la croissance tumorale qui semble se manifester essentiellement en début de traitement par le β carotène.

Il est certain que l'effet du β carotène s'exerce ici sur la prolifération , le traitement ayant été instauré sur des tumeurs bien vascularisées dont la croissance est bien installée.

En ce qui concerne l'acide rétinoïque, on constate une bonne tolérance et le même effet freinateur sur la croissance des tumeurs. Il est à noter que la dose d'acide rétinoïque à 9 mg / kg n'exerce pas cet effet , on pourrait incriminer le fait qu'il y a alors mauvaise dissolution de ce produit lorsqu'il est à forte concentration et par conséquent passage dans le sang à des doses trop faibles.

Le poids des tumeurs

Bien que les % d'inhibition des poids des tumeurs paraissent significatifs, la signification n'est pour vérifiée si l'on compare les poids des tumeurs lors du sacrifice des animaux.

Comme nous le constatons le pourcentage relatif d'inhibition du poids tumoral avoisine 20 % pour le lot traité au β carotène ce qui concorde bien avec les résultats rapportés dans la littérature où le β carotène montre un effet antiprolifératif d'amplitude modérée et souvent transitoire lorsqu'il s'agit, et c'est notre cas, de traiter une tumeur en phase proliférative à croissance rapide mais cette conclusion ne peut être reportée à l'expérimentation 4 où les poids des tumeurs chez les souris traitées ne sont guère différents de ceux des souris témoins.

Résultats : Marqueurs du stress oxydatif

Les dosages ont été réalisés sur un carcinome pulmonaire au 24^{ème} passage en ce qui concerne le traitement par l'acide rétinolique (expérimentation 3), 24^{ème} passage (expérimentation 3) et 36^{ème} passage (expérimentation 4) pour le traitement au β carotène.

Acide rétinolique : 3 doses (3, 6, 9 mg / kg) 1 jour / 2 , de J 8 à J 20 , soit 7 injections.

Tableau des résultats :

	Témoins (greffées)	Traités a. rétinolique			Valeurs normales (non greffées)
		3mg / kg	6mg / kg	9mg/kg	
RETINOL ($\mu\text{mol} / \text{l}$)	0,472 + 0,303	1,174 + 0,317	0,728 + 0,027	0,687 + 0,066	
A. RETINOIQUE ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	-	-	-	-	-
β CAROTENE ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	ND	ND	ND	ND	ND
MDA ($\mu\text{mol}/\text{l}$) <i>fluorimétrie</i>	2,96 + 0,21	3,09 + 0,37	2,87 + 0,23	2,56 + 0,43	3,50
SOD (U /mg d'Hb)	1,06 + 0,09	1,06 + 0,18	1,05 + 0,13	1,07 + 0,70	1,09

Expérimentation 3

NB : Les valeurs normales ne sont qu'un ordre de grandeur

β carotène : 1 dose de 30 mg / kg , 1 jour / 2 , de J 8 à J 20 , soit 7 injections

Tableau des résultats :

	Témoins <i>(greffées)</i>	Traités β carotène <i>(greffées)</i>	Valeurs normales <i>(non greffées)</i>
RETINOL (μmol / l)	0,966 + 0,440	1,680 + 0,510	-
A.RETINOIQUE (μmol/l)	-	-	-
β CAROTENE (μmol/l) <i>fluorimétrie</i>	ND	0,453 + 0,015	ND
MDA (μmol/l) <i>fluorimétrie</i>	2,88 + 0,43	3,18 + 0,29	3,50
SOD (U/mg d'Hb)	1,06 + 0,09	1,15 +0,01	1,09

Expérimentation 3

β carotène : 1 dose de 30 mg / kg , 1 jour / 2 , de J 7 à J 21 , soit 8 injections.

Tableau des résultats :

	Témoins <i>(greffées)</i>	Traités β carotène <i>(greffées)</i>	Valeurs normales <i>(non greffées)</i>
A. RETINOIQUE (ng / ml)			
forme cis	traces	pas de pic	
forme all trans	0,68	pas de pic	
β CAROTENE (μmol/l) <i>fluorimétrie</i>	ND	0,556 + 0,021	ND
MDA (μmol/l) <i>HPLC</i>	1,05 + 0,21	1,16 + 0,24	0,97 + 0,12
SOD (U/mg d'Hb)	0,73 + 0,32	0,66 + 0,17	1,09 + 0,23
GPx (U/g d'Hb)	128,70 + 50,94	99,14 + 25,20	301 + 89,34

FOIE

	Témoins <i>(greffées)</i>	traités β carotène <i>(greffées)</i>
MDA (μmol / g de prot) <i>HPLC</i>	0,79 + 0,25	0,78 + 0,24
β CAROTENE (μmol / g de prot) <i>HPLC</i>	ND	0,28 + 0,12

TUMEUR

	Témoins <i>(greffées)</i>	traités β carotène <i>(greffées)</i>
MDA (μmol / g de prot) <i>HPLC</i>	0, 213 + 0,32	0,167 + 0,27
β CAROTENE (μmol / g de prot) <i>HPLC</i>	ND	ND

Expérimentation 4

C- Manipulation 5 :

Protocole :

* carotenoides : β carotène cristallisé extrait de carottes (SIGMA)

* Espèce et souche animale : souris nude , femelles homozygotes de souche SWISS nu provenant du centre d'élevage des Oncins d'IFFA CREDO.

β carotène à 30 mg / kg = témoins : 16

traitées : 16

* traitement et système solvant :

- β carotène : Ethanol 1 partie

Emulphor 1 partie

Eau distillée 18 parties

injection de 30 mg / kg ; par voie intrapéritonéale ; 1 jour sur 2, 5 injections.

Dosages :

* ponction du sang : le sang est ponctionné au niveau de l'oeil ou au niveau cardiaque et récupéré sur anticoagulant (héparinate de sodium), homogénéisé puis centrifugé à 3500 tours / minute. Le plasma est mis dans des tubes à oligoéléments pour le dosage du MDA et de l'acide rétinolique ; le culot est utilisé pour les dosages de la SOD et de la GPx.

* les dosages sanguins :

idem précédemment



Résultats

Les dosages ont également été effectués d'une part sur des souris nude saines non greffées afin d'avoir des valeurs témoins et d'autre part sur des souris nude non greffées et traitées par le β carotène afin de comprendre l'action du β carotène, indépendamment de la tumeur.

Tableau des résultats :

	Témoins <i>non greffées</i>	Traités β carotène <i>non greffées</i>
A.RETINOIQUE (ng / ml)		
forme cis	traces	pas de pic
forme all trans	0,76	pas de pic
MDA (μmol/l) <i>fluorimétrie</i>	0,97 + 0,12	0,74 + 0,28
SOD (U/mg d'Hb)	1,08 + 0,23	1,08 + 0,22
GPx (U/g d'Hb)	301 + 89,34	297 + 81,20

FOIE

	Témoins	traités β carotène
MDA (μmol / g de prot)	0,451 + 0,32	0,471 + 0,22
<i>HPLC</i>		
β CAROTENE (μmol / g de prot)	ND	1,20 + 0,91
<i>HPLC</i>		

Interprétation

Paramètres du stress oxydatif

Pour une meilleure compréhension, il est bon de rappeler que la superoxyde dismutase (SOD) détruit l'anion superoxyde tandis que la glutathion peroxydase (GPx) métabolise quand à elle le peroxyde d'hydrogène.

On ne dosera pas ces enzymes mais on évaluera leur activité.

Le carcinome pulmonaire à petites cellules ne présente pas de résultats similaires selon le nombre de passage effectués sur les souris nude (24^{ème} et 36^{ème} passage d'une tumeur greffée sur des souris SWISS / nu)

Par contre les dosages de rétinol, SOD, et MDA sont similaires en ce qui concerne le traitement des souris par l'acide rétinoïque et le β carotène lors du 24^{ème} passage.

On ne constate pas de différences statistiquement significatives pour les dosages de MDA et de SOD entre les lots souris greffées traitées et non traitées ainsi que les lots souris greffées et non greffées mais uniquement une légère tendance à l'augmentation pour les concentrations de MDA ceci pour les souris greffées traitées ou non par le β carotène lors du 36^{ème} passage. Ceci confirme les travaux de Melle A.S. Gauchez, travaux qui démontraient que la lipoperoxydation était plus intense chez les souris xénogreffées.

Lors de l'administration de l'acide rétinoïque on constate une augmentation de rétinol (métabolite de l'acide rétinoïque) tandis que l'administration de β carotène entraîne certes une élévation du rétinol mais une baisse de l'acide rétinoïque qui est l'un des métabolites du β carotène. Après comparaison avec le lot témoin où l'on observe des traces d'acide rétinoïque de la forme cis et un pic d'acide rétinoïque de la forme all trans , on constate une consommation d'acide rétinoïque chez les souris greffées traitées par le β carotène.

Les taux de GPx chez les souris greffées sont nettement diminués par rapport aux souris saines. Le traitement par le β carotène ne permet pas la restauration de ce taux bien qu'étant décrit dans la littérature comme un capteur de l'oxygène singulet.

Les dosages sanguins de β carotène par fluorimétrie permettent d'apprécier le passage du β carotène par voie intrapéritonéale dans le solvant eau distillée-émulphor-éthanol. Pour les témoins les valeurs sont nulles ; on peut émettre l'hypothèse qu'effectivement il y a une absence de β carotène ou des traces mais non détectables par la technique utilisée (manque de sensibilité).

Au niveau du foie et de la tumeur, on ne trouve pas de différences statistiquement significatives pour les lots traités et témoins quant au dosage du MDA. Le β carotène se retrouve au niveau du foie (passage direct d'une faible quantité ?) mais pas dans la tumeur.

conclusion :

Analysant les résultats des expérimentations menées, nous ne prétendons pas tirer de conclusions mais simplement proposer quelques tentatives d'explications et suggérer quelques propositions pour des recherches complémentaires.

Notre choix délibéré concernant l'administration du β carotène par voie parentérale, préférentiellement à sa voie habituelle d'administration qui est la voie orale, a été dicté par le souhait d'obtenir après un cycle d'injection relativement court, des taux plasmatiques de β carotène détectables par les méthodes utilisées au laboratoire de biochimie C et susceptibles de provoquer certaines modifications du statut en antioxydant tant chez la souris saine non porteuse de greffe que la souris xéno greffée.

Ce premier objectif fut atteint bien que nous nous soyons heurtés à la difficulté de trouver un système solvant adéquat.

Il est fort probable que la dose administrée et qui au demeurant fut bien tolérée, puisse être diminuée par la mise en oeuvre d'une forme galénique permettant une meilleure solubilisation et biodisponibilité du β carotène hydrophobe.

Nous avons pu tenter un essai de traitement au β carotène sur des souris athymiques porteuses d'un carcinome pulmonaire à petites cellules (modèle établi par le Dr M.F. Poupon) et que nous avons choisi parce que les cancers pulmonaires ont fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques corrélant une faible incidence de ce type de cancer à une teneur plasmatique élevée en β carotène.

Nous avons choisi d'instaurer le traitement à un moment très précis : après la prise de greffe sur un greffon vascularisé en pleine croissance; il s'agissait donc d'un essai thérapeutique sur une tumeur à croissance rapide en phase proliférative.

Il est évident que pour traiter ce type de tumeur le β carotène ne pourrait servir que d'appoint à une chimiothérapie classique. Nous pensons que l'effet du β carotène devrait également être étudié très précocément après l'implantation tumorale : administration de β carotène dès le lendemain de la greffe par exemple, pour connaître son influence sur la prise de greffe elle-même et sur la mise en place de la croissance tumorale.

Les études portant sur les marqueurs du stress oxydant ont été faites en fin d'expérimentation; à un moment où l'organisme a été fortement perturbé par la prolifération tumorale. Le statut en antioxydant de cet organisme a probablement, dans ces conditions, subi d'importantes modifications et l'influence de l'administration du β carotène est à l'évidence fort difficile et complexe à étudier à ce stade.

L'évaluation du statut en antioxydant pourrait être envisagée précocément par exemple au moment où se manifeste l'action du β carotène.

Il n'est pas exclu que l'utilisation d'un autre modèle tumoral "sensible" à l'action du β carotène et de croissance moins rapide que le carcinome à petites cellules, tel un épithélioma malpighien de l'oropharynx, de l'oesophage ou du poumon voire un carcinome de la vessie puisse apporter de meilleures informations.

Les interactions du β carotène avec d'autres antioxydants plasmatiques tels que l'acide ascorbique et l' α tocophérol pourraient également être étudiées.

En ce qui concerne l'aide à la thérapeutique, le β carotène pourrait être utilisé afin d'améliorer l'état général des patients mais c'est surtout en terme de prévention qu'il prend toute sa valeur.

Actuellement, une enquête épidémiologique française : SUVIMAX, est mise en place sous la direction du Professeur Hercberg (INSERM, Paris) et le Professeur A. Favier (Biochimie C , Hopital Michallon, Grenoble). Elle consiste à supplémenter des sujets volontaires en vitamine A, vitamine E, vitamine C, sélénium et β carotène. Les résultats devraient jouer en faveur d'un effet préventif de ces divers antioxydants vis à vis des cancers.

ABREVIATIONS :

ADN : acide désoxyribonucleique
ARN : acide ribonucleique
AMPc : adénosine 3'-5'-cyclic monophosphate
CAT : catalase
CSF : colony stimulating factor
CIVD : coagulation intravasculaire dissiminée
DTPA : diethylenetriaminepentaacetic
EGF : epidermal growth factor
EDTA : ethylenediaminetetraacetic
GPx : glutathion peroxydase
HPLC : high performance liquid chromatography
IL2 : interleukine 2
IL1 : interleukine 1
LT : lymphocyte T
LAM : leucémie aigüe myélocytaire
MDA : malondialdehyde
µg : microgramme
mg : milligramme
ODC : ornithine décarboxylase
PDGF : platelet derived growth factor
PM : poids moléculaire
PKc : protéine kinase c
QSP : quantité suffisante pour
cRBP : cellular retinol binding protein
pRBP : plasmatic retinol binding protein
SOD : superoxyde dismutase
TG : transglutaminase
TBA : acide thiobarbiturique
UI : unité internationale
UV : ultraviolet
λ : longueur d'onde

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Arnaud J. ; Fortis I. ; Favier A. ; "Simultaneous determination of retinol , α tocopherol and β carotene in serum by isocratic HPLC"
* J. chromat. 572 : 103-116 ; 1991.
- 2- Badwey JA.;Robinson JM.; Curnette JT.;"Retinoids stimulate the release of superoxyde by neutrophils and change their morphology."
* J Cell Physiol 127 : 223 - 228. ;1986.
- 3- Bentley DL. and Groudine M.;" A block to elongation is largely responsible for de creased transcription of c-myc in differentiated HL- 60 cells. "
* Nature 321 : 702 - 706.; 1986.
- 4- Bollag W.;" retinoids and cancers"
* Cancer chemother pharmacol 3 : 207; 215 ; 1979
- 5- Bolmer SD. and Wolf G.;" Retinoids and phorbol esters alter release of fibronectin from enucleated cells. "
* Proc Natl Acad Sci USA 79 : 6541 - 6545.; 1982.
- 6- Bourgeade M F et Besancon F.; "Induction of 2' 5' oligoadenylate synthetase by reti noic acid in 2 transformed human cell lines."
* Cancer Res 44 : 5355 - 5360 ; 1984
- 7- Burton GW, Ingold KU " β carotène : an unusual type of lipid antioxydant."
* Science 224 : 569 - 573 ;1984.
- 8- Burton G.W.;"Antioxidant action of Carotenoids"
* J Nutr : 109 - 111 ; 1989.
- 9- Burton GW; Joyce A and Ingold Ku .;"First proof that vitamin E is major lipid - solu ble, chain breaking antioxidant in human"
blood plasma Lancet II : 327.;1982.
- 10- Chang K.S. ; Stass S.A. ;"Characterization of a fusion cDNA (RAR/myl) transcribed from the t (15 ;17) translocation breakpoint in acute promyelocyte leukemia "
* Mol. Cell. Biol. 12: 800-810 ; 1992.
- 11- Chytil F. and Ong DE.;" Mediation of retinoic acid induced growth and anti-tumor acti vity."
* Nature 260 : 49 - 51. ;1976.
- 12- Cohen L.;" L'alimentation et le cancer"
* Pour la science Janvier : 20-27 ; 1988.

- 13 - Comstock W.G.; Helzsover J. K.; Bush L.T.; "Prediagnostic serum levels of carotenoids and vitamin E as related to subsequent cancer in Washington County, Maryland"
* Am J clin Nutr ; 53 : 260S.-4S ; 1991.
- 14- Cope FO.; Howard BD. and Boutwell RK. ; "The in vitro characterization of the inhibition of mouse brain kinase-C by retinoids and their receptors. "
* Experientia 42 : 1023 - 1027.;1986
- 15 - Cunningham W.J. and Ehmann C.W.;" Clinical aspects of the retinoids"
* Semin dermatol 2 : 145-160 ; 1983
- 16- Chauvin C. ; Jacrot M. ; Riondel J. ; Brambilla E. ; Foote A.M. ; Brambilla C. ; and Benabid A.L. ; "Amplification of oncogenes in lung carcinoma grafted in nude mice"
* Anticancer Res. 9 : 449 - 452 ; 1989.
- 17- Cornic M. ; Guidez F. ; "Mode d'action des rétinoïdes dans une nouvelle approche thérapeutique des leucémies aiguës promyélocytaïres "
* Bull Cancer 79 :697-704 ; 1992.
- 18- Davis PJ ; Murtaugh MP ; Moore W.T.;"Retinoic acid induced expression of tissue transglutaminase in human promyelocytic leukemia (HL 60) cells."
* J Biol Chem. 260 : 5166 - 5176 ; 1985
- 19- Delva L. ;Cornic M. ;"Application thérapeutique de l'acide rétinoïque dans la leucémie aiguë promyélocytaire "
* Immunoanal. Biol. Spéc. 25: 17-21 ;1991.
- 20- Dennert G.;" Immunostimulation by retinoic acid. In retinoids. Differentiation and Disease (Nugent J. and Clark S. eds) London."
* Pitman. . pp 117-126.;1985.
- 21- Di Mascio P. ; Kaiser S. ; Sie H. ;"Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher "
* Arch. Biochem. Biophys. 274 :1-7 ; 1989.
- 22- Douer D and Koeffler HP.;" Inhibition of the clonal growth of human myeloid leukemia cells"
* J Clin invest 69 : 277,283., 1982
- 23- Earp HS.; Lee LW; Raymond VW. (Abstr);" EGF and retinoic acid stimulate EGF receptor synthesis. "
* J. Cell Biochem Suppl 10 C : 129.; 1986.
- 24- Eccles S.;" Effects of retinoids on growth and dissemination of malignant tumours : immunological considerations. "
* Biochem Pharmacol 34 : 1599 - 1610. ;1985.

- 25- Esterbauer H. ; Striegl G. ; "The role of vitamine E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoprotein "
* Ann. NY Acad Sci 570 : 254-267 ;1989.
- 26- Eunice J. ; Rousseau A. ; Davidson J. ; "Protection by b caroten and related compounds against oxygen- mediated cytotoxicity and genotoxicity "
* Free radical biology and medicine Vol 13 ; pp 407-433 ; 1992
- 27- Felsted RL. ;Gupta SK. ;Glover CJ ;"Cell surface membrane protein changes during the differentiation of cultured human promyelocytic leukemia HL-60 cells. "
* Cancer Res 43 : 2754 - 2761.; 1983
- 28- Fontana JA ; Reppucci A ; Durham JP ;"correlation between the induction of leukemic cell differentiation by various retinoids and modulation of protein kinases."
* Cancer Res 46 : 2468 - 2473 ; 1986
- 29- Foote C.S ; Denny R. W. ;"Chemistry of singlet oxygen. VIII. Quenching by β -carotene."
* J. Am. Chem Soc. 90 : 6233 - 6235 ; 1968.
- 30- Foote C.S. ; Denny R. W. ; Weaver. L ; Chang, Y. Peters.J.;" Quenching of singlet oxygen."
* Ann N.Y. Acad. Sci. 171 : 139 - 148 ; 1970.
- 31- Foote. C.S. ;Chang Y.C. ;Denny R. W.;" Chemistry of singlet oxygen. X Carotenoid quenching parallels biological protection."
* J. Am. Chem. Soc. 92 : 5216 - 5218 ; 1970
- 32- Gallacher RE ; Chang CS ; and schwartz EL. ;"Metabolism of retinoic acid by wild type and RA resistant HL 60 cells ; marked effect of serum."
* Blood 68 (suppl 1) : 188 a ; 1986
- 33- Gauchez A.S. ; Riondel J. ; Jacrot M. ; Calop J. ; Favier A.;" Espèces réactives de l'oxygène et cancérogénèse . Modèle d'étude in vivo . La souris nude "
* Thèse diplôme d'état de pharmacie . Grenoble.,1992.
- 34- Gercel C. and Schroeder EW.;"Relationship between cell surface glycoconjugates and cell-cell interactions of murine and human melanoma cells"
* J Cell Biol 99 : 63 a.; 1984.
- 35- Golomb H.M. ; Rowley J.D. ; "partial deletion of long arm of chromosome 17 "
* Arch; Intern. Med. 138 : 825-828 ; 1976.
- 36- Grosleron N. ;" Relation vitamine A ; β carotène et cancer épidermoïde bronchique"
* Thèse Université Bordeaux II Médecine ; 1985

- 37- Gunzler W.A. ;Kremers H. and Flohé L. " An improved coupled test procedure for glutathione peroxydase (EC 1-11-19) in blood "
* Z Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 Jg , 5. 444-448 ; 1974.
- 38- Haringer S. ; Garewal ;" Potentiel role of β carotene in prevention of oral cancer "
* Ann. J. Nutr. 53 : 294S - 7S ;1991.
- 39- Hemila H. and Wikstrom M. ;"Retinoids activate superoxide production by polymorphonuclear leucocytes."
* Scand J Immunol 21 : 227 - 234. ;1985.
- 40- Harris C.C. ; Kaufman DG, Sporn M B.;" Histogenesis of squamous metaplasia and squamous cell carcinoma of the respiratory epithelium in an animal model"
* Cancer chemother Rep (Part 3) vol 4 (2) : 43-54 ;1973
- 41- Hattchouel J.M., Laplanche A.;" Rétinoides et caroténoïdes dans les essais de chimioprévention des cancers"
* Bull cancer 79, 957 - 962 ; 1992
- 42- Jetten AM. ;"Effects of retinoic acid on the binding and mitogenic activity of epidermal growth factor."
* J Cell Physiol 110 : 235 - 240 ;1982.
- 43- Jetten AM. and Shirley JE. ;"Action of retinoic acid on the diacylglycerol-induced ornithine decarboxylase activity. Reduction of EGF binding and protein kinase C activation in rat tracheal epithelial 2C5 cells."
* Exp cell Res 166 : 519 - 525. ;1986.
- 44- Jetten AM. ;Jetten MER. ;Shapiro S. et AL. ;"Characterization of the action of retinoids on mouse fibroblast cell lines."
* Exp Cell Res 119 : 289 - 299.;1979.
- 45- King Le. JR.;"What does epidermal growth factor do and how does it do it ? "
* J invest Dermatol 84 : 165 - 167.; 1985.
- 46- Krinsky NI ;" The protective fonctions of carotenoid pigments
In : photophysiology (Giese, A.C. ed)"
* Vol. 3 , pp 123 - 195 - Academic Press, New York.;1968.
- 47- Krinsky. N. I. ;"Biological roles of singlet oxygen. "
* New York : Academic Press ; 597 - 641.; 1979.
- 48- Kumer S. Antony M. and Mehrotra NK.;" Oxidized glutathione reductase activity in mouse epidermis : TPA induced change and its modulation by vitamin A."
* Biochem Biophys Res Commun 125 : 967-973. ;1984.

- 49- Krinsky N. ; Cornwell D.G. ; "The transport of vitamine A and carotenoids in human plasma ."
* Arch. Biochem. Biophys. 73: 233-246 ; 1958.
- 50- Krinsky N.;" Antioxidant functions of carotenoids"
Free radical biology and medecine.
* Vol 7 , pp 617 - 635 , 1989.
- 51- Lippman S.M., . Kessler J.F.; Meyskens F.L.;" Retinoids as preventive and therapeutic
Anticancer agents (Part I)"
* Cancer treatment reports vol 71 n° 4 ; April 1987
- 52- Livesey SA ; Collier Gr;"effect of retinoic acid on cellular content and human parathyroid
hormone activation of cyclic adenosine 3' 5' monophosphate dependent protein kinase
isoenzymes in clonal rat osteogenic sarcoma cells."
* Cancer Res 45 : 5734 . 5740 ; 1985
- 53- Lotan R.;"Immunomodulatory effects of retinoids."
* J Nutr Growth Cancer 3 : 57 - 65.;1986.
- 54 - Lotan R.; Meromsky L. and Marikovsky Y.;" Prevention by retinoic acid of anionic site
redistribution on the surface of cultured human sarcoma cells"
* Biol Cell 51 : 147 - 156.; 1984.
- 55- Lotan R.;"Effects of Vitamine A and its analogs (rétinoids) on normal and neoplas
tics cells"
* Biochim Biophys Acta 605 : 33 - 91 ; 1980
- 56- Lotan R and Nicolson GL;" Inhibitory effects of retinoic acid or retinyl acetate on the
growth of untransformed; tranformed and tumor cells in vitro."
* J Natl Cancer inst 59 : 1717.1722 ; 1977
- 57 - Luk GK ; Civin CI. ; Weissman RM;"Ornithine decarboxylase : essential in proliferation
but not differenciation of human promyelocytic leukemia cells."
* Science 216 : 75 - 77 ; 1982
- 58- Malone F.;" Studies evaluating antioxydants and β carotene as chemopreventives
agents for cancer."
* Am J. Clin Nutr. ; 53 : 001 . 009 ; 1991.
- 59- Manesme O.; Furr H.; Olson J.A.;" Métabolisme et fonction de la vitamine A"
* Arch Fr Pediat 42 : 325-31 ; 1985
- 60- Marcelo C.L. and Madison KC.;" Regulation of the expression of epidermal keratinocyte
profleration and differentiation of the vitamine A analogs"
* arch Dermatol Res. 276: 381. 389 ; 1984.

- 61- Marklund S. and Marklund G. " involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase "
* Eur. J. Biochem. 47 , 469-474 ; 1974 .
- 62- Martner J E and Bertram J S.;"Appearance of tyrosine phosphorylation correlates with time of transformation in 10 T1/2 cells inhibition of retinyl acetate"
* Proc Am. Assoc Cancer Res 25 : 146 ; 1984
- 63- Maruyama T. ;"Differentiation and the cell membrane excitability of teratocarcinoma OTT 6050 in culture."
* Dev Biol 108 : 246 - 249.; 1985
- 64- Mathews Roth M. ; "transport of β carotene in serum of individuals with carotenemia "
* Clin. Chem. 20 (12) : 1578-1579 ; 1974.
- 65- Meromsky L. and Lotan R.;" Modulation by retinoic acid o cellular, surface exposed. and secreted glycoconjugates in cultured human sarcoma cells. "
* JNCI 72 : 203 - 215.;1984.
- 66- Merriman RL. and Bertram JS.;"Reversible inhibition by retinoids of 3 - methyl - cho lanthracene - induced neoplastic transformation in C3H 10T1/2 clone 8 cells."
* Cancer Res 39 : 1661 - 1666.; 1979.
- 67- Mettlin C. ;Graham S. " Vitamine A and lung cancer"
* J. Natl. Init. 62 : 1435-1438 ; 1979.
- 68- Moon C.; "Comparative aspects of Carotenoids and retinoids as chemopreventive agents for cancer"
* J. Nutr n° 119 : 127-134 ; 1989
- 69- Moskal JR ;Lockney MW. ;Marvel CC;"Effect of retinoic acid and phorbol-12 - myristate - 13 - acetate on glycosyltransferase activities in normal and transformed cells."
* Cancer Res 47 : 787 - 790. ;1987.
- 70- Murtaugh MP and Davies PJ ;"Transglutaminase expression and fibronectine cross linking on the cell surface of peritoneal macrophages"
* J cell Biol 99 : 326 a ; 1984
- 71- Nakhasi HL; Nagarajan L. and Anderson WB;" Increase in cell-surface N- acetylglucosamide beta (1-4) galactosyltransferase activity with retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells."
* FEBS Lett 168 : 222 - 226.;1984.

- 72- Nettesheim P ; Snyder C and Kim JCS;"vitamine A and the susceptibility of respiratory tract tissues to carcinogenic insult"
* Environ Heath Perspect 29 : 89-93 ; 1979
- 73- Niles RM ; Loewy B and Rogeij S ;" The effect of retinoic acid on protein phosphorylation in mouse melanoma cells."
* Exp cell Res 164 : 437 - 448 ; 1986
- 74- Nishizuka Y.;"Studies and perspectives of protein kinase C"
* Science 233 : 305 - 312. ;1986.
- 75- O'Brien J.;" Free radical mediated chemical carcinogenesis"
* Am Ny Aca of Sciences
- 76- Packer JE, Mahood JS, Mora Arellano VO, Slater T. ;" Free radicals and singlet oxygen scavengers. Reaction of peroxy radical with β carotène; diphenylfuran and 1,4-diazo-bicyclo 2.2.2. octane."
* Biochem - Biophy Res commun 98 : 901 - 906
- 77- Richard M.J.; Portal B.; Méo J.; Coudray C. and Favier " Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fraction that react with thiobarbituric acid"
* Clin. Chem.vol. 38 N°5 : 704-709 ; 1992
- 78- Richard M.J. ; Guiraud P. ;Méo J. and Favier " High performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde - thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially reagent "
* Journal of chromatography ; 577 : 9-18 ; 1992.
- 79- Riscoe MK ; Ferro AJ and Fitchen J H. ;"Methylthioadenosine (MTA) metabolism is essential for differentiation of HL 60 cells"
* Blood 68 (suppl 1) : 192 a ; 1986
- 80- Riondel J. ; Jacrot M. ; Picot F. ; Beriel H. ; Mouriquand C. ; Potier P. ; "Therapeutic response to taxol of six human tumors xenografted into nude mice "
* Cancer Chemother and Pharmacol. 17 : 137-142 ; 1986.
- 81- Riondel J. ; Jacrot M. ; Fessi H. ; Puisieux F. ; Potier P. ; "Effect of free and liposome-encapsulated taxol on two brain tumors xenografted into nude mice "
* in vivo 6 : 23-28 ; 1992.
- 82- Riondel J. ; Jacrot M. ; Nissou N.F. ; Picot F. ; Beriel H. ; Mouriquand C. ; Potier P. ; "Antineoplastic activity of two taxol derivatives on an ovarian tumor xenografted into nude mice "
* Anticancer Res. 8 : 387-390 ; 1988

- 83- Roberts AB.; Frolik CA. ;Anzano MA. ;"Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues."
* Fed Proc 42 : 2621 - 2626. ;1983.
- 84- Russel D.H.;" Ornithine decarboxylase a key regulatory enzyme in normal and neoplastic growth"
* Drugs metab Rev 16 : 1.88 ; 1985
- 85- Salkeld R.M.;" Déficiences vitaminiques, exemples de conséquences pathologiques"
* Journées vitamines Cah Nutr Diét XXVI 1 ; 1991.
- 86- Shapiro PE. and Edelson RL."Effects of retinoids on the immune system. In retinoids : New Trends in Research and Therapy (Saurat JH. ed.) "
* Basel. Karger. . pp 225 - 235.;1985.
- 87- Shekelle R.B. ; Lepper M. ; Liu S. " Dietary vitamin A and risk of cancer in the western electric study "
* Lancet ;2 : 1185-1190 ; 1981.
- 88- Sherman MI ;Gubler ML; Barkai U.;"Role of retinoids in differentiation and growth of embryonal carcinoma cells. In Retinoids. Differentiation and Disease (Nugent J. and Clark S. eds). London."
* Pitman. . pp 42 - 60.;1985.
- 89- Sidell N.;Rieber P. and Golub SH. ;"Immunological aspects of retinoids in humans. Analysis of retinoic acid enhancement of thymocyte responses to PHA "
* Cell Immunol 87 : 118 - 125. ;1984.
- 90 - Sidell N. ;Lucas CA. and Kreutzberg GW.;" Regulation of acetylcholinesterase activity by retinoic acid in a human neuroblastoma cell line."
* Exp Cell Res 155 : 305 - 309. ;1984.
- 91- Sporn MB. ;Roberts AB.; Roche NS.."Mechanism of action of retinoids."
* Supplement to J Am Acad Dermatol (Topical retinoids : an update. Proceedings of a symposium) 15 (part 2) : 756 - 764
- 92- Strickland S. ;Breitman TR ;Frickel F.. ;"Structureactivity relationships of a new series of retinoidal benzoic acid derivatives as measured by induction of differentiation of murine F9 teratocarcinoma cells and human HL-60 promyelocytic leukemia cells. "
* Cancer Res 43 : 5268 - 5272. ;1983.
- 93- Sugiura M ; Shafman T ; Mitchell T ;"involvement of spermidine in proliferation and differentiation of human promyelocytic leukemia cells."
* Blood 63 : 1153 - 1158 ; 1984
- 94- Tachibana K.; Sone S.;Tsubura E. ;"Stimulatory effect of vitamin A on tumoricidal activity of rat alveolar macrophages. "
* Br J. Cancer 49 : 343 - 348.; 1984.

- 95- Terao J. "Antioxidant activity of β caroten related carotenoid in solution "
* Lipids Vol 24 N° 7 :1989.
- 96- Thé (de) H. ; Chomienne C. ; Lamotte M. ; "The t (15,17) translocation of acute pro myelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor a gene to a novel transcribed locus
* Nature 347 : 558-561 : 1990
- 97- Tobler A.;Dawson MI. and Koeffler HP.;" Retinoids : structure function relationship in normal and leukemic hematopoiesis in vitro. "
* J Clin Invest 78 : 303 - 309. :1985
- 98- Tsambaos D ; Merk H. ; Bolsen K.;"carotenoid ethyl ester inhibits induction of aryl hydrocarbon hydroxylase by D M BA : in retinoid New trends in research and therapy"
* Basel Karger ; 129 - 135 ; 1985.
- 99- Vitale C ; Rakowki I and Raza A;" Number of DNA replication cycles completed by HL 60 cells during differentiation induced by 13 cis-retinoic acid (RA)"
* Blood 68 (Suppl 1) 194 a : 1986
- 100- Weibsburger H.J. ;". Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins; antioxydants and carotenoids"
* Am J Clin Nutr : 53 : 226S - 37S ; 1991
- 101- Westin EH.; Wong-Staal F.; Gelmann EP.." Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. "
* Proc Natl Acad Sci USA 79 : 2490 - 2494. :1982
- 102- Wolbach S.B. and Howe.P.R. ;"Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin"
* J Exp Med 42 : 753-777 :1925
- 103- Yei Mei Peng ; Yeh Sham Peng " a non saponification method for the determination of carotenoids , retinoids and tocopherol in solid human tissues "
* Cancer Epidemiology , biomarkers and prevention vol 2 : 139-144 : 1994
- 104- Zerlauth G. and Wolf G.;" Studies on the tumor promoter induced release of fibronectin from human lung fibroblasts and its counteraction by retinoic acid."
* Carcinogenesis 6 : 531 - 534; 1985.

A U T O R I S A T I O N D ' I M P R E S S I O N

De la Thèse dont l'intitulé est :

CANCERS β carotène

CANDIDAT : M

elle Josse Moniel

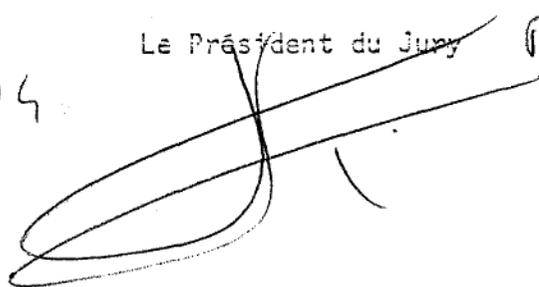
VU

GRENOBLE, le

24 Mai 1994

Le Président du Jury

P. Faivre



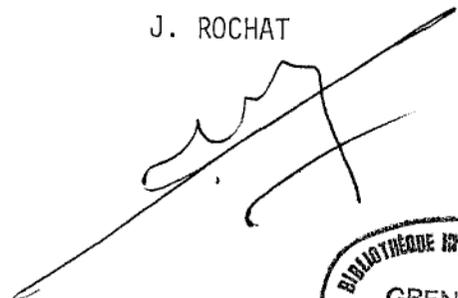
VU

GRENOBLE, le 18 mai 1994

P/ Le Président de l'Université
Joseph FOURIER GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine

Le Directeur de l'UFR de Pharmacie

J. ROCHAT



ANNEE 1994

THESE N°

JOSSE MURIEL

Née le 9 janvier 1967

β carotène et cancers

Le cancer demeure actuellement dans les pays industrialisés une des causes majeures de mortalité.

Thérapeutique et chirurgie s'efforcent d'enrayer l'évolution tumorale cependant, il semble judicieux de penser qu'une alimentation saine et équilibrée prise de façon régulière dès le plus jeune âge puisse retarder l'apparition de tumeurs.

Des études épidémiologiques ont régulièrement mis en évidence l'effet bénéfique des régimes favorisant un apport alimentaire de vitamines, de polyphénols, flavonoïdes et de β carotène auquel on attribue des propriétés antioxydantes.

Certaines espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans les étapes de la cancérogénèse. A partir de cette hypothèse des études expérimentales ont permis de démontrer l'inhibition par le β carotène de la croissance d'un cancer du poumon transplanté sur souris athymiques.

De plus cet effet bénéfique du β carotène pourrait relever d'une activité immunostimulante vis à vis des cellules tueuses non induites (natural killer cells).

MOTS CLES : β carotène, cancer, antioxydant, radicaux libres, souris athymique.

JURY:

- Président : Monsieur le Professeur A. Favier
- Directeur de thèse : Madame le Docteur J. Riondel
- Membres : Monsieur le Professeur J. Calop

Madame le Docteur M. Jacrot (sciences)

Monsieur le Docteur C. Coudray (pharmacien)

THESE SOUTENUE LE :

24 Mai 1994, salle des Thèses, faculté de Médecine et Pharmacie, GRENOBLE.