

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Frères Mentouri Constantine  
Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre:32/D3C/2017

N° de série: 02/Bioch/2017

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3ème cycle

*Option: Biochimie, biotechnologies*

Thème de la recherche

L'effet préventif des flavonoïdes et des phénols de thé vert  
(*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) sur le cancer de la prostate  
chez une population de l'Est Algérien: étude  
épidémiologique et étude expérimentale *in vitro* et *in*  
*humaine*

**Présentée par:**

**Mme LASSED Somia**

**Devant le jury:**

<b>Président:</b>	<b>Pr. Meraihi Zahia</b>	<b>Université Frères Mentouri Constantine</b>
<b>Directrice de thèse:</b>	<b>Pr. Zama Djamilia</b>	<b>Université Frères Mentouri Constantine</b>
<b>Examineur:</b>	<b>Pr. Benayache Fadila</b>	<b>Université Frères Mentouri Constantine</b>
<b>Examineur:</b>	<b>Pr. Khennouf Seddik</b>	<b>Université Ferhat Abbas Sétif</b>
<b>Examineur:</b>	<b>Pr. Abdennour Cherif</b>	<b>Université Badji Mokhtar Annaba</b>

**Année universitaire : 2016/2017**

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	4
<b><u>Première partie : Généralités sur le cancer de la prostate</u></b>	
1. Description et fonction de la prostate.....	5
2. Maladies et désordres de la prostate hors le cancer.....	5
3. Le cancer de la prostate.....	6
3.1 Epidémiologie.....	6
3.2 Facteurs de risques.....	7
3.3 Anatomopathologie.....	10
3.4 Symptômes .....	14
3.5 Dépistage.....	14
3.6 Diagnostic .....	14
3.7 Traitement.....	15
<b><u>Deuxième partie: Le stress oxydant et le cancer de la prostate</u></b>	
1. Généralité sur le stress oxydant et systèmes de défenses.....	17
1.1 Définition du stress oxydant.....	17
1.2 Les espèces réactives de l'oxygène et leur production.....	17
1.3 Sources endogènes des espèces réactives de l'oxygène.....	19
1.4 Facteurs environnementaux favorisant la production des ERO.....	20
1.5 Rôle physiologique des ERO.....	20
1.6 Cibles biologiques des ERO.....	21
1.7 Systèmes de défenses antioxydants.....	23
1.8 Pathologies liées au stress oxydant.....	26
2. Implication du stress oxydant dans le cancer de la prostate.....	26
2.1 Rôle de stress oxydant dans la carcinogenèse prostatique.....	27
2.2 L'origine des ERO dans le cancer de la prostate.....	28
2.3 Les voies de signalisation cellulaire activées par les ERO à l'origine de l'évolution du cancer de la prostate.....	30
<b><u>Troisième partie: Le thé vert « Source riche en phénols et en flavonoïdes »</u></b>	
1. Généralité sur les composés phénoliques.....	32
1.1 Définition des composés phénoliques.....	32
1.2 Principales classes des composés phénoliques.....	32
1.3 Biodisponibilité des composés phénoliques.....	37

1.4 Propriétés biologiques des composés phénoliques.....	38
2. Le thé vert.....	41
2.1 Description de la plante <i>Camellia sinensis</i> .....	41
2.2 Classification botanique de la plante <i>Camellia sinensis</i> .....	42
2.3 Composition chimique de thé vert.....	43
2.4 Activité anticancéreuse des polyphénols du thé vert dans la prostate.....	47

**ETUDE 1 : Etude Epidémiologique cas-témoins « la relation entre les habitudes alimentaires, le mode de vie, les antécédents familiaux et le risque de cancer de la prostate dans la population de l'Est-Algérien ».....**

1. MATERIELS ET METHODES.....	53
1.1 Recrutement des individus.....	53
1.2 Collecte de données.....	54
1.3 Analyse statistiques.....	56
2. RESULTATS.....	56
2.1 Caractéristiques générale de la population recrutée.....	56
2.2 Répartition des patients selon l'âge de diagnostic de cancer de la prostate.....	58
2.3 Relation entre les habitudes alimentaires et le risque de cancer de la prostate.....	59
2.4 Relation entre les antécédents familiaux et le risque de cancer de la prostate.....	64
2.5 Relation entre les habitudes toxiques (l'alcool et le tabagisme) et le risque de cancer de la prostate.....	65
3. DISCUSSION.....	67

**ETUDE 2: Etude expérimentale *in vitro* et *in humaine*: l'effet préventif des flavonoïdes et des phénols de thé vert (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) sur le cancer de la prostate.....**

1. MATERIELS ET METHODES.....	79
1.1 Etude expérimentale: <i>In Vitro</i> .....	79
1.1.1 Matériel végétal.....	79
1.1.2 Extraction des feuilles de thé vert.....	79
1.1.3 Détermination de la teneur totale de thé vert en phénols.....	82
1.1.4 Détermination de la teneur totale de thé vert en flavonoïdes.....	82
1.1.5 Analyse des extraits de thé vert par HPLC- TOF/MS.....	82
1.1.6 Évaluation de l'activité antioxydante de thé vert.....	83
1.1.7 Évaluation de l'activité anticancéreuse de thé vert sur des cellules cancéreuses prostatiques.....	86

1.1.8	Évaluation de l'effet de thé vert sur la condensation de la chromatine nucléaire et la polarisation mitochondriale utilisant la microscopie à épifluorescence vitale.....	89
1.1.9	Évaluation de l'effet de thé vert sur la protéine p53 utilisant le western blot.....	89
1.2	Etude expérimentale: <i>In vivo (In humaine)</i> .....	91
1.2.1	Recrutement des individus.....	91
1.2.2	Collecte des échantillons de sang.....	92
1.2.3	Préparation d'hémolysat d'érythrocytes.....	93
1.2.4	Evaluation des différents paramètres biochimiques.....	93
1.3	Analyse statistiques.....	98
2	RESULTATS.....	99
2.1	Caractérisation de la composition et des activités du thé vert <i>in vitro</i> .....	99
2.1.1	Rendement de l'extraction de thé vert.....	99
2.1.2	Teneur totale des extraits de thé vert en phénols et en flavonoïdes.....	100
2.1.3	Evaluation de la teneur des extraits de thé vert en composés phénoliques utilisant HPLC-TOF / MS.....	100
2.1.4	L'activité antioxydante de thé vert.....	105
2.1.5	L'activité anticancéreuse de thé vert sur les cellules cancéreuses prostatiques.....	111
2.1.6	L'effet de thé vert sur la condensation de la chromatine nucléaire et la polarisation mitochondriale.....	114
2.1.7	L'effet de thé vert sur la protéine p53.....	118
2.2	Etude <i>in vivo (in humaine)</i> .....	120
2.2.1	Caractéristiques générales de la population étudiée.....	120
2.2.2	Effet de la consommation de thé vert sur le statut antioxydant.....	122
2.2.3	Effet de la consommation de thé vert sur le statut oxydant.....	126
2.2.4	Effet de la consommation de thé vert sur la glycémie, le bilan lipidique et les protéines totales.....	128
3	DISCUSSION.....	132
	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	141
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
	<b>PUBLICATIONS</b>	
	<b>ANNEXES</b>	
	<b>RESUMES</b>	

## ***Communications et publications***

Une grande partie de ce travail a été présentée sous forme de communications dans différents congrès et a fait l'objet des publications internationales. D'autres communications et publications concernant les activités biologiques des plantes médicinales ont été également réalisées.

### **Publications:**

Radja Djebbari, Yasmine Chemam, Amel Amrani, **Somia Lassed**, Nassima Boubekri, Djamila Zama, Fadila Benayache, Samir Benayache. **In vitro antioxidant activities of n-butanol extract of *Helianthemum confertum***. International Journal of Phytomedicine. 2015; 7 (1):119-122.

**Somia Lassed**, Amel Amrani, Muhammed Altun, Djamila Zama<sup>1</sup>, Ibrahim Demirtas, Fadila Benayache, Samir Benayache. **In vitro Antioxidant, Inhibition of Oxidative DNA Damage and Antiproliferative Activities of Ethanolic Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract**. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2015; 35(1): 36-42.

Samira Kenouche, Aicha Latreche, Sabrina Bicha, **Somia Lassed**, Ali Bentamene, Ratiba Boucheham, Nassima Boubekri, Jouel Creche, Djamila Zama, Samir Benayache<sup>1</sup>, Fadila Benayache. **Phytochemical and Antioxidant Activity of *Limonium Pruinatum* (L.)**. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(1):1855.

**Somia Lassed**, CláudiaM. Deus, Nuno Lourenço, Abderrezak Dahdouh, Albert A.Rizvanov, Paulo J. Oliveira, Djamila Zama. **Diet, Lifestyles, Family History, and Prostate Cancer Incidence in an East Algerian Patient Group**. BioMed Research International. 2016; vol. 2016.

**Somia Lassed**, CláudiaM. Deus, Radja Djebbari, Djamila Zama, Paulo J. Oliveira, Albert A. Rizvanov, Abderrezak Dahdouh, Fadila Benayache, Samir Benayache. **Protective Effect of Green Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) against Prostate Cancer: From in Vitro Data to Algerian Patients**. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2017; vol. 2017.

### **Communications affichées:**

**Lassed S**, Ounnous, Dahdouh A, Zama D. « **Alimentation et cancer de la prostate** », 1<sup>er</sup> congrès de la SALUDPP, Le XII<sup>ème</sup> congrès de la SACU, Les VII<sup>èmes</sup> Journées de l'ASUR. Constantine, Les 11 et 12 mai 2012.

**Lassed Somia**, Amrani Amel, Zama Djamila, Boubekri Nassima, Benayache Fadila, Benayache Samir. « **Free radical scavenging and anti-oxidative activities of green tea**

**(*Camellia sinensis*) extract** », 11th International Ethnobotany Symposio, in Antalya/Turkey2-5 november, 2013, Volume: Emir. J. Food Agric. 2013. 25 Suppl. Issue <http://www.ejfa.info/>

Zama Djamila, **Lassed Somia**, Lahnneche Maya, Boumoud Meriem, Bouchair Mohamed, Boubekri Nassima, Amrani Amel, Benayache Fadila, Benayache Samir. « **Impact of green tea consumption on oxidative stress in cardiovascular patients** », 11th International Ethnobotany Symposio, in Antalya/Turkey2-5 november, 2013, Volume: Emir. J. Food Agric. 2013. 25 Suppl. Issue <http://www.ejfa.info/>

**Lassed Somia**, Amrani Amel, Belfarhi Leila, Zama Djamila, Benayache Fadila, Benayache Samir. « **In vitro antioxydant activity, total polyphenol and flavonoids content of ethanolic extract of green tea (*Camellia sinensis*)** », 4th international meeting on pharmacy and pharmaceutical sciences, at Marmara University in Istanbul,Turkey, 18-21 september 2014.

#### **Communications orales:**

**Lassed S**, Zama D. « **Effet préventif des flavonoïdes sur le cancer de la prostate** », Journées Doctoriales. Constantine, Le 7 mars 2013.

**Lassed Somia**, Deus Claudia, Zama Djamila, Paulo Oliveira, Benayache Fadila, Benayache Samir. « **In vitro scavenging activity and cytotoxicity effect of green tea (*Camellia sinensis*) extracts again prostate cancer cell lines** », 4th international meeting on pharmacy and pharmaceutical sciences, at Marmara University in Istanbul,Turkey, 18-21 september 2014.

Djebbari Radja, **Lassed Somia**, Zama Djamila, Bouchair Mohamed, Lahnneche Maya, Boumoud Meriem, Amel Amrani, F. Benayache, Benayache Samir. « **In Vitro and in vivo antioxydant activities and antihypercholesterolemic affects of green tea in normal and cardiovascular diseases patients** », 5 th Chemistry Conference, Abha , Saoudi Arabia; 04/2014

## REMERCIEMENTS

*Avant tout, je remercie le Dieu le Tout Puissant, Maître du temps et des circonstances, plein d'amour, de tendresse et de bonté, qui est toujours avec moi et qui me donne la santé et la capacité de réaliser ce travail, El Hamdoulil Allah.*

*Je suis heureuse d'avoir l'occasion d'exprimer ma gratitude vis-à-vis des personnes qui ont joué un rôle réel tout au long de ma thèse. J'espère que les quelques mots que je m'appête à écrire réussiront à retranscrire fidèlement mes sentiments à leur égard.*

*Tout d'abord je souhaite remercier professeur **ZAMA Djamila** mon directrice de thèse pour sa disponibilité, sa gentillesse et le degré d'humanisme dont il fait preuve. Elle était la lumière de ma route pendant ce long parcours. Elle m'a vraiment soutenu et guidé et elle me donne toujours le courage pour aller plus loin dans la recherche. La pertinence de ses remarques a contribué à l'amélioration de la qualité de mon travail. Je vous remercie de votre aide et de votre écoute surtout dans les moments difficiles. Veuillez trouver ici, madame, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour vous.*

*Je remercie professeur **MERAIHI Zahia** d'avoir contribué à ma formation à la licence et au master et à mon initiation à la recherche scientifique ; je la remercie également pour le soutien qu'elle m'a apporté pendant le doctorat. Je suis très heureuse puisque vous avez accepté de présider le jury de ma thèse. Merci madame, vous avez me donné un grand courage.*

*Je témoigne également ma gratitude au professeur **BENAYACHE Fadila** et au professeur **BENAYACHE Samir** de m'avoir accueillie au sein de l'unité de recherche valorisation des ressources naturelles, molécules bioactives et analyses physicochimiques et biologiques (VARENBIOMOL), pendant la réalisation de l'extraction. Je remercie également madame **BENAYACHE Fadila** d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.*

*J'exprime mes sincères et profonds remerciements également au professeur **KHENNOUF Seddik** de l'université Ferhat Abbas Sétif et au professeur **ABDENNOUR Cherif** de l'université Badji Mokhtar Annaba d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, merci pour votre disponibilité.*

*Je témoigne ma reconnaissance au professeur **DAHDOUH Abderrezak** médecin chef du service d'urologie dans la Clinique d'Urologie Néphrologie et de Transplantation Rénale Daksi – Constantine; pour m'avoir facilitée l'accès et la réalisation de l'étude dans la clinique d'urologie.*

*Je remercie également l'équipe du laboratoire de biochimie dans la clinique d'urologie et dans l'établissement public hospitalier (EPH) de la daïra de Chelghoum Laïd. Vous n'avez ménagé aucun effort pour contribuer à la réalisation de ce travail de recherche je vous en remercie.*

*Je suis profondément reconnaissante au docteur **Paulo J. Oliveira** de m'avoir accueillie au CNC– Center for Neuroscience and Cellular Biology, UC-Biotech Building, Biocant Park, University of Coimbra, Coimbra, Portugal. Cette expérience me permet de prendre beaucoup de choses dans la recherche scientifique et de réaliser une grande partie de ma thèse.*

*Thank you so much **Mr Paulo** for everything. I'am really grateful for all the help. You believe me and you believe with my studies. You gave me the courage when I despaired and you always understand and complete my ideas.*

*Thank you for all persons in your laboratory, Claudia, Teresa, Susana, Filippa,.....,all*

*Je suis aussi reconnaissante au professeur **Ibrahim Demirtas** de m'avoir accueillie au Plant Research Laboratory, Department of Chemistry, ÇankırıKaratekin University, Uluşazı Campus, Çankırı, Türkiye. Grâce à vous j'ai réalisé des nouvelles expériences par les quelles j'ai renforcé les résultats de mon étude.*

#### ***Mes remerciements s'adressent particulièrement***

*Aux hommes qui ont eu confiance en moi en participant à l'enquête et surtout en m'accordant la prise de sang pour la réalisation de tous les dosages. C'est grâce à vous que ce travail a été réalisé je vous exprime mes profonds remerciements.*

*J'exprime mes sincères et profonds remerciements à tous ceux qui m'ont aidée, assistée, encouragée et orientée:*

*Docteur Amel Amrani, Docteur Nassima Boubakri, Radja Djebbari, Khadija Bakhouché et beaucoup d'autres*

*J'exprime mes remerciements également à tous les doctorants au niveau notre laboratoire et au niveau de l'unité de recherche valorisation des ressources naturelles, molécules bioactives et analyses physicochimiques et biologiques (VARENBIOMOL)*

## DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail :*

*À la mémoire de mon père **LASSED AMAR**, ma grand-mère **DJAMILA** et mon oncle **KAMEL**:  
Paix à votre âme*

***Surtout À ma petite famille,***

*A mon cher mari **Anes** A mon cher mari qui a su m'épauler, me pousser dans mes choix, et qui m'encourage toujours à aller plus loin, quoique cela nous coûte. Ta patience m'a toujours égayé même dans les moments les plus durs. Sans toi je ne serai pas arrivée jusque là.*

*A mes chers enfants **Ala Arrahmene** et **Iyed** qui sont les fleurs et le miel de ma vie. Je vous aime plus que moi. Je m'excuse si j'étais un peu nerveuse durant cette période, je vous promette d'être la meilleur maman dans le monde pour vous. Grâce à vous et pour vous j'essaie de faire tout ce que je peux. Tous les mots ne suffiraient pas... Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien et votre amour, ce modeste travail doit vous servir d'exemple pour réussir et faire mieux que votre maman ; Je vous aime.*

*À ma grand famille, grâce à qui j'en suis là aujourd'hui, parce que vous avez toujours cru en moi et m'avez soutenue. Vous avez tous contribué à votre manière à cette réussite... Je vous aime.*

*À ma mère,*

*qui m'a tant et tant donnée et m'a si bien accompagnée tout au long de mes études. Ton amour et ta patience m'ont accompagnée à chacun de mes pas. J'ai conscience de tous les sacrifices que tu as du faire pour me permettre de mener mes études dans les meilleures conditions possibles. Reçois par cette thèse le témoignage de mon amour.*

*Merci maman.*

*À mon père **Souhil**,*

*Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée. Je te remercie d'être toujours près à me donner sans compter et sans limite. Tu m'as donné tant d'amour qui suffit pour nourrir la terre entière. J'espère que j'ai pu vous rendre fiers de moi. J'espère pouvoir te rendre une petite partie de ton amour et de ta générosité.*

*A mes frères ...*

***Lotfi, Yazid et Aymen**, j'espère que vous serez toujours les meilleurs; je vous aime.*

*À mes amies, Mes très chères bien aimées **Imen, Wided, Assia, Fouzia** avec vous j'ai passées de très beaux moments, j'espère qu'on reste toujours ensemble.*

*Durant cette période, j'ai rencontré des personnes formidables. Un grand Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et que j'aurais oublié de citer.*

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub>:</b>	Oxygène singulet	<b>ERO:</b>	Espèces Réactives de l'Oxygène
<b>4- AF:</b>	4–AminoPhénazone	<b>ES:</b>	ÉlectroSpray
<b>8-OHdG:</b>	8-Hydroxy-2'-désoxyGuanosine	<b>EtOAc:</b>	Acétate d'éthyle
<b>ADNmt:</b>	ADN mitochondrial	<b>EtOH:</b>	Ethanol
<b>CAT:</b>	Catalase	<b>FBS:</b>	Sérum Fœtal Bovin
<b>CDK:</b>	Cyclin-dépendent kinase	<b>GA:</b>	Acide Gallique
<b>CG:</b>	Catéchine-3-Gallate	<b>GC:</b>	GalloCatéchine
<b>CHCl<sub>3</sub>:</b>	Chloroforme	<b>GCG:</b>	GalloCatéchine-3-Gallate
<b>CHE:</b>	CHolestérol-Estérase	<b>GK:</b>	Glycérol Kinase
<b>CHOD:</b>	CHolestérol-OxyDase	<b>GOD:</b>	Glucose-oxydase
<b>COX-2:</b>	CylcoOXYgenase-2	<b>GPO:</b>	GlycéroPhosphate Déshydrogénase
<b>Cu, Zn-SOD:</b>	Cuivre, Zinc- SuperOxyde Dismutase	<b>GPx :</b>	Glutathion Peroxydase
<b>DAP:</b>	DihydroxiAcétone Phosphate	<b>GR :</b>	Glutathion Réductase
<b>DMSO:</b>	DiMéthylSulfoxyde	<b>GSH:</b>	Glutathion Réduit
<b>DPPH:</b>	2,2-DiPhényl-1-Picrylhydrazyle	<b>GSSG:</b>	Glutathion oxydée
<b>DTNB:</b>	Acide 5-5'-DiThiobis [2-NitroBenzoïque]	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Le peroxyde d'hydrogène
<b>EC:</b>	(-)-EpiCatéchine	<b>HBP:</b>	Hypertrophie Bénigne de la Prostate
<b>ECG:</b>	(-)-EpiCatéchine Gallate	<b>IC50:</b>	Concentration Inhibitrice Médiane
<b>EGC:</b>	(-)-EpiGalloCatéchine	<b>IL-6:</b>	InterLeukine 6
<b>EGCG:</b>	EpiGalloCatéchine-3-Gallate	<b>LPL:</b>	LipoProtéinLipase
<b>ERK:</b>	Kinase Réglementé-signal Extracellulaire	<b>LPO:</b>	PerOxidation Lipidique

<b>MDA:</b>	MalonDiAldéhyde	<b>ROO<sup>•</sup>:</b>	Radical peroxyde
<b>MEK:</b>	MAPK-ERK-Kinase	<b>SAPK2:</b>	Stress-Activated Protein Kinase 2
<b>MeOH:</b>	Méthanol	<b>SG:</b>	Score de Gleason
<b>MPO:</b>	MyéloPerOxydase	<b>SRB:</b>	Sulforhodamine B
<b>NADPH-oxydase ou Nox:</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Oxydase	<b>SV-40:</b>	Virus Simian 40
<b>n-BuOH:</b>	<i>n</i> -butanol	<b>TBA:</b>	Acide ThioBarbiturique
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	Facteur Nucléaire-Kappa B	<b>TBARS:</b>	Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique
<b>NO:</b>	Monoxyde d'azote	<b>TCA:</b>	Acide TriChloroAcétique
<b>Nrf2:</b>	Facteur 2 du facteur Nucléaire érythroïde 2	<b>TNF<math>\alpha</math>:</b>	Facteur de Nécrose Tumorale $\alpha$
<b>O<sub>2</sub><sup>-•</sup>:</b>	Anion superoxyde	<b>Trx:</b>	Thiorétoxine
<b>OH<sup>•</sup>:</b>	Radical hydroxyle		
<b>ONOO:</b>	Peroxynitrite		
<b>PDK1:</b>	Phosphoinositide-Dépendante de la Kinase 1		
<b>PI3K:</b>	PhosphatidylInositol-3-Kinase		
<b>PIN:</b>	Néoplasie Intraépithéliale		
<b>PIP2:</b>	PhosphatidylInositol-4,5-diPhosphate		
<b>PIP3:</b>	PhosphatidylInositol-3,4,5-triPhosphate		
<b>POD:</b>	PerOxyDase		
<b>PSA:</b>	Antigène Spécifique de la Prostate		
<b>QE:</b>	Quercétine		
<b>RA:</b>	Récepteur d'Androgène		
<b>ROO<sup>•</sup>:</b>	Radical peroxyde		

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Anatomie de l'appareil urogénital masculin.....	5
<b>Figure 2:</b> L'incidence et mortalité du cancer de la prostate dans le monde en 2012 exprimée en ASR.....	6
<b>Figure 3:</b> L'incidence et mortalité du cancer de la prostate dans l'Algérie en 2012 exprimée en ASR.....	7
<b>Figure 4:</b> Schéma de classification des grades tumoraux de cancer de la prostate selon Gleason modifié par la société internationale de pathologie urologique (ISUP) en 2005.....	11
<b>Figure 5:</b> Schéma récapitulatif des sources des espèces réactives de l'oxygène, enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et cibles biologiques.....	18
<b>Figure 6:</b> Schéma de la peroxydation lipidique (exemple de l'acide arachidonique) .....	21
<b>Figure 7:</b> Quelques modifications des chaînes latérales des acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	23
<b>Figure 8:</b> Les voies de signalisation cellulaire activées par les ERO et la modulation des facteurs de transcription impliqués dans la carcinogenèse prostatique.....	31
<b>Figure 9:</b> Structures chimiques des principaux acides phénoliques.....	33
<b>Figure 10:</b> La structure générale et quelques exemples de lignanes.....	34
<b>Figure 11:</b> Quelques exemples de xanthones.....	34
<b>Figure 12:</b> La structure de base et quelques exemples de coumarines.....	35
<b>Figure 13:</b> La structure de base de principales classes de flavonoïdes.....	36
<b>Figure 14:</b> Structure chimique d'un tanin hydrolysable, exemple de la castalagine (a) et d'un tanin condensé, exemple de la proanthocyanidol C1 (b).....	37
<b>Figure 15:</b> Piégeage des ERO ( $R^{\cdot}$ ) par transfert d'un hydrogène (exemple de flavonoïdes, Fl) ou par transfert d'un électron (a) et les sites de chélation des ions métalliques ( $Me^{n+}$ ) par les composés phénoliques (Ph) (b) .....	39

<b>Figure 16:</b> La plante <i>Camellia sinensis</i> .....	42
<b>Figure 17:</b> Structures chimiques des principaux composés de thé vert.....	46
<b>Figure 18:</b> Effet des catéchines du thé vert, EGCG sur la modulation de diverses voies de signalisation cellulaire.....	49
<b>Figure 19:</b> Répartition des patients selon l'âge de diagnostic de cancer de la prostate.....	58
<b>Figure 20:</b> Protocole d'extraction des feuilles de thé vert.....	81
<b>Figure 21:</b> Teneur totale des extraits de thé vert en phénols et en flavonoïdes.....	101
<b>Figure 22:</b> Chromatogrammes des extraits de thé vert. (a) Chromatogramme d'extrait éthanolique, (b) Chromatogramme d'extrait chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ).....	102
<b>Figure 23:</b> Chromatogrammes des extraits de thé vert. (c) Chromatogramme d'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc), (d) Chromatogramme d'extrait <i>n</i> -butanolique ( <i>n</i> -BuOH).....	103
<b>Figure 24:</b> L'activité antiradicalaire de thé vert vis à vis du radical libre DPPH.....	106
<b>Figure 25:</b> L'activité antiradicalaire de thé vert vis à vis du radical hydroxyle (OH <sup>•</sup> ).....	108
<b>Figure 26:</b> Inhibition de la peroxydation lipidique par le thé vert.....	109
<b>Figure 27:</b> Image de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose présentant l'effet des extraits de thé vert sur la protection de l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages oxydatifs causés par le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) photolysé par rayonnement UV.....	111
<b>Figure 28:</b> L'activité anticancéreuse de l'extrait éthanolique de thé vert sur la lignée cellulaire PC-3 (2.5X10 <sup>4</sup> cellules / puits).....	112
<b>Figure 29:</b> L'activité anticancéreuse de l'extrait chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ), l'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc), et l'extrait <i>n</i> -butanolique ( <i>n</i> -BuOH) de thé vert sur la lignée cellulaire PC-3 (a) et la lignée cellulaire de fibroblastes BJ (b).....	113
<b>Figure 30:</b> Effet d'extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc) et <i>n</i> -butanolique ( <i>n</i> -BuOH) de thé vert sur la condensation de la chromatine nucléaire et la polarisation mitochondriale dans la lignée cellulaire PC-3. ....	115
<b>Figure 31:</b> Effet d'extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc) et <i>n</i> -butanolique ( <i>n</i> -BuOH) de thé vert sur la condensation de la chromatine nucléaire et la polarisation mitochondriale dans la lignée cellulaire BJ.....	116

<b>Figure 32:</b> Le potentiel membranaire mitochondrial évalué en tant que fluorescence relative TMRM (standard de déviation (SD) du signal TMRM) mesurée dans les lignées de cellules PC-3 (a) et BJ (b) avec et sans traitement par les extraits de thé vert.....	117
<b>Figure 33:</b> Effet de 24 h traitement par les extraits de thé vert sur la quantité cellulaire de p53.....	119
<b>Figure 34:</b> Effet de la consommation de thé vert sur le taux du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins.....	123
<b>Figure 35:</b> Effet de la consommation de thé vert sur l'activité du glutathion peroxydase (GPx) érythrocytaire chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins.....	124
<b>Figure 36:</b> Effet de la consommation de thé vert l'activité de la catalase (CAT) érythrocytaire chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins.....	124
<b>Figure 37:</b> Effet de la consommation de thé vert sur le taux des thiols totaux érythrocytaire chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins.....	125
<b>Figure 38:</b> Effet de la consommation de thé vert sur le taux de l'albumine chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins.....	125
<b>Figure 39:</b> Effet de la consommation de thé vert sur le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau d'érythrocytes des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins.....	127
<b>Figure 40:</b> Effet de la consommation de thé vert sur le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau du plasma des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins.....	127
<b>Figure 41:</b> Effet de la consommation de thé vert sur la glycémie des patients atteints de cancer de la prostate et les témoins.....	129
<b>Figure 42:</b> Effet de la consommation de thé vert sur le taux de triglycérides des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins.....	129
<b>Figure 43:</b> Effet de la consommation de thé vert sur le taux de cholestérol total des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins.....	130
<b>Figure 44:</b> Effet de la consommation de thé vert sur le taux des protéines totales des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins.....	130

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Classification TNM du cancer de la prostate.....	13
<b>Tableau 2:</b> Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes.....	36
<b>Tableau 3:</b> Caractéristiques générales de la population recrutée.....	57
<b>Tableau 4:</b> Association entre le type et la quantité des différents aliments et le risque du cancer de la prostate.....	61
<b>Tableau 5:</b> Association entre les antécédents familiaux de cancer de la prostate et le risque de cancer de la prostate.....	64
<b>Tableau 6:</b> Association entre la consommation d'alcool et le risque de cancer de prostate.....	65
<b>Tableau 7:</b> Association entre le tabagisme et le risque de cancer de la prostate.....	66
<b>Tableau 8:</b> Rendement de l'extraction de thé vert.....	99
<b>Tableau 9:</b> Les différents phénols révélés dans les extraits de thé vert et leur teneur.....	104
<b>Tableau 10:</b> Les concentrations inhibitrices médianes des extraits de thé vert et de la vitamine C vis-à-vis du radical DPPH, du radical hydroxyle (OH <sup>•</sup> ) et de la peroxydation lipidique.....	110
<b>Tableau 11:</b> Caractéristiques générales des cas et des témoins.....	121
<b>Tableau 12:</b> Tableau récapitulatif des différents paramètres chez les témoins et chez les patients atteints du cancer de la prostate avant et après la consommation.....	131

---

**INTRODUCTION**

La prostate est une glande exocrine qui fait partie du système reproducteur masculin lequel joue un rôle fondamental dans la fertilité des hommes (Wilson *et al.*, 1911; Tortora *et al.*, 2007). Cette glande peut être le siège de trois affections principales: l'adénome de la prostate (McNeal, 1990), l'infection de la prostate ou prostatite (Collins *et al.*, 1998) et le cancer de la prostate, pathologie la plus grave des affections (McNeal, 1991).

Le cancer de la prostate est rare avant l'âge de 50 ans, mais son incidence croît fortement avec l'âge (Ferlay *et al.*, 2013). Dans le monde, il est le deuxième cancer le plus fréquent et la cinquième cause de décès chez les hommes. Son incidence varie fortement d'un pays à l'autre (Center *et al.*, 2012). Elle est très élevée en Australie / Nouvelle-Zélande alors qu'elle est faible dans les pays asiatiques (Ferlay *et al.*, 2013). En Algérie, selon la base de données GLOBOCAN 2012, il est le quatrième cancer le plus fréquent et la sixième cause de décès chez l'homme (Ferlay *et al.*, 2013). Selon les données de prédiction, les taux d'incidence et de mortalité de cette maladie seront augmentés en Algérie: passant de 1037 nouveaux cas en 2012 à 1477 nouveaux cas qui seront diagnostiqués en 2020 et de 595 décès en 2012 à 791 décès en 2020 (Ferlay *et al.*, 2013).

Le cancer de la prostate est une maladie multifactorielle. Son étiologie reste encore largement méconnue. Cependant, la participation de plusieurs facteurs comme les variations géographiques et l'origine ethnique (Ferlay *et al.*, 2013), les facteurs génétiques (Morganti *et al.*, 1956), le vieillissement (Kwabi-Addo *et al.*, 2007), l'alimentation (Homma *et al.*, 2004), le mode de vie et les habitudes toxiques (Plaskon *et al.*, 2003; McGregor *et al.*, 2013) sont fortement suspectés.

Le stress oxydant est suggéré d'être le lien entre plusieurs facteurs de risque comme le vieillissement (Udensi *et al.*, 2016), le déséquilibre des androgènes (Khandrika *et al.*, 2009), l'alimentation (Homma *et al.*, 2004) et l'inflammation chronique (Nelson *et al.*, 2002) et le cancer de la prostate. En plus, la glande prostatique est connue d'être très vulnérable au stress oxydant à cause de l'inflammation et de la dérégulation hormonale qui peut se produire au niveau de cet organe (Siddiqui *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont montré que le stress oxydant est plus élevé dans l'épithélium des patients atteints du cancer de la prostate comparant aux hommes sains. Ceci a été démontré directement au sein de cellules tumorales par des taux élevés des ERO ou indirectement via l'augmentation des dommages oxydatifs (Khandrika *et al.*, 2009). Il a été rapporté également que le stress oxydant élevé peut participer non seulement au développement de cancer de la prostate mais aussi à sa progression et sa gravité (Guéritat, 2015). Actuellement, le cancer de la prostate ne peut être guéri que dans des cas rares, diagnostiqués à un stade précoce (Fournier *et al.*, 2004). Lorsque le cancer est localement avancé ou métastatique le traitement ne peut offrir qu'un succès limité dans

la réduction de la mortalité chez les patients (Tannock *et al.*, 2004; Bastide *et al.*, 2013). Devant cette situation, la recherche a été orientée vers la prévention et plusieurs études ont commencés à étudier l'effet de certains antioxydants alimentaires sur la prévention ou la réduction du risque de développement ou de progression du cancer de la prostate (Vance *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont analysé l'effet the thé vert, connu depuis longtemps par ces propriétés antioxydantes (Dutta *et al.*, 2013) sur la prévention de cancer de la prostate (Gupta *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2001). La plupart des études épidémiologiques ont trouvé que la consommation du thé vert réduite le risque de cancer de la prostate (Jian *et al.*, 2004; Kurahashi *et al.*, 2008). D'autres études ont montré également que le thé vert par sa richesse en polyphénols est capable d'inhiber significativement la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques *in vitro* (Gupta *et al.*, 2000). Le traitement des souris TRAMP (transgenic adenocarcinoma of mouse prostate) par une infusion enrichie à 95% de catéchines du thé vert a confirmé les résultats de ces études et montre que le thé vert est capable de provoquer un retard significatif de l'incidence de tumeurs primitives de la prostate et d'inhiber presque complètement les métastases chez les souris (Gupta *et al.*, 2001).

Les effets bénéfiques de thé vert observés dans ces études qui suggèrent l'importance d'identifier l'effet chimiopréventif de thé vert sur le cancer de la prostate chez les humains (Gupta *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2007). Cependant, jusqu'à aujourd'hui il n'y a eu que quelques études d'intervention ont été réalisées chez les humains (Jatoi *et al.*, 2003; Bettuzzi *et al.*, 2006; McLarty *et al.*, 2009).

Le présent travail est consiste à évaluer l'effet préventif des flavonoïdes et des phénols de thé vert (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) sur le cancer de la prostate chez la population de l'Est Algérien. Devant le manque d'études épidémiologiques réalisées sur le cancer de la prostate en Algérie plusieurs questions sont posées:

- Quel sont les principaux facteurs de risque et de prévention de cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien ?
- Est-ce que la consommation de thé vert peut être associée à une réduction du risque du cancer de la prostate chez la population de l'Est Algérien ?
- Est-ce que le stress oxydatif pouvait être associé au développement et à la progression du cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien ?

- Est-ce que la consommation de thé vert peut avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate via la réduction de stress oxydant ?

Dans ce cadre, deux études ont été réalisées parallèlement: une étude épidémiologique et une étude expérimentale *in vitro* et *in humaine* :

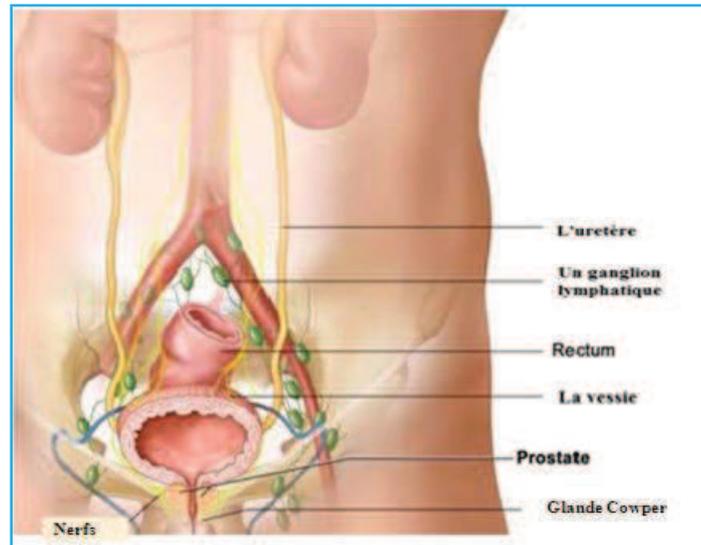
- L'étude épidémiologique vise à analyser la relation entre l'âge, le mode de vie, les antécédents familiaux et les habitudes alimentaires incluant la consommation de thé vert et le risque de cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien; avec une comparaison des résultats obtenus à ceux d'autres études réalisés sur différentes populations dans le monde.
- L'étude expérimentale *in vitro* et *in humaine* vise à évaluer l'effet préventif du thé vert sur le cancer de la prostate. Dans la partie *in vitro* nous avons déterminé la teneur en phénol et en flavonoïdes du thé vert utilisé et évalué ces activités antioxydantes et antiprolifératives et dans la partie *in humaine* nous avons évalué et suivi le statut oxydant et antioxydant ainsi que certains paramètres biochimiques chez les patients de la population de l'Est Algérien avant et après la consommation de thé vert.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Première partie: Généralités sur le cancer de la prostate

### 1. Description et fonction de la prostate

La prostate est une glande exocrine de l'appareil urogénital masculin. Elle est située au croisement des voies génitales et urinaires, sous la vessie et en avant du rectum. Sa pointe ou apex, est dirigée vers le bas, sa partie aplatie regarde la vessie et sa face postérieure le rectum. Elle a une forme d'une châtaigne et une grosseur d'une balle de golf. Chez un adulte, elle mesure environ 3-4 cm de long, 3-5 cm de largeur et 2-3 cm d'épaisseur et pèse entre 16 et 20 grammes (figure 1) (Wilson *et al.*, 1911; Tortora *et al.*, 2007).



**Figure 1:** Anatomie de l'appareil urogénital masculin

(<http://www.anticancerfund.org/sites/default/files/resize/news>)

La glande prostatique joue un rôle fondamental dans la fertilité masculine. Sa fonction principale est de stocker et sécréter un liquide laiteux et légèrement acide (pH d'environ 6.5) qui offre aux spermatozoïdes, lors de l'éjaculation avec le fluide vésiculaire, un milieu convenable à leur fonction. La sécrétion prostatique protège les spermatozoïdes et assure leur mobilité et viabilité. Elle contient diverses substances: l'acide citrique; enzymes protéolytiques, telles que l'antigène spécifique de la prostate (PSA), le pepsinogène, le lysozyme, l'amylase l'hyaluronidase; la phosphatase acide (Wilson *et al.*, 1911); des facteurs de croissance; l'albumine, la séminalplasmine, les polyamines (spermidine et spermine), un taux élevé en zinc et un système de défense antioxydant constitué par la catalase, la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase (Soufir, 2010).

### 2. Maladies et désordres de la prostate en dehors du cancer

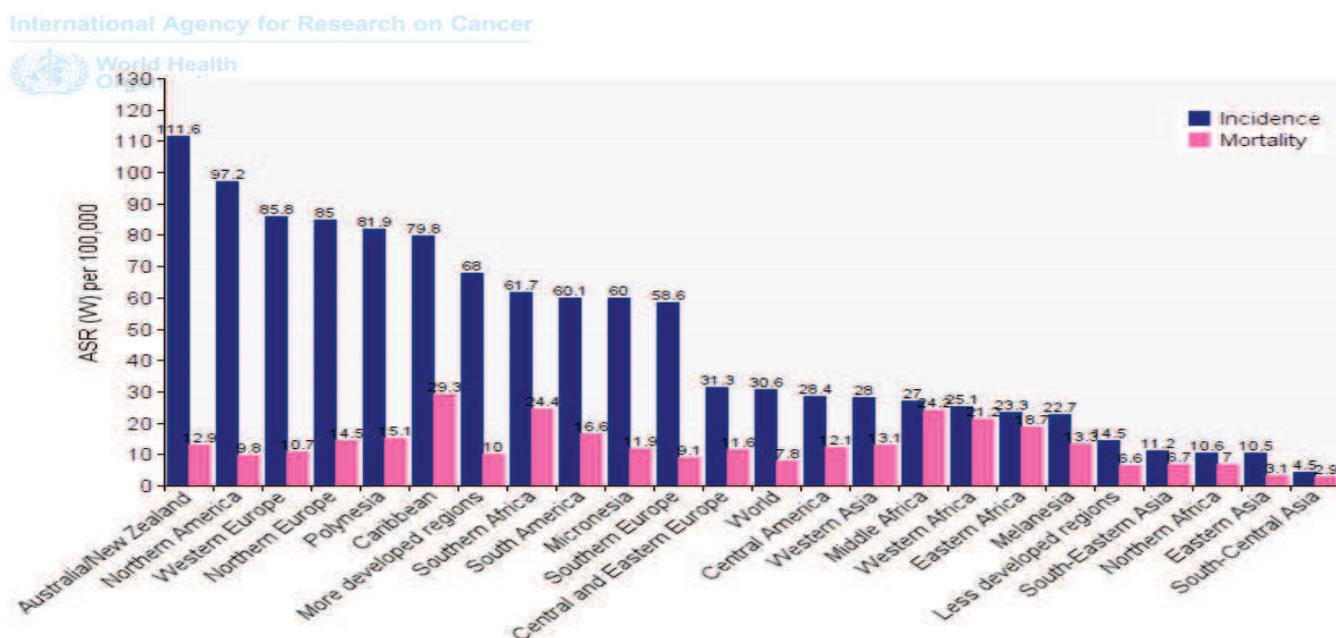
Les maladies de la prostate touchent plus de la moitié de tous les hommes et leur prévalence augmente avec l'âge. Les deux principales pathologies, en dehors du cancer, sont l'hypertrophie bénigne (HBP: adénome de la prostate) et la prostatite (inflammation de la prostate) (Collins *et*

*al.*, 1998; McNeal, 1990). Elles sont des problèmes typiques auxquels les hommes sont confrontés. Contrairement au cancer de la prostate, elles ne mettent pas habituellement la vie en péril mais elles sont ennuyeuses et parfois douloureuses. Autres désordres sont aussi observés dans les biopsies prostatiques et le plus répandu est la néoplasie intraépithéliale (PIN) (Montironi *et al.*, 2007).

### 3. Le cancer de la prostate

#### 3.1 Epidémiologie

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme après le cancer du poumon, avec 1.1 million nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2012 (Center *et al.*, 2012). Son incidence est très élevée en Australie / Nouvelle-Zélande, Amérique du Nord, Europe occidentale et septentrionale, relativement élevée dans certaines régions telles que les Caraïbes, l'Afrique du Sud et en Amérique du Sud, mais faible dans la population asiatique (figure 2) (Ferlay *et al.*, 2013). Il était également la cinquième cause de décès par cancer dans le monde en 2012. Les taux les plus élevés sont relevés dans les Caraïbes, l'Afrique australe et centrale (figure 2) (Ferlay *et al.*, 2013; Torre *et al.*, 2015).

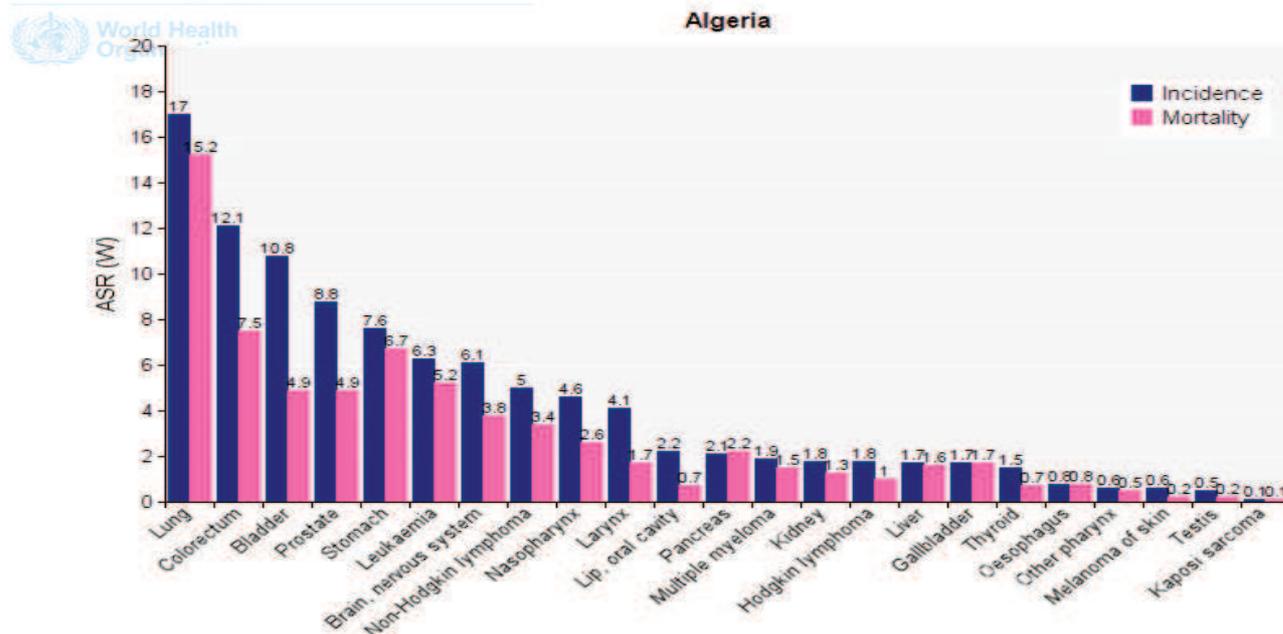


**Figure 2:** L'incidence et mortalité du cancer de la prostate dans le monde en 2012 exprimée en ASR (Age- Standardized Rate) qui l'incidence standardisée pour l'âge pour 100,000 personnes (Ferlay *et al.*, 2013).

En Algérie, selon la base de données GLOBOCAN 2012, le cancer de la prostate était le quatrième cancer le plus fréquent (8.8 cas / 100,000) et la sixième cause de décès (4.9 décès / 100,000) chez l'homme (figure 3). Son incidence augmente fortement avec l'âge. Le nombre des

hommes diagnostiqués moins de 65 ans était 275 cas et de 65 ans et plus était 762 cas (Ferlay *et al.*, 2013).

International Agency for Research on Cancer



**Figure 3:** L'incidence et mortalité du cancer de la prostate dans l'Algérie en 2012 exprimée en ASR (Age- Standardized Rate) (Ferlay *et al.*, 2013).

### 3.2 Facteurs de risques

#### 3.2.1 L'âge

L'âge semble le facteur de risque le plus important. Le cancer de la prostate est rare avant 50 ans, seulement 1.57 % des cas sont diagnostiqués mais son incidence croît fortement après l'âge de 65 ans, plus de 68 % d'incidence; avec une prédominance entre 65 et 75 ans (Ferlay *et al.*, 2013). Quatre-vingt-treize pour cent des décès liés au cancer de la prostate surviennent aussi après l'âge de 65 ans dont 72 % entre 65 et 80 ans et 21 % après 80 ans. Dans les études d'autopsie, l'incidence des cancers histologiques croît aussi avec l'âge mais avec une fréquence de 30 % à 30 ans, 50 % à 50 ans et plus de 75 % à 85 ans. Les statistiques nord-américaines rapportent une incidence annuelle de 21/100,000 hommes avant 65 ans, passant à 819/100,000 hommes au-delà de 65 ans et la probabilité d'être atteint d'un cancer de la prostate croît avec l'âge, passant de 1/100,000 hommes à moins de 39 ans à 1/103 entre 40 et 59 ans et 1/8 hommes de 60 à 79 ans (Kuhn *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2004).

#### 3.2.2 Les variations géographiques et l'origine ethnique

Les données épidémiologiques montrent qu'il existe une très grande variation d'incidence de cancer de la prostate selon les variations géographiques et l'origine ethnique. Aux Etats-Unis une différence significative dans l'incidence a été observée entre les différentes races (Ferlay *et al.*,

2013). Les Afro-Américains marquent l'incidence la plus élevée, supérieure de plus de 30 % par rapport aux Américains caucasiens. Plusieurs études proposent les facteurs génétiques et environnementaux d'être la cause de ces variations d'incidence. Une prédisposition génétique peut expliquer la plus grande fréquence de cancer de la prostate chez les Américains d'origine africaine dont l'incidence est la même que les Africains vivant au Niger ou à la Jamaïque (Osegbe, 1997; Glover *et al.*, 1998). L'augmentation rapide de l'incidence du cancer de la prostate chez les hommes qui ont émigré des pays d'Asie vers les Etats-Unis suggère le rôle de facteurs d'environnement (le changement de style de vie, l'alimentation....). Plusieurs études trouvent que le risque de cancer de la prostate augmente significativement chez les émigrés asiatiques avec un mode de vie occidental (Namiki *et al.*, 2010).

### 3.2.3 Facteurs génétiques

Avec l'âge et l'origine ethnique, les antécédents familiaux constituent un autre facteur de risque certifié. La variation de l'incidence de cancer de la prostate selon la variation géographique et ethnique met la lumière fortement sur l'association de facteurs génétiques au risque de cancer de la prostate. Dès les années 1950, les travaux cliniques avaient relevé l'existence d'une agrégation familiale possible pour le cancer de la prostate (Morganti *et al.*, 1956). Dans une étude réalisée à Canada, la présence des antécédents familiaux, augmente le risque de cancer de la prostate, de 3 fois (Ghadirianl *et al.*, 1997). Dans une autre étude, 20 % des cas présente des formes familiales. Certaines formes sont dues de l'exposition des membres de la famille à un carcinogène commun, alors que d'autres sont véritablement des formes héréditaires (Valeri *et al.*, 1999). Plusieurs gènes de prédisposition sont également identifiés et proposés d'être responsable de l'apparition de la forme familiale de cancer de la prostate (Valeri *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 2002).

### 3.2.4 Facteurs environnementaux

#### - Facteurs alimentaires

Malgré des contradictions observées entre les résultats des différentes études concernant l'alimentation comme facteur favorisant le cancer de la prostate, beaucoup d'études épidémiologiques trouvent une association positive entre les habitudes alimentaire et le cancer de la prostate. Les principaux facteurs nutritionnels possiblement impliqués dans le cancer de la prostate sont:

- *La viande rouge*: beaucoup d'études montrent qu'une grande consommation de viande rouge peut accroître significativement le risque de cancer de la prostate (Gann *et al.*, 1994; Le Marchand *et al.*, 1994; Sinha R *et al.*, 2009). La consommation de la viande rouge 5 fois par

semaine comme plat principal dans l'étude de Gann *et al.*, 1994 augmente 2.5 fois le risque de cancer de la prostate.

- *Graisses saturées*: l'impact des graisses saturées d'origine animale sur le cancer de la prostate a été directement liée au risque de cancer de la prostate avancé. Toutefois, les matières grasses des produits laitiers (à l'exception du beurre) ou des poissons n'ont aucun rapport avec le risque de cancer de la prostate (Giovannucci *et al.*, 1993). une autre étude a montré que la grande consommation de graisses saturées augmente 3 fois le risque de décès par cancer de la prostate (Fradet *et al.*, 1999).
- *Les produits laitiers*: une association positive entre les produits laitiers et le cancer de la prostate a été aussi observée dans plusieurs études. Dans étude réalisée avec 43 435 japonais, la consommation excessive de produits laitiers augmente 1.63 le risque de cancer de la prostate (Kurahashi *et al.*, 2008). L'étude prospective de Tseng *et al.*, 2005, a montré que les hommes ayant une consommation élevée de produits laitiers, ont un risque 2.2 fois plus élevé de développer un cancer de la prostate.
- *L'apport énergétique et l'obésité*: ces deux facteurs semblent aussi corrélés au risque de cancer de la prostate (Andersson *et al.*, 1996; Engeland *et al.*, 2003). Dans les pays industrialisés, l'obésité est l'un des problèmes de santé, les plus importants. Dans les pays riches, plus de la moitié des adultes ayant un poids excessif avec 30% de cas obèses (l'indice de masse corporelle (IMC) est supérieur à 30 Kg/m<sup>2</sup>) (James *et al.*, 2004). De nombreuses études montrent que le risque de cancer de la prostate augmente significativement chez les obèses et le cancer pourrait être plus agressif, avec une mortalité accrue de l'ordre de 20 à 34 % (Rodriguez *et al.*, 2001; Calle *et al.*, 2003). L'obésité peut aussi associer à un désordre endocrinien conduisant au diabète de type II insulino-résistant ayant pour conséquence une hyper insulinémie et un niveau plus élevé d'IGF-1. Ces deux facteurs favorisent la prolifération cellulaire et empêchent l'apoptose dans de nombreux tissus et peut être lié à genèse tumorale du cancer de la prostate (Calle *et al.*, 2003; Freedland *et al.*, 2005).

### - Autres facteurs

Il a été suggéré que l'exposition aux UV peut avoir un rôle protecteur contre le cancer de la prostate par via le métabolisme de la vitamine D (Luscombe *et al.*, 2001). Une étude récente a montré que la prise d'alcool durant une longue période augmente significativement le risque de cancer de la prostate agressif et non agressif (McGregor *et al.*, 2013). Une association positive entre le tabagisme et le risque de cancer de la prostate est également rapportée (Plaskon *et al.*, 2003). Plusieurs autres études ont analysées la relation entre les polluants environnementaux tel que les pesticides et les polluants d'origines industrielles et le cancer de la prostate mais jusqu'à

ce jour aucune association significative n'a mise en évidence et les polluants environnementaux ne sont pas considérés comme facteurs de risques (Multigner *et al.*, 2008).

### 3.3 Anatomopathologie

#### 3.3.1 Localisation

Le cancer de la prostate est une transformation maligne de cellules glandulaire prostatique qui dans la majorité des cas, est un adénocarcinome hormono-dépendant, dépend des androgènes testiculaires (90%) et surrenaliens (10%), se développant au niveau de l'épithélium glandulaire et plus particulièrement au niveau des cellules sécrétrices. Les autres formes tels que le carcinome à petites cellules, carcinomes à cellules transitionnelles, carcinome épidermoïde sont rares, de l'ordre de 3%. La plupart de ces formes particulières sont diagnostiquées tardivement et elles sont plus agressives. Le cancer de la prostate apparaît dans 70% des cas au niveau de la zone périphérique de la prostate, mais peut se développer au niveau de la zone de transition (20%), dans la zone centrale (10%), ou peut aussi envahir plusieurs zones (McNeal, 1981). Il se présente le plus souvent de manière multifocale. Des lésions au sein d'un même lobe ou bilatérale sont observées dans deux tiers des cas sur des pièces de prostatectomie avec une moyenne de 2.4 cas de cancer par pièce (Haffner *et al.*, 2009).

#### 3.3.2 Extension

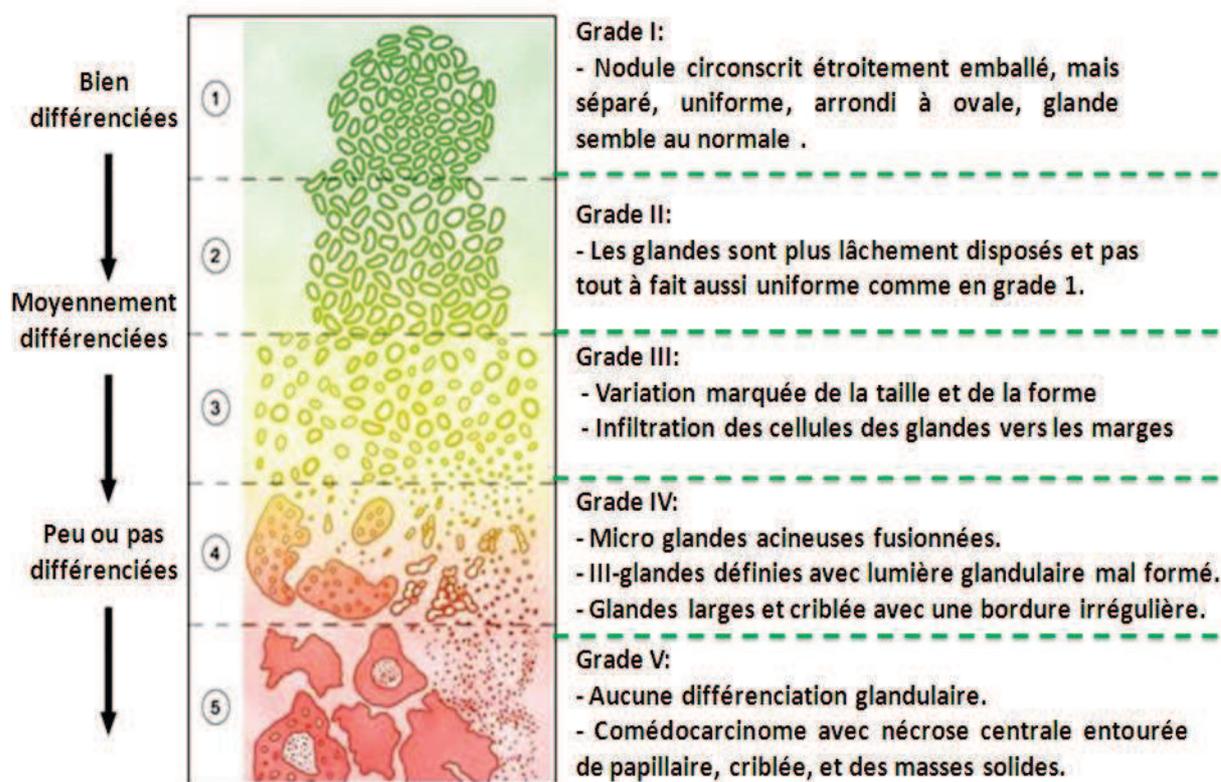
La progression de cancer de la prostate est le plus souvent lente, caractérisée par une longue période de latence ( $\geq 10$  ans) (Etzioni *et al.*, 1998; Bostwick, 1998). Le cancer reste localisé dans la glande au début de la maladie, puis évolue, franchit la capsule prostatique, s'étend dans la graisse péri prostatique, dans la majorité des cas à la partie postéro latérale de la glande via les espaces péri nerveux, puis vers les vésicules séminales. Les sites métastatiques, les plus fréquents, sont ganglionnaires et osseuses. Les atteintes osseuses touchent préférentiellement le bassin, le rachis, les côtes et le sternum. L'atteinte rectale est très rare. L'atteinte du col vésical, du trigone et de la terminaison des uretères, voire de la paroi pelvienne, apparaît dans les tumeurs localement évoluées. L'atteinte pulmonaire, bien que fréquente sur les études autopsiés, est rarement détectée en clinique courante et les autres localisations (hépatiques, surrenaliennes, rénales, cutanées...) sont exceptionnelles (Villers *et al.*, 1989; Ohori *et al.*, 1993).

### 3.3.3 Classification

#### - Classification de Gleason: le grade tumoral

La classification de Gleason est une classification anatomopathologique utilisée pour exprimer les résultats obtenus sur les biopsies prostatiques, les copeaux de résection endoscopique ou les pièces de prostatectomies (Epstein *et al.*, 2005). Le grade de Gleason comporte cinq sous-groupes notés de 1 (bien différencié) à 5 (indifférencié) selon l'architecture glandulaire de la tumeur (figure 4). Compte tenu de l'hétérogénéité habituelle au sein d'une même tumeur, la différenciation est exprimée par le score de Gleason (SG), est calculé par la somme du grade des deux contingents tumoraux les plus représentés au sein de la tumeur étudiée (score varié de 2 à 10) (Epstein *et al.*, 2010):

- ▶ Les tumeurs bien différenciées (score de 2 à 4),
- ▶ Les tumeurs moyennement différenciées (score 5 à 6),
- ▶ Les tumeurs peu ou pas différenciées (score de 8 à 10),
- ▶ Les tumeurs de score 7 ont un pronostic intermédiaire entre moyennement différenciées et peu ou pas différenciées.



**Figure 4:** Schéma de classification des grades tumoraux de cancer de la prostate selon Gleason modifié par la société internationale de pathologie urologique (ISUP) en 2005 (Gleason, 1962; Gleason, 1992; Epstein *et al.*, 2005).

**- Classification TNM: stade tumoral**

La classification TNM est un système international de classification des tumeurs malignes (Edge *et al.*, 2010). Cette classification permet d'évaluer les caractéristiques d'un cancer selon des critères de propagations anatomiques locales, régionales et métastatiques à distance en fonction des résultats de l'examen clinique, radiologique et histologique. Elle permet aux cliniciens du monde entier de parler un langage commun en termes de stadification tumorale, d'établir un pronostic et de proposer une prise en charge thérapeutique spécifique. Elle prend en compte la combinaison d'indicateurs de classement représentés par les lettres T, N et M. La lettre T, pour Tumeur, précise la taille et l'extension de la tumeur primitive au niveau de la prostate, la lettre N pour Node en anglais, indicateur du nombre et du volume des ganglions lymphatiques atteints et la lettre M indicateur du degré de propagation des Métastases à distance (tableau 2). La classification TNM peut être clinique (cTNM) ou pathologique (pTNM). La cTNM s'appuie sur les données disponibles avant la réalisation du traitement, permet le choix du traitement. La classification pTNM tient compte des renseignements supplémentaires apportés par le geste chirurgical et l'examen histopathologique de la pièce opératoire (tableau 1) (Edge *et al.*, 2010).

**- Classification de D'Amico**

Cette classification permet de classer les formes localisées de cancer de la prostate en fonction de leur risque évolutif après traitement (prostatectomie totale, radiothérapie externe ou curiethérapie interstitielle). Trois sous-groupes de cancers de la prostate localisés selon le risque de rechute après traitement local sont définis (D'Amico *et al.*, 2003):

- Cancer à faible risque évolutif: PSA < 10 ng/ml et SG < 6 et stade clinique T1c ou T2a.
- Cancer à risque intermédiaire: PSA entre 10 et 20 ng/ml ou score de Gleason de 7 ou stade clinique T2b.
- Cancer à risque élevé: PSA > 20 ng/ml ou score de Gleason > 7 (8, 9 ou 10) ou stade clinique T2c.

**Tableau 1:** Classification TNM du cancer de la prostate (American Joint Committee on Cancer, 7th ed. 2010) (Edge *et al.*, 2010)

<b>Tumeur primitive (T)</b>
<p><i>Clinique</i></p> <p>TX: tumeur primitive non évaluée  T0: tumeur primitive non retrouvée  T1: tumeur ni palpable au toucher rectal (TR), ni visible en imagerie  T1a: tumeur occupant moins de 5 % du tissu réséqué avec un score de Gleason &lt; 7 ou absence de grades 4 ou 5  T1b: tumeur occupant plus de 5 % du tissu réséqué ou un score de Gleason &gt; 7 ou présence de grades 4 ou 5  T1c: tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'une élévation de la valeur des PSA  T2: tumeur limitée à la prostate<sup>1</sup>  T2a: tumeur atteignant la moitié d'un lobe ou moins  T2b: tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais sans atteindre les 2 lobes  T2c: tumeur atteignant les 2 lobes  T3: extension au-delà de la capsule  T3a: extension extra-capsulaire uni- ou bilatérale  T3b: extension aux vésicules séminales uni- ou bilatérale  T4: tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscles releveurs de l'anus ou la paroi pelvienne)</p> <p><i>Pathologique (pT)<sup>2</sup></i></p> <p>pT0 : absence de tumeur identifiée après prostatectomie totale  pT2 : tumeur limitée à la prostate  pT2a : tumeur limitée à un demi- lobe ou moins  pT2b : tumeur unilatérale avec atteinte de plus d'un demi- lobe, mais pas des 2 lobes  pT2c : tumeur bilatérale  pT3 : extension extraprostatique  pT3a : extension extraprostatique uni- ou bilatérale incluant le col vésical  pT3b : envahissement des vésicules séminales uni- ou bilatérale  pT4 : envahissement d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscle releveurs de l'anus ou la paroi pelvienne)</p>
<b>Ganglions régionaux (N)</b>
<p>(p)NX : ganglions régionaux non évalués  (p)N0 : absence de métastase ganglionnaire régionale  (p)N1 : atteinte ganglionnaire régionale  (p)N1 mi : métastase ganglionnaire ≤ 0,2 cm (optionnel)</p>
<b>Métastases à distance (M)</b>
<p>MX : métastases à distance non évaluées  M0 : absence de métastase à distance  M1 : métastases à distance  M1a : atteinte des ganglions non régionaux  M1b : atteinte osseuse  M1c : autres sites avec ou sans atteinte osseuse</p>
<p><sup>1</sup> tumeur trouvée dans un ou les deux lobes par biopsie à l'aiguille, mais pas palpable ou fiable visible par imagerie, est classé comme T1c ; <sup>2</sup> pas de classification pT pour le stade T1.</p>

### 3.4 Symptômes

Le cancer de la prostate est le plus souvent asymptomatique au stade initial. Une fois la maladie est suffisamment évoluée certains symptômes commencent à apparaître. A un stade localement avancé, le cancer peut entraîner des troubles urinaires. Lorsqu'il progresse, certains patients développent une rétention urinaire aiguë pouvant entraîner une infection, avec des saignements apparents dans l'urine. A un stade très avancé, le cancer peut être responsable de douleurs au niveau de l'anus et du rectum ou de coliques néphrétiques. Si le cancer de la prostate se propage aux ganglions lymphatiques, l'obstruction du système de drainage lymphatique apparent et cela conduit à un gonflement intraitable du scrotum, du pénis, des pieds et des jambes. Dans le bassin, un cancer peut propager entre les nerfs et provoquer des douleurs sciatiques. Les douleurs osseuses sont les symptômes les plus communs d'un cancer de la prostate métastatique. En plus de l'inconfort qu'ils causent, des métastases au niveau des hanches et des vertèbres peuvent conduire à des fractures spontanées. La métastase peut également atteindre d'autres sites comme la moelle osseuse, le foie et les poumons provoquant (Scardino *et al.*, 2010).

### 3.5 Dépistage

L'utilisation du PSA à la fin des années 1980 a ouvert la voie du dépistage de cancer de la prostate à un stade localisé (asymptomatique) potentiellement curable par les moyens thérapeutiques actuels (Carrol, 2009). Le dépistage peut être très utile mais jusqu'à maintenant aucun pays n'a mis en place de programme de dépistage organisé du cancer de la prostate dans la population générale et les recommandations actuelles restent encore très controversées (Davidson *et al.*, 2004). L'association de toucher rectal et de PSA est la méthode de référence pour le dépistage de cancer de la prostate (Brawer *et al.*, 1998; Mistry *et al.*, 2003).

### 3.6 Diagnostic

Dans la plupart des cas le cancer de la prostate est asymptomatique et son diagnostic peut être la cause d'une anomalie au toucher rectal dans le cadre du bilan d'une affection de voisinage (affection digestive, hernie inguinale), une augmentation du taux de PSA observé lors le diagnostic d'une autre maladie (HBP, prostatite,..) ou encore une anomalie à l'échographie endorectale, réalisée lors d'une pathologie de voisinage (digestive). Le diagnostic de cette maladie peut être tardif réalisé après l'apparition des symptômes, mais dans ce cas, le cancer est généralement localement avancé ou métastatique. Pour les deux formes asymptomatique ou symptomatique le démarche de diagnostic consiste toujours à réaliser initialement un interrogatoire avec le patient suivi par le toucher rectal, le dosage de PSA et la biopsie prostatique pour confirmer un diagnostic (Fournier *et al.*, 2004; Salomona *et al.*, 2013).

---

### 3.7 Traitement

#### 3.7.1 Prostatectomie totale

La prostatectomie totale est une intervention chirurgicale correspond à une ablation totale de la glande prostatique et des vésicules séminales. Un curage ganglionnaire ilio-obturateur bilatéral avec examen extemporané peut être réalisé pour assurer l'absence de métastases ganglionnaires. En l'absence de métastase, la glande prostatique est retirée et une anastomose est réalisée entre la vessie et l'urètre pour assurer l'écoulement des urines (Bastide, 2009; Moran *et al.*, 2013). La prostatectomie totale est l'un des traitements de référence du cancer de la prostate localisé. Son indication peut être recommandée chez des patients de stade T1c-T3a N0 ou NX, M0 ou MX avec une espérance de vie  $\geq 10$  ans (Fournier *et al.*, 2004).

#### 3.7.2 Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional du cancer de la prostate. Elle a évolué au cours des dernières années avec le développement des techniques d'imagerie. Deux types de radiothérapie peuvent être utilisés:

- La radiothérapie externe est la plus utilisée indiquée pour les patients à faible risque, à risque intermédiaire ou encore à haut risque. Une irradiation de haute énergie par rayons X est dirigée au niveau de la prostate en préservant le plus possible les tissus de voisinage. Une dose de 70 à 80 grays est délivrée sur la prostate et les vésicules séminales en 35 à 40 séances (Fournier *et al.*, 2004; Gross, 2011).
- La curiethérapie est indiquée pour des patients à faible risque ou à risque intermédiaire. Il consiste à l'implantation permanente sous anesthésie générale de grains radioactifs dans la prostate par voie transpérinéale échoguidée, d'iode 125, le plus souvent, ou encore du palladium 103. Cette irradiation « in situ » permet d'administrer des doses supérieures à la radiothérapie externe avec une marge de sécurité de 2 à 3 mm. Le double objectif est d'obtenir davantage d'efficacité antitumorale et moins d'effets secondaires sur les tissus sains à proximité (Nag *et al.*, 1999; Fournier *et al.*, 2004).

#### 3.7.3 Ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU)

Les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) est un traitement local du cancer de la prostate non métastatique et développé. Le principe de cette technique est d'induire une nécrose intraprostatique utilisant une sonde endorectale émettant des ultrasons de haute intensité. L'intervention s'effectue sous anesthésie et la sonde est couplée par échographie endorectale pour le repérage. Le faisceau d'ultrasons est émis sous forme d'impulsions qui se focalise vers la zone à traiter à travers la paroi du rectum. Le traitement par cette technique peut être proposé à des patients âgés préférentiellement de plus de 70 ans (ou à des patients plus jeunes lorsqu'il existe une morbidité compétitive) présentant une tumeur T1-T2N0M0, un score de Gleason  $\leq 7$  (3+4),

une valeur de PSA < 15 ng/ml, un volume prostatique < 40 ml et un volume tumoral limité (Rebillard *et al.*, 2008).

### 3.7.4 Cryothérapie

La cryothérapie est un traitement local du cancer de la prostate. Elle consiste à transmettre dans la prostate une température très froide par voie périnéale utilisant des cryosondes sous contrôle échographique endorectal. Cette technique permet de détruire les cellules cancéreuses par congélation (dénaturation des protéines cellulaires, rupture de la membrane cellulaire par les cristaux de glace). Ce traitement peut être proposé pour les patients avec tumeur localisé  $\leq$  T2b, volume prostatique  $\leq$  40 ml, PSA  $\leq$  10 ng/ml, score de Gleason  $\leq$  7 et une espérance de vie > 10 ans (Rebillard *et al.*, 2005; Finley *et al.*, 2010).

### 3.7.5 Hormonothérapie

L'hormonothérapie est une stratégie thérapeutique consiste à empêcher le développement du cancer de la prostate et ses éventuelles métastases via l'inhibition de l'action stimulante de la testostérone (suppression androgénique). Elle est indiquée de façon indiscutable dans les cancers métastatiques et en cas d'envahissement ganglionnaire. Elle est assurée soit par une castration chirurgicale ou médicale (Finley *et al.*, 2010; Bastide *et al.*, 2013).

La Castration chirurgicale peut être réalisée par exérèse des deux testicules ou par exérèse de la pulpe testiculaire. Elle supprime de façon définitive et immédiate la source testiculaire de testostérone qui représente 95% de la sécrétion de testostérone circulante. L'efficacité thérapeutique de cette intervention dépend du stade, du grade de la tumeur et de la valeur du PSA au diagnostic (Finley *et al.*, 2010).

La castration médicale repose sur l'utilisation des médicaments permettent un sevrage androgénique soit par l'inhibition de la production de testostérone ou par l'inhibition de ces récepteurs. Il existe plusieurs classes de médicaments qui se diffèrent par le mode d'action parmi les quelles: les œstrogènes, les analogues de la LHRH, les antagonistes de la LHRH, les anti-androgènes et les inhibiteurs de la biosynthèse des androgènes (Bastide *et al.*, 2013).

### 3.7.1 Chimiothérapie

La chimiothérapie est le traitement de référence de cancer de la prostate métastatique hormonorésistant. Elle consiste à utiliser des médicaments anticancéreux par voie orale ou intraveineuse. Les agents chimiothérapeutiques, les plus couramment utilisés, sont le docétaxel (Taxotere), le mitoxantrone (Novantrone) et le cabazitaxel (Jevtana). Plusieurs protocoles de chimiothérapie peuvent être utilisés, repose toujours sur le cas de patient et la probabilité de sa tolérance aux différents agents chimiothérapeutiques (Tannock *et al.*, 1996; Tannock *et al.*, 2004).

---

---

## Deuxième partie: Le stress oxydant et le cancer de la prostate

### 1. Généralité sur le stress oxydant et systèmes de défenses

#### 1.1 Définition du stress oxydant

Pour les organismes dits aérobies, la mitochondrie est considérée comme une usine d'énergie. Basant sur des réactions d'oxydoréductions qui ont lieu dans la chaîne respiratoire, cet organe fournit 90% de l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire (Rolfe *et al.*, 1997). Au niveau de la chaîne respiratoire, la réduction de l'oxygène en molécules d'eau est associée avec la production de 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP). Cependant ce processus n'est toutefois pas parfait puisque 2 à 3% de l'oxygène s'échappent et peuvent être transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Koppenol, 2001). Physiologiquement, les ERO jouent un rôle très important dans la cellule et un équilibre parfait est maintenu entre sa production et les systèmes de défenses antioxydantes (Valko *et al.*, 2007). L'altération de cet équilibre en faveur des ERO donne naissance au stress oxydant. Selon Sies, la notion de stress oxydant est l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue des ERO, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes (Sies, 1991).

#### 1.2 Les espèces réactives de l'oxygène et leur production

Les espèces réactives de l'oxygène (en anglais *reactive oxygen species*, ROS) sont souvent des radicaux libres, espèces chimiques (molécules ou atomes) qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, ce qui les rend généralement instables et capables de réagir plus au moins rapidement avec d'autres biomolécules environnantes (Asmus *et al.*, 2000). Parmi ceux formés chez les êtres vivants, l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le monoxyde d'azote NO, les radicaux peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ) et hydroxyles ( $OH^{\cdot}$ ). Il existe d'autres espèces réactives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le peroxydinitrite (ONOO), ne sont pas des radicaux libres, mais sont réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux (Yoshikawa *et al.*, 2000). En effet l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) est considéré comme le précurseur des ERO. Il est formé après réduction de l'oxygène  $O_2$  par un électron et peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est très instable et peut traverser la membrane plasmique (Mao *et al.*, 1992). Le monoxyde d'azote NO est généré par l'oxyde nitrique synthase (NOS) en présence d'arginine. Ce radical à son tour peut réagir avec l'anion superoxyde pour former les peroxydinitrites, un composé secondaire. Lorsque la concentration de cofacteur (tétrahydrobioptéridine, BH4) des NOS diminue, ces enzymes peuvent produire l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ).

L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) proviens de divers sources cellulaires dismutées par les superoxydes dismutases (SOD) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), relativement stable qui peut diffuser au travers les membranes. Cette molécule peut avoir plusieurs destinations:

- ▶ Elle peut être convertie en eau par les enzymes catalase et glutathion peroxydase,
- ▶ Transformé en acide hypochloreux (HOCl) par la myéloperoxydase lors la phagocytose,
- ▶ Encore donne via la réaction de Fenton ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$ ) une entité très réactive, le radical hydroxyle, ( $OH^{\cdot}$ ).

La réaction de Fenton peut aussi générer ce radical directement à partir de l'anion superoxyde (Favier, 2003) (figure 5).

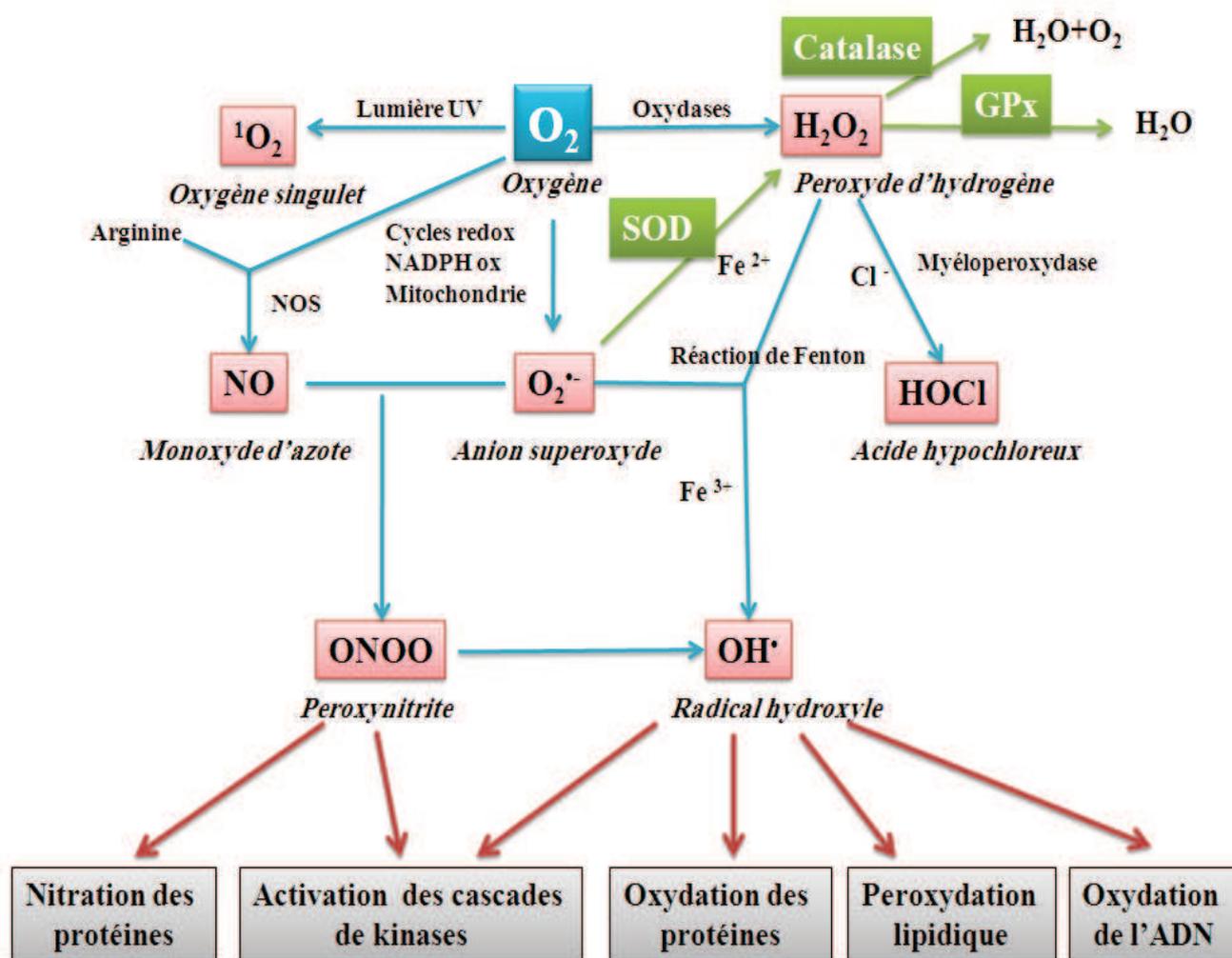


Figure 5: Schéma récapitulatif des sources des espèces réactives de l'oxygène, enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et cibles biologiques (Favier, 2003).

### 1.3 Sources endogènes des espèces réactives de l'oxygène

#### 1.3.1 L'auto-oxydation de petites molécules

L'auto-oxydation de molécules comme la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source des ERO. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) (Freeman *et al.*, 1981).

#### 1.3.2 La xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui génère des ERO en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie et les intestins. La production des ERO par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais il est important lors de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène notamment lors l'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) (Harrison, 2002).

#### 1.3.3 La NADPH oxydase

La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes. Lors la phagocytose, la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes, produit une grande quantité des anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire (phénomène d'explosion oxydative « respiratory burst ») qui donne naissance ensuite aux plusieurs autres formes d'oxygène plus toxiques pour le pathogène. Ce processus est très utile contre les pathogène mais si ces produits sont libérés de manière exagérée dans le milieu extracellulaire, ils peuvent engendrer des dommages tissulaires (Babior, 1996; Carrichon, 2009).

#### 1.3.4 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant parallèlement des ERO ( $O_2^{\bullet -}$  et  $H_2O_2$ ). Un mauvais contrôle ou couplage au niveau du cycle catalytique P450 peut conduire à une production continue des ERO, qui affectent les voies de signalisation et d'autres fonctions cellulaires (Zangar *et al.*, 2004).

#### 1.3.5 Les peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production des espèces réactives de l'oxygène surtout le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En effet ces organites ont pour rôle de détoxifier la cellule en dégradant certaines molécules comme les acides gras et l'alcool. Ils sont riches en oxydases (D-aminoacides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase,...). Ces enzymes

sont engagées principalement dans le métabolisme de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui est utilisé par la suite par la catalase pour oxyder les substrats toxiques (réaction de peroxydation). Ce type de réaction est très important dans le foie, les cellules rénales, où les peroxysomes détoxifient certaines toxines passant dans le sang (Schrader *et al.*, 2006).

### 1.3.6 La mitochondrie

La mitochondrie produit en effet 90% des ERO cellulaires. Au cours du transfert des électrons, dans des conditions physiologiques, il peut y avoir des fuites d'électrons et production d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par le complexe I et le coenzyme Q au niveau du complexe III. Le radical  $O_2^{\cdot-}$  est métabolisé par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Celui-ci peut être décomposé en  $H_2O$  par la glutathion peroxydase (GPx), transformé en radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) par la réaction de Fenton, ou encore diffuser dans le cytoplasme et modifier l'activité de protéines cytoplasmiques ou nucléaires. Une surproduction des ERO mitochondrial peut être l'origine d'un apport excessif de substrats par rapport aux réels besoins énergétiques de la cellule comme dans le cas de l'hyperglycémie ou de l'inhibition de transfert des électrons au sein du complexe III par certains biomolécules comme la céramide (Carrière *et al.*, 2006).

### 1.4 Facteurs environnementaux favorisant la production des ERO

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent également contribuer à la formation des ERO. Une production importante est observée dans l'intoxication aux métaux lourds qui se trouvent souvent dans l'environnement comme le cadmium, le mercure et l'arsenic (Flora *et al.*, 2008). Les rayonnements X ou  $\gamma$  ou d'ultraviolets sont capables également de générer des ERO. Les particules inhalées tel que l'amiante et la silice peuvent être une autre source des ERO, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer. En outre, la pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise de certains médicaments comme les contraceptifs sont aussi des facteurs environnementaux favorisant la production des ERO (Favier, 2003).

### 1.5 Rôle physiologique des ERO

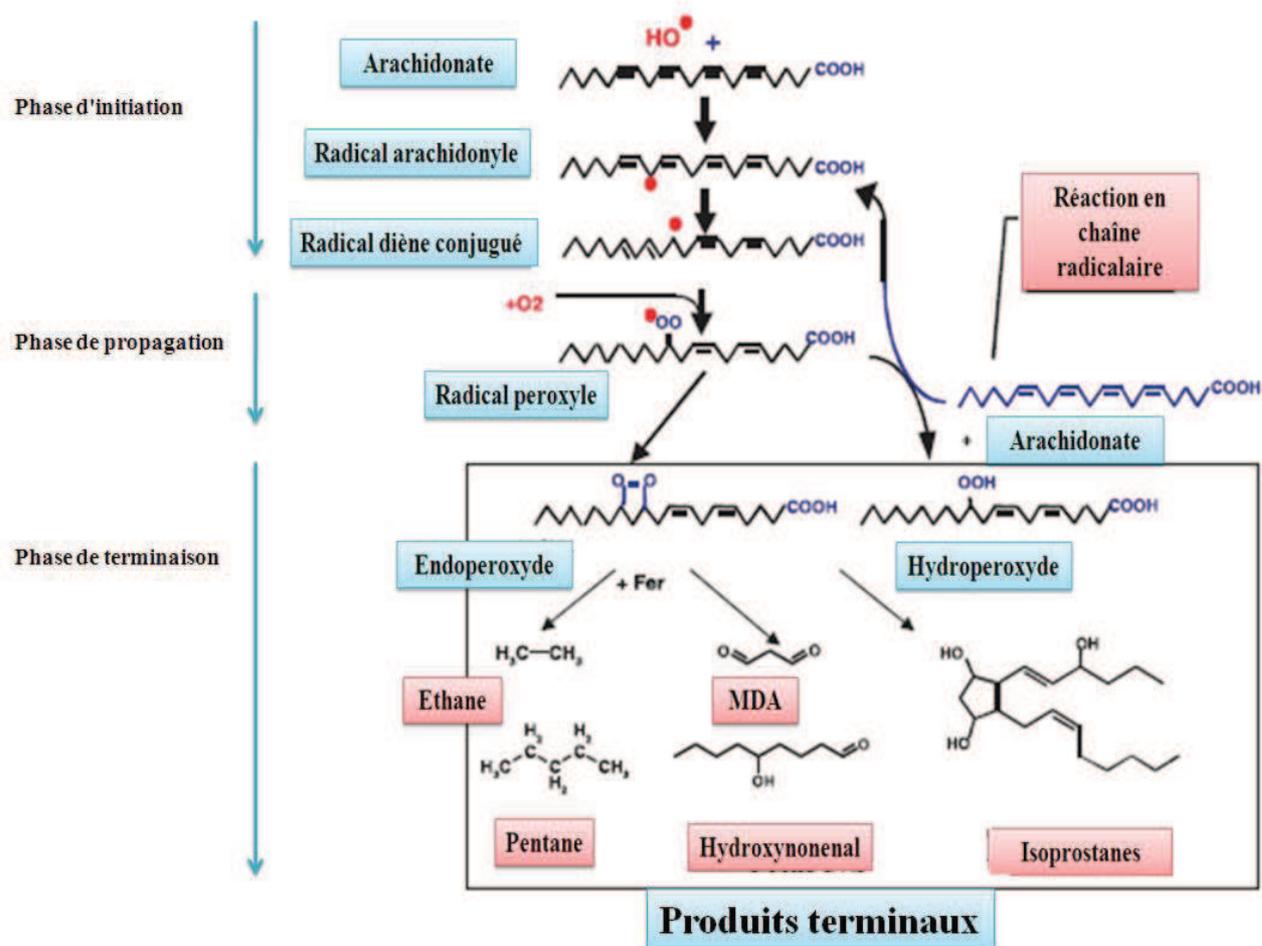
Physiologiquement, les espèces réactives de l'oxygène existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles, assurant nombreuses fonctions utiles. Ils participent à la défense immunitaire contre les agents pathogènes (phagocytose), au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Favier, 2003).

## 1.6 Cibles biologiques des ERO

### 1.6.1 Les lipides

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement visées par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde.

Cette réaction de peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Ce processus génère des hydro peroxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques, le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonéal (figure 6). Ainsi un unique évènement oxydatif peut altérer de nombreuses molécules lipidiques et induire une accumulation d'hydro peroxydes dans les membranes ce qui réduira leur fluidité ainsi que l'activité des protéines transmembranaires (Favier, 2003; Michel *et al.*, 2008).



**Figure 6:** Schéma de la peroxydation lipidique (exemple de l'acide arachidonique) (Favier, 2003).

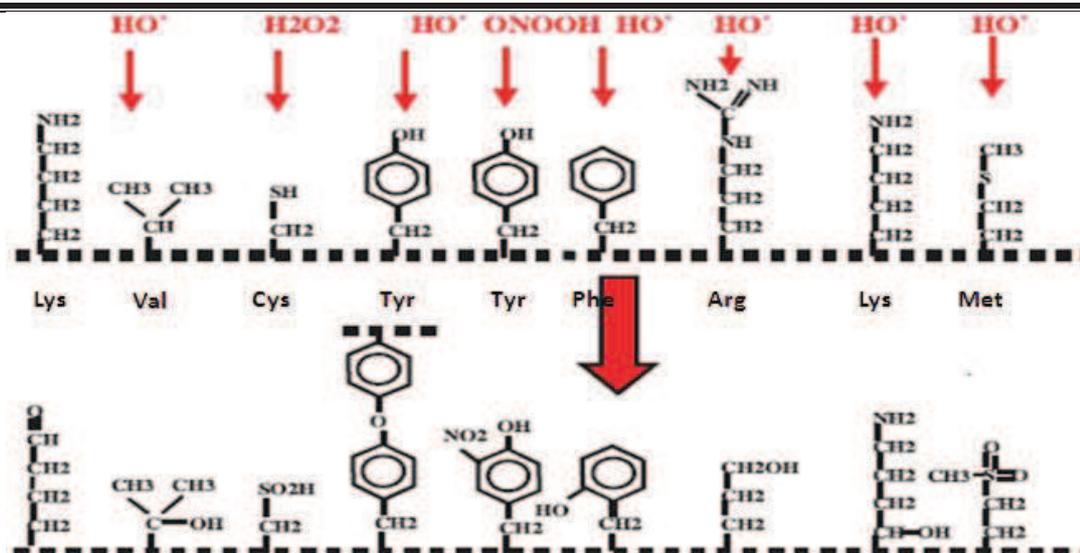
### **1.6.2 Les acides nucléiques**

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par ERO. Cinq classes principales de dommages oxydatifs peuvent être générées: les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Favier, 2003). L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimido uracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone. Il peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin.

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides ou de protéines et formation des adduits sur les bases de l'ADN comme MDA-guanine, éthénodérivés et lysinoguanine. En effet il existe des systèmes de réparation de l'ADN mais ces systèmes peuvent être dépassés. Les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases, soit une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par apoptose (Favier, 2003).

### **1.6.3 Les protéines**

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées (figure 7). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent hydrophobes et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).



**Figure 7:** Quelques modifications des chaînes latérales des acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

#### 1.6.4 Les sucres

Comme les autres molécules biologiques les sucres peuvent aussi s'oxyder. En présence de traces métalliques, l'oxydation de glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ), et entraîne la coupure de protéines et leur glycation par arrachement du céto-aldéhyde formant un dérivé de produit de glycation avancé (AGE, Advanced Glycation End product). Ce phénomène de glycosoxydation chez les diabétiques peut contribuer à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Wolff *et al.*, 1988).

### 1.7 Systèmes de défenses antioxydants

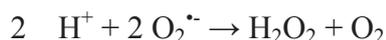
#### 1.7.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydant constituent la première ligne de défense antioxydant. Elles permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ERO, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser (Haleng *et al.*, 2007).

##### - Les superoxydes dismutases (SOD)

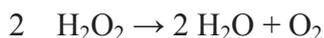
La superoxyde dismutase est une métalloprotéine, qui représente une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Il en existe trois isoformes décrites chez les mammifères qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire: la Cu/Zn-

SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3 extracellulaire (Haleng *et al.*, 2007).



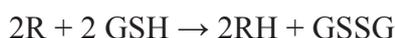
#### - La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie (Scibior *et al.*, 2006).

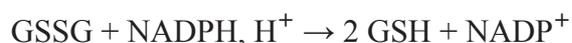


#### - Les glutathion peroxydases (GPxs)

Les glutathion peroxydases sont des enzymes principalement à sélénium de structures très proches présentes dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytoplasme, noyau et la mitochondrie. Il existe plusieurs isoformes différents par leur expression dans l'organisme, structure et leur localisation cellulaire. Elles sont considérées comme des partenaires essentiels des superoxydes dismutases et de la vitamine E. Elles assurent la réduction des peroxydes d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcool et des espèces radicalaires en espèce non radicalaire, grâce à la présence de glutathion réduit (GSH) selon les réactions suivantes (Chabory, 2009):



Pour ces réactions, perdre un taux constant de GSH est nécessaire, ce qui est assuré par la glutathion réductase (GR). Cette enzyme catalyse la réduction de GSSG en GH en présence du cofacteur NADPH,  $\text{H}^+$  (Chabory, 2009).



### 1.7.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques

#### - Le glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine ( $\gamma$ -L-Glutamyl cystéinyl glycine). C'est un composé de petite masse moléculaire qui contient un groupement thiol libre apporté par la cystéine lui conférant ses principales propriétés biochimiques. Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très

faible. Le glutathion réduit permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH). De plus, il piège le peroxyde d'hydrogène et réagit avec l'oxygène singulet et le radical hydroxyle. Il est aussi cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition et régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire (Haleng *et al.*, 2007).

### - La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol)

La vitamine E est une vitamine liposoluble qui a des propriétés antioxydantes. Il en existe huit formes dont la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol. Elle joue son rôle antioxydant principal dans les membranes biologiques, notamment au niveau de la membrane mitochondriale qui contient de forts taux de vitamine E et qui est riche en acides gras polyinsaturés cibles du stress oxydant. Cette activité antioxydante est liée à sa capacité à capter l'électron célibataire des radicaux libres (Chabory, 2009).



### - La vitamine C (acide L-ascorbique)

C'est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière. Il s'agit de l'acide L-ascorbique et de ses sels, les ascorbates de sodium et de calcium. Elle est un excellent piègeur des ERO ( $\text{O}_2^{\bullet-}$  ou  $\text{OH}^\bullet$ ). Elle permet de limiter les mutations de l'ADN provoquées par un stress oxydant. Elle agit également sur certains hydroperoxydes lipidiques réduisant ainsi la peroxydation lipidique. La vitamine C permet également de régénérer la vitamine E (Haleng *et al.*, 2007; Chabory, 2009).

### - La vitamine A

La vitamine A est une vitamine liposoluble existe dans l'organisme sous forme de rétinol, de rétinal, d'acide rétinoïque et de rétinyl phosphate. Ces molécules sont altérées par l'oxygène de l'air, leur rôle principal est la protection des membranes cellulaires en réduisant la peroxydation lipidique (Haleng *et al.*, 2007; Chabory, 2009).

### - L'acide urique

L'acide urique sérique est le produit final du métabolisme des purines (adénine, guanine) qui proviennent elles-mêmes du catabolisme des acides nucléiques endogènes et exogènes. Il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant des ERO. Il réduit les radicaux hydroxyles, du monoxyde et du dioxyde d'azote. Il est également un neutralisant puissant de l'oxygène singulet, de l'acide hypochloreux et du radical superoxyde. Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C) (Haleng *et al.*, 2007).

- **La bilirubine**

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème. Il est non hydrosoluble, elle se lie à l'albumine, ce qui empêche sa pénétration dans les tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger le radical peroxy et l'oxygène singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Haleng *et al.*, 2007).

- **Les oligo-éléments**

Les oligo-éléments sont principalement des cofacteurs enzymatiques impliqués dans toutes les voies métaboliques et notamment dans la protection contre les espèces radicalaires. Les principaux oligo-éléments sont le sélénium qui joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx, le zinc cofacteurs essentiels de la SOD cytosolique, le manganèse cofacteur des SOD mitochondriales. A concentration physiologique, le cuivre et le fer présentent également des activités antioxydantes comme cofacteur de SOD et de catalase mais à des concentrations élevées ils deviennent des pro-oxydants par l'intermédiaire des réactions de Fenton (Scibior *et al.*, 2006; Haleng *et al.*, 2007).

**1.8 Pathologies liées au stress oxydant**

Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydant peut être le facteur déclenchant originel. C'est le cas des cancers, des pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence musculaire), des maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer). La sclérose latérale amyotrophique familiale est l'exemple le plus démonstratif, puisque cette maladie génétique est due à un défaut sur le gène de l'enzyme antioxydant superoxyde dismutase. Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida ou le choc septique, le diabète, la maladie de Parkinson ou l'insuffisance rénale (Favier, 2006).

**2. Implication du stress oxydant dans le cancer de la prostate**

En effet, les ERO non neutralisés sont impliqués largement dans les processus cellulaires associés à l'initiation et le développement de nombreux cancers, y compris le cancer de la prostate. L'origine de ce stress oxydant peut être non seulement la défaillance des mécanismes de défense antioxydant mais également les mutations de l'ADN mitochondriales, l'inflammation chronique, la perturbation des mécanismes de réparation de l'ADN, l'apoptose, etc. Le stress oxydant est considéré aussi comme un lien entre plusieurs facteurs de risque comme le vieillissement, le déséquilibre des androgènes, les graisses alimentaires et le cancer de la prostate (Khandrika *et al.*, 2009).

---

## 2.1 Rôle de stress oxydant dans la carcinogenèse prostatique

Le stress oxydant pourrait jouer un rôle majeur dans les différentes étapes de la carcinogenèse prostatique:

### *a. La phase d'initiation*

Dans la phase d'initiation du cancer, les mutations génétiques et les altérations structurales induites par les dommages oxydatifs pourront être l'origine de l'activation d'oncogènes et de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Lors une absence de réparation ou lors une réparation dite fautive de l'ADN, les ERO peut avoir des effets mutagènes. En plus, les processus de peroxidation lipidique peuvent aussi contribuer dans le mécanisme de carcinogenèse en formant des adduits avec l'ADN (Guéritat, 2015).

### *b. La phase de promotion*

Les ERO peuvent participer à la phase de promotion de la tumorigenèse en modulant les voies de signalisation impliquées dans l'augmentation de la prolifération cellulaire et/ou la diminution de la mort cellulaire. Ces résultats sont confirmés dans le cancer de la prostate humain. Un profil redox différent au sein de deux lignées cancéreuses représentant divers stades d'évolution du cancer de la prostate a été identifié. *In vitro*, les niveaux des ERO intracellulaires et extracellulaires sont statistiquement plus élevés durant la croissance cellulaire notamment durant la phase S et G2/M du cycle cellulaire pour les cellules LNCaP vs les cellules PC3. Il est suggéré que ces dernières, plus invasives et caractérisées par des niveaux plus élevées de 8-OHdG que les cellules LNCaP (Guéritat, 2015).

### *c. La phase de progression*

La progression tumorale implique des changements cellulaires et moléculaires irréversibles, caractérisés par une accumulation de désordres génétiques supplémentaires, par une instabilité génétique et par une perturbation de l'intégrité chromosomique étroitement corrélés à l'augmentation du stress oxydant dans le tissu cancéreux au cours de l'évolution tumorale. En effet, plusieurs gènes suppresseurs de tumeur ont un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire peuvent être génétiquement altérés dans le cancer de la prostate. Par exemple, les mutations des gènes RB1, p53 et p27 sont rarement observées dans les tumeurs prostatiques localisées de bas grade mais surviennent fréquemment dans les stades avancés de la maladie, suggérant leur implication dans la progression tumorale (Guéritat, 2015).

---

## 2.2 L'origine des ERO dans le cancer de la prostate

### 2.2.1 La mitochondrie, ERO et cancer de la prostate

Plusieurs rapports ont mis en évidence un lien possible entre l'altération du métabolisme et de la mutation de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans le cancer de la prostate. En effet les mutations de l'ADN mitochondrial pouvant contribuer à la tumorigenèse prostatique notamment via une surproduction des ERO. Plusieurs études ont montré des changements significatifs de l'expression génomique nucléaire codant pour le complexe IV mitochondrial dans la prostate maligne par rapport la prostate saine (Khandrika *et al.*, 2009). Jessie et ses collègues en 2001 ont montré aussi pour la première fois que plusieurs délétions se produisent dans l'ADNmt des prostates malignes plus âgées par rapport aux prostates malignes les plus jeunes, et ils ont suggéré que l'augmentation du stress oxydatif avec le temps a provoqué une augmentation de l'accumulation de mutations dans l'ADNmt (Jessie *et al.*, 2001). Petros *et al.*, ont rapporté une fréquence élevée des mutations de la sous-unité du cytochrome oxydase mitochondriale chez les patients atteints d'un cancer de la prostate. Ils ont montré aussi que les mutations de l'ADNmt inhibent la phosphorylation oxydative conduisant à une augmentation des ERO et contribuer aussi à tumorigenèse prostatique et que l'introduction d'un ADNmt muté dans la lignée cellulaire PC3 conduit à une augmentation significative de la croissance tumorale via une production élevée des ERO (Petros *et al.*, 2005).

### 2.2.2 Les NADPH oxydases (Nox), ERO et cancer de la prostate

Dans le cancer de la prostate, les Nox représentent non seulement une source majeure de génération des ERO, mais elles sont aussi responsables de la croissance et du maintien du phénotype agressif de l'adénocarcinome. Il a été rapporté que la Nox 1 est présente dans le tissu tumoral prostatique et que les Nox 2, Nox 4 et Nox 5 sont présentes dans lignées cancéreuses de la prostate mais sont absentes dans les cellules prostatique normales. La Nox 1 est impliquée dans la croissance et l'angiogenèse et qu'elle est capable de convertir le cancer de la prostate à une forme agressive alors que la down-regulation de la Nox 5 conduit à l'arrêt de la croissance et de l'apoptose (Khandrika *et al.*, 2009).

### 2.2.3 L'inflammation, ERO et cancer de la prostate

L'inflammation aigue ou chronique peut contribue au développement du cancer de la prostate via plusieurs mécanismes comme le stress oxydant, instabilité génomique, dommage oxydative de l'ADN ou indirectement par l'augmentation de niveau des facteurs pro-inflammatoire (cytokines) comme le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) et IL-1. Dans le site inflammatoire, les phagocytes (neutrophiles et macrophages) génèrent des ERO lors la phagocytose, mais aussi synthétisent et secrètent une grande quantité de facteurs de croissance, des cytokines et protéases qui intervient non seulement dans la régénération de tissu endommagé mais aussi dans le processus de

tumorigenèse. L'exposition prolongée du tissu prostatique à ces molécules produit lors l'inflammation est conduit à une importante augmentation des ERO qui à l'origine de modifications structurales et fonctionnelles des protéines et surtout d'altérations génétiques et de modifications post-traductionnelles. En effet les cytokines peuvent induire des dommages récurrents à l'ADN conduisant à une augmentation de la fréquence des mutations et par conséquence à l'initiation et la croissance du cancer de la prostate dans le site inflammatoire (Mishra *et al.*, 2014).

### **2.2.4 Vieillessement, ERO et cancer de la prostate**

Le vieillissement est un processus complexe associé à de nombreux troubles métaboliques et peuvent augmenter l'incidence de divers cancers incluant le cas de cancer de la prostate pour lequel l'âge est considéré comme un facteur de risque majoritaire. Basant sur la théorie radicalaire ("*free radical theory*") de Harman en 1956, une forte corrélation entre l'âge, le stress oxydant et le cancer de la prostate a été établie (Udensi *et al.*, 2016). Avec l'avancement de la technologie, de nombreux chercheurs ont soutenu la théorie d'Harman et conclu que l'accumulation de mutations dans l'ADN mitochondrial avec l'âge est une cause majeure de vieillissement humain. Ces résultats non seulement établis un lien entre le stress oxydant et l'âge mais en effet ils peuvent expliquer l'incidence accrue du cancer de la prostate avec l'âge (Khandrika *et al.*, 2009). En outre, Il a été rapporté que l'âge augmente le stress oxydant dans de nombreux tissus et que le système de défense antioxydant est significativement réduit chez les patients âgés et en particulier chez ceux atteints de cancer de la prostate (Szewczyk-Golec *et al.*, 2015).

### **2.2.5 Les hormones stéroïdiennes, ERO et cancer de la prostate**

Les hormones stéroïdiennes et tout particulièrement les androgènes sont des sources potentielles des ERO. Ils sont capables d'augmenter le stress oxydant au sein de cellules cancéreuses prostatiques humaines androgéno-sensibles LNCaP via une altération de l'activité mitochondriale et via une altération des défenses antioxydantes comme le glutathion. D'autres recherches ont également trouvés que les niveaux circulants de GPx sont nettement diminués dans le plasma aussi bien que dans le tissu de la prostate dans les échantillons de biopsie des patients atteints du cancer de la prostate. La perte accrue du glutathion peut réduire la protection de la mitochondrie contre les effets des ERO générés conduisant à l'augmentation de stress oxydant dans les cellules de la prostate et par conséquence aux multiples changements dans l'expression des gènes qui peuvent donner naissance au cancer (Khandrika *et al.*, 2009).

---

## 2.3 Les voies de signalisation cellulaire activées par les ERO à l'origine de l'évolution du cancer de la prostate

### 2.3.1 Les voies des MAPKs (Mitogen-activated proteins kinases)

Les MAPKs sont des sérine/thréonine kinases responsables de la transmission des signaux extracellulaires évoqués par des facteurs de croissance, des hormones, des cytokines ou différents types de stress. Dans les cellules de mammifères, les trois sous-familles principales de MAPKs sont ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) et SAPK2 (*stress-activated protein kinase 2*) connue sous le nom de p38. Il semble que les trois sous-familles de MAPKS peuvent être impliquées dans la tumorigenèse prostatique via le stress oxydant (Rodríguez-Berriguete *et al.*, 2012).

Les ERO peuvent induire l'activation de la voie de signalisation ERK en modulant indirectement Ras via les récepteurs de facteurs de croissance ou agissant directement sur Ras. L'activation de la cascade de signalisation ERK est associée à la progression du cancer de la prostate et semble même être corrélée à la malignité de la pathologie (Guéritat, 2015).

Les voies JNK et p38 sont activées en réponse à des cytokines pro-inflammatoires ou à des stress tels que les lésions à l'ADN ou les radiations ionisantes. Ils contrôlent l'expression des gènes impliqués préférentiellement dans les processus apoptotiques. Cependant dans un état de stress oxydant, les ERO peuvent activer les voies de signalisation JNK et p38 via ASK1 et MEKK et ces deux voies peuvent être impliquées par conséquent dans les mécanismes d'angiogenèse et d'invasion facilitant la croissance et les métastases de cancer de la prostate (figure 8) (Guéritat, 2015).

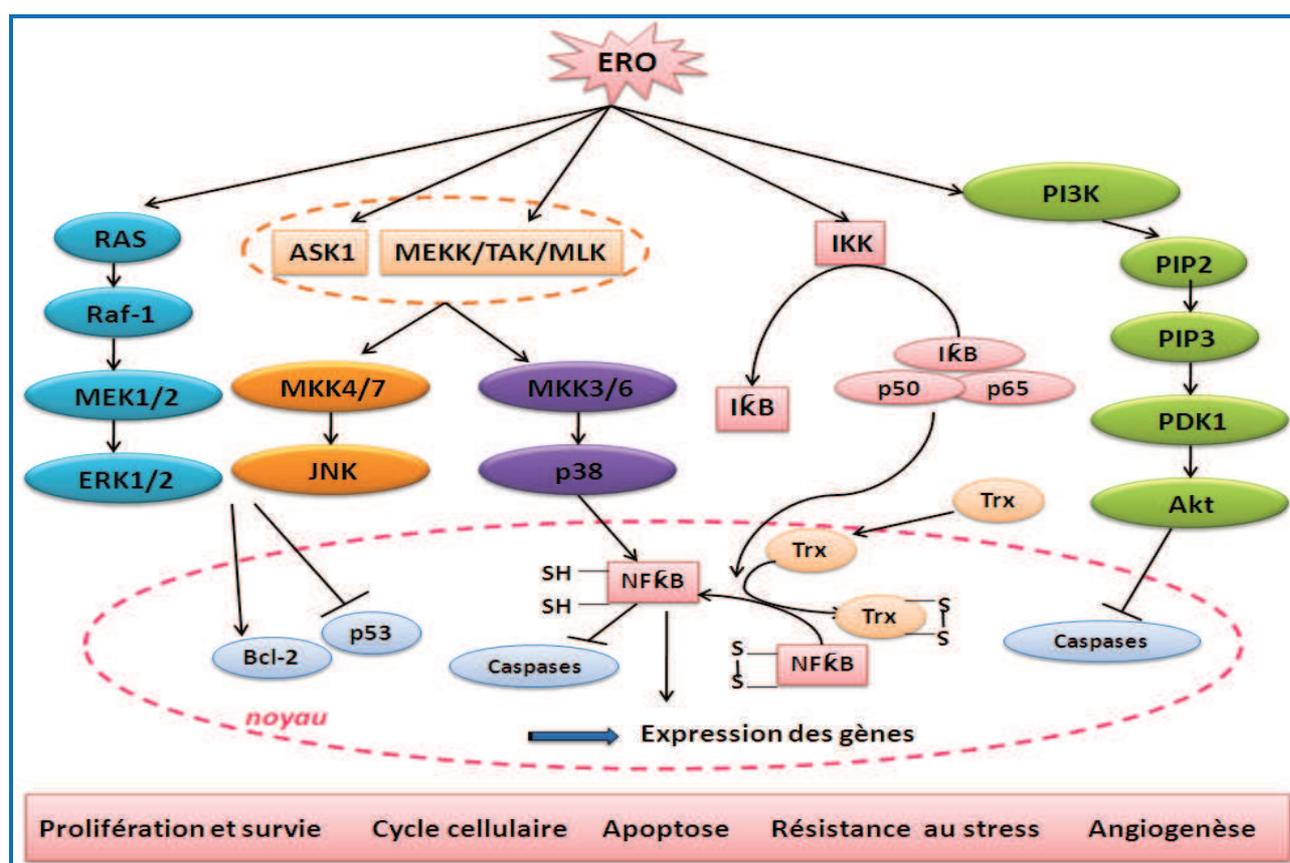
### 2.3.2 La voie PI3K/Akt

La voie PI3K (la phosphatidylinositol-3-kinase)/ Akt est une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire, la prolifération cellulaire, et l'angiogenèse, et qui constitue un centre d'intérêt dans l'étude de l'oncogenèse. Il a été suggéré que cette voie joue un rôle important dans la tumorigenèse prostatique. Elle se trouve up-régulée dans 30 à 50% de cancer de la prostate (Guéritat, 2015). Il a été rapporté que les ERO peuvent induire une sur-activation de la sérine-thréonine kinase Akt qui connue pour down-réguler les défenses antioxydantes et promouvoir la survie cellulaire (figure 8). La Akt présente également des propriétés anti-apoptotiques importantes due à sa capacité d'inactiver les molécules pro-apoptotiques telles que la caspase-9 ou à sa capacité de déréguler les protéines de la famille Bcl-2. Comme les ERO, des niveaux élevés de Nox dans les cellules cancéreuses prostatiques peuvent également être impliquées dans l'activation de la voie Akt. Il a été rapporté aussi que l'inhibition des

ERO conduit à une perte d'expression d'Akt au sein des cellules cancéreuses prostatiques (Guéritat, 2015).

### 2.3.3 Nuclear factor-kappa B (NF-κB)

NF-κB est un facteur de transcription nucléaire qui régule un large nombre de gènes impliqués dans la survie cellulaire, la différenciation, l'inflammation et la croissance. Il existe sous forme inactive dans le cytoplasme. Son activation en réponse à des stimuli extracellulaires tels que le stress oxydant ou encore les rayonnements ionisants induisent la dissociation des protéines inhibitrices IκB permet sa translocation dans le noyau où il pourra activer des gènes cibles (figure 8) (Guéritat, 2015). Il semble que l'activation de NF-κB est associée au processus de tumorigenèse prostatique. Des études ont trouvés que l'activité de ce facteur est plus élevée dans les lignes cellulaires et les xénogreffes androgéno-indépendantes par rapport aux androgéno-dépendants, ainsi que dans le cancer de la prostate métastatique par rapport le cancer localisée (Jin *et al.*, 2008).



**Figure 8:** Les voies de signalisation cellulaire activées par les ERO et la modulation des facteurs de transcription impliqués dans la carcinogenèse prostatique (Guéritat, 2015).

---

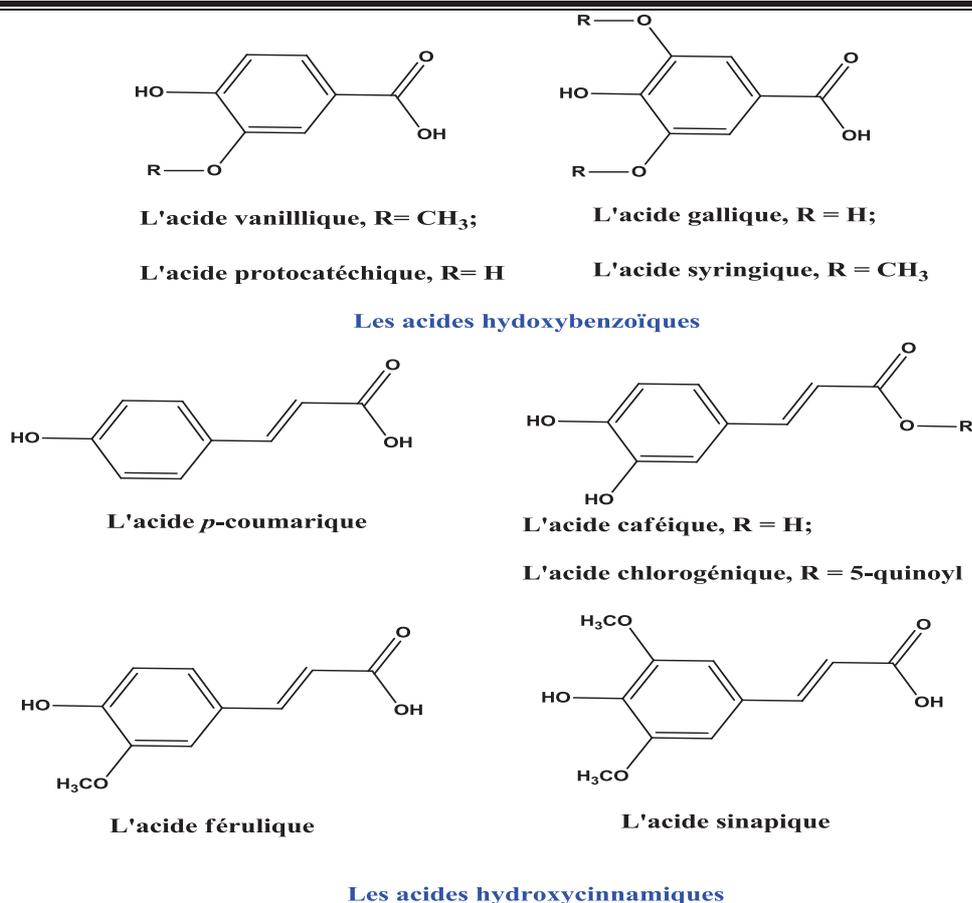
---

**Troisième partie: Le thé vert « Source riche en phénols et en flavonoïdes »****1. Généralité sur les composés phénoliques****1.1 Définition des composés phénoliques**

Les composés phénoliques constituent une grande famille de molécules organiques issus du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont largement présente dans le règne végétal, actuellement plus de 8000 composés ont été identifiés dont plus de 4000 sont des flavonoïdes. D'un point de vue structural, la désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Leur structure variée donc depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Ils sont capables de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques : de ce fait, on les retrouve très souvent substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...) (David Hoffmann, 2003; Macheix *et al.*, 2005).

**1.2 Principales classes des composés phénoliques****1.2.1 Composés phénoliques simples****1.2.1.1 Acides phénoliques**

Ce sont des composés organiques rencontrés chez les plantes possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes: les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (Chira *et al.*, 2008). Parmi les acides hydroxybenzoïques, on trouve l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gentisique et l'acide gallique et les principaux acides hydroxycinnamiques sont les acides caféique, *p*-coumarique, férulique et sinapique (figure 9) (Chira *et al.*, 2008).



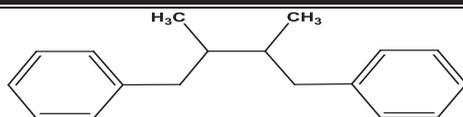
**Figure 9:** Structures chimiques des principaux acides phénoliques (Tsao, 2010).

### 1.2.1.2 Les stilbènes

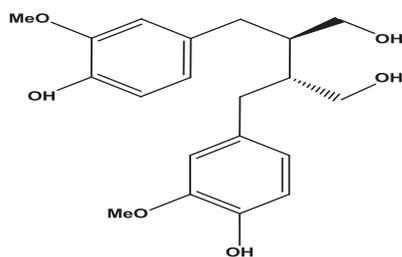
Les stilbènes sont des composés polyphénoliques. Ils sont constituée de dérivés hydroxy-, méthoxy- du stilbène simple, ainsi que leurs formes hétérosidiques ou polymères (David Hoffmann, 2003). Ils se trouvent en petites quantités dans notre alimentation. Le raisin constitue l'apport alimentaire le plus important de ces composés dont principalement le resvératrol en plus de certains formes d'oligomères comme le pallidol, les viniférines et un tétramère de resvératrol : l'hopéaphénol (Chira *et al.*, 2008).

### 1.2.1.3 Les lignanes

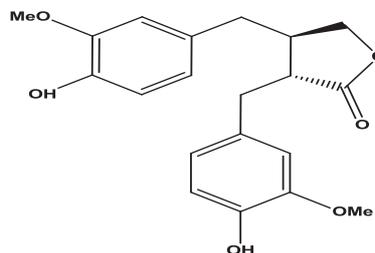
Les lignanes sont des polyphénols très répandus chez les végétaux. Chez les plantes vasculaires, ils peuvent être isolés à partir de tiges, d'écorces, de racines, mais aussi de graines. Beaucoup de lignanes sont cytotoxiques, avec fréquemment des propriétés anti-mitotiques, mais le plus souvent non exploitables en thérapeutique en raison d'une très grande toxicité. Ainsi, seuls des dérivés héli-synthétiques de la podophyllotoxine sont aujourd'hui largement utilisés dans les protocoles de la chimiothérapie. Enfin, dans plusieurs plantes alimentaires on trouve des lignanes tels que le sécoisolaricirésinol et le matairésinol, dotés de propriétés phyto-oestrogènes et susceptibles de prévenir des pathologies cardiovasculaires et certains cancers (figure 10) (Sainvitu *et al.*, 2012).



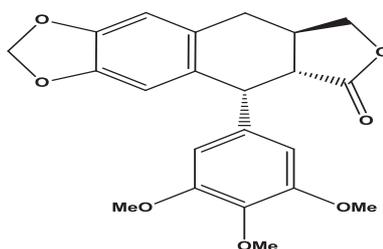
Structure générale de lignanes



Le sécoisolaricirésinol



Le matairésinol

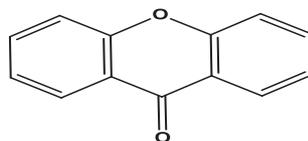


La podophyltoxine

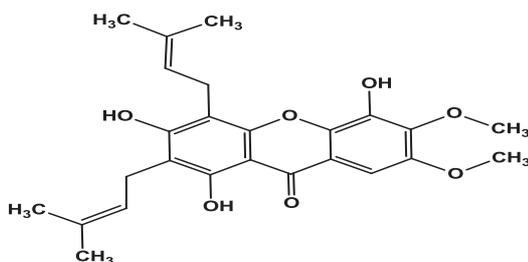
Figure 10: La structure générale et quelques exemples de lignanes (Sainvitu *et al.*, 2012).

#### 1.2.1.4 Les xanthones

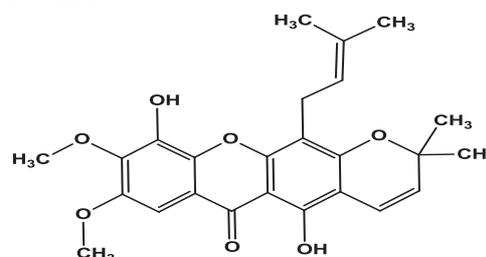
Les xanthones sont des composés polyphénoliques. Ils se trouvent dans des plantes comme la gentiane (*Gentiana lutea*), la swertia (*Swertia sp*) et la mangue (*Mangifera indica*). Il existe plusieurs types de xanthones parmi lesquels: le xanthène-9-one, le globuliférine et le gaboxanthone (figure 11). Ils présentent une variété d'effets bénéfiques dans les organismes vivants: effet antimicrobien, effet anti-tumoral, effet anti-inflammatoire, effet antiseptiques,... (David Hoffmann, 2003).



Le xanthène-9-one



Le globuliférine

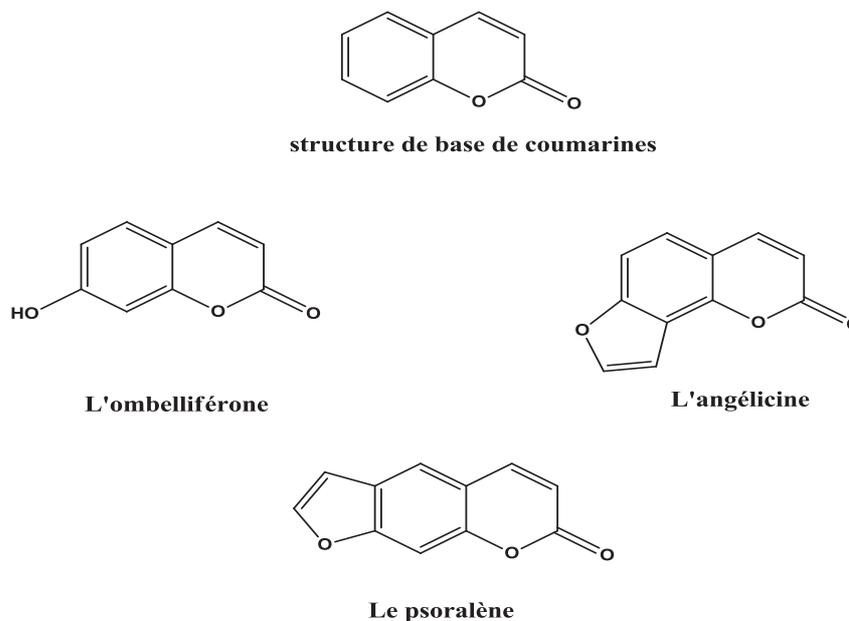


Le gaboxanthone

Figure 11: Quelques exemples de xanthones (Muanda, 2010).

### 1.2.1.5 Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés largement distribués dans le règne végétal. Du point de vue structural, il existe trois classes de composés coumarines: simples hydroxycoumarines tel que l'ombelliférone, les furanocoumarines comme l'angélicine et les pyranocoumarines tel que le psoralène (figure 12) (David Hoffmann, 2003).



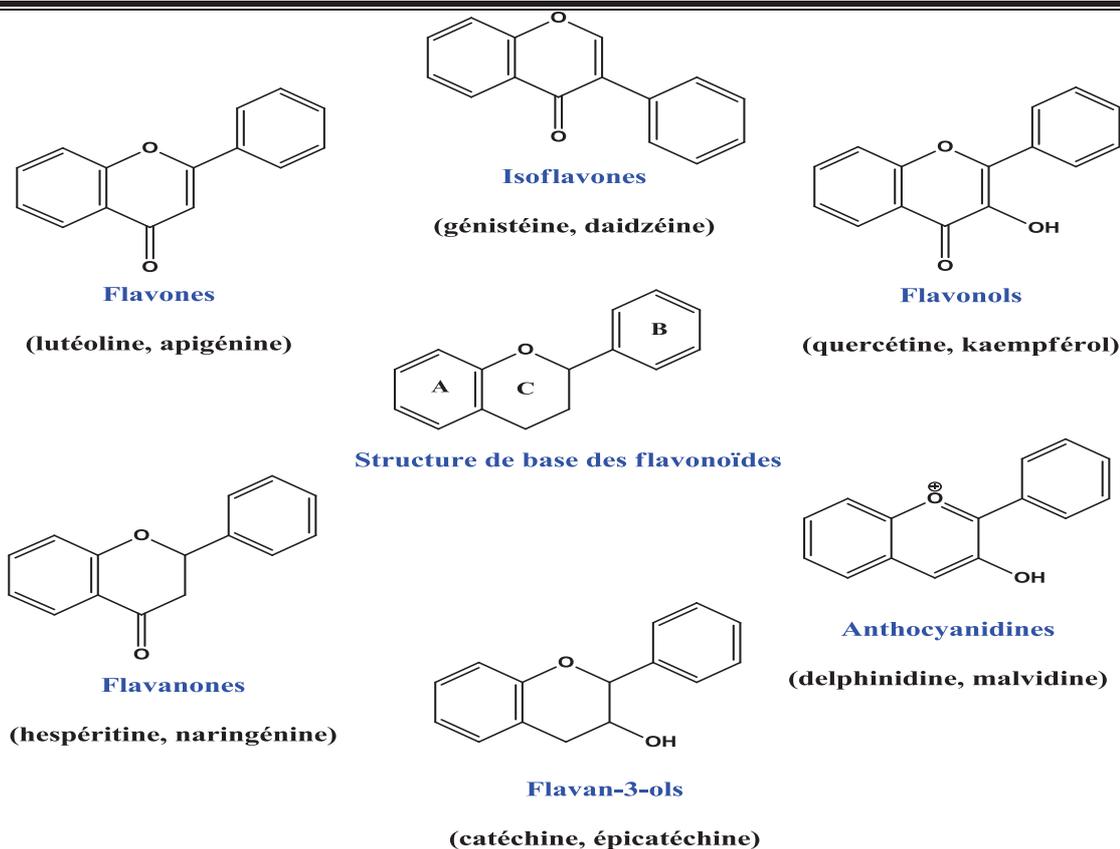
**Figure 12:** La structure de base et quelques exemples de coumarines (David Hoffmann, 2003).

### 1.2.1.6 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005). Ils sont rencontrés principalement dans les fruits, les légumes, le thé et le café (tableau 2).

#### - Structure et classification

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants. Ils constituent en générale de deux noyaux aromatiques reliés par un pont de 3 carbones. La structure de base des flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5, 7. La plupart existent sous forme de glycosides, la nature du sucre variant grandement selon les espèces (Chira *et al.*, 2008). Ils se répartissent en plusieurs familles de composés, dont les plus importantes sont: les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavan-3-ols, les flavanones et les anthocyanidines (Figure 13) (David Hoffmann, 2003).



**Figure 13:** La structure de base de principales classes de flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008).

**Tableau 2:** Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes (Erdman *et al.*, 2007).

Classes de flavonoïdes	Sources alimentaire
<b>Flavonols</b> (la quercétine, le kaempférol et la rutine)	Les oignons, le chou frisé, les poireaux, le brocoli, les pommes, les baies bleues, le thé.
<b>Flavones</b> (lutéoline, apigénine)	Le persil, le céleri.
<b>Flavanones</b> (l'ériodictyol, la naringénine et l'hespéritine)	Dans les agrumes, le jus d'orange contient entre 200 et 600 mg d'hesperidine / L et entre 15 et 85 mg de narirutine / L.
<b>Isoflavones</b> (génistéine, daïdzéine et la glyciteine)	Le soja et ses produits dérivés.
<b>flavan-3-ols</b> (catéchines)	Dans de nombreux fruits tels que le raisin, les thés (vert, noir et oolong), le cacao et le chocolat.
<b>Anthocyanidines</b> (la pélargonidine, la cyanidine, la delphinidine, la péonidine et la malvidine)	Les baies, les raisins, céréales, certains légumes à feuilles et racines comme le chou, les haricots, les oignons et les radis. Les raisins noirs peuvent contenir jusqu'à 600 mg d'anthocyanes / 100 g, et les baies jusqu'à 500 mg / 100 g

### 1.2.2 Les composés phénoliques complexes (tanins)

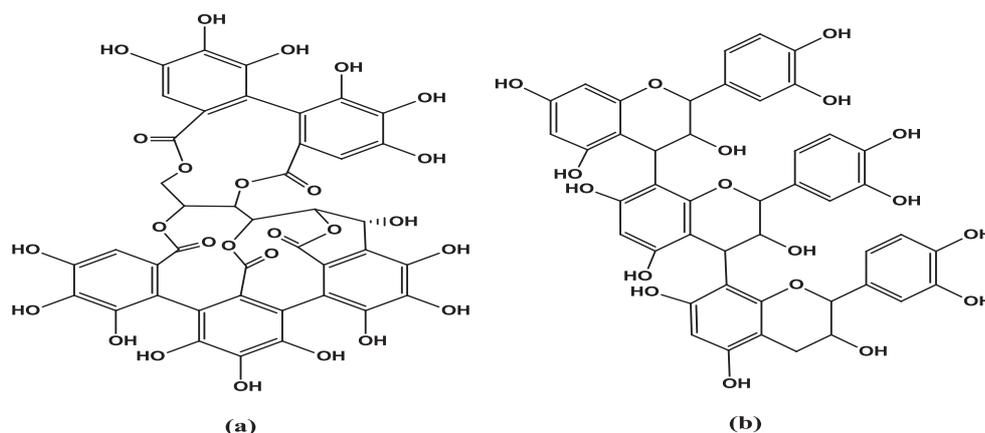
Les tanins sont des formes phénoliques condensées utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines d'où leur capacité à tanner le cuir. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (Macheix *et al.*, 2005).

#### - *Tanins hydrolysables*

Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (Figure 14, a). Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique. Ils sont abondant chez certain arbres en sont des sources industrielles: tannins de chêne et de châtaigner. Parmi ces composés on trouve la castalagine (Macheix *et al.*, 2005).

#### - *Tannins condensés*

Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (Figure 14, b). En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, etc...) et de certaines boissons comme le thé et de l'amertume du chocolat (Macheix *et al.*, 2005).



**Figure 14:** Structure chimique d'un tanin hydrolysable, exemple de la castalagine (a) et d'un tanin condensé, exemple de la proanthocyanidol C1 (b) (Macheix *et al.*, 2005).

### 1.3 Biodisponibilité des composés phénoliques

La biodisponibilité est définie comme étant la fraction réelle d'un composé ou d'un nutriment ingéré qui atteint la circulation sanguine et les sites spécifiques où elle peut exercer son action biologique (Erdman *et al.*, 2007). Les concentrations en composés phénoliques dans la circulation sanguine dépendent de leur métabolisme et de leur absorption depuis le tractus gastro-intestinal. Les polyphénols alimentaires se trouvent le plus souvent sous formes d'esters, de glycosides ou encore de polymères qui ne peuvent être absorbés tels quels. En effet seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamiques sous forme liée tels que l'acide chlorogénique peuvent être

absorbés directement à partir de l'estomac et seuls les aglycones de polyphénols (ex.: les flavanols) et les O- $\beta$ -D-glucosides peuvent être absorbés dans le petit intestin (Day *et al.*, 2003; Manach *et al.*, 2005). Les polyphénols non absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle atteignent le colon et vont subir des modifications structurales médiées par la flore microbienne : hydrolysatation des glycosides et dégradation de l'aglycone en acides phénols simples. Cette étape pourrait être décisive pour l'action biologique des polyphénols car elle produirait certains métabolites actifs. Avant leur passage dans la circulation systémique, les polyphénols qui deviennent sous forme d'aglycones vont encore voir leur structure modifiée par les processus de conjugaisons qui prennent place à la fois dans l'intestin grêle mais surtout dans le foie. Les conjugaisons qui regroupent glucuronidation, sulfation et méthylation représentent une voie commune de détoxification de nombreux xénobiotiques visant à réduire leurs potentiels effets nocifs et permettre leur excrétion facilitée dans la bile ou l'urine en augmentant leur solubilité (D'Archivi *et al.*, 2010). Il est important de souligner que les mécanismes de conjugaison sont très efficaces, et les aglycones libres sont généralement absentes ou présentes dans de faibles concentrations plasmatiques après consommation de doses nutritionnelles (D'Archivi *et al.*, 2010). Une exception concerne les catéchines de thé vert, dont les aglycones peuvent constituer une proportion importante de la quantité totale de plasma (77%, 31% et 21% d'EGCG, d'EGC et d'EC respectivement se trouvent sous forme libre) (Lee *et al.*, 2002). Les formes dimères et trimères de catéchine sont susceptibles également d'être absorbés tandis que les polymères de degré de polymérisation élevé ne peuvent pas être absorbés par la paroi intestinale qu'après leurs dégradation (Hollman, 2001; Erdman *et al.*, 2007).

### 1.4 Propriétés biologiques des composés phénoliques

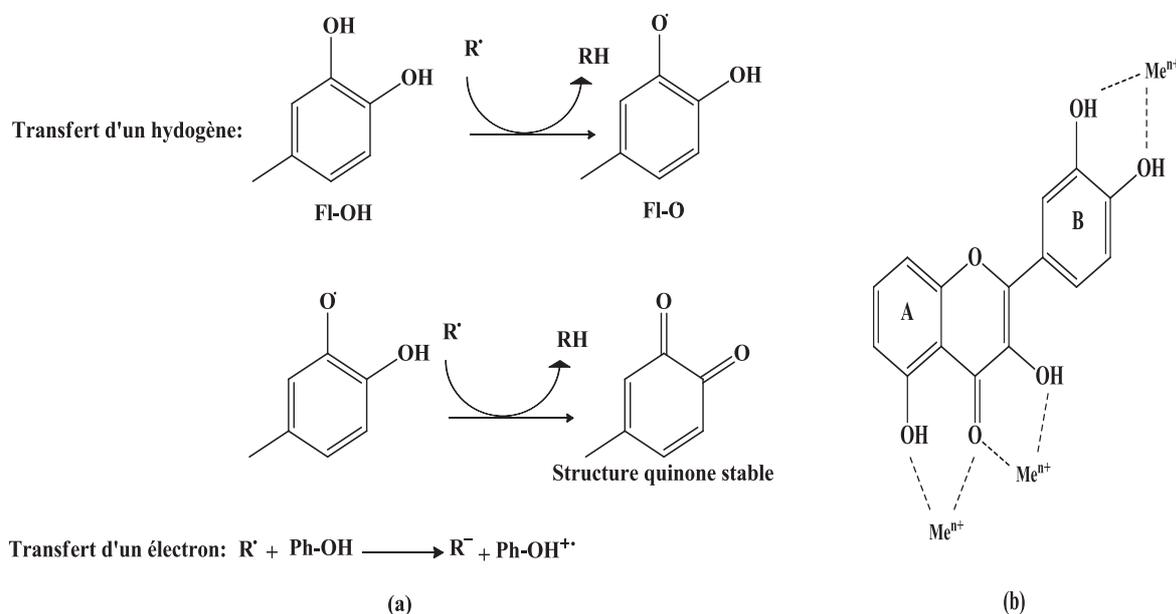
Les composés phénoliques sont caractérisés d'un grand nombre de propriétés biologiques parmi les quelles on citant:

#### - L'activité antioxydante

Les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont très connus par leur propriété antioxydante qui est largement étudiée et qui est fréquemment cité comme étant la propriété clé de la prévention et / ou la réduction du stress chronique qui en lien direct avec des plusieurs maladies. En effet les composés phénoliques peuvent exercer leur activité antioxydante via plusieurs mécanismes. Ils sont capables de piéger directement les ERO grâce à leur groupement hydroxyle, chélater les ions métalliques comme les ions de cuivre et de fer qui sont responsables de la production des ERO (réaction de Fenton) (figure 15), inhiber les enzymes génératrices des ERO comme la myéloperoxydase (MPO), les NADPH oxydases et la xanthine oxydase et aussi de stimuler d'autres enzymes à activité antioxydante comme la catalase et la superoxyde dismutase (Quideau *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013). Ils ont également montré une

action antioxydante synergique par la régénération d'autres antioxydants puissants tels que l' $\alpha$ -tocophérol (Quideau *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013).

La neutralisation ou la stabilisation des ERO par les composés phénoliques peut s'effectuer soit par le transfert d'hydrogène soit par le transfert d'un électron à l'ERO. Le radical aryloxy ( $\text{Ph-O}^\bullet$ ) formé après le transfert de l'hydrogène à l'ERO peut réagir avec un autre ERO pour former une structure quinone stable, alors que le radical aryloxy ( $\text{Ph-OH}^{\bullet+}$ ) formé après le transfert d'un électron à l'ERO est cationique et stable (figure 15) (Kumar *et al.*, 2013). Il a été montré que les polyphénols du thé vert sont des antioxydants très puissants. Elles sont capables de piéger les ERO en générant des radicaux phénoliques plus stables. En raison de leur concentration élevée dans le thé et de leur structure, les catéchines sont les polyphénols de thé les plus étudiés. Elles sont capables de piéger plusieurs ERO comme l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), les radicaux peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) et hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Forester *et al.*, 2011).



**Figure 15:** Piégeage des ERO ( $\text{R}^\bullet$ ) par transfert d'un hydrogène (exemple de flavonoïdes, Fl) ou par transfert d'un électron (a) et les sites de chélation des ions métalliques ( $\text{Me}^{n+}$ ) par les composés phénoliques (Ph) (b) (Quideau *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013).

#### - L'activité antibactérienne, antifongique et antivirale

Un grand nombre d'études montre que les composés phénoliques sont caractérisés par des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales (Li *et al.*, 2014). Plusieurs flavonoïdes comprenant l'apigénine, la galangine, les flavones, les flavonols, les isoflavones, les flavanones et les chalcones possèdent une activité antibactérienne puissante. Leur mode d'action peut être lié à leur capacité de former des complexes avec des protéines par des forces non spécifiques telles que la liaison hydrogène conduisant à l'inactivation des adhésines microbiennes, des enzymes et des protéines de transport d'enveloppe cellulaire (Kumar *et al.*, 2013). Il a été montré que les

polyphénols de thé peuvent réduire significativement la résistance à la chaleur des spores de *Bacillus stearotherophilus* et de *Clostridium thermoaceticum*. L'épigallocatechine-3-gallate a montré aussi des effets antimicrobiens contre une variété de pathogènes. Plusieurs flavonoïdes incluant les catéchines peuvent inhiber le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En plus, les polyphénols ont présentés un effet synergique avec les antibiotiques. La combinaison de ces deux agents peut retarder le développement de la résistance car l'effet antibactérien est atteint avec de plus faibles concentrations de médicaments (Li *et al.*, 2014).

### - L'activité anti-inflammatoire

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les composés phénoliques sont des agents anti-inflammatoires très intéressants. Ils inhibent l'inflammation par la modulation de la fonction de plusieurs enzymes et molécules clés du processus de l'inflammation. L'acide hydrocaféique, dihydroxyphénylacétique et hydroferulique présentent des effets anti-inflammatoires importants, ils peuvent inhiber plus de 50% de production de prostaglandine E-2. Un certain nombre de flavonoïdes tels que l'hespéridine, l'apigénine, la lutéoline et la quercétine peuvent affecter spécifiquement la fonction des systèmes enzymatiques impliqués dans la génération de processus inflammatoires (Kumar *et al.*, 2013). La consommation de polyphénols de thé vert a entraîné une diminution des taux de marqueurs de l'inflammation et des cytokines pro-inflammatoires dans la peau et les tumeurs cutanées de souris exposées aux UV. Les catéchines peuvent exercer des effets anti-inflammatoires par divers mécanismes différents, y compris la modulation des isoformes de l'oxyde nitrique synthase (Li *et al.*, 2014).

### - L'activité anticancéreuse

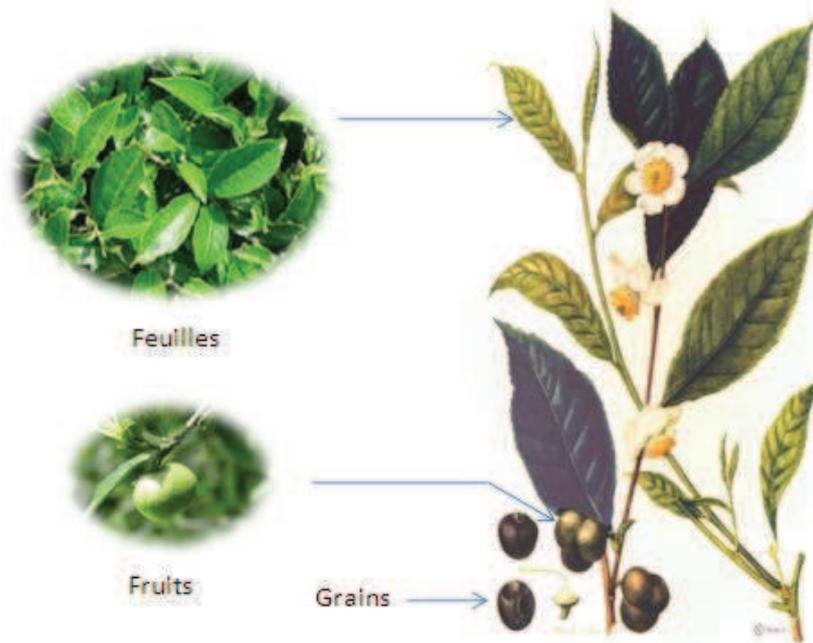
Les composés phénoliques naturels jouent un rôle important dans la prévention et le traitement du cancer. Les effets anticancéreux des polyphénols ont été observés dans plusieurs organes incluant l'estomac, le duodénum, le côlon, le foie, les poumons, la glande mammaire, la peau et la prostate. De nombreux polyphénols, tels que les proanthocyanidines, les flavonoïdes, le resvératrol, les tanins, l'épigallocatechine-3-gallate, l'acide gallique et l'anthocyanine, ont été testés; tous ont montré des effets anticancéreux et protecteurs bien que leurs mécanismes d'action se soient avérés différents. En effet les composés phénoliques peuvent inhiber l'expression de la protéine p53 mutante induisant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire, bloquer les voies de signalisation cellulaire et inhiber les protéines de choc thermique (Kumar *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

## 2. Le thé vert

Le thé est la boisson la plus consommée au monde après l'eau. Plus de 300 différents types de thé sont produits à partir des feuilles de la plante *Camellia sinensis* par différents procédés de fabrication. Généralement, ils sont divisés en trois types: le thé vert (non fermenté), le thé Oolong (partiellement fermenté) et le thé noir (fermenté). Environ 78% des thés produits est de thé noir, tandis que le thé vert, principalement consommé en Chine et au Japon, représente environ 20% et le thé Oolong représente environ 2% de la production. Le thé est considéré comme native du sud de la Chine mais maintenant il est cultivé dans de nombreux autres pays comme l'Inde, le Japon, le Sri Lanka, l'Indonésie et l'Afrique centrale (Sang *et al.*, 2011). La boisson de thé vert est une infusion des feuilles séchées de la plante *Camellia sinensis*. Après la cueillette, les feuilles du théier sont flétries, puis roulées pour extraire les sucs, puis chauffées afin de neutraliser les enzymes responsables de l'oxydation des polyphénols. Elles subissent enfin un séchage final. Le chauffage s'effectue selon deux méthodes principales : la méthode chinoise utilise des bassines de cuivre placées sur le feu, alors que les Japonais passent les feuilles à travers des jets de vapeur (Wang *et al.*, 2000).

### 2.1 Description de la plante *Camellia sinensis*

La plante *Camellia sinensis* est un genre de plantes à fleurs dans la famille des Theaceae. Il s'agit d'un arbuste à feuilles persistantes ou petit arbre qui habituellement taillés à moins de deux mètres lorsqu'il est cultivé pour ses feuilles, mais il peut atteindre 10 à 15 mètre pour certains variétés. Les fleurs du théier sont blanches à jaune clair, et mesurent entre 2.5 et 4 cm de diamètre, avec 7 à 8 pétales. Les fruits sont des capsules de 1.5-3 cm de diamètre environ. Les graines peuvent être pressées pour donner une huile. Les feuilles ont une forme allongée, elliptique longues de 4-15 cm de long et 2-5 cm de large (figure 16). Les jeunes feuilles de couleur vert clair sont de préférence récoltées pour la production de thé. Les feuilles plus vieilles sont plus vertes. Différents âges des feuilles produisent des qualités de thé différentes, car leurs compositions chimiques sont différentes. Habituellement, la pointe (bourgeon) et les deux à trois premières feuilles sont récoltées pour le traitement. Cette cueillette manuelle est répétée chaque 1 à 2 semaine (Namita *et al.*, 2012).



**Figure 16:** La plante *Camellia sinensis* (Namita *et al.*, 2012; Huang, 2000).

## 2.2 Classification botanique de la plante *Camellia sinensis*

La plante *Camellia sinensis* appartient à la famille botanique de Theaceae qui fait partie de l'ordre Ericales dans la classe Magnoliopsida dans le règne Plantae (Namita *et al.*, 2012; Preedy, 2012):

**Règne:** Plantae

**Sous-Règne:** Viridiplantae

**Super-Division:** Embryophyta

**Division:** Tracheophyta

**Classe:** Magnoliopsida

**Super-Ordre:** Asteranae

**Ordre:** Ericales

**Famille:** Theaceae

**Genre :** *Camellia*

**Espèce :** *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze

Il existe plusieurs variétés de la plante *Camellia sinensis* parmi les quelles *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Camellia sinensis* var. *assamica*, *Camellia sinensis* var. *dehungensis* et *Camellia sinensis* var. *pubilimba*. Le thé vert commercial est principalement produit par les deux premières variétés: *Camellia sinensis* var. *sinensis* ou Théier de Chine, caractérisé par des petites feuilles (de

3 à 10 cm) rigides et mates, cultivé essentiellement en Chine et au Japon pour la production de thé vert, et *Camellia sinensis* var. *assamica* ou Théier d'Assam, caractérisé par des feuilles brillantes, claires, souples et grandes (jusqu'à 20 cm) à texture assez épaisse, cultivé et utilisé essentiellement pour la production de thé noir en Inde, à Ceylan (ou Sri Lanka), en Indonésie et en Afrique (Preedy, 2012).

### 2.3 Composition chimique de thé vert

Le thé contient environ 4000 composés bioactifs mais en effet sa composition chimique varie selon le climat, la saison, les pratiques horticoles, la variété et l'âge des feuilles. Dans la fabrication du thé vert, les feuilles sont chauffées pour inactiver les enzymes responsables de l'oxydation des polyphénols et séchées pour préserver leurs constituants. Sa composition chimique par conséquent contrairement aux autres types de thé (noir et Oolong) est similaire à celle des feuilles fraîches de la plante (Harbowy *et al.*, 1997; Namita *et al.*, 2012).

#### 2.3.1 Les polyphénols

Les polyphénols sont considérés comme l'un des composés les plus bénéfiques du thé vert pour la santé de ses consommateurs. Sa concentration détermine la qualité du thé. Il s'agit principalement des flavonoïdes (30 % de la matière sèche des feuilles) qui sont principalement des flavanols (catéchines) et dans une moindre mesure des flavonols de flavone en plus de des proanthocyanides (Balentine *et al.*, 1997).

##### - Flavan-3-ols "catéchines"

Les catéchines se trouvent majoritairement dans le thé vert, alors que dans les autres types tels que les thé oolong et noir ils s'oxydent lors la fermentation et se trouvent avec des quantités beaucoup plus faibles (Ananingsih *et al.*, 2013). Dans une infusion typique de thé vert préparée par 2.5 g de thé vert dans 250 ml d'eau chaud infusé pendant 3 min, les catéchines représentent 30 à 42% de l'ensemble des composés (Balentine *et al.*, 1997). Les quatre principaux catéchines sont: l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), (-)-épigallocatechine (EGC), (-)-épicatechine gallate (ECG) et (-)-épicatechine (EC) (figure 17). L'EGCG est la catéchine majeure dans le thé, constitue 50 à 80% de catéchines totaux. D'autres catéchines comme gallocatechine-3-gallate (GCG), catéchine (C), catéchine-3-gallate (CG) et gallocatechine(GC) sont aussi identifiés dans le thé vert mais avec des petites quantités (Sang *et al.*, 2011).

##### - Flavonols et flavones

Les flavonols, y compris la quercétine, le kaempférol, la myricétine et leurs glycosides (mono-, di- et tri-), sont également présents dans le thé. Ils constituent environ 0.5 à 2.5% d'extrait dans les infusions. L'apigénine et ses glycosides sont les seules flavones identifiées dans le thé. Ils représentent une très faible fraction de polyphénols (figure 17). Plus récemment, 19

flavonols O-glycosylés, 7 flavones C-glycosylées, 28 flavonols glycosylés acylés et 3 flavonols ont été également identifiés (Sang *et al.*, 2011).

### - Les tanins

Les tanins hydrolysables tels que le camelliatannine A et les tanins condensés (proanthocyanidines) sont également présents dans le thé mais avec des quantités très faibles par rapport aux flavan-3-ol (figure 17) (Harbowy *et al.*, 1997).

#### 2.3.2 Les acides phénoliques

L'acide gallique et son ester d'acide quinique (la théogalline) sont les principaux acides phénoliques trouvés dans le thé. L'acide chlorogénique, l'acide 4-coumarylquinique, l'acide cinnamique, les acides coumaroyl et caféoyl-quinique ont été également identifiés (figure 17) (Harbowy *et al.*, 1997).

#### 2.3.3 Les méthylxanthines

Les méthylxanthines tel que la caféine, la théophylline et la théobromine sont des alcaloïdes présents dans quelques aliments tels que le café, le cacao et le thé. La caféine représente la méthylxanthine principale du thé suivie par la théobromine en quantités beaucoup plus petites (figure 17). Dans une infusion de thé, environ 2 à 5% des composés solubles est de caféine, alors que seulement de très petites quantités de théobromine et de théophylline sont déterminés (Harbowy *et al.*, 1997).

#### 2.3.4 Les acides nucléiques

L'ARN et l'ADN des feuilles de thé sont métabolisés naturellement et digérés dans les conditions de flétrissement et de fermentation par les nucléases de thé. Ces réactions cataboliques produisent des purines qui ont été détectées en très petites quantités dans le thé (Harbowy *et al.*, 1997).

#### 2.3.5 Les acides aminés et les protéines

Dix-huit acides aminés sont identifiés dans le thé vert. Ils constituent environ 6% de matière solide de thé. Les peptidiques sont également identifiés et ils constituent environ 6% d'extrait solide. En plus des acides aminés courants, la theanine est un acide aminé identifié uniquement dans le thé. Elle améliore la saveur de thé et module les effets stimulants de la caféine (figure 17) (Harbowy *et al.*, 1997).

### **2.3.6 Glucides, pectines et fibres et acides organiques**

Les feuilles de thé contiennent des résidus de sucre libres en plus des substances pectiques, des polysaccharides et des fibres. Les glucides représentent environ 11% d'extrait solide de thé. Le thé est une source aussi importante d'acide oxalique, d'acide malique, ainsi que des acides citrique, isocitrique et succinique (Harbowy *et al.*, 1997).

### **2.3.7 Lipides, chlorophylles, caroténoïdes et composés apparentés**

Les chlorophylles et les caroténoïdes sont les principaux pigments des feuilles fraîches de thé. Ils ont un impact important sur le goût de thé. Les lipides, les terpénoïdes et les saponines forment une grande partie de la feuille fraîche. Les stéroïdes et les lipides constituent une fraction importante de la crème de thé. En générale, les lipides représentent environ 3 à 4% de poids d'une feuille de thé (Harbowy *et al.*, 1997).

### **2.3.8 Les polyamines**

Polyamines comme le spermidine et le spermine sont également identifiés dans le thé (figure 17). La quantité de ces composés est variée selon le type de thé. Elle est de 63 mg/g dans les feuilles de thé noir et de 123 mg/g dans feuilles de thé vert (da Silva Pinto, 2013).

### **2.3.9 Minéraux et vitamines**

Le thé est riche en potassium et contient des quantités importantes de calcium et de magnésium, ainsi que de petites quantités de manganèse, de fer, de phosphore, de cuivre, de nickel, de sodium, le zinc et le soufre. Les boissons de thé sont également une source significative de fluorure et de l'aluminium. La vitamine C a également été détectée dans le thé vert (Harbowy *et al.*, 1997).

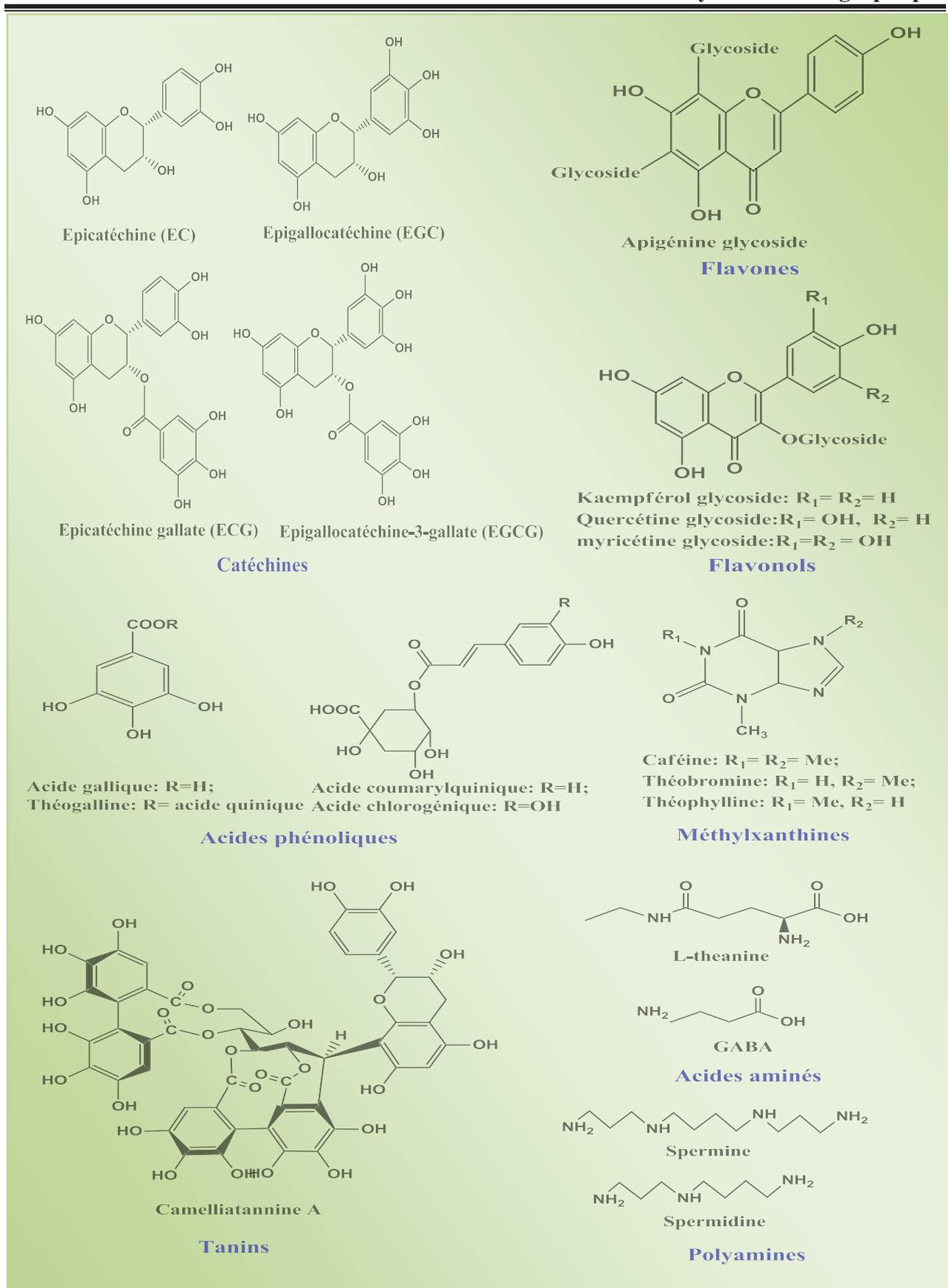


Figure 17: Structures chimiques des principaux composés de thé vert (Harbowy *et al.*, 1997; Sang *et al.*, 2011; Davalli *et al.*, 2012).

## 2.4 Activité anticancéreuse des polyphénols du thé vert dans la prostate

L'activité anticancéreuse du thé vert est largement analysée dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. Il a été montré que cette activité est contribué principalement aux polyphénols qui peuvent inhiber la tumorigénèse et la progression tumorale dans différents organes incluant la prostate. Ces composés et plus particulièrement les catéchines peuvent affecter l'activité enzymatique et moduler les voies de signalisation cellulaires et par conséquent inhibe la prolifération, l'invasion cellulaire et le développement du cancer (Davalli *et al.*, 2012).

### 2.4.1 Les mécanismes d'action des catéchines dans les lignées cellulaires de cancer de la prostate

Les catéchines du thé vert peuvent exercer plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de la formation et de la progression du cancer. Ci-dessous, nous rapportons les principaux mécanismes d'action des catéchines observés dans certaines lignées cellulaires du cancer de la prostate:

#### - L'inhibition de la prolifération et arrêt du cycle cellulaire

Les catéchines peuvent inhiber la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques via la dérégulation du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (Gupta *et al.*, 2000). Cet effet a été observé *in vitro* dans les cellules épithéliales immortalisées de la prostate SV-40 (PNT1a), dans les cellules androgène-dépendantes (LNCaP) et aussi dans les cellules androgène-indépendantes (PC3, DU145), tandis que les cellules épithéliales prostatiques humaines normales ne sont pas affectées même lorsque la dose administrée est élevée (Gupta *et al.*, 2000; Caporali *et al.*, 2004). La IC<sub>50</sub> de l'EGCG est comprise entre 40 et 200 µM, en fonction du type de lignée cellulaire (LNCaP < PNT1a < DU145 < PC3), ainsi que la durée de l'expérience (Albrecht *et al.*, 2008). Il a été montré que le traitement de LNCaP et DU145 par EGCG provoque une stimulation des inhibiteurs de cycline kinase en phase G1, qui à leur tour, inhibent la kinase dépendante de cycline (CDK) fonctionnelle en phase G0 / G1, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire, conduisant à la mort cellulaire apoptotique, indépendamment de l'état cellulaire de p53 (mutée ou active) (Gupta *et al.*, 2000).

#### - L'apoptose

L'EGCG induit l'apoptose dans les cellules LNCaP principalement par la stabilisation de p53 par une phosphorylation spécifique et par une régulation négative de l'activité de NFκB, ce qui entraîne une réduction de l'expression de la protéine proapoptotique Bcl2. La stabilisation de p53 induite par EGCG provoque une régulation de WAF1 / p21 et Bax; produisant un changement dans le rapport Bax / Bcl2 en faveur de l'apoptose (Hastak *et al.*, 2003).

### - Effets anti-oxydants ou prooxydants

Grâce à leur activité antioxydante, les catéchines sont capables de piéger les ERO et de chélate les métaux de transition, produits pendant toutes les phases de carcinogenèse (Siddiqui *et al.*, 2007). En plus l'EGCG peut activer l'EpRe, présent dans la région promotrice de nombreux gènes impliqués dans la réponse cellulaire au stress oxydatif et induire la phosphorylation de Nrf2. Ce dernier qui est un facteur de transcription joue un rôle central dans la réponse antioxydante permettant l'activation des enzymes antioxydantes (Na *et al.*, 2008). Cependant, les catéchines peuvent également être une source de génération des ERO dans les cellules cancéreuses, induisant un stress oxydant et, par conséquent, activant les voies apoptotiques. Aussi bien, l'EGCG inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose dans la lignée cellulaire DU145, en augmentant la formation des ERO conduisant à la dépolarisation mitochondriale et à l'apoptose. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore clairs, l'apoptose induite n'est pas liée aux membres de la famille Bcl2, car EGCG n'a pas altéré l'expression de Bcl2, dans cette lignée cellulaire (Chung *et al.*, 2001).

### - Modulation de la signalisation NFκB et inhibition des voies d'inflammation.

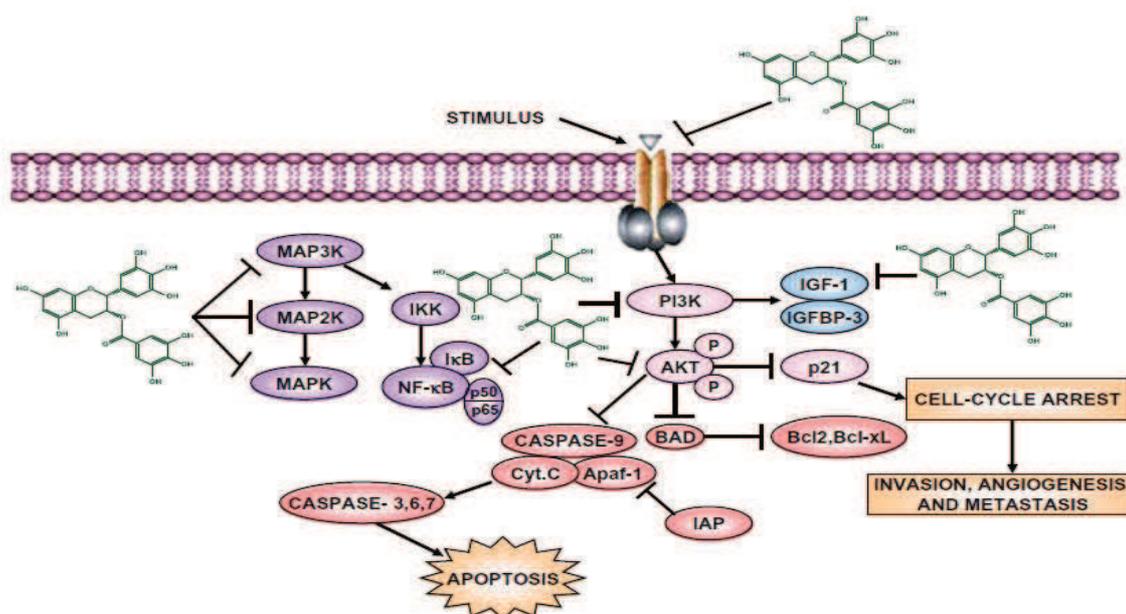
Le NFκB est un facteur de transcription sensible à l'oxydo-réduction, souvent surexprimé dans les lignées cellulaires cancéreuses. L'EGCG diminue la liaison de NFκB à l'ADN et réduit l'expression de sa sous-unité p65 dans des cellules LNCaP (figure 18). La surexpression NFκB est une cible importante dans le cancer de la prostate en raison de la réglementation de diverses cibles en aval qui comprennent les protéines cyclooxygénase-2 (COX-2) (Hastak *et al.*, 2003).

### - Effet sur le récepteur d'androgène (RA) et Antigène spécifique de la prostate (PSA).

L'EGCG est un antagoniste direct de l'action des androgènes (figure 18). Elle est capable d'interagir physiquement avec le domaine de la liaison du ligand de RA en remplaçant le ligand par une affinité élevée (IC50: 0.4 μM) (Siddiqui *et al.*, 2011). Dans les lignées cellulaires de LNCaP, l'EGCG supprime la prolifération cellulaire, l'expression de PSA et l'activité transcriptionnelle du RA, à une concentration comprise entre 10 et 20 μM (Chuu *et al.*, 2009). L'effet sur l'expression du PSA pourrait être lié à la réduction de l'activité du RA, mais il faut également noter que l'EGCG, *in vitro*, peut diminuer l'expression de PSA par une action directe sur les mécanismes de transcription et de traduction (Pezzato *et al.*, 2004).

## - Inhibition du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) et les voies de signalisation cellulaire

L'axe IGF joue un rôle important dans l'apparition et le développement du cancer de la prostate. La liaison de l'IGF1 à son propre récepteur active les voies de signalisation cellulaire MAPKs et PI3K (la phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT, qui régulent plusieurs processus cellulaires comme la prolifération, la survie / la mort, et la motilité, habituellement altérée dans la carcinogenèse. Ces deux voies se trouvent up-régulés dans le cancer de la prostate. Il a été rapporté que l'EGCG peut inhiber l'activité des récepteurs de l'IGF-1 avec une IC50 de 14  $\mu\text{M}$  (Li *et al.*, 2007) et que le traitement des cellules DU145 et LNCap avec des doses de l'EGCG réduit également le taux l'IGF lui-même (Thomas *et al.*, 2009). L'EGCG est capable aussi de diminuer directement les niveaux de PI3K et d'Akt phosphorylé (figure 18). Ces effets observés induisent la régulation négative des voies de signalisation et par conséquent l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques (Siddiqui *et al.*, 2004).



**Figure 18:** Effet des catéchines du thé vert, EGCG sur la modulation de diverses voies de signalisation cellulaire (Khan *et al.*, 2008).

### 2.4.2 La chimioprévention du cancer de la prostate par les polyphénols du thé vert dans les modèles des souris transgéniques

Plusieurs études précliniques réalisées chez des animaux transgéniques et des modèles de tumeurs xéno greffes ont confirmés les propriétés anti-tumorales des catéchines de thé vert et suggèrent l'importance d'identifier leur chimioprévention chez les humains. L'étude expérimentale réalisée par Gupta *et al.*, a montré un retard significatif de l'incidence des tumeurs primitives de la prostate et une inhibition presque complète des métastases accompagnée d'une augmentation

significative de la survie chez les souris transgéniques TRAMP traitées par 0.1% d'infusion orale d'un mélange enrichi à 95% de catéchines du thé vert (Gupta *et al.*, 2001). Une autre étude a montré une diminution significative de l'IGF, accompagnée d'une inhibition de la cascade de signalisation impliquant à la fois les voies PI3K / AKT et MAPKs et une inhibition parallèle du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et des métalloprotéinases de matrice chez les souris TRAMP traitées par catéchines (Adhami *et al.*, 2004). Le traitement des souris TRAMP par EGCG pendant 32 semaines réduit également l'activité de la voie NFκB et change l'équilibre entre Bax et Bcl2 en faveur de l'apoptose (Siddiqui *et al.*, 2008). Harper *et al.*, trouvent aussi que l'administration de 0.06% d'EGCG au souris réduit significativement la prolifération cellulaire par apoptose et les niveaux de RA, de l'IGF1 et de son récepteur. Cette étude a montré également que l'EGCG ne peut inhiber que la prolifération du cancer de la prostate chez les souris à un stade précoce mais pas à des stades avancés (Harper *et al.*, 2007).

### **2.4.3 L'effet chimiopréventif possible des polyphénols de thé vert sur le cancer de la prostate chez les humains**

En effet le cancer de la prostate est considéré comme un candidat idéal pour la chimioprévention car il a une prévalence élevée, une longue période de latence, et il est potentiellement mortelle. Les stratégies de prévention pourraient avoir un avantage économique élevé sur la santé publique et un impact positif profond sur la qualité de vie des patients (Davalli *et al.*, 2012). Plusieurs études épidémiologiques ont analysé la relation entre la consommation de thé vert et le risque du cancer de la prostate. Cependant les résultats sont actuellement contradictoires. La plupart des études trouvent que la consommation de thé vert peut réduire significativement le risque du cancer de la prostate (Jian *et al.*, 2004; Kurahashi *et al.*, 2008). Alors que d'autres études trouvent qu'il n'a pas une association entre la consommation de thé vert et le cancer de la prostate (Allen *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2006).

Il n'y a eu que quelques études d'intervention évaluant l'effet du thé vert sur le traitement ou la prévention du cancer de la prostate chez les humains et seulement peu entre eux ont trouvé des résultats encourageants (Bettuzzi *et al.*, 2006; McLarty *et al.*, 2009). Aucun effet n'a été observé dans l'étude de Choan *et al.*, (2005) qui visant à évaluer l'effet d'un extrait de thé vert (250 mg GTC / jour) sur le taux de PSA chez des patients atteints du cancer de la prostate résistant à la castration. Une autre étude dans le même objectif trouve également des résultats négatifs. Au cours des 6 mois de suivi, seulement un seul patient, parmi 42, a manifesté une baisse transitoire de 50% du taux de PSA (Jatoi *et al.*, 2003).

**ETUDE 1:**

**Etude Epidémiologique cas-témoins « la relation entre l'âge, les habitudes alimentaires, le mode de vie, les antécédents familiaux et le risque de cancer de la prostate dans la population de l'Est-Algérien »**

Le cancer de la prostate est constitué un problème de santé publique chez les hommes dans le monde entier. Il est classé en deuxième rang juste après le cancer du poumon, avec 1.1 million nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2012 (Center *et al.*, 2010). Sa incidence varie plus de 25 fois dans le monde; elle était très élevée en Australie / Nouvelle-Zélande (111.6 cas / 100,000), Amérique du Nord (97.2 cas / 100,000), Europe occidentale (85.8 cas / 100,000) et septentrionale (85.0 cas / 100,000), relativement élevée dans certaines régions telles que les Caraïbes (79.8 cas / 100,000), l'Afrique du Sud (61.8 cas / 100,000) et en Amérique du Sud (60.1 cas / 100,000), alors qu'elle était faible dans la population asiatique avec des taux estimés de 10.5 cas / 100,000 et 4.5 cas / 100,000 en Asie (Centre et Sud-est) (Ferlay *et al.*, 2013). En Algérie, selon la base de données GLOBOCAN 2012, le cancer de la prostate était le quatrième cancer le plus fréquent (8.8 cas / 100,000) et la sixième cause de décès (4.9 décès / 100,000) chez l'homme (Ferlay *et al.*, 2013). Comparant aux autres pays du monde, l'incidence de cancer de la prostate en Algérie est considérée comme faible par rapport à certains pays occidentaux comme la Norvège et la Suède (129.7 et 119 cas diagnostiqués et environ 18 décès pour 100 000, respectivement), mais il est resté élevé par rapport à de nombreux pays asiatiques, en particulier la Chine, la Corée et le Bhoutan (5.3, 3.2 et 1.2 cas diagnostiqués et de 2.5, 1.3 et 0.7 décès pour 100,000, respectivement) (Ferlay *et al.*, 2013).

L'incidence de cancer de la prostate est faible dans les pays asiatiques par rapport aux pays industrialisés occidentaux. Mais de nombreuses études épidémiologiques ont trouvé que cette incidence augmente rapidement chez les populations de migrants asiatiques qui ont assimilé l'alimentation et le mode de vie occidentaux, remplaçant la consommation de soja, de thé, de poissons, de fruits et de légumes par la consommation de viande rouge et les aliments riches en matières grasses (Namiki *et al.*, 2010). En outre, une étude menée en Australie occidentale a décrit que le risque de cancer de la prostate et en particulier la forme agressive qui augmente significativement chez environ 80% des hommes consommant un régime de style occidental (Ambrosini *et al.*, 2008). Ces données expriment le rôle direct des facteurs d'environnement surtout l'alimentation et le mode de vie sur le développement et la progression de cancer de la prostate, indépendamment des facteurs génétiques. Beaucoup d'études épidémiologiques surtout cas-témoin trouvent que certains facteurs alimentaires comme les graisses saturées d'origine animale (Giovannucci *et al.*, 1993), les produits laitiers (Tseng *et al.*, 2005) et les viandes rouges (Gann *et al.*, 1994) peuvent augmenter le risque du cancer de la prostate, alors que la consommation des légumes et des fruits (Deneo-Pellegrini *et al.*, 1999), des poissons (Augustsson *et al.*, 2003) et de thé vert (Jian *et al.*, 2004) peuvent avoir un effet préventif important.

Dans la présente étude nous avons examiné pour la première fois la relation entre l'âge, les habitudes alimentaires incluant la consommation de thé vert, les antécédents familiaux de cancer de la prostate, la consommation de l'alcool, le tabagisme et le risque de cancer de la prostate chez une population de l'Est Algérien.

## **1. MATERIELS ET METHODES**

### **1.1 Recrutement des individus**

#### **- Les cas**

Une étude épidémiologique cas-témoins sur un échantillon représentatif d'une population de l'Est Algérien, est réalisée durant une période s'étale entre 2011 et 2014. Tous les nouveaux et les anciens malades diagnostiqués avec un cancer de la prostate et suivis dans le service d'urologie dans la Clinique d' Urologie Néphrologie et de Transplantation Rénale Daksi – Constantine sont invités à participer dans l'étude. Parmi 100 patients invités, un patient a refusé de participer et neuf étaient trop malades pour être déplacés à la clinique et interrogés. A la fin de la période d'étude, la cohorte étudiée est constituée de 90 patients avec une moyenne d'âge de  $70.90 \pm 6.97$  ans et une moyenne d'âge de diagnostic de cancer de la prostate de  $68.87 \pm 0.73$ , allant de 50 à 88 ans.

#### **- Les témoins**

Les témoins sont sélectionnés suivant plusieurs critères. C'étaient des hommes, résidant dans la même zone géographique des patients, avec un âge dans le même intervalle d'âge de diagnostic de cancer de la prostate chez les malades. Ils présentent ni le cancer de la prostate ni des maladies ou des désordres associés comme l'hypertrophie bénigne de la prostate, la prostatite ou le néoplasie intraépithéliale (PIN). Les patients avec d'autres tumeurs malignes sont également exclus de cette étude. Parmi 200 hommes sélectionnés, 10 ont refusé de participer pour différentes raisons. Notre groupe témoin est constitué à la fin de 190 hommes avec une moyenne d'âge de  $67.13 \pm 0.72$ , allant de 50 à 88 ans. 61 hommes ont été traités à l'hôpital pour certaines maladies urologiques (35 avaient des calculs rénaux, 25 avaient une infection urinaire et 10 avaient d'autres maladies), 14 étaient des hommes du personnel de l'hôpital invités à participer et 115 étaient des hommes sélectionnés dans la salle de prélèvement sanguin du laboratoire de biochimie dans l'établissement public hospitalier (EPH) de la daïra de Chelghoum Laïd.

### 1.2 Collecte des données

La collecte des données a été réalisée au moyen d'un questionnaire de la fréquence des aliments (FFQ: food frequency questionnaire), bien étudié et structuré marche avec le but de l'étude (annexe 1). Ce questionnaire a été préparé après la réalisation d'une vaste recherche bibliographique et la détermination des principaux facteurs de risques et de prévention probables de cancer de la prostate cités par différentes études sur différentes populations.

La première section du questionnaire renferme:

- ▶ des informations personnelles (date et lieu de naissance, adresse, poids, taille, travail ou anciens travail et niveau d'éducation),
- ▶ maladies actuelles ou anciennes,
- ▶ des informations médicales concernant le cancer de la prostate (âge de diagnostique de la maladie, valeur de PSA, stade de la maladie, traitement médicamenteux, ...).

Les informations médicales comme le score de Gleason, le taux de PSA au début du diagnostic et le traitement primaire utilisé pour chaque cas sont ensuite complétées et collectées correctement à partir des dossiers médicaux des patients.

Le questionnaire pose ensuite des questions sur les habitudes alimentaires, les antécédents familiaux de cancer de la prostate et les habitudes toxiques (alcool et tabac). Pour une meilleure collection des données tous les questionnaires ont été remplis face à face avec les cas et les témoins.

La partie du questionnaire concernant les habitudes alimentaires comporte des questions sur la fréquence de consommation de différents produits alimentaires au cours des dernières années. Les différents items utilisés sont les suivants:

- Le nombre de repas consommé par jour.
- Le type de repas consommé (traditionnels ou de fast-food), en utilisant la question «quel le type de repas le plus consommé?».
- La consommation de poisson et de la viande rouge (moutons et veaux), en utilisant la question «combien de fois par semaine ou par mois?».
- La consommation de matières grasses d'origine animales, en utilisant les expressions «jamais, petite, moyenne ou grande partie».
- La consommation de produits laitiers (lait, fromage et yogourt), en utilisant les expressions «petite, moyenne ou grande partie». Une petite partie signifie la consommation seulement d'une tasse de lait ou d'autres produits (fromage, yaourt ..) par jour, une partie moyenne

signifie la consommation d'une tasse de lait avec un autre produit (fromage, yaourt ..) par jour, et une grande partie signifie plus de 2 tasses de lait par jour et / ou avec une grande quantité d'un autre produit (fromage, yaourt ..).

- La consommation totale des fruits et des légumes, en utilisant la question «combien de fois par semaine ?».
- La consommation de thé vert, en utilisant la question «combien de tasse par jour ?».

Pour les antécédents familiaux de cancer de la prostate, en utilisant la question «avez vous un membre de la famille: père, grand-père, frère, fils, oncle ou cousin qui a été diagnostiqué avec le cancer de la prostate? ».

Pour les habitudes toxiques (la consommation de l'alcool et le tabagisme), en utilisant les termes «non- consommateurs», «anciens consommateurs» et «consommateurs actuels».

Les anciens consommateurs ont été définis comme ceux qui avaient consommé des boissons alcoolisées ou du tabac plus tôt dans leur vie, mais pas au cours des dernières années et les consommateurs actuels pour les cas étaient considérés comme ceux qui consomment des boissons alcoolisées ou du tabac avant et après le diagnostic du cancer de la prostate. La consommation totale du tabac a été déterminée à l'aide de l'unité-Paquet-Année (UPA).

Puisque la progression de cancer de la prostate est le plus souvent lente, caractérisée par une longue période de latence ( $\geq 10$  ans) (Etzioni *et al.*, 1998; Bostwick, 1992), l'ancien apport alimentaire et mode de vie des participants peut être plus important pour prédire le risque de cancer de la prostate.

Pour cela, nous avons interrogé les cas et les témoins sur leurs habitudes alimentaires et leurs modes de vie de 10 ans avant le diagnostic de cancer de la prostate et avant la date de l'interrogatoire respectivement.

Notre étude a été approuvée par le Comité d'éthique de l'EHS Daksi qui avait certifié que la collecte des données a été effectuée au service d'urologie dans la Clinique d'Urologie Néphrologie et de Transplantation Rénale Daksi – Constantine et qu'aucun risque pour les participants n'a été noté (annexe 3).

---

**1.3 Analyse statistiques**

Le traitement et l'analyse des données collectées des questionnaires des 90 cas de cancer de la prostate et des 190 témoins ont été effectués par le logiciel Graph Pad Prism version 7. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  écart type pour les variables continues et des nombres et des pourcentages pour les variables qualitatives.

Avant l'analyse des données, le test de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé pour vérifier l'homogénéité dans la répartition de l'âge des deux groupes. Fondé sur le test de Shapiro-Wilk qui a un niveau de signification de 0.05, des tests non paramétriques sont choisis pour analyser les données.

Pour les variables continues, comme les valeurs de PSA, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. Le reste des variables (la consommation des différents types d'aliment, les antécédents familiaux du cancer de la prostate, le tabagisme et la consommation d'alcool) ont été regroupés en catégories correspondant aux différentes réponses obtenus dans les questionnaires.

La fréquence des réponses a été mesurée et stockée dans des tableaux des contingences. Tous les tableaux sont ensuite analysés à l'aide du test chi-carré (chi-square, en anglais) pour estimer les odds ratios (OR) et les risques relatifs (RR). Les intervalles de confiance des odds ratios (OR) sont calculés par la méthode logit Woolf. Les valeurs de  $p$  de tendance ( $p_{\text{trend}}$ ) sont déterminées par le test chi carré pour la tendance (chi-square test for trend, en anglais). Des valeurs de  $p < 0.05$  sont considérées comme statistiquement significatives.

**2. RESULTATS****2.1 Caractéristiques générales de la population recrutée**

38 % des cas du cancer de la prostate présentaient un score de Gleason lors du diagnostic de 5 à 7 et 62% des cas présentaient un score de Gleason entre 8 et 10. Le taux médian d'antigène spécifique de la prostate (PSA) était plus élevé chez les cas que chez les témoins ( $p < 0.0001$ ).

12% des patients ont été orientés vers la prostatectomie comme un traitement initial et 88% des cas ont été orientés vers l'hormonothérapie. La comparaison de l'âge des cas et des témoins ne montre aucune différence significative. De plus, le test non paramétrique Kolmogorov-Smirnov a montré que l'âge des deux groupes appartient à la même distribution. Tous les participants vivaient dans la même zone géographique distribuée dans différentes wilayas de l'Est Algérien (tableau 3).

**Tableau 3:** Caractéristiques générales de la population recrutée à l'étude

	Cas, n (%)	Témoins, n (%)	Les valeurs de $p^b$
<b>Nombre de participants</b>	90	190	
<b>Age (ans)</b>	68.87 ± 0.73 <sup>a</sup>	67.13 ± 0.72 <sup>a</sup>	0.1012
<b>PSA (ng/ml)</b>	122 ± 22.04 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.10 <sup>a</sup>	< 0.0001****
<b>Score de Gleason</b>			
5-7	34 (38)	-	-
8-10	56 (62)	-	-
<b>Le traitement primaire</b>			
Prostatectomie	11 (12)	-	-
Hormonothérapie	79 (88)	-	-
<b>Distribution selon les wilayas</b>			
Constantine	34 (38)	60 (32)	-
Mila	16 (18)	43 (23)	-
Guelma	4 (4)	10 (5)	-
Sétif	5 (6)	12 (6)	-
Oum El Bouaghi	10 (11)	15 (8)	-
Jijel	8 (9)	19 (10)	-
Skikda	6 (7)	14 (7)	-
Bejaia	2 (2)	5 (3)	-
Tébassa	3 (3)	8 (4)	-
M'Sila	2 (2)	4 (2)	-

<sup>a</sup> Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type.

<sup>b</sup> Basé sur le test de Mann-Whitney; PSA: antigène spécifique de la prostate; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 2.2 Répartition des patients selon l'âge de diagnostic de cancer de la prostate

Les résultats de la présente étude montrent que le cancer de la prostate est diagnostiqué dans la population étudiée après l'âge de 50 ans, mais son incidence augmente fortement avec l'âge:

- ▶ 11% des patients diagnostiqués à un âge entre 50 et 59 ans,
- ▶ 37% des patients à un âge entre 60 et 69 ans,
- ▶ alors que 52% des patients sont diagnostiqués à un âge après 70 ans (figure 19).

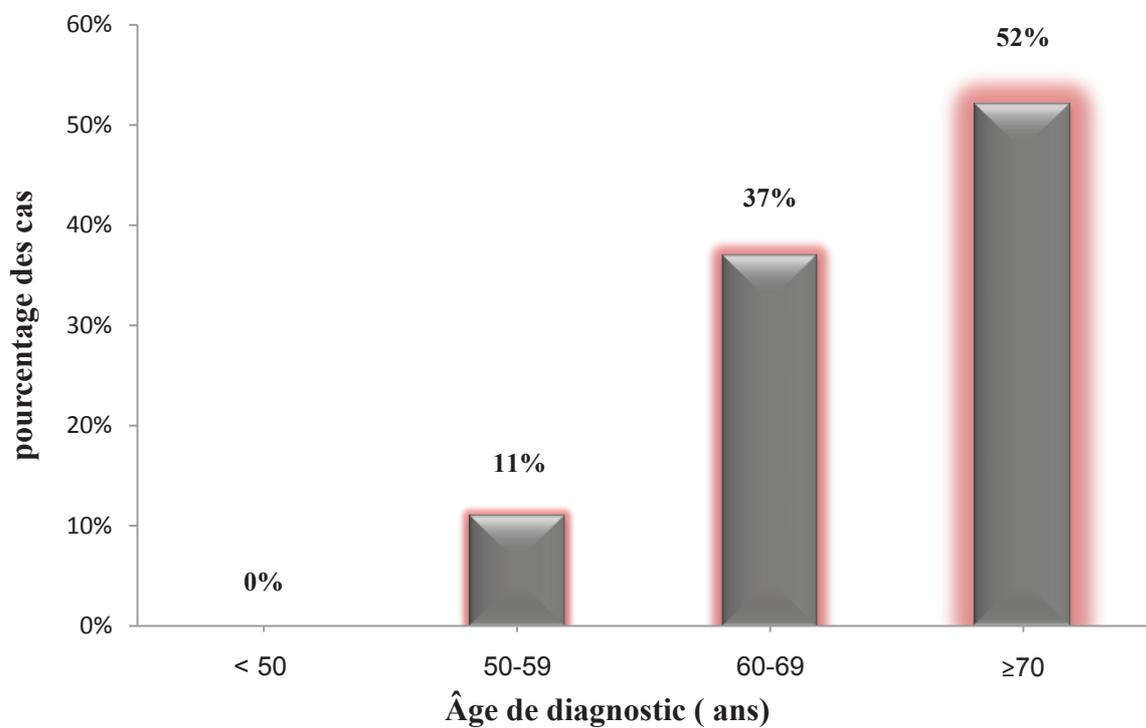


Figure 19: Répartition des patients selon l'âge de diagnostic de cancer de la prostate

---

### 2.3 Relation entre les habitudes alimentaires et le risque de cancer de la prostate

---

Les résultats de l'association entre la consommation de différents aliments et le cancer de la prostate sont exprimés sous forme des odds ratios (OR) et des risques relatifs (RR) résumés dans le tableau 4.

En comparant les hommes qui consommaient plus de trois repas par jour aux hommes qui consommaient seulement deux à trois repas par jour, aucune association significative n'a été observée entre le nombre de repas consommés par jour et le risque de cancer de la prostate (OR 1.41, RR 1.25;  $p = 0.323$ ).

Nous n'avons observé également aucune association significative entre le type de repas consommé et le risque de cancer de la prostate, en comparant la consommation fréquente des repas de fast-food à la consommation le plus souvent des repas traditionnels (OR 1.54, RR 1.3;  $p = 0.230$ ).

En outre, aucune corrélation n'a été établie entre la consommation du poisson et le cancer de la prostate, en comparant les hommes qui mangeaient du poisson plus de trois fois par mois à ceux qui mangeaient du poisson 2 fois ou moins par mois (OR 1.04, RR 1.03;  $p = 0.895$ ).

Une corrélation significative est établie entre la consommation de viande rouge et le risque de cancer de la prostate chez la population étudiée.

L'analyse des données montre qu'il existe une association positive forte entre la consommation de la viande de mouton et le risque de cancer de la prostate ( $p_{tendance} < 0.0001$ ). Les odds ratios et les risques relatifs augmentent significativement avec l'augmentation de la consommation de la viande de moutons.

Comparant aux hommes qui n'avaient jamais ou rarement consommé de viande de mouton, les odds ratios et les risques relatifs sont respectivement 3.33 et 2.46;  $p = 0.0002$  chez ceux qui la consommaient entre une et deux fois par mois et 4.99 et 3.10;  $p < 0.0001$ , chez ceux qui la consommaient trois fois ou plus par mois.

Une association positive a également été observée entre la consommation de viande de veau et le cancer de la prostate ( $p_{tendance} = 0.013$ ), mais le risque est seulement significatif chez les hommes qui la consommaient trois fois ou plus par mois: OR 2.39, RR 1.83 ( $p = 0.017$ ).

La consommation de graisses saturées d'origine animale (provient principalement de la consommation de la viande rouge) présente une forte corrélation positive ( $p_{tendance} < 0.0001$ ) avec le risque de cancer de la prostate. Le risque de cancer de la prostate est trois fois plus élevé chez les hommes qui consommaient des grandes quantités de graisses saturées par rapport à ceux qui n'en consommaient jamais ou qui consommaient seulement des petites quantités par rapport au total de l'apport alimentaire quotidien: OR 7.38, RR 3.02 ( $p < 0.0001$ ).

La consommation de produits laitiers était également associée au risque de cancer de la prostate. Le risque augmente de façon significative chez les hommes ayant une forte consommation de produits laitiers par rapport à ceux qui en consomment moins: OR 3.13, RR 2.07 ( $p < 0.0001$ ).

Une forte association inverse entre la consommation de fruits et de légumes et le risque de cancer de la prostate ( $p_{tendance} < 0.0001$ ) est établie: Les odds ratios et les risques relatifs ont diminué de façon significative avec l'augmentation de consommation de fruits et de légumes.

Les résultats ont montré que le cancer de la prostate est moins fréquent chez les hommes qui consomment 7 à 13 fois par semaine de légumes: OR 0.38, RR 0.68 ( $p = 0.04$ ) et beaucoup moins fréquent pour ceux qui consomment des légumes 14 fois ou plus par semaine: OR 0.03, RR 0.12 ( $p < 0.0001$ ) et des fruits 7 à 14 fois par semaine: OR 0.02, RR 0.10 ( $p < 0.0001$ ).

La consommation de thé vert diminue le risque de cancer de la prostate et est reliée avec l'augmentation de la consommation de thé vert.

Les odds ratios et les risques relatifs étaient respectivement de 0.64 et 0.74 ( $p = 0.1569$ ) pour les hommes qui buvaient de 1 à 3 tasses par jour et de 0.40 et 0.51 ( $p = 0.2025$ ) pour ceux qui consommaient plus de 3 tasses par jour.

Cependant, ces résultats n'étaient pas significatifs; statistiquement dans les limites ( $p_{tendance} = 0.07$ ), très proche de seuil de signification ( $p = 0.05$ ).

**Tableau 4:** Association entre le type et la quantité des différents aliments et le risque du cancer de la prostate.

	Cas, n (%)	Témoins, n (%)	OR <sup>a</sup>	IC à 95% <sup>a</sup>	RR <sup>a</sup>	IC à 95% <sup>a</sup>	<i>p</i> <sup>a</sup>
<b>Nombre de repas /jour:</b>							
2 to 3	70 (78)	158 (83)	1				
> 3	20 (22)	32 (17)	1.41	0.75 - 2.63	1.25	0.84-1.86	0.3238
<b>Type de repas:</b>							
Traditionnels > fast-food	71 (79)	162 (85)	1				
Fast-food > traditionnels	19 (21)	28 (15)	1.54	0.81 - 2.95	1.32	0.89-1.97	0.2303
<b>Poisson, fois/mois:</b>							
0-2	55 (61)	118 (62)	1				
≥ 3	35 (39)	72 (38)	1.04	0.62 - 1.74	1.03	0.72-1.45	0.8957
<b>Viande rouge, fois/mois:</b>							
<b>Viande de mouton:</b>							
0	17 (19)	95 (50)	1				
1-2	40 (44)	67 (35)	3.33	1.74 - 6.37	2.46	1.49-4.06	0.0002 ***
≥ 3	25 (28)	28 (15)	4.99	2.36 -10.53	3.10	1.84-5.24	< 0.0001 ****
<i>P</i> <sub>tendance</sub> <sup>b</sup>	< 0.0001 ****						

<b>Viande de veau:</b>							
0	16 (18)	57 (30)	1				
1-2	39 (43)	81 (43)	1.71	0.87 - 3.36	1.48	0.89-2.45	0.1394
≥ 3	35 (39)	52 (27)	2.39	1.19 - 4.83	1.83	1.11-3.03	0.0170 *
<i>P</i> <sub>tendance</sub> <sup>b</sup>			0.013*				
<b>Graisses saturées (d'origine animale):</b>							
Jamais ou petite partie <sup>1</sup>	37 (41)	127 (67)	1				
Partie moyenne <sup>1</sup>	10 (11)	43 (23)	0.79	0.36 - 1.74	0.83	0.44-1.56	0.7020
Grande partie <sup>1</sup>	43 (48)	20 (10)	7.38	3.87 -14.06	3.02	2.17-4.20	< 0.0001 ****
<i>P</i> <sub>tendance</sub> <sup>b</sup>			< 0.0001****				
<b>Produits laitiers:</b>							
Petite ou moyenne partie <sup>2</sup>	45 (50)	144 (76)	1				
Grande partie <sup>3</sup>	45 (50)	46 (24)	3.13	1.84 - 5.31	2.07	1.49-2.88	< 0.0001 ****
<b>Fruits, fois/semaine:</b>							
< 2	17 (19)	4 (2)	1				
2-6	59 (66)	34 (18)	0.40	0.12 - 1.31	0.78	0.60-1.01	0.198
7-14	14 (15)	152 (80)	0.02	0.00 - 0.07	0.10	0.06-0.17	< 0.0001 ****
<i>P</i> <sub>tendance</sub> <sup>b</sup>			< 0.0001****				

Légumes, fois/semaine:							
< 7	18 (20)	7 (4)	1				
7-13	60 (67)	61 (32)	0.38	0.14 - 0.98	0.68	0.50-0.93	0.048*
≥ 14	12 (13)	122 (64)	0.03	0.01 - 0.10	0.12	0.06-0.22	< 0.0001 ****
$P_{\text{tendance}}^b$		< 0.0001****					
Consommation de thé vert, tasse/jour:							
< 1	67 (75)	122 (64)	1				
1-3	21 (23)	59 (31)	0.64	0.36 - 1.15	0.74	0.48-1.12	0.1569
> 3	2 (2)	9 (5)	0.40	0.08 - 1.92	0.51	0.14-1.82	0.2025
$P_{\text{tendance}}^b$		0.07					

**OR:** le odds ratio; **RR:** le risque relatif; **IC à 95%:** l'intervalle de confiance à 95%; <sup>a</sup> Déterminé par le test chi carré; <sup>b</sup> Déterminé par le test chi carré pour la tendance; (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*\*)  $p < 0.005$ , (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .<sup>1</sup> Relativement à l'apport alimentaire quotidien. <sup>2</sup> Une tasse de lait ou d'autres produits (fromage, yaourt..) par jour ou une tasse de lait avec un autre produit (fromage, yaourt..) par jour. <sup>3</sup> Plus de 2 tasses de lait par jour et / ou avec une grande quantité d'un autre produit (fromage, yaourt..).

**2.4 Relation entre les antécédents familiaux et le risque de cancer de la prostate**

L'analyse des résultats montre une association positive entre les antécédents familiaux et le risque de cancer de la prostate dans la population Algérienne étudiée ( $p_{tendance} < 0.0001$ ). 22% des cas avaient des antécédents familiaux de cancer de la prostate, contre seulement 4% de témoins. Le risque de cancer de la prostate est deux fois plus élevé (RR 2.31) chez les hommes ayant des antécédents de deuxième degré (grand-père ou oncle) et presque trois fois plus élevé (RR 2.82) chez les hommes ayant des antécédents de premier degré (père ou frère) (tableau 5).

**Tableau 5:** Association entre les antécédents familiaux de cancer de la prostate et le risque de cancer de la prostate.

	Cas, n (%)	Témoins, n (%)	OR <sup>a</sup>	IC à 95% <sup>a</sup>	RR <sup>a</sup>	IC à 95% <sup>a</sup>	P <sup>a</sup>
<b>Les antécédents familiaux</b>							
<b>du cancer de la prostate:</b>							
Absent	70 (78)	182 (96)	1				
De 1 <sup>er</sup> degré	11 (12)	3 (1)	9.53	2.58 - 35.20	2.82	2.01 - 3.96	0.0002 ***
De 2 <sup>eme</sup> degré	9 (10)	5 (3)	4.68	1.51 - 14.45	2.31	1.49 - 3.58	0.0063 **
$P_{tendance}^b$	< 0.0001****						

**OR:** le odds ratio; **RR:** le risque relatif; **IC à 95%:** L'intervalle de confiance à 95%; <sup>a</sup> Déterminé par le test chi carré; <sup>b</sup> Déterminé par le test chi carré pour la tendance; (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.005$ , (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

**2.5 Relation entre les habitudes toxiques (l'alcool et le tabagisme) et le risque de cancer de la prostate**

Une association positive forte a été observée entre la consommation d'alcool et le risque de cancer de la prostate ( $p < 0.0001$ ). Le risque relatif est de 2.51 fois plus élevé chez les anciens consommateurs par rapport aux autres (tableau 6).

**Tableau 6:** Association entre la consommation d'alcool et le risque de cancer de la prostate.

	Cas, n (%)	Témoins, n (%)	OR <sup>a</sup>	IC à 95% <sup>a</sup>	RR <sup>a</sup>	IC à 95% <sup>a</sup>	P <sup>a</sup>
<b>La consommation d'alcool:</b>							
Non-consommateurs	64 (71)	177 (93)	1				
Anciens consommateurs	26 (29)	13 (7)	5.53	2.68 - 11.42	2.51	1.84 - 3.40	< 0.0001 ****

*OR: le odds ratio; RR: le risque relatif; IC à 95%: L'intervalle de confiance à 95%;<sup>a</sup> Déterminé par le test chi carré;<sup>b</sup> Déterminé par le test chi carré pour la tendance; (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.005$ , (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .*

Les résultats obtenus montrent également que le tabagisme a une forte association positive avec le risque de cancer de la prostate ( $p_{\text{tendance}} < 0.0001$ ). L'odds ratio et le risque relatif chez les anciens fumeurs par rapport aux non-fumeurs étaient respectivement de 3.17 et 2.27 et chez les fumeurs actuels étaient respectivement de 4.05 et 2.60.

Les résultats de l'analyse de la consommation totale du tabac ont montré une relation dose-réponse entre la quantité de tabac consommée et le risque de cancer de la prostate ( $p_{\text{tendance}} < 0.0001$ ).

Le risque est presque 3 fois plus élevé chez les hommes consomment 30 à 39 paquet-année du tabac (presque 219 à 284.7 kg de tabac) dans leur vie et de 3.56 fois plus élevé chez les hommes qui ont consommé plus de 40 paquet-année du tabac (plus de 292 kg de tabac) dans leur vie (tableau 7).

**Tableau 7:** Association entre le tabagisme et le risque de cancer de la prostate.

	Cas, n (%)	Témoins, n (%)	OR <sup>a</sup>	IC à 95% <sup>a</sup>	RR <sup>a</sup>	IC à 95% <sup>a</sup>	P <sup>a</sup>
<b>Le tabagisme:</b>							
Non-fumeurs	22 (24)	99 (52)	1				
Anciens fumeurs	50 (56)	71 (37)	3.17	1.76 - 5.69	2.27	1.47 - 3.50	0.0001 ***
Fumeurs actuels	18 (20)	20 (11)	4.05	1.84 - 8.89	2.60	1.57 - 4.31	0.0006 ***
<i>P</i> <sub>tendance</sub> <sup>b</sup>			< 0.0001****				
<b>Consommation totale du tabac, unité paquet-année:</b>							
0	22 (24)	99 (52)	1				
1-9	9 (10)	20 (11)	2.02	0.81 - 5.04	1.70	0.88 - 3.30	0.1326
10- 19	15 (17)	27 (14)	2.50	1.14 - 5.46	1.96	1.12 - 3.42	0.0311 *
20- 29	11 (12)	23 (12)	2.15	0.91- 5.05	1.78	0.96 - 3.29	0.0964
30- 39	9 (10)	8 (4)	5.06	1.75 - 14.59	2.91	1.62 - 5.23	0.0033 **
≥ 40	24 (27)	13 (7)	8.30	3.66 -18.83	3.56	2.28 - 5.57	< 0.0001 ****
<i>P</i> <sub>tendance</sub> <sup>b</sup>			< 0.0001****				

**OR:** le odds ratio; **RR:** le risque relatif; **IC à 95%:** L'intervalle de confiance à 95%; <sup>a</sup> Déterminé par le test chi carré; <sup>b</sup> Déterminé par le test chi carré pour la tendance; (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.005$ , (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

### 3. DISCUSSION

Dans cette étude, les témoins et les cas de cancer de la prostate ont été recueillis dans la même période et ont été interrogés face-à-face en utilisant un questionnaire structuré pour diminuer la probabilité de biais. Les cas n'ont été interrogés qu'après la confirmation du diagnostic de cancer de la prostate et les témoins ont été sélectionnés soigneusement et apparié aux cas en âge et en région de résidence.

En général après le diagnostic de cancer, le mode de vie et les habitudes alimentaires des patients commencent à changer et des fois à être perturbés à cause des traitements et de l'état psychique. Les habitudes alimentaires récentes des malades ne peuvent donc pas refléter l'alimentation typique consommée avant l'apparition de cancer de la prostate. De plus le cancer de la prostate est caractérisé le plus souvent par une longue période de latence (10 à 15 ans) (Bostwick, 1992; Etzioni *et al.*, 1998) et l'ancien apport alimentaire et le mode de vie des participants peut être plus important pour prédire le risque du cancer de la prostate. Pour diminuer le niveau d'erreur, nous avons utilisé dans cette étude les habitudes alimentaires de 10 ans avant le diagnostic de cancer de la prostate pour les malades et avant la date de l'interrogatoire pour les témoins. Cependant cette étude est une étude cas-témoins et nous ne pouvons donc pas exclure un certain degré de biais de rappel (Kolonel *et al.*, 1999).

La présente étude montre que l'incidence de cancer de la prostate augmente significativement avec l'âge. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature (Ferlay *et al.*, 2013) et confirment que l'âge constitue un facteur de risque majoritaire pour de cancer de la prostate. En effet, les études ont établis une corrélation forte entre le vieillissement et plusieurs maladies incluant le cancer de la prostate. Avec l'avancée de l'âge, l'accumulation des mutations dans l'ADN mitochondrial peut contribuer à la tumorigenèse prostatique via une surproduction des ERO et l'augmentation de stress oxydant (Khandrika *et al.*, 2009; Udensi *et al.*, 2016).

Le nombre de repas consommé par jour qui peut être un indicateur de l'apport énergétique total ne montre aucune association avec le risque de cancer de la prostate dans la population algérienne étudiée. Théoriquement, un apport énergétique élevé peut jouer un rôle important dans plusieurs néoplasmes. Il peut stimuler le système nerveux sympathique et le métabolisme de base menant à l'augmentation de la libération d'IGF-1 qui augmente automatiquement la prolifération cellulaire via la stimulation de la mitose (Dunn *et al.*, 1997).

La plupart des études cas-témoins ont rapporté une association positive entre le risque accru de cancer de la prostate et l'apport énergétique élevé (Andersson *et al.*, 1996; GrÖnberg *et al.*, 1996; Richman *et al.*, 2013). L'étude expérimentale de Mukherjee *et al.*, (1999) a montré que la restriction énergétique associée au castration réduit significativement la densité tumorale et

l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire. La concentration de graisse alimentaire peut n'avoir aucune influence sur la croissance de la tumeur de la prostate lorsque l'apport énergétique est réduit (Mukherjee *et al.*, 1999).

Cependant, d'autres études concordent avec la notre et ne montrant aucune association entre l'apport énergétique et le cancer de la prostate (Ghadirian *et al.*, 1996; Schuurman *et al.*, 1999).

En effet aucune association significative n'a été trouvée entre le type de repas consommé et le risque de cancer de la prostate, mais nous avons observé que la plupart des cas et des témoins consommaient le plus souvent des repas traditionnels plutôt que des repas de fast-food.

Les repas traditionnels en Algérie sont considérée comme méditerranéens, caractérisés par une consommation élevée d'aliments frais, de pains, beaucoup d'aliments céréaliers généralement fabriqués à partir de blé à la maison, l'apport de légumes, de fruits et une consommation modérée de poisson et de viande rouge. Il a été rapporté que le régime méditerranéen est associé à un risque plus faible de cancer de la prostate (Couto *et al.*, 2011).

Une étude de suivi a montré qu'un score méditerranéen plus élevé n'a pas été associé au risque de cancer de la prostate avancé ou à la progression de la maladie et une plus grande adhérence au régime méditerranéen après le diagnostic de cancer de la prostate non métastase a été associé à une mortalité globale plus faible (Kenfield *et al.*, 2014).

Aucune étude n'a analysé l'association entre la consommation des repas de fast-food et le risque de cancer de la prostate. Cependant, une étude a constaté que la consommation régulière des fritures (frites, poulet frit, poisson frit et beignets) est associée à un risque accru de cancer de la prostate (Stott-Miller *et al.*, 2013).

De nombreuses études épidémiologiques ont examiné la relation entre la consommation de poisson et le cancer de la prostate. Plusieurs d'entre elles ont trouvé que la consommation élevée de poisson peut réduire le risque de cancer de la prostate mais les résultats d'autres études restent contradictoires. Dans une étude de suivi réalisé sur 47 882 hommes pendant 12 ans, la consommation de poisson plus de trois fois par semaine contre moins de deux fois par mois a réduit significativement le risque de cancer de la prostate. L'association la plus forte a été trouvée pour le cancer métastatique (RR 0.56) (Augustsson *et al.*, 2003).

Une autre étude a montré également que la consommation de cinq portions ou plus par semaine de poissons par rapport à moins d'une fois était associée à une réduction significative du risque de cancer de la prostate (Chavarro *et al.*, 2008).

Des études réalisées sur des modèles animaux et des lignées cellulaires ont trouvé que les acides gras polyinsaturés  $\omega$ -3 à longue chaîne qui proviennent essentiellement de la consommation de poisson peuvent inhiber la progression du cancer et bloquer l'invasion des cellules cancéreuses en régulant l'activité enzymatique protéolytique des cellules tumorales (Connolly *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2006). Une étude récente a également suggéré que les acides gras  $\omega$ -3 du tissu prostatique, en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA) peuvent avoir un effet protecteur contre la progression du cancer de la prostate chez les hommes à faible risque de cette maladie (Moreel *et al.*, 2014).

Toutefois, une étude de méta-analyse n'a fourni aucune preuve forte de l'effet protecteur de la consommation de poisson contre le cancer de la prostate mais elle montre qu'elle peut réduire significativement la mortalité associée du cancer de la prostate (Szymanski *et al.*, 2010).

Dans notre étude, aucune association n'a été observée entre la consommation de poisson et le cancer de la prostate. La plupart des cas et des témoins consommaient le poisson moins de deux fois par mois et seulement quelques-uns d'entre eux le consommaient plus de 3 fois par mois. Dans cette dernière catégorie seulement 17% des cas et 14% des témoins mangeaient le poisson une à deux fois par semaine et ceci semble à être trop faible pour la réduction de risque de cancer de la prostate par rapport à certaines études citées (Augustsson *et al.*, 2003; Chavarro *et al.*, 2008). Par conséquent, l'effet protecteur du poisson contre le cancer de la prostate n'a pas été confirmé dans la population étudiée.

L'analyse des données montre une forte association entre la consommation de la viande rouge, la consommation élevée de graisse animale et le risque de cancer de la prostate. Comparant aux hommes qui ne mangent jamais ou rarement de viande rouge, le risque de cancer de la prostate est presque 2 fois plus élevé chez les hommes mangeaient la viande de veau 3 fois ou plus par mois, plus de 2 fois plus élevé chez les hommes mangeaient la viande de mouton 1 ou 2 fois par mois et 3 fois plus élevé chez les hommes mangeaient de viande de mouton 3 fois ou plus par mois.

En plus, le risque de cancer de la prostate était 3 fois plus élevé chez les hommes ayant une forte consommation des graisses animales (de viande rouge) par rapport à ceux qui ne les consomment jamais.

Beaucoup d'études ont examiné la relation entre la consommation de viande rouge et le risque de cancer de la prostate, néanmoins les résultats restent contradictoires. Certaines études suggèrent une association positive (Gann *et al.*, 1994; Le Marchand *et al.*, 1994; Sinha *et al.*, 2009), tandis que d'autres n'ont trouvé aucune association (Michaud *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2005).

Une étude cas-témoin menée au sein de la Physicians Health Study cohorte a constaté que la consommation de viande rouge (veau, mouton ou de porc) au moins 5 fois par semaine comme un plat principal (contre 1-3 fois par mois ou moins) a augmenté 2.5 fois le risque de cancer de la prostate (Gann *et al.*, 1994). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude réalisée à Hawaï qui trouve une association significativement élevée entre la consommation de la viande de veau et le cancer de la prostate (RR 1.6) (Le Marchand *et al.*, 1994).

En effet la viande est une source très importante de protéines nobles, de glucides et de certains micronutriments comme le fer, le sélénium, les vitamines A, B12 et l'acide folique (Biesalski, 2005). Ce risque accru est peut être due au déclenchement de la carcinogenèse par la teneur élevée de viande rouge en graisses saturées, la formation des amines hétérocycliques et hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérigènes lors de la cuisson de la viande à haute température ou de la promotion de la cancérogenèse par le fer héminique (Cross *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2009).

Esther M. John *et al.*, (2011) ont trouvé que la consommation élevée de hamburgers, de viandes rouges grillées et des amines hétérocycliques augmente significativement le risque de cancer de la prostate avancé (John EM *et al.*, 2011).

Dans notre étude, la consommation des graisses saturées d'origine animale peut être un autre facteur de risque de cancer de la prostate dans la population Algérienne. Ce résultat est en accord avec plusieurs études (Giovannucci *et al.*, 1993, Fradet *et al.*, 1999; Koutros *et al.*, 2008) mais pas avec d'autres (Park *et al.*, 2007; Wallström *et al.*, 2007).

L'étude prospective de cohorte de Giovannucci *et al.*, (1993) a montré que la consommation de viande rouge et de graisse saturée était directement liée au risque de cancer de la prostate avancé. Cette étude a trouvé également que l'association de viande rouge au cancer de la prostate était principalement due à la graisse animale. Toutefois, la graisse provenant des produits laitiers (à l'exception du beurre) ou du poisson n'était pas liée au risque de cancer de la prostate (Giovannucci *et al.*, 1993). Dans une autre étude, les hommes qui consomment une quantité élevée de graisses saturées ont un risque 3 fois plus élevé de mourir par le cancer de la prostate (Fradet *et al.*, 1999).

Les graisses saturées peuvent participer au développement de ce cancer par plusieurs mécanismes comme l'augmentation de concentration des hormones sexuelles et de l'IGF-1 (Barnard *et al.*, 2003), l'altération de la fonction de la membrane cellulaire et la modulation des processus métaboliques (Comba *et al.*, 2011) ou l'augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (Tada *et al.*, 2009).

Dans cette étude, on trouve également que la consommation élevée des produits laitiers peut augmenter 2 fois le risque de cancer de la prostate dans la population algérienne. La relation entre le cancer de la prostate et les produits laitiers a fait l'objet de plusieurs études. Beaucoup ont trouvé une association positive (Tseng *et al.*, 2005; Mitrou *et al.*, 2007; Kurahashi *et al.*, 2008), certaines ont rapporté une association nulle (Koh *et al.*, 2006; Huncharek *et al.*, 2008), tandis qu'une étude a trouvé une association inverse (Vlajinac *et al.*, 1997).

L'étude prospective de Tseng M *et al.*, a trouvé des résultats presque semblables à ceux de notre étude. Elle a montré que les hommes avec une consommation élevée de produits laitiers ont un risque 2.2 fois plus élevé de développer un cancer de la prostate (Tseng *et al.*, 2005). Cependant, dans la majorité des autres études, le risque relatif était bas. Il était 1.63 dans une étude réalisée avec 43,435 japonais (Kurahashi *et al.*, 2008) et 1.26 dans une grande étude prospective réalisée en Finlande (Mitrou *et al.*, 2007).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la relation entre la consommation excessive de produits laitiers et le développement de cancer de la prostate. En effet, un niveau élevé en calcium ou du phosphate dans le plasma peut réduire le taux de métabolite actif de vitamine D, 1-25 dihydroxycholécalférol (Giovannucci, 1998), qui est un facteur antiprolifératif, pro-apoptotique et différenciateur des cellules tumorales humaines en culture (Blutt *et al.*, 2000). Une grande consommation de lait et de calcium est associée aussi à une augmentation de taux plasmiq ue de l'IGF-1 (Gunnell *et al.*, 2003). L'œstrogène présent dans le lait a été proposé également comme une autre explication à cause de son rôle génotoxique possible dans la glande prostatique (Qin *et al.*, 2004).

Parmi tous les aliments étudiés, les légumes et les fruits ont montré des effets protecteurs significatifs sur le cancer de la prostate chez la population algérienne de cette étude.

La consommation de 7 à 13 portions de légumes par semaine diminue 62 % du risque de cancer de la prostate et la consommation de 14 portions ou plus diminue jusqu'à 96 % du risque chez la population étudiée.

Une diminution de 98% du risque de cancer de la prostate a été observée également chez les hommes qui consommaient 7 à 14 portions de fruits par semaine comparés à ceux qui consommaient moins de 2 portions par semaine.

Nos résultats supportent l'hypothèse suggérée par plusieurs études qui ont montré que la consommation élevée de légumes et de fruits peut prévenir du cancer de la prostate (Deneo-Pellegrini *et al.*, 1999). Néanmoins, certaines études ont suggéré que la consommation de fruits ou de légumes ne peut exercer aucun rôle protecteur contre le risque de cancer de la prostate (Le Marchand *et al.*, 1994; Meng *et al.*, 2014).

En outre, une étude cas-témoins comprenant plus de 1 200 participants a constaté qu'une consommation élevée de légumes peut réduire le cancer de la prostate, mais aucune association n'a été observée avec l'apport de fruits (Cohen *et al.*, 2000).

Les résultats d'une étude cas-témoins réalisé au Canada ont montré qu'une association significative décroissante a été observée avec l'augmentation des apports de légumes verts, de tomates, d'haricots / lentilles et de légumes crucifères, alors une consommation élevée de fruits était associée à un odds ratio élevé (OR 1.51) (Jain *et al.*, 1999). Cependant, d'autres études ont observé un risque élevé de cancer de la prostate avec une grande consommation de fruits (Schuurman *et al.*, 1998).

Des études précliniques réalisées chez des animaux transgéniques, des modèles de tumeurs xénogreffes et sur des lignées cellulaires ont montré que les polyphénols du thé vert, en particulier les catéchines, peuvent inhiber significativement la prolifération de cancer de la prostate (Davalli *et al.*, 2012).

Posant l'hypothèse que le thé vert pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate, plusieurs études épidémiologiques sur différentes populations ont été réalisées. La plupart ont trouvé que la consommation de thé vert peut réduire significativement le risque du cancer de la prostate. Dans une étude cas-témoin réalisé en Chine du Sud-Est la consommation de 3 tasses de thé vert par jour réduit significativement le risque du cancer de la prostate (Jian *et al.*, 2004).

Une grande étude de cohorte réalisée au Japon a trouvé que la consommation de thé vert ne présente aucune association avec le cancer de la prostate localisé mais elle était associée à une diminution dose-dépendante du risque de cancer de la prostate avancé. Cependant la consommation de 5 tasses ou plus par jour comparativement à moins de 1 tasse / jour de thé vert peut réduire significativement le risque de cancer de la prostate dans la population étudiée (RR 0.52) (Kurahashi *et al.*, 2008).

Dans notre étude, la consommation de 1 à 3 tasses et plus de 3 tasses de thé vert par jour peut diminuer respectivement 26% et 49% de risque de cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien. Cependant, ces résultats sont dans les limites et statistiquement non significatifs.

Comme dans certaines études (Allen *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2006), nos résultats n'arrivent pas à confirmer l'effet protecteur de la consommation de thé vert contre le cancer de la prostate. Cela peut s'expliquer par le fait que le thé vert n'est pas une vraie boisson populaire en Est Algérien. La population étudiée reflète le fait que la plupart des individus n'ont jamais ou rarement bu du thé vert et que seulement 2 et 5 % des cas et des témoins respectivement buvaient plus de 3 tasses par jour.

Les antécédents familiaux de cancer de la prostate semblent être un autre facteur de risque dans la population algérienne. 22% des cas contre seulement 4% des témoins avaient des antécédents familiaux de cancer de la prostate. Un risque élevé du cancer de la prostate chez les hommes ayant des antécédents familiaux de la maladie a été observé. Le RR était 2.82, 2.31 et 2.57 fois plus élevé chez les hommes ayant des antécédents familiaux de 1<sup>er</sup> degré, de 2<sup>eme</sup> degré et de 1<sup>er</sup> et 2<sup>eme</sup> degré respectivement.

La relation entre les antécédents familiaux et le cancer de la prostate a été examinée par plusieurs chercheurs dans de nombreuses études et dans différentes populations. La plupart des études trouvant une association positive (Steinberg *et al.*, 1990; Whittemore *et al.*, 1995; Ghadirianl *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 2013).

Dans l'étude de Steinberg *et al.*, le risque d'avoir un cancer de la prostate est de 2 fois plus élevé chez les hommes ayant des antécédents familiaux de 1<sup>er</sup> degré, 1.7 fois plus élevé pour qui ayant des antécédents familiaux de 2<sup>eme</sup> degré et de 8.8 lorsqu'il existe simultanément des parents de 1<sup>er</sup> et 2<sup>eme</sup> degré (Steinberg *et al.*, 1990).

Dans une étude cas-témoin réalisée aux États-Unis et au Canada chez les Noirs, les Blancs et les Américains d'origine asiatique, 5% des témoins et 13% des cas ont un père, un frère ou un fils atteint de cancer de la prostate. Le risque de cancer de la prostate était 2 à 3 fois plus élevé dans ces trois groupes ethniques (Whittemore *et al.*, 1995).

Dans une étude cas-témoins basée sur la population du cancer de la prostate menée à Montréal, à Toronto et à Vancouver entre 1989 et 1993, la présence des antécédents familiaux augmente le risque de cancer de la prostate 3 fois, 15% des cas contre 5% des témoins présentaient des antécédents familiaux de cancer de la prostate (Ghadirianl *et al.*, 1997).

Une étude récente a suggéré que les antécédents familiaux constituent également un véritable facteur de risque de cancer de la prostate au Brésil, un pays avec une population très diverse en termes de race, d'origine ethnique, de culture et de statut socioéconomique (OR = 1.79,  $p= 0.003$ ) (Muller *et al.*, 2013).

Les études ont constaté également que le risque augmentait avec le nombre des parents atteints (Steinberg *et al.*, 1990; Lesko *et al.*, 1996) et variait selon les liens familiaux (Lesko *et al.*, 1996). En plus, le risque observé est devenu plus élevé lorsque le cancer est survenu chez l'apparenté à un jeune âge. Il est 7 fois plus élevé chez le frère ou le père d'un sujet atteint de cancer de la prostate avant 50 ans (Carter *et al.*, 1993).

La consommation d'alcool est un autre facteur de risque de cancer de la prostate déterminé dans cette population algérienne. Comparés au non consommateurs, le RR est 2.51 fois plus élevé pour les anciens consommateurs. Aucun utilisateur actuel n'a été trouvé dans cette population étudiée la plupart des cas et des témoins n'ont jamais bu de l'alcool ou juste l'ont bu quelques fois pendant la jeunesse et le reste (29% des cas et 7% des témoins) étaient des anciens utilisateurs.

La plupart des études n'ont montré aucune association entre la consommation d'alcool et le cancer de la prostate (Rohrmann *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2010; Rota *et al.*, 2012) et peu d'études ont rapporté une association inverse (Breslow *et al.*, 1999; Barba *et al.*, 2004).

Une étude de suivi a révélé une association inverse significative entre le passé lointain de la consommation excessive d'alcool (25 boissons / semaine) et le cancer de la prostate, à l'âge de 25 ans (RR = 0.20), de 35 ans (RR = 0.30) et de 45 ans (RR = 0.39), mais aucune association entre la consommation actuelle d'alcool et le cancer de la prostate a été observé (Breslow *et al.*, 1999).

De même, une association inverse a été observée dans une autre étude entre le nombre d'années de consommation d'alcool et le risque de cancer de la prostate (Barba *et al.*, 2004). Dans ces études, le rôle protecteur de l'alcool observé a été expliqué par le fait que l'alcool peut augmenter la clairance métabolique de la testostérone (Andersson *et al.*, 1986).

Néanmoins nos résultats sont compatibles avec de nombreuses études soutenant l'hypothèse que l'alcool pourrait augmenter le risque de cancer de la prostate. Dans une étude récente cas-témoins, la consommation d'alcool durant une longue période dans la vie a augmenté significativement le risque de cancer de la prostate agressif et non agressif (McGregor *et al.*, 2013). Une étude Américaine a trouvé que les hommes qui consommaient de grandes quantités d'alcool dans une courte durée étaient également exposés à un risque élevé de cancer de la prostate (Platz *et al.*, 2004).

D'autres études ont suggéré que les consommateurs lourds d'alcool ou les toxicomanes alcooliques ont une incidence plus élevée de cancer de la prostate. Quatre boissons alcoolisées par jour sont associées à environ 21% d'augmentation de risque de cancer de la prostate (Dennis, 2000). Dans notre étude les informations obtenues des cas et des témoins n'étaient pas suffisantes pour analyser l'association entre la quantité et la durée de consommation d'alcool et le risque de cancer de la prostate dans la population Algérienne.

Actuellement la plupart des études ne considère pas le tabagisme comme un facteur de risque pour le cancer de la prostate (Le Marchand *et al.*, 1994; Grönberg *et al.*, 1996; Rohrmann *et al.*, 2008).

Contrairement nous avons constaté que le tabagisme était associé à un risque élevé de cancer de la prostate dans la population Algérienne. Il augmente le risque de cancer de la prostate 2.27 fois chez les anciens fumeurs et de 2.60 fois chez les fumeurs actuels. Cette association observée était dose-réponse avec le nombre de paquet-année du tabac fumées dans toute leur vie ( $p < 0.0001$ ), RR est de 1.96, 2.91 et 3.56 pour les hommes consommés 10 à 19 ans, 30 à 39 ans et 40 ans ou plus.

Nos résultats concordent avec quelques études. Dans l'étude de Plaskon *et al.*, les fumeurs actuels sont associés à un risque élevé par rapport les anciens fumeurs (OR= 1.4) et une dose-réponse a été notée entre le nombre de paquets-années fumé et le risque de cancer de la prostate ( $p_{tendance} = 0.03$ ) (Plaskon *et al.*, 2003). Dans une autre étude, le risque relatif pour le cancer de la prostate était significativement plus élevé chez les fumeurs de cigarettes, mais aucune relation dose-réponse claire n'a été observée (Hsing *et al.*, 1990).

Une autre étude a montré que les hommes avaient fumé plus de 15 paquet-année de cigarettes au cours les 10 ans précédentes sont à un risque élevé de développer une métastase à distance et un cancer prostatique fatal, mais ce risque sera éliminé 10 ans après l'arrêt du tabac (Giovannucci *et al.*, 1999).

Deux mécanismes pathogéniques ont été proposés d'être le lien entre la cigarette et le cancer de la prostate. La première est liée à des substances cancérigènes trouvées dans le tabac tel que le cadmium qui peut interagir avec le récepteur des androgènes et induire indirectement le cancer de la prostate (Ye *et al.*, 2000) et la deuxième concernant l'impact du tabac sur le niveau des hormones sexuelles, les fumeurs sont signalés à avoir un niveau élevé de testostérone circulante (Dai *et al.*, 1988).

Notre étude trouve pour la première fois que les habitudes alimentaires, le mode de vie et les antécédents familiaux du cancer de la prostate peuvent avoir un effet très important sur le développement du cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien.

L'âge semble un facteur de risque majoritaire pour le cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien. La consommation de viande rouge, la consommation élevée de graisse saturée d'origine animale et de produits laitiers, les antécédents familiaux de cancer de la prostate, la consommation d'alcool et le tabagisme sont les principaux facteurs de risques déterminés dans la population étudiée.

Des effets protecteurs ont été identifiés pour la consommation élevée de fruits et de légumes. Malgré que les résultats soient statistiquement limités, le thé vert semble aussi avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien. Cette étude trouve également que le nombre et le type de repas consommés par jour ainsi que la consommation de poisson sont des facteurs indépendants de cancer de la prostate la population algérienne.

## **ETUDE 2**

**Etude expérimentale *in vitro* et *in humaine*: l'effet préventif des flavonoïdes et des phénols de thé vert (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) sur le cancer de la prostate**

Basé sur les données épidémiologiques disponibles dans la base de données GLOBOCAN 2012, le cancer de la prostate est l'un des cancers les plus fréquemment diagnostiqué et la sixième cause de décès chez les hommes en Algérie (Ferlay *et al.*, 2013). Selon les données de prédiction ces taux d'incidence et de mortalité de cette maladie seront augmentés dans les prochaines années (Ferlay *et al.*, 2013).

Comme la plupart des cancers, les facteurs étiologiques de cancer de la prostate sont actuellement mal connus. Néanmoins de nombreuses études ont trouvé que plusieurs facteurs comme le vieillissement (Kwabi-Addo *et al.*, 2007; Minelli *et al.*, 2009), l'alimentation (Homma *et al.*, 2004) et l'inflammation chronique (Nelson *et al.*, 2002) peuvent être impliqués dans le développement et la progression de cancer de la prostate.

Ces études ont montré aussi que le stress oxydant peut être le lien entre ces facteurs de risque et le cancer de la prostate (Nelson *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2004; Kwabi-Addo *et al.*, 2007; Minelli *et al.*, 2009).

Le stress oxydant peut également intervenir dans les différentes phases de la carcinogenèse prostatique (initiation, promotion et progression). Plusieurs études ont montré des modifications significatives dans l'équilibre oxydant-antioxydant chez les patients atteint de cancer de la prostate. Des taux significatifs élevés de malondialdéhyde et de céruloplasmine, un niveau inférieur de glutathion réduite et une diminution de l'activité du glutathion peroxydase, de la catalase et de la superoxyde dismutase sont observés (Srivastava *et al.*, 2005; Kotrikadze *et al.*, 2008; Sandhya *et al.*, 2010).

Le thé vert, une boisson préparée à partir des feuilles sèches de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, a été largement étudié pour son effet antioxydant (Dutta *et al.*, 2013; Al-Awaida *et al.*, 2014) et chimiopréventif du cancer (Picard, 1996; Otsuka *et al.*, 1998; Albrecht *et al.*, 2008).

Des études épidémiologiques ont trouvé que la consommation de thé vert peut diminuer le risque de cancer de la prostate (Jian *et al.*, 2004; Kurahashi *et al.*, 2008).

En utilisant des lignées de cellules de cancer de la prostate, il a été montré que les polyphénols du thé vert, en particulier les catéchines, peuvent inhiber la carcinogenèse par différents mécanismes d'action comprenant l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire (Gupta *et al.*, 2000), l'apoptose (Hastak *et al.*, 2003), l'inhibition du récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) (Li *et al.*, 2007) et la régulation négative des récepteurs des androgènes par l'interaction avec le domaine de la liaison du ligand (Siddiqui *et al.*, 2011).

Dans de nombreux essais précliniques, l'administration d'une infusion orale d'un mélange enrichi par les catéchines du thé vert chez des souris TRAMP (transgenic adenocarcinoma of mouse prostate) a confirmé l'efficacité du thé vert dans la diminution de la progression de cancer de la prostate (Gupta *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2007). Ces études suggèrent l'importance d'identifier l'effet chimiopréventif des polyphénols de thé vert sur le cancer de la prostate chez les humains (Gupta *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2007).

Cependant, il n'y a eu que quelques études d'intervention évaluant l'effet du thé vert sur le traitement ou la prévention du cancer de la prostate chez les humains (Jatoi *et al.*, 2003; Bettuzzi *et al.*, 2006; McLarty *et al.*, 2009) et seulement peu entre eux ont trouvé des résultats encourageants (Bettuzzi *et al.*, 2006; McLarty *et al.*, 2009).

La présente étude visait à déterminer et répondre si le stress oxydatif pouvait être associé au développement et à la progression du cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien et si la consommation de thé vert peut avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate via la réduction de stress oxydant. Afin d'atteindre ces objectifs, l'étude a été divisée en deux parties: une partie *in vitro* et une partie *in humaine*. Nous avons choisi un type de thé vert chinois très commercialisé en Algérie et nous avons déterminé sa teneur en phénol et flavonoïdes. En plus nous avons évalué ces activités antioxydantes et antiprolifératives *in vitro* en utilisant plusieurs méthodes. Ensuite dans l'étude *in vivo*, nous avons évalué et suivi le statut oxydant et antioxydant ainsi que certains paramètres biochimiques chez les patients atteints de cancer de la prostate avant et après la consommation de thé vert.

## **1. MATERIELS ET METHODES**

### **1.1 Etude expérimentale: *In Vitro***

#### **1.1.1 Matériel végétal**

Le matériel végétal est le thé vert chinois commercial (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) qui constitue de feuilles séchées de la plante *Camellia sinensis*. Une quantité de 2000 mg de feuilles a été nettoyée de poussières et de débris utilisant un tamis et préparée pour l'extraction.

#### **1.1.2 Extraction des feuilles de thé vert**

L'extraction des feuilles de thé vert a été effectuée selon le protocole utilisé habituellement dans le laboratoire (Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Université Frères Mentouri Constantine) (figure 20). Dans la première étape, les feuilles sont soumises à une extraction par macération dans un mélange éthanol / eau (7/3 : v/v) pendant 48 heures trois fois successives. Les macérats sont ensuite filtrés sur un papier filtre et réunis.

Le filtrat combiné a été séché par évaporation à basse température (35°C) à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Une petite quantité d'extrait éthanolique brute obtenu a été gardé dans l'étuve à température ambiante jusqu'à son utilisation. Le reste d'extrait a été récupéré du ballon d'évaporation par l'eau distillée bouillante et solubilisé dans un volume total d'eau de 800 ml. Après une décantation pendant toute une nuit, le mélange a été filtré pour éliminer tous les impuretés qui peuvent exister. Le filtrat récupéré a subi ensuite des extractions par des solvants de polarité croissante (l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol). Cette opération a été réalisée dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement on prenant soin de dégazer régulièrement. Le mélange est laissé au repos jusqu'à on observe clairement que les deux phases, organique et aqueuse, sont séparées.

L'affrontement par l'éther de pétrole est réalisé seulement deux fois. Il était juste pour débarrasser le filtrat des cires, des lipides et de la chlorophylle. La phase aqueuse récupérée a subi ensuite trois extractions successives avec le chloroforme pour obtenir une phase organique contenant des composés phénoliques aglycones.

La phase aqueuse restante a subi à son tour trois extractions successives avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique certains composés phénoliques aglycones mais surtout les monoglycosides. La phase aqueuse restante est mélangée avec le *n*-butanol pour récupérer notamment les composés phénoliques di et triglycosides. Les trois phases organiques récoltées sont ensuite évaporées à sec à basse température (35°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Les extraits obtenus sont pesés puis repris du ballon d'évaporation par le méthanol et ensuite laissés séchés à température ambiante dans l'étuve. Tous les extraits de thé vert obtenus de l'extraction (extrait éthanolique brute (EtOH), extrait chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc) et extrait *n*-butanolique (*n*-BuOH) (figure 20) sont conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

Feuilles de thé vert (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)

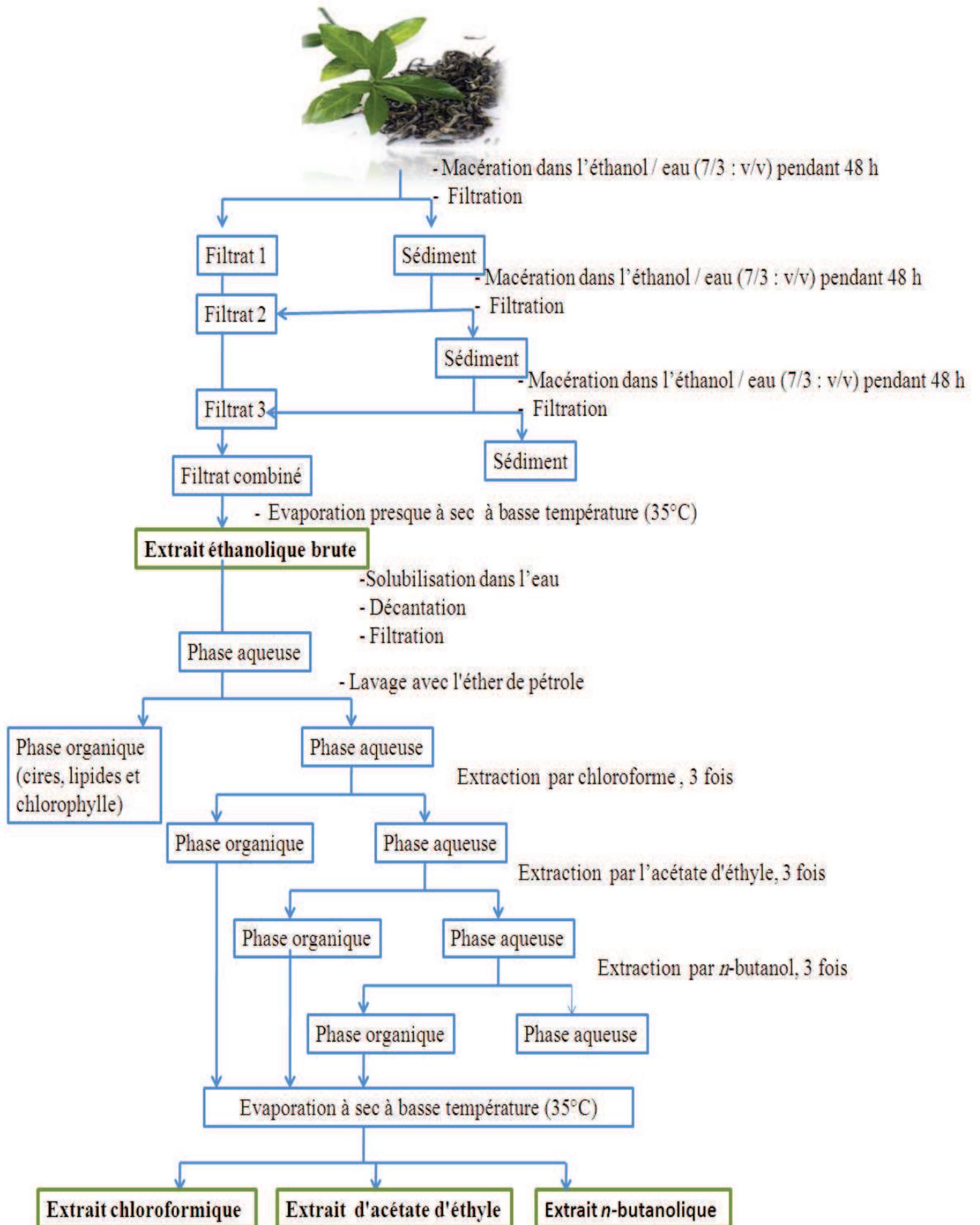


Figure 20: Protocole d'extraction des feuilles de thé vert.

### 1.1.3 Détermination de la teneur totale de thé vert en phénols

La teneur totale en phénols dans les différents extraits de thé vert (EtOH, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc et n-BuOH) a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton *et al.*, (1999). Les extraits de thé vert sont solubilisés dans le méthanol (MeOH) à une concentration de 1mg/ml. A chaque 20 µl des solutions d'extraits préparés, 100 µl de Folin-Ciocalteu et 1580 µl d'eau distillée ont été ajoutés successivement. Trois minutes plus tard, on ajoute 300 µl de carbonate de sodium (20 %). Les tubes à essai ont été secoués pendant 2 h à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 765 nm.

La concentration des composés phénoliques totaux a été déterminée en µg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par mg d'extrait en utilisant l'équation suivante de la courbe étalon d'acide gallique (annexe 4, figure 1):

$$\text{Absorbance} = 0.001 \times [\text{acide gallique}]$$

### 1.1.4 Détermination de la teneur totale de thé vert en flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes dans les extraits de thé vert a été déterminée selon la méthode de Wang *et al.*, (2008). A chaque 0.5 ml des extraits de thé vert préparés dans le méthanol à une concentration de 1mg/ml, 0.5 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 2% a été ajouté. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm.

La concentration des flavonoïdes a été déterminée en µg d'équivalent de quercétine (QE) par mg d'extrait en utilisant l'équation suivante de la courbe étalon de la quercétine (annexe 4, figure 2):

$$\text{Absorbance} = 0.034 \times [\text{quercétine}] + 0.015$$

### 1.1.5 Analyse des extraits de thé vert par HPLC- TOF/MS

La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse avec un analyseur à temps de vol (HPLC-TOF/MS), réalisée dans le laboratoire Plant Research à l'université de Çankiri Karatekin en Turquie, a été utilisée pour analyser la teneur phénolique des différents extraits de thé vert.

Le système HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity, muni d'une colonne ZORBAX SB-C18 (4.6x100 mm, 3.5 µm) est couplé au détecteur MS à temps de vol 6210 (TOF) et. Les phases mobiles A et B étaient une solution d'eau ultrapure avec de l'acide formique à 0.1% et de l'acétonitrile, respectivement. Le débit était de 0.6 ml / min et la température de la colonne était de 35 ° C.

Les extraits de thé vert (200 ppm) et les solutions stock de 23 composés phénoliques standards (2.5 ppm) ont été préparés dans le méthanol à température ambiante. Les échantillons ont été filtrés en passant par un filtre en PTFE (0.45 µm) par un injecteur pour éliminer les particules. Le volume d'injection était de 10 µl et le programme de solvant était comme suit: 0 min 10% de B; 0-1 min 10% B; 1-20 min 50% B; 20-23 min 80% B; 23-25 min 10% B; 25-30 min 10% B.

Le mode d'ionisation de l'instrument MS-TOF était électrospray (ES) négatif avec une température de gaz de 325 ° C, un débit de gaz de 10.0 l/min et un nébuliseur de 40 (psi). La teneur des extraits de thé vert en phénols a été déterminée en comparant les temps de rétention et les valeurs m/z des extraits de thé vert à celle des composés phénoliques standards.

### 1.1.6 Évaluation de l'activité antioxydante de thé vert

#### 1.1.6.1 Piégeage du radical libre DPPH

La capacité des extraits de thé vert à piéger le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) a été évaluée par la méthode de Braca *et al.*, (2001). Tout d'abord, le DPPH, la vitamine C et les différents extraits de thé vert sont préparés préalablement dans le méthanol. Ensuite, 3 ml de solution de DPPH (0.004%) a été ajouté à des concentrations croissantes (1, 2.5, 5, 10, 20 et 25 µg / ml) d'extraits de thé vert ou de la vitamine C préparés dans le méthanol. Les essais ont été effectués en triple. Les tubes d'essai des échantillons ont été incubés dans l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été ensuite mesurée à 517 nm. La vitamine C a été utilisé comme contrôle positif et le pourcentage d'activité de piégeage de DPPH (*I* %) a été calculé en utilisant l'équation (1):

$$I \% = \left[ \frac{(A0 - A1)}{A0} \right] \times 100, \quad (1)$$

A0: Absorbance de la solution de DPPH seule

A1: Absorbance de la solution de DPPH + l'extrait de thé vert ou de la vitamine C.

Les concentrations inhibitrices médianes (IC50) des différents extraits de thé vert et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH (*I* %) en fonction des concentrations croissantes des extraits de thé vert et de la vitamine C.

### 1.1.6.2 Piégeage du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)

La capacité des extraits de thé vert à piéger le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) a été évaluée selon la méthode de la littérature de Wang *et al.*, (2008) avec quelques modifications. Afin de générer les radicaux hydroxyles par réaction de Fenton, 0.5 ml de FeSO<sub>4</sub> (8 mM) a été mélangé avec 0.8 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mM). Ensuite 0.5 ml d'eau distillée est ajouté suivi par des concentrations croissantes des différents extraits de thé vert ou de vitamine C (1, 2.5, 5, 10, 20 et 30 µg/ml) et 0.2 ml de salicylate de sodium (6 mM). Les échantillons ont été mélangés puis incubés à 37 ° C pendant 1 h. L'absorbance a été mesurée à 562 nm.

La vitamine C a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'activité de piégeage du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) (*I* %) a été calculé en utilisant l'équation suivante:

$$I \% = \left[ 1 - \frac{A1 - A2}{A0} \right] \times 100$$

A0: Absorbance du témoin (sans extrait ou vitamine C)

A1: Absorbance de l'échantillon avec l'extrait ou vitamine C

A2: Absorbance de l'échantillon sans salicylate de sodium.

Les concentrations inhibitrices médianes (IC50) des différents extraits de thé vert et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) (*I* %) en fonction des concentrations croissantes des extraits de thé vert et de la vitamine C.

### 1.1.6.3 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

La capacité des extraits de thé vert à inhiber la peroxydation lipidique a été évaluée selon le protocole modifié de Cao et Ikeda, (2009) en utilisant le vitellus d'œuf comme source riche en lipides. A 0.5 ml d'homogénat de vitellus d'œuf à 10%, 50 µl de FeSO<sub>4</sub> (0.07 M) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé ensuite avec des concentrations croissantes d'extraits de thé vert ou de la vitamine C (50, 100, 200, 300 et 400 µg / ml) à 37 ° C pendant 30 min.

Après incubation, on ajoute successivement 1 ml de TCA 20% (acide trichloracétique) et 1.5 ml de TBA 1% (acide thiobarbiturique). Les échantillons ont été mélangés puis incubés une deuxième fois pendant 15 minutes à 95°C.

Après centrifugation des échantillons à 400 g pendant 20 min, les substances réactives thiobarbiturique résultantes (TBARS) ont été mesurées dans le surnageant à 532 nm.

La vitamine C a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique ( $I$  %) a été calculé en utilisant l'équation (1), où  $A_0$  est l'absorbance de témoin (sans extrait de thé vert ou vitamine C) et  $A_1$  est l'absorbance de l'échantillon + de l'extrait de thé vert ou de la vitamine C.

Les concentrations inhibitrices médianes (IC50) des différents extraits de thé vert et de la vitamine C ont été calculées à partir des équations des courbes de tendances linéaires obtenues des graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique ( $I$  %) en fonction des concentrations croissantes des extraits de thé vert et de la vitamine C.

#### **1.1.6.4 Inhibition des dommages oxydatifs de l'ADN**

Le pouvoir des extraits de thé vert à inhiber les dommages oxydatifs de l'ADN a été testé dans laboratoire Plant Research à l'université de Çankiri Karatekin en Turquie, utilisant un ADN plasmidique photolysé par rayonnement UV en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Russo *et al.*, 2001).

Dans la première étape, un ADN plasmidique 46966 a été extrait des bactéries *Escherichia coli*. Ensuite des aliquotes de 1  $\mu$ l de plasmides 46966 (200  $\mu$ g / ml) ont été mis dans deux groupes de microtubes eppendorf. Dans le premier groupe, on a ajouté séparément 50  $\mu$ g des différents extraits de thé vert suivi par 4  $\mu$ l de  $H_2O_2$  à 3% et dans le deuxième groupe on a ajouté seulement de 4  $\mu$ l de  $H_2O_2$  à 3% et ce groupe et servi comme contrôle irradié (CR).

Tous les microtubes eppendorf sont ensuite placés directement sur la surface d'un transilluminateur UV (300 nm) pendant 10 min à température ambiante. Un aliquote de 1  $\mu$ l de plasmides 46966 a été mis dans un autre microtube eppendorf et laissé sur payasse pour servir comme contrôle non irradié (C0).

La séparation d'ADN a été réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Tous les échantillons ont été soumis dans les puits du gel d'agarose par ordre. Les échantillons de contrôle non irradié (C0) et de contrôle irradié (CR) sont placés respectivement dans les premiers puits. Après la migration, le gel d'agarose est photographié au moyen d'un système d'imagerie au gel de Lourmat (Vilber).

### 1.1.7 Évaluation de l'activité anticancéreuse de thé vert sur des cellules cancéreuses prostatiques

L'activité anticancéreuse des différents extraits de thé vert a été évaluée sur une lignée cellulaire de cancer de la prostate métastatique humaine PC-3. L'activité anticancéreuse de l'extrait éthanolique a été évaluée par l'analyseur de cellules en temps réel xCELLigence (RTCA) dans laboratoire Plant Research à l'université de Çankiri Karatekin en Turquie et l'activité de l'extrait chloroformique, d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique a été évaluée utilisant la méthode de la sulforhodamine B (SRB) au CNC (Center for Neuroscience and Cell biology) à l'université de Coimbra au Portugal.

#### 1.1.7.1 Système xCELLigence (RTCA)

##### - *Culture des cellules et préparation de la suspension cellulaire*

Les cellules PC-3 dérivés d'un cancer de la prostate métastatique humaine ont été cultivées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu d'aigle modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma), supplémenté avec 10% du sérum fœtal bovin (FBS) (Sigma, Allemagne) et 2% d'une solution pénicilline/streptomycine (Sigma, Allemagne) dans des boîtes de Pétri pour culture cellulaire, stériles. Toutes les cellules ont été soumises à des passages par trypsinization lorsqu'elles atteignent 70-80% de confluence.

Lors de l'expérience, les cellules PC-3 ont été détachées du fond de la boîte de culture par 10 ml d'une solution de trypsine-EDTA. Après le détachement des cellules, la trypsinization est arrêtée par 10 ml de milieu de culture et mélanger soigneusement. Cette suspension a été transférée dans un tube conique et placé dans la centrifugeuse. Le surnageant est aspiré par vacuum et les cellules PC-3 qui restent au fond du tube sont diluées dans 4 ml de milieu. La concentration cellulaire de la suspension obtenue a été mesurée par CEDEX HiRes compteur des cellules qui utilise le bleu de Trypan.

##### - *Préparation de la solution d'extrait éthanolique*

L'extrait éthanolique est préparé dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 20 mg/ml puis stockés à 4 ° C dans l'obscurité.

##### - *Traitement des cellules par l'extrait éthanolique et mesure de la prolifération cellulaire*

Avant de commencer la manipulation, la hotte de culture cellulaire ainsi que les matériels qui y seront utilisés dedans doivent être stérilisés par de l'éthanol à 70% pour éviter la contamination.

Une plaque 96 puits stérile a été utilisée. Premièrement on a ajouté 50 µl du milieu de culture DMEM dans tous les puits de la plaque et on la laissée dans la hotte pendant 15 minutes, puis dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> pendant 15 minutes supplémentaires. Après ce temps, une mesure de nombre des cellules a été effectuée pour confirmer que le milieu nutritionnel n'est pas contaminé par des cellules. Ensuite, on a ajouté 100 µl de la suspension cellulaire ( $2.5 \times 10^4$  cellules/100 µl) dans les tous les puits de la plaque à l'exception des trois derniers qui sont utilisés comme contrôle négative (contiennent du milieu de culture sans cellules). La plaque est laissée dans la hotte pendant 30 min. Ensuite, la plaque a été insérée dans l'instrument xCELLigence dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> et une mesure a été effectuée pendant 80 min. Après, 25 µl de la solution d'extrait éthanolique est mélangé à 475 µl du milieu de culture DMEM. Ensuite 50, 20 et 10 µl de cette solution ont été ajouté dans les puits respectivement pour des concentrations de 250, 100 et 50 µg / ml. A la fin, le volume final a été complété dans les puits à 200 µl avec du milieu de culture DMEM. Trois puits avec des cellules PC-3 ne sont pas traités, utilisés comme contrôle positive.

La plaque a été insérée ensuite dans l'instrument xCELLigence dans l'incubateur pendant 51 h. La prolifération des cellules PC-3 en présence et en absence d'extrait éthanolique est mesurée par xCELLigence durant toutes les 51 h et suivi à l'aide d'un ordinateur lié à l'instrument.

#### **1.1.7.2 Méthode de la sulforhodamine B (SRB)**

##### **- *Culture cellulaire***

La lignée cellulaire de cancer de la prostate métastatique humaine PC-3 (Kaighn *et al*, 1979) et la lignée cellulaire des fibroblastes BJ dérivée du tissu du prépuce (America Tissue Type Collection Manassas, VA) (Lorenz *et al*, 2001), ont été cultivés dans des milieux RPMI (1640) et DMEM (D5648) (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY) respectivement, supplémentés avec 1.5 g/l de sodium de bicarbonate, de 10% sérum fœtal bovin (FBS), de 100 U/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine dans des boîtes de culture tissulaire à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été nourries tous les 2 à 3 jours, et sous-cultivées une fois qu'elles ont atteint 70-80% de confluence.

##### **- *Préparation des solutions des extraits chloroformique, d'acétate d'éthyle et n-butanolique***

Les extraits de thé vert (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc et *n*-BuOH) ont été solubilités dans le DMSO à des concentrations croissantes (5, 10, 25 et 50 mg/ml) et stockés à 4 ° C dans l'obscurité.

- *Traitement des cellules par les extraits et mesure de la prolifération cellulaire*

La prolifération cellulaire a été mesurée utilisant la méthode de la sulforhodamine B (SRB) qui basée sur la mesure des protéines cellulaires, qui dépend de la quantité de cellules dans chaque puits (Lin *et al.*, 1999). Dans la présente étude, nous avons utilisé des fibroblastes BJ du prépuce humain, qui ont une longue durée de vie et sont couramment utilisés comme lignée cellulaire non tumorale (Tripathi *et al.*, 2012) et la lignée cellulaire PC-3 humaine, communément utilisée comme un modèle *in vitro* dans les études sur le cancer de la prostate (Kaighn *et al.*, 1979).

Les deux lignées cellulaires PC-3 et BJ ont été cultivées dans des plaques de 48 puits à un volume final de 500  $\mu$ l par puits et à une densité de 10 000 et 20 000 cellules par ml, respectivement. Pour diminuer le niveau d'erreur quatre plaques sont préparées pour chaque lignée cellulaire. Après 24 h d'incubation dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>, les deux lignées cellulaires ont été traitées avec des concentrations croissantes d'extraits de thé vert (5, 10, 25 et 50  $\mu$ g/ml). Les extraits de thé vert ont été ajoutés directement dans milieu de culture aux concentrations décrites tenant en compte que le volume total de DMSO était toujours inférieur à 0.1%, ce qui a eu des effets négligeables dans toutes les expériences. La première ligne des puits de la plaque est dans toutes les expériences réservée aux contrôles qui ont reçu que de DMSO. Afin de négliger l'effet de DMSO sur les cellules dans les échantillons, le volume de DMSO ajouté aux contrôles doit être toujours équivalent au volume des solutions des extraits ajoutés dans les échantillons.

Après 24 h d'incubation avec les extraits, le milieu d'incubation a été aspiré par vacuum et les puits ont été rincés avec du PBS à 1%. Ensuite les cellules ont été fixées dans de l'acide acétique à 1% dans du méthanol glacé pendant au moins un jour dans le congélateur. Les cellules ont été ensuite incubées avec 0.05% (p / v) de réactif SRB préparé dans de l'acide acétique à 1% pendant 1 h à 37 °C. Après ce temps, le réactif est versé et les plaques sont rincées avec de l'acide acétique à 1% afin d'éliminer le colorant non lié aux protéines cellulaires. 1 ml de solution de base Tris (10 mM, pH 10) est ajouté dans tous les puits utilisés des plaques pour extraire le colorant lié aux protéines cellulaires. Après l'agitation des plaques, 200  $\mu$ l de chaque puits des plaques de 48 puits a été transféré dans les puits des plaques 96 puits.

L'absorbance a été mesurée à 540 nm et la quantité de colorant libéré qui est proportionnelle au nombre de cellules présentes dans les puits a été mesurée (Lin *et al.*, 1999). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de contrôle.

### **1.1.8 Évaluation de l'effet de thé vert sur la condensation de la chromatine nucléaire et la polarisation mitochondriale utilisant la microscopie à épifluorescence vitale**

Ce test a été réalisé au niveau de CNC (Center for Neuroscience and Cell biology) à l'université de Coimbra au Portugal. Un microscope à épifluorescence vitale a été utilisé pour détecter la condensation de la chromatine nucléaire et les altérations de la polarisation mitochondriale dans la lignée cellulaire de cancer de la prostate métastatique humaine PC-3 avant et après le traitement par les extraits de thé vert. Les fibroblastes BJ sont utilisés comme une lignée cellulaire non tumorale. Les deux lignées cellulaires PC-3 et BJ ont été cultivées dans des plaques stériles à 6 puits contenant une lamelle stérile en verre par puits, à une densité de 35 000 et 40 000 cellules/ml dans un volume final de 2 ml par puits, respectivement. Après 24 h d'incubation dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>, trois puits de chaque lignée cellulaire ont été traités par 50 µg/ml d'extrait d'acétate d'éthyle et trois autres de chaque lignée cellulaire ont été traités par 50 µg/ml d'extrait *n*-butanolique. Quelques puits sont laissés sans traitement et utilisés comme des contrôles. Ensuite toutes les plaques ont été incubées pendant 24 h. Trente minutes avant la fin d'incubation, les cellules ont été incubées avec des sondes de fluorescence, TMRM (100 nM) et Hoechst 33342 (1 µg/ml) préparés dans un tampon de solution de microscopie (NaCl 120 mM; 3.5 mM de KCl; 0.4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 mM de NaHCO<sub>3</sub>; 1.2 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10 mM de pyruvate de sodium; 20 mM de HEPES, pH 7.4). Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse TE2000U et ont été traitées avec le programme ImageJ 1.45S.

### **1.1.9 Évaluation de l'effet de thé vert sur la protéine p53 utilisant le western blot**

Le western blot, réalisé au niveau de CNC (Center for Neuroscience and Cell biology) à l'université de Coimbra au Portugal, a été utilisé pour déterminer l'effet des extraits de thé vert sur la teneur des cellules cancéreuses prostatiques en protéine cellulaire p53. Cette technique a été effectuée passant par plusieurs étapes.

#### **- Préparation des échantillons**

Les lignées cellulaires PC-3 et BJ ont été cultivées dans les conditions mentionnés précédemment à une densité de 35 000 et 40 000 cellules/ml respectivement dans des boîtes de Pétri de culture cellulaire de 176.62 cm<sup>2</sup> et incubées à l'incubateur à CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules atteignent 80- 90% de confluence, quatre boîtes de Pétri de chaque lignée cellulaire ont été traitées par 50 µg/ml d'extrait d'acétate d'éthyle et quatre autres de chaque lignée cellulaire ont été traitées par 50 µg/ml d'extrait *n*-butanolique.

Des boîtes contrôles sont également préparées pour chaque lignée cellulaire et traitées avec de DMSO à la place des extraits de thé vert. Après 24 h d'incubation, les lignées cellulaires PC-3 et BJ ont été récoltées par trypsinisation. Les cellules flottantes dans le milieu de culture ont également été recueillies et combinées avec les cellules adhérentes. Après une centrifugation à 1000 g pendant 15 minutes, le culot cellulaire est lavé une fois avec le PBS et une autre centrifugation a été réalisée. Les cellules ont été ensuite lysées par sonication dans un tampon de la lyse cellulaire (Bio-Rad, 9803) supplémenté de fluorure de phénylméthylsulfonyl (inhibiteur des protéases). Ensuite, les teneurs en protéines ont été déterminées par la méthode de Bradford, (1976).

**- *Électrophorèse sur gel***

Les protéines ont été dénaturées à 100 ° C pendant 5 minutes dans un tampon Laemmli (Bio-Rad). Puis les échantillons sont chargés l'un à côté de l'autre dans des puits formés dans le gel. 20 µg de protéines de chaque échantillon sont séparées selon leur taille par électrophorèse sur 14% de gels de SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE). Les protéines sont séparées par masse en « bandes » dans chaque « couloir » formé sous les puits. Un couloir est réservé au standard », une mixture de protéines possédant des poids moléculaires définis.

**- *Transfert des protéines sur membrane***

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par les anticorps, elles sont transférées électrophorétiquement du gel sur une membrane de PVDF (difluorure de polyvinylidène). La membrane est placée face-à-face avec le gel, et un courant électrique est appliqué. Après le transfert, la membrane est lavée deux fois avec de l'eau distillée puis marquée avec la solution de marquage au rouge Ponceau pendant 5 minutes avec une agitation douce. Après lavage de la membrane avec de l'eau distillée au moins trois fois les protéines cellulaires sont visualisées. Comparant aux bandes des protéines de standard utilisé les niveaux des bandes de différentes protéines des échantillons sur la membrane sont marqués et le niveau de la protéine p53 est déterminé. La membrane est ensuite photographiée au moyen d'un système d'imagerie. Cette étape nous permet d'évaluer sur la membrane si la quantité de protéine mise dans chaque puits est similaire.

**- *Blocage***

La membrane est coupée horizontalement afin d'utiliser la partie qui contienne seulement la protéine p53. Un blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé en plongeant la membrane dans une solution du lait à 5% préparé dans du

TBST (Tris-HCl 50 mM, pH 8, 154 mM NaCl et 0.1% tween 20) pendant 2 h à température ambiante.

- **Détection**

La membrane a été incubée pendant une nuit à 4 ° C avec les anticorps dirigés contre la protéine p53 (1: 1 000), puis avec des anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de souris (1: 2 500) pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite elle a été incubée avec le système de détection ECF (de GE Healthcare, Piscataway, NJ) et photographiée avec le système d'imagerie multispectrale Biospectre (UVP, LLC Upland, CA, Cambridge, RU). La densité de chaque bande a été calculée avec Quantity One Software (Bio-Rad).

**1.2 Etude expérimentale: *In vivo* (*In humaine*)**

**1.2.1 Recrutement des individus**

- **Les cas**

Quatre-vingt-dix patients diagnostiqués avec un cancer de la prostate et suivi dans le service d'urologie dans la Clinique d'Urologie Néphrologie et de Transplantation Rénale Daksi – Constantine ont été interviewés et invités à participer à l'étude. L'objectif de l'étude et la procédure qui va être utilisée sont bien expliqué à tous les patients (annexe 1). Quatre-vingt-sept patients ont accepté de participer et ils ont nous donné leur consentement écrit (annexe 2) alors que trois ont refusé. Le même type de thé vert chinois commercial que nous avons déterminé sa teneur en phénol et flavonoïdes et évalué ces activités antioxydantes et antiprolifératives *in vitro* a été distribué aux patients.

Les participants ont été invités de boire 5 tasses d'infusion de thé vert par jour pendant 6 mois. Chaque tasse de thé doit être fraîchement préparée par l'infusion de 2 g de feuilles de thé vert dans 100 ml d'eau à une température de 70-80 ° C pendant 5 minutes (Astill *et al.*, 2001). Pour que l'infusion de thé soit préparée par la même manière par tous les patients, la quantité fournie de thé a été pesée et divisée en doses de 2 g et rechargée dans les paquets de thé accompagnée de la méthode de préparation de l'infusion.

Les informations médicales comme le score de Gleason, le taux de PSA au début du diagnostic et le traitement utilisé pour chaque patient sont collecté à partir des dossiers médicaux des patients.

**- Les témoins**

Les témoins sont sélectionnés soigneusement à la Clinique d'Urologie Néphrologie et de Transplantation Rénale Daksi – Constantine et dans la salle de prélèvement sanguin du laboratoire de biochimie dans l'établissement public hospitalier (*EPH*) de la daïra de Chelghoum Laïd. Ils étaient des individus sains (ne présentent aucune maladie prostatique ou chronique), non fumeurs et non buveurs d'alcool liés aux cas en âge et en sexe. Afin d'éviter le maximum des facteurs qui peut affecter le statut oxydant et antioxydants chez le groupe témoin, les fumeurs, les buveurs d'alcool et les hommes présentant après les analyses une glycémie perturbé ont été également exclues.

**1.2.2 Collecte des échantillons de sang**

Afin d'évaluer certains paramètres biochimiques sanguins reflétant le statut oxydant et antioxydant chez les patients et les témoins, des prélèvements sanguins sont effectués à jeun au sein de la Clinique d'Urologie Néphrologie et de Transplantation Rénale Daksi – Constantine et du laboratoire de biochimie dans l'établissement public hospitalier (*EPH*) de la daïra de Chelghoum Laïd. La collecte des échantillons pour les patients est réalisée en trois étapes successives: avant la consommation de thé vert ( $T = 0$ ), après 3 mois de consommation de thé vert ( $T = 3$  mois) et après 6 mois de consommation de thé vert ( $T = 6$  mois). Les échantillons de sang ont été prélevés dans des tubes héparinés et immédiatement centrifugés à 3000 g pendant 15 min. Le plasma est séparé des éléments figurés du sang et recueilli dans des tubes secs étiquetés et numérotés. Les érythrocytes ont été lavés trois fois successive par une solution isotonique froide de chlorure de sodium (0.9 %) (1: 10, v / v). Le surnageant et la couche des globules blancs après centrifugation (3000 tour/min, 15 min) ont été soigneusement éliminés après chaque lavage. Les érythrocytes obtenus sont ensuite séparés en deux tubes étiquetés et numérotés, un servi pour le dosage du glutathion réduit (GSH) et l'autre pour la préparation de l'hémolysat qui est utilisé pour le dosage des autres paramètres. Tous les échantillons sont ensuite immédiatement conservés à – 80°C afin d'être analysés ultérieurement.

Le Comité d'éthique de l'EHS Daksi avait certifié que la collecte des échantillons a été effectuée au service d'urologie dans la Clinique d'Urologie Néphrologie et de Transplantation Rénale Daksi – Constantine et confirme qu'aucun risque pour les participants a été noté (annexe 3).

### 1.2.3 Préparation d'hémolysat d'érythrocytes

L'hémolysat est préparé pour le dosage du malondialdéhyde (MDA) érythrocytaire, les thiols totaux et l'évaluation de l'activité enzymatique du catalase et du glutathion peroxydase. Le jour du dosage, une fraction d'érythrocytes de chaque échantillon est mise en suspension à 50% dans une solution de NaCl à 0.9 %. Puis un volume de cette suspension est mélangé avec 9 volumes d'eau distillée et agité vigoureusement utilisant le vortex. Après 5 à 10 min, une centrifugation à 300 g pendant 15 minutes est réalisée pour éliminer les débris cellulaires. Les hémolysats obtenus sont transférés dans des tubes secs numérotés selon l'ordre des échantillons et conservés au froid (dans la glace) au moment du dosage des différents paramètres.

### 1.2.4 Evaluation des différents paramètres biochimiques

#### 1.2.4.1 Dosage du glutathion réduit (GSH) au niveau d'érythrocytes

Le dosage du glutathion réduit (GSH) a été réalisé selon la méthode de Beutler *et al.*, (1963). Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation du GSH par l'acide 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB, Ellman's Reagent) et la formation de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB), un composé de couleur jaune absorbe la lumière à 412 nm, selon la réaction suivante:



Brièvement, 0.2 ml d'érythrocytes ont été mélangé avec 1.8 ml d'eau distillée, puis 3 ml de solution de précipitation de protéines (1.65 g d'acide métaphosphorique, 0.2 g d'EDTA et 30 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée) ont été ajoutés. Après 5 minutes, le mélange est centrifugé à 300 g pendant 15 minutes. Ensuite 8 ml de solution de phosphate disodique (0.3 mM) et 1 ml de DTNB (1 mM) ont été ajoutés à 2 ml de surnageant. Parallèlement le blanc a été préparé en remplaçant les érythrocytes par 0.2 ml d'eau distillée et le standard de GSH en remplaçant les érythrocytes par 0.2 ml de solution du glutathion (0.1 mM). Après 5min, la densité optique a été mesurée à 412 nm utilisant un spectrophotomètre. La concentration du GSH est exprimée en mg par dl d'érythrocytes (mg/dl).

#### 1.2.4.2 Evaluation de l'activité de la catalase (CAT) érythrocytaire

L'activité de la catalase érythrocytaire a été estimée dans l'hémolysat selon la méthode de Claiborne, (1985). Elle est basée sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) du fait de l'activité de la catalase présente dans l'échantillon selon la réaction suivante :



Un volume de 25 µl d'hémolysat a été mélangé avec 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et 975 µl du peroxyde d'hydrogène (0.019 M). La densité optique a été mesurée trois fois successive chaque 60 secondes. L'activité de la catalase a été exprimée en unité internationale par g d'hémoglobine (UI / gHb).

#### 1.2.4.3 Evaluation de l'activité du glutathion peroxydase (GPx) érythrocytaire

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été évaluée par la méthode de Flohe et Gunzler, (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par le glutathion peroxydase (GPx) qui se trouve dans l'échantillon en présence de glutathion réduit (GSH) selon la réaction suivante:



Brièvement, 0.2 ml d'hémolysat est mélangé avec 0.4 ml de GSH (0.1 mM), 0.2 ml de solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM de, PH 7.4). Après 5 min d'incubation à 25 ° C, 0.2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3 mM) a été ajouté. Le mélange a été incubé à 37 ° C pendant 10 minutes. La réaction a été arrêtée ensuite par 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 1%. Après centrifugation, le surnageant est incubé avec le DTNB et le TBS. La densité optique a été mesurée à 412 nm et l'activité GPx a été exprimée en µmol GSH / gHb.

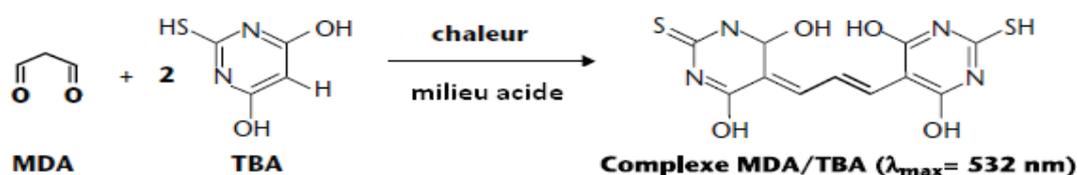
#### 1.2.4.4 Dosage des thiols totaux au niveau d'érythrocytes

Le dosage des thiols totaux est réalisé selon la méthode de Sedlak et Lindsay, (1968) avec quelques modifications. Un volume de 50 µl d'hémolysat est mélangé avec 600 µl du tampon Tris-EDTA et 40 µl de DTNB. Le volume final du mélange réactionnel est complété jusqu'à 4 ml par le méthanol. Les échantillons ont été incubés pendant 15 min à température ambiante puis centrifugés pendant 15 min à 300 g. La densité optique a été mesurée à 412 nm.

La concentration des thiols totaux dans les érythrocytes est calculée utilisant le coefficient d'extinction molaire,  $13.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  exprimée en  $\mu\text{mol} / \text{gHb}$ .

#### 1.2.4.5 Dosage du malondialdéhyde (MDA) au niveau d'érythrocytes

La peroxydation lipidique dans les érythrocytes a été évaluée en mesurant le malondialdéhyde (MDA) dans l'hémolysat selon la méthode de double chauffage de Draper et Hadley, (1990). Cette méthode est basée sur la réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique dans un milieu acide (pH 2-3) et à chaud (test des TBARS). La condensation d'une molécule de MDA avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) forme un complexe coloré en rose présentant un maximum d'absorbance à 532 nm selon la réaction suivante:



Un volume de 2.5 ml de solution de TCA à 10% est mélangé avec 0.5 ml d'hémolysat, puis incubé au bain marie pendant 15 min à 90- 100°C. Après refroidissement des échantillons dans l'eau du robinet, une centrifugation a été réalisée à 1000 g pendant 10 min. 2 ml de surnageant est mélangé ensuite avec 1 ml de TBA (0.67%) et incubé une deuxième fois au bain marie pendant 15 min à 90- 100°C. Après refroidissement des échantillons dans l'eau du robinet, la densité optique a été mesurée à 532 nm. La concentration du MDA a été calculée utilisant le coefficient d'absorbance de complexe MDA-TBA,  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , et exprimée en  $\mu\text{mol} / \text{gHb}$ .

#### 1.2.4.6 Dosage de l'hémoglobine (Hb)

Le dosage de l'hémoglobine a été réalisé par la méthode de la cyanméthémoglobine utilisant le réactif de Drabkin (Drabkin et Austin, 1932). Un volume de 20  $\mu\text{l}$  d'érythrocytes a été mélangé avec 5 ml de la solution de Drabkin. Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 540 nm. Parallèlement une courbe étalon a été réalisée utilisant des échantillons d'érythrocytes avec des concentrations d'hémoglobine connus. La concentration d'hémoglobine a été exprimée en g/dl (annexe 4, figure 3).

#### 1.2.4.7 Dosage du MDA au niveau du plasma

La peroxydation lipidique a été évaluée aussi au niveau du plasma par le dosage du MDA selon la méthode d'Uchiyama et Mihara, (1978). Le principe de cette méthode est basée sur la réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique dans un milieu acide (pH 2-3) et à chaud. La densité optique du complexe formé entre le MDA de l'échantillon et le TBA est mesurée à 532 nm et la concentration du MDA est exprimée nmol/ 1ml plasma.

#### 1.2.4.8 Dosage de l'albumine

L'albumine est constitué la source principale des groupements thiols dans le plasma. Son dosage est réalisé à l'aide d'un kit commercial (Spinreact, Espagne). L'albumine se combine au vert de bromocrésol, à pH légèrement acide, entraînant un changement de couleur de l'indice, passant du jaune-vert au vert-bleuté. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration d'albumine présente dans l'échantillon.

Un volume de 5 µl de plasma est mélangé avec 1 ml de réactif (vert de bromocrésol, pH 4.2, 0.12 mmol/l). Le blanc est constitué de 1 ml de réactif et le standard est préparé par 5 µl de la solution étalon de l'albumine est 1 ml de réactif. Après 10 min d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 630 nm.

#### 1.2.4.9 Dosage de la glycémie

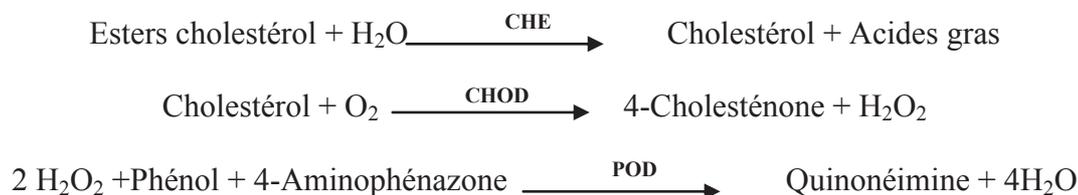
Le dosage de la glycémie est réalisé à l'aide d'un kit commercial (Spinreact, Espagne). La glucose-oxydase (GOD) catalyse l'oxydation de glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produit se détecte avec un accepteur chromogène d'oxygène, phénol, 4-aminophénazone (4- AF), en présence de la peroxydase (POD). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de glucose présente dans l'échantillon.



Un volume de 10 µl de plasma est mélangé avec 1 ml de réactif (TRIS pH 7.4, phénol, glucose oxydase, peroxydase, 4 – aminophénazone). Le blanc est constitué de 1 ml de réactif et le standard est préparé par 10 µl de la solution étalon de glucose est 1 ml de réactif. Après 10 min d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 505 nm.

### 1.2.4.10 Dosage du cholestérol total

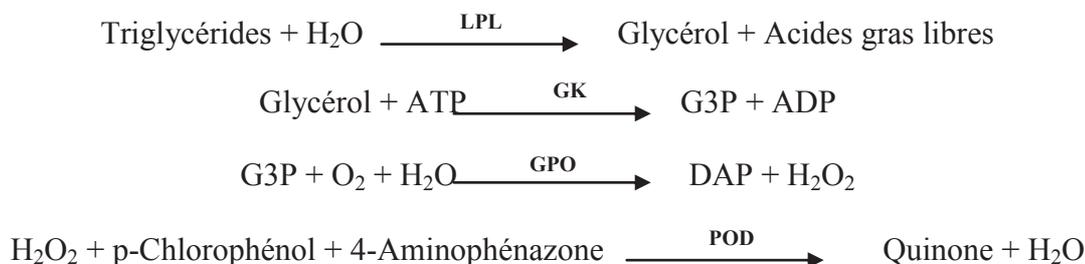
Le dosage du cholestérol total est réalisé à l'aide d'un kit commercial (Spinreact, Espagne). La réaction du réactif avec le cholestérol présent dans l'échantillon donne lieu à un composé coloré. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de glucose présente dans l'échantillon.



Un volume de 10 µl de plasma est mélangé avec 1 ml de réactif (PIPES pH 6.9, phénol, cholestérol-estérase (CHE), cholestérol-oxydase (CHOD), peroxydase (POD), 4-aminophénazone). Le blanc est constitué de 1 ml de réactif et le standard est préparé par 10 µl de la solution étalon de cholestérol est 1 ml de réactif. Après 10 min d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 505 nm.

### 1.2.4.11 Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides est réalisé à l'aide d'un kit commercial (Spinreact, Espagne). Les triglycérides incubés avec de la lipoprotéinlipase (LPL) libèrent du glycérol et des acides gras libres. Le glycérol est phosphorylé par la glycérophosphate déshydrogénase (GPO) et de l'ATP en présence de glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'adénosine-5-di phosphate (ADP). Le G3P est alors transformé en dihydroxiacétone phosphate (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par le GPO. Au final, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) réagit avec du 4-aminophénazone (4- AF) et du p-chlorophénol, réaction catalysée par la peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rouge. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides présents dans l'échantillon.



Un volume de 10 µl de plasma est mélangé avec 1 ml de réactif (GOOD pH 7.5, p-chlorophénol, lipoprotéine lipase, glycérol kinase, glycérol-3-oxydase, peroxydase, 4 – Aminophénazone, ATP). Le blanc est constitué de 1 ml de réactif et le standard est préparé par 10 µl de la solution étalon de triglycérides est 1 ml de réactif. Après 10 min d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 505 nm.

#### **1.2.4.12 Dosage des protéines totales**

Le dosage des protéines totales est réalisé par la méthode de Biuret utilisant un kit commercial (Spinreact, Espagne). Les protéines de l'échantillon donnent une couleur violette/bleue avec le réactif de Biuret. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon.

Un volume de 25 µl de plasma est mélangé avec 1 ml de réactif de Biuret. Le blanc est constitué de 1 ml de réactif et le standard est préparé par 25 µl de la solution étalon de l'albumine bovine est 1 ml de réactif. Après 5 min d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 540 nm.

### **1.3 Analyse statistiques**

Le traitement et l'analyse des données ont été effectués par le logiciel Graph Pad Prism version 7. Les résultats de Sulforhodamine B ont été exprimés sous forme de moyenne ± SEM et les résultats de microscope à épifluorescence vitale et de western blot ont été exprimés sous forme de moyenne ± écart type.

Des comparaisons multiples ont été effectuées utilisant une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie d'un test de comparaisons multiple de Dunnett. Les résultats du dosage des différents paramètres biochimique dans l'étude *In humaine* ont été exprimés sous forme de moyenne ± écart type.

L'analyse de la différence entre les différents groupes étudiés est effectuée par le test *t* de Student. Des valeurs de  $p < 0.05$  sont considérés comme statistiquement significatives.

## 2. RESULTATS

### 2.1 Caractérisation de la composition et des activités du thé vert *in vitro*

#### 2.1.1 Rendement de l'extraction de thé vert

Une masse de 664.97 g d'extrait éthanolique brute a été obtenu de l'extraction de 2000 g de feuilles de thé vert par un mélange éthanol / eau (7/3 : v/v) avec un rendement de 33.44%. L'extraction de cet extrait par des solvant de polarité croissante a nous permis d'obtenir successivement 4.7 g d'extrait chloroformique, 27.66 g d'extrait d'acétate d'éthyle et 46.31 g d'extrait *n*-butanolique. L'extrait *n*-butanolique représente le rendement le plus élevé (2.31%), suivit par l'extrait d'acétate d'éthyle (1.38%). Le rendement le plus faible a été obtenu par l'extrait chloroformique (0.23%) (tableau 8).

**Tableau 8:** Rendement de l'extraction de thé vert

<i>Matériel végétal</i>	<i>Extrait</i>	<i>Masse (g)</i>	<i>Rendement (%)</i>
2000 g de feuilles de thé vert	Éthanolique brute (EtOH)	664.97	33.24
	Chloroformique (CHCl <sub>3</sub> )	4.7	0.23
	Acétate d'éthyle (EtOAc)	27.66	1.38
	<i>n</i> -butanolique ( <i>n</i> -BuOH)	46.31	2.31

### 2.1.2 Teneur totale des extraits de thé vert en phénols et en flavonoïdes

Le dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes dans les différents extraits de thé vert a montré que le thé vert utilisé dans cette étude contient des quantités importantes en composés phénoliques et en flavonoïdes. L'extrait éthanolique révèle  $700 \pm 1$   $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique / mg d'extrait de composés phénoliques et de  $33.74 \pm 0.05$   $\mu\text{g}$  d'équivalent de quercétine / mg d'extrait de flavonoïdes totaux (figure 21, a).

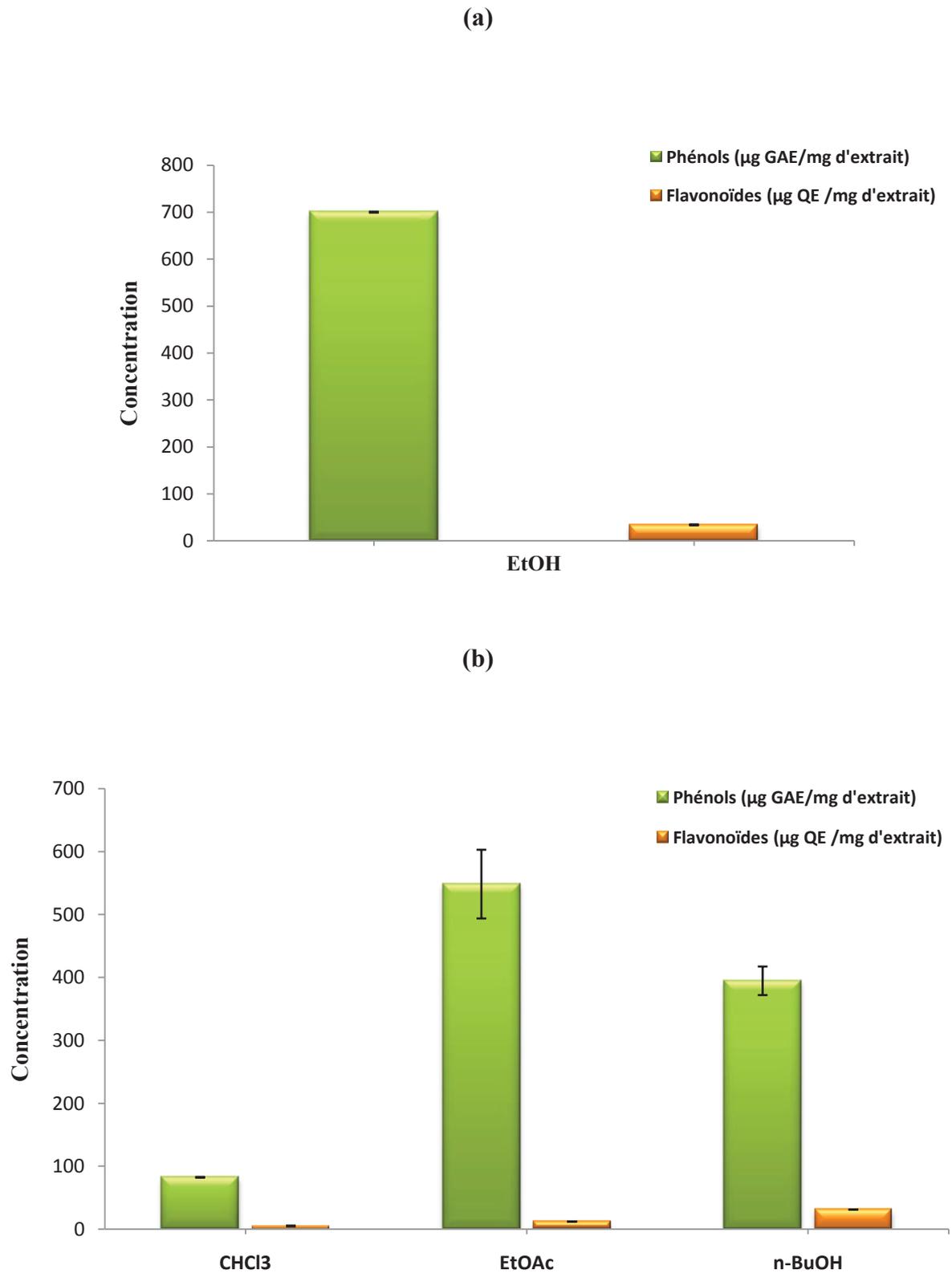
Les deux extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique renferment la plupart de ces composés. Elles révèlent respectivement  $548.33 \pm 54.62$  et  $394.66 \pm 22.67$   $\mu\text{g}$  d'équivalent acide gallique / mg d'extrait de composés phénoliques et  $12.16 \pm 0.01$  et  $31.20 \pm 0.1$   $\mu\text{g}$  d'équivalent de quercétine / mg d'extrait de flavonoïdes totaux.

Par contre l'extrait chloroformique ne contient que des quantités mineures de ces composés, soit  $82.33 \pm 5.04$   $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique / mg d'extrait de composés phénoliques et  $5.04 \pm 0.59$   $\mu\text{g}$  d'équivalent de quercétine / mg d'extrait de flavonoïdes totaux (figure 21, b).

### 2.1.3 Evaluation de la teneur des extraits de thé vert en composés phénoliques utilisant HPLC-TOF / MS

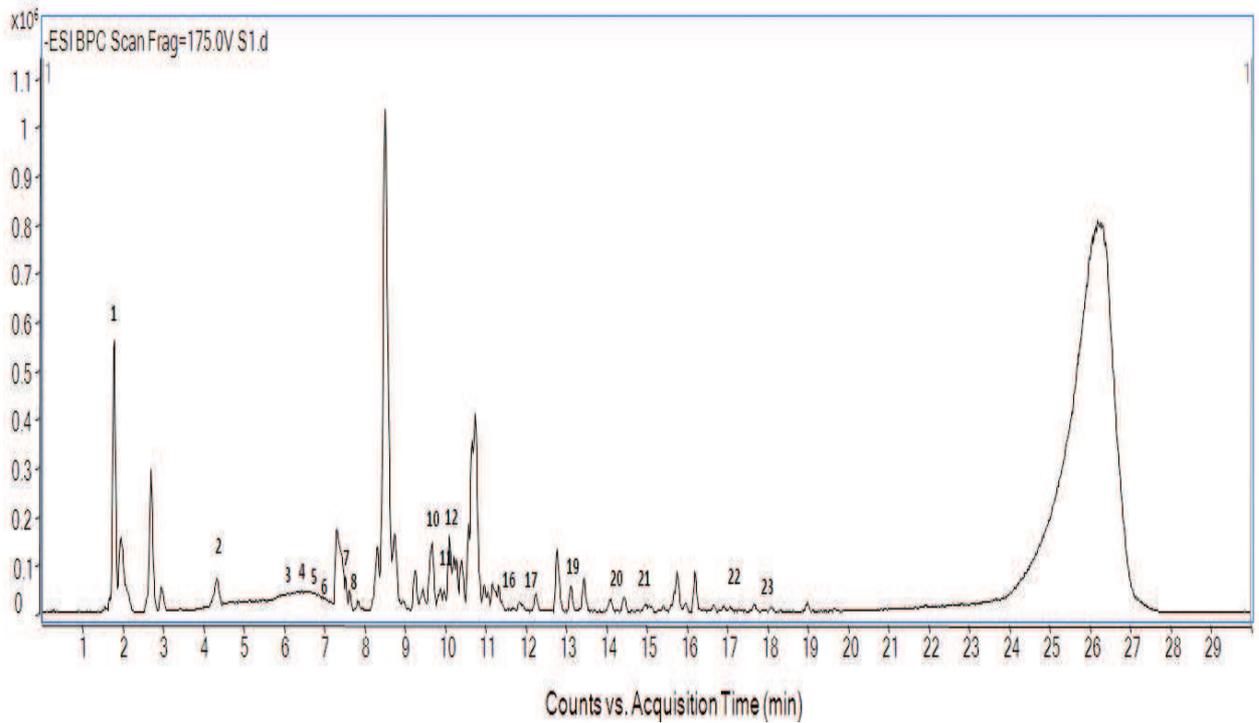
L'analyse des extraits par HPLC-TOF / MS a révélé la présence de différents phénols dans le thé vert. Parmi 23 composés phénoliques standards utilisés, 18 ont été détectés dans l'extrait éthanolique de thé vert. Les quantités les plus élevée sont observées pour l'acide gallique, la rutine, les catéchines, la quercétine, l'acide gentisique, l'acide vanilique, l'acide salicylique, l'acide ellagique et l'acide chlorogénique (figure 22, a ; tableau 9).

Dans les extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique, 17 différents phénols sont détectés. L'extrait d'acétate d'éthyle contient une quantité élevée d'acide gallique et de catéchines et des quantités importantes d'acide vanillique, d'acide salicylique, de rutine et d'acide *p*-coumarique (figure 23, c ; tableau 9). L'extrait *n*-butanolique contient également une quantité élevée d'acide gallique suivie de rutine, d'acide gentisique, d'acide salicylique et d'acide chlorogénique (figure 23, d ; tableau 9). Quinze phénols ont été détectés dans l'extrait chloroformique bien que tous soient présents en petites quantités (figure 22, b ; tableau 9).

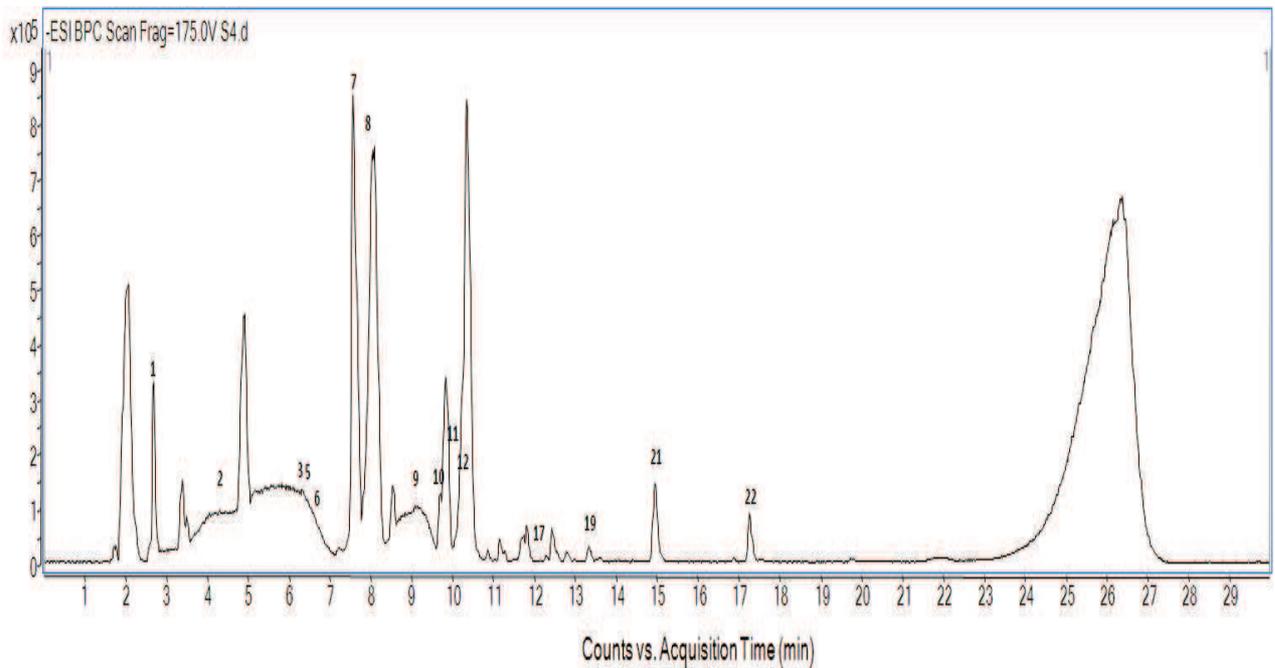


**Figure 21:** Teneur totale des extraits de thé vert en phénols et en flavonoïdes. (a) Teneur totale d'extrait éthanolique brut (EtOH) en phénols et en flavonoïdes, (b) Teneur totale d'extrait chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), d'acétate d'éthyle (EtOAc) et *n*-butanolique (n-BuOH) en phénols et flavonoïdes. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type ( $n = 3$ ).

(a)

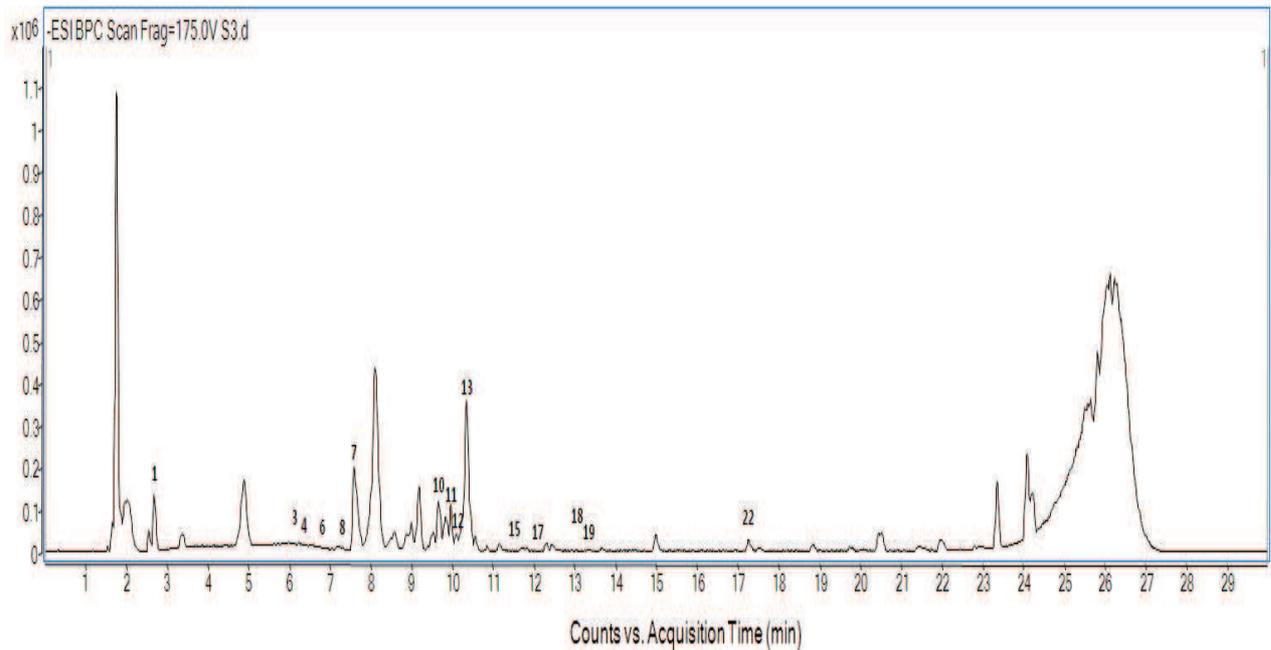


(b)

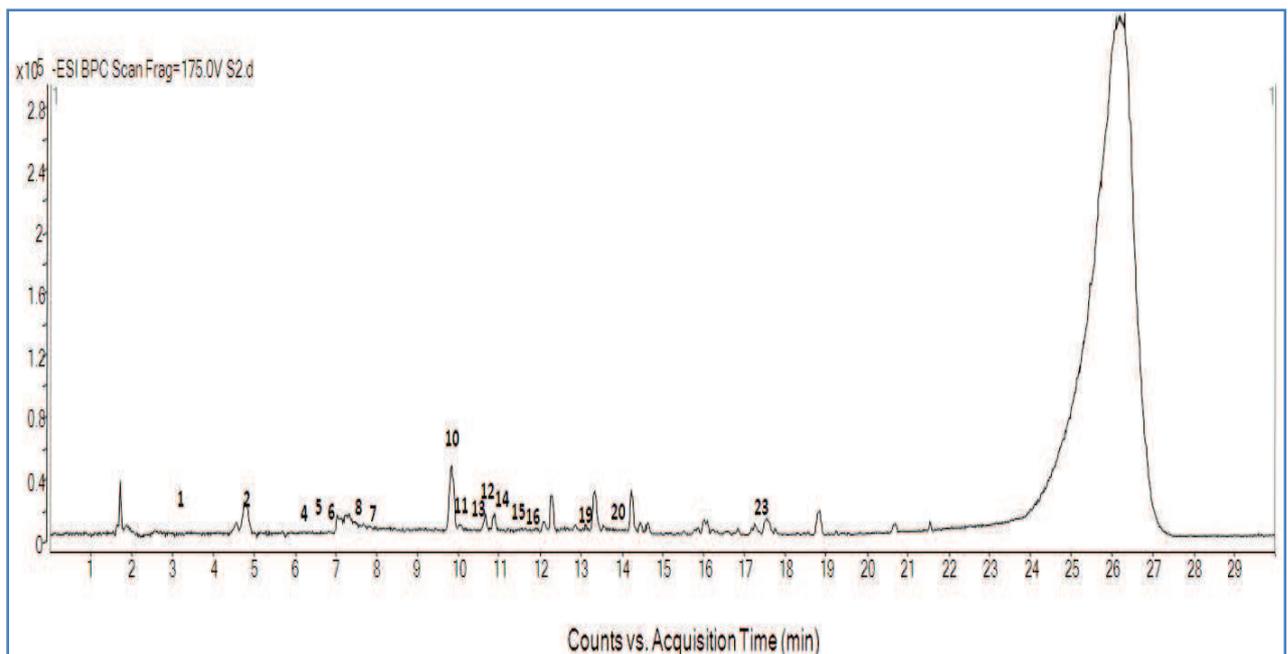


**Figure 22:** Chromatogrammes des extraits de thé vert. (a) Chromatogramme d'extrait éthanolique, (b) Chromatogramme d'extrait chloroformique (CHCl<sub>3</sub>). Les conditions chromatographiques ont été décrites dans la partie Matériels et Méthodes. Les phénols détectés par HPLC-TOF / MS sont exprimés en nombre de 1 à 23 (tableau 9).

(c)



(d)



**Figure 23:** Chromatogrammes des extraits de thé vert. (c) Chromatogramme d'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc), (d) Chromatogramme d'extrait *n*-butanolique (*n*-BuOH). Les conditions chromatographiques ont été décrites dans la partie Matériels et Méthodes. Les phénols détectés par HPLC-TOF / MS sont exprimés en nombre de 1 à 23 (tableau 9).

**Tableau 9:** Les différents phénols révélés dans les extraits de thé vert et leur teneur.

Teneur des extraits de thé vert en composés phénoliques exprimé en mg/ kg de feuilles sèches de thé vert, ND: non détecté					
	Phénols	Extrait EtOH	Extrait CHCl <sub>3</sub>	Extrait EtOAc	Extrait <i>n</i> -BuOH
1	Acide gallique	7473.79	0.25	777.93	1344.96
2	Acide gentisique	686.86	0.15	ND	102.14
3	Catéchines	980.40	0.04	174.95	ND
4	Acide chlorogénique	123.98	ND	2.37	21.18
5	Acide 4-hydroxybenzoïque	8.16	0.31	ND	1.8
6	acide protocatéchique	21.43	0.03	2.49	3.51
7	Acide caféique	34.10	0.04	7.43	5.66
8	Acide vanillique	360.18	5.00	46.31	20.04
9	4-hydroxybenzaldéhyde	0	0.3	0	ND
10	Rutine	2462.73	0.11	22.2	646.29
11	Acide <i>p</i> -coumarique	72.09	0.70	15.00	4.18
12	Acide ellagique	125.16	0.51	0.85	1.35
13	Acide chicorique	0	ND	0.2	0.67
14	Acide férulique	ND	ND	ND	1.92
15	Hespéridine	ND	ND	0.65	2.5
16	Apigénine-7-glucoside	6.96	ND	0	1.96
17	Acide rosmarinique	4.73	0.03	0.237	ND
18	Ester éthylique de l'acide protocatéchique	0	ND	0.05	0
19	Acide salicylique	233.45	6.5	34.69	21.23
20	Resvératrol	1.03	ND	ND	0.08
21	Quercétine	954.92	0.71	ND	ND
22	Naringénine	9.51	0.08	0.35	ND
23	Kaempférol	26.18	ND	ND	0.43

## 2.1.4 L'activité antioxydante de thé vert

### 2.1.4.1 Piégeage du radical libre DPPH

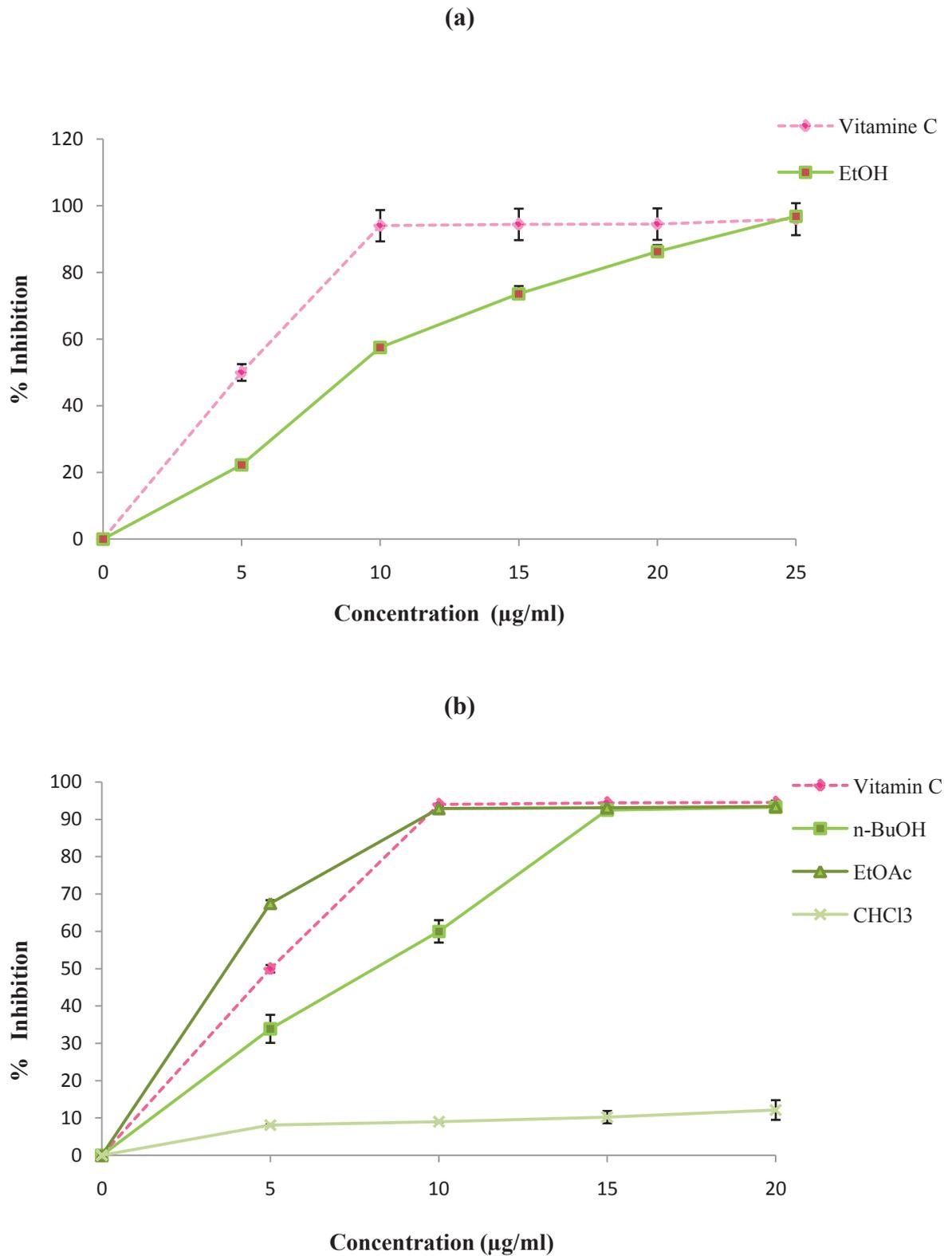
L'activité antiradicalaire de thé vert vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée dans les différents extraits. Les résultats obtenus dans cette méthode montrent que le thé vert est un puissant antioxydant. Une diminution dose-dépendante du radical DPPH a été observée lors le traitement des échantillons par des concentrations croissantes d'extrait éthanolique brut.

Le pouvoir antiradicalaire, le plus élevé (96%) est observé avec une dose de 25  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ; pouvoir équivalent à celui qu'exerce la vitamine C (96%) à la même concentration. 50% des radicaux DPPH ont été piégés avec seulement  $10.35 \pm 0.14 \mu\text{g} / \text{ml}$  d'extrait. Cette activité est semble importante comparant à celle obtenus avec la vitamine C dans les mêmes conditions ( $\text{IC}_{50} = 5 \pm 0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) (figure 24 (a), tableau 10).

Une inhibition significative dose-dépendante du radical DPPH a été également observée avec l'extrait d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique.

Les concentrations inhibitrices médianes ( $\text{IC}_{50}$ ) sont respectivement  $2.98 \pm 0.32$  et  $7.58 \pm 0.74 \mu\text{g} / \text{ml}$  et les pourcentages d'inhibition du radical DPPH les plus élevés sont respectivement 93.4% et 93.2%, similaires à la vitamine C dans la même concentration (20  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) (figure 24 (b), tableau 10).

Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait *n*-butanolique est très proche à celle de la vitamine C ( $\text{IC}_{50} = 5 \pm 0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), tandis que celle d'acétate d'éthyle est plus élevé. Contrairement, l'extrait chloroformique ne montre aucune activité antioxydante significative vis-à-vis du radical DPPH et sa concentration inhibitrice médiane ( $\text{IC}_{50}$ ) est très élevée ( $207.94 \pm 3.12 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) par rapport à la vitamine C (figure 24 (b), tableau 10).



**Figure 24:** L'activité antiradicalaire de thé vert vis à vis du radical libre DPPH. (a) L'activité antiradicalaire d'extrait éthanolique (EtOH) et de la vitamine C, (b) l'activité antiradicalaire d'extrait chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), d'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc), d'extrait *n*-butanolique (*n*-BuOH) et de la vitamine C. Les valeurs sont des moyennes ± écart type ( $n = 3$ ).

#### 2.1.4.2 Piégeage du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)

La capacité de thé vert à piéger le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) est également évaluée. Les résultats obtenus montrent que le thé vert a une activité antioxydante élevée contre ce radical libre. L'extrait éthanolique brut neutralise significativement les radicaux hydroxyles formés par la réaction de Fenton dans le milieu réactif et cet effet observé est dose-dépendant. Le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (75%) est observé avec une dose de 30 µg / ml; pouvoir proche à celui qu'exerce la vitamine C (85.5%) dans la même concentration. La concentration inhibitrice médiane est de 12.83 ± 0.63 µg / ml. Cette activité est élevée comparant à celle obtenus avec la vitamine C dans les mêmes conditions (IC<sub>50</sub> = 10.32 ± 0.72 µg / ml) (figure 25 (a), tableau 10).

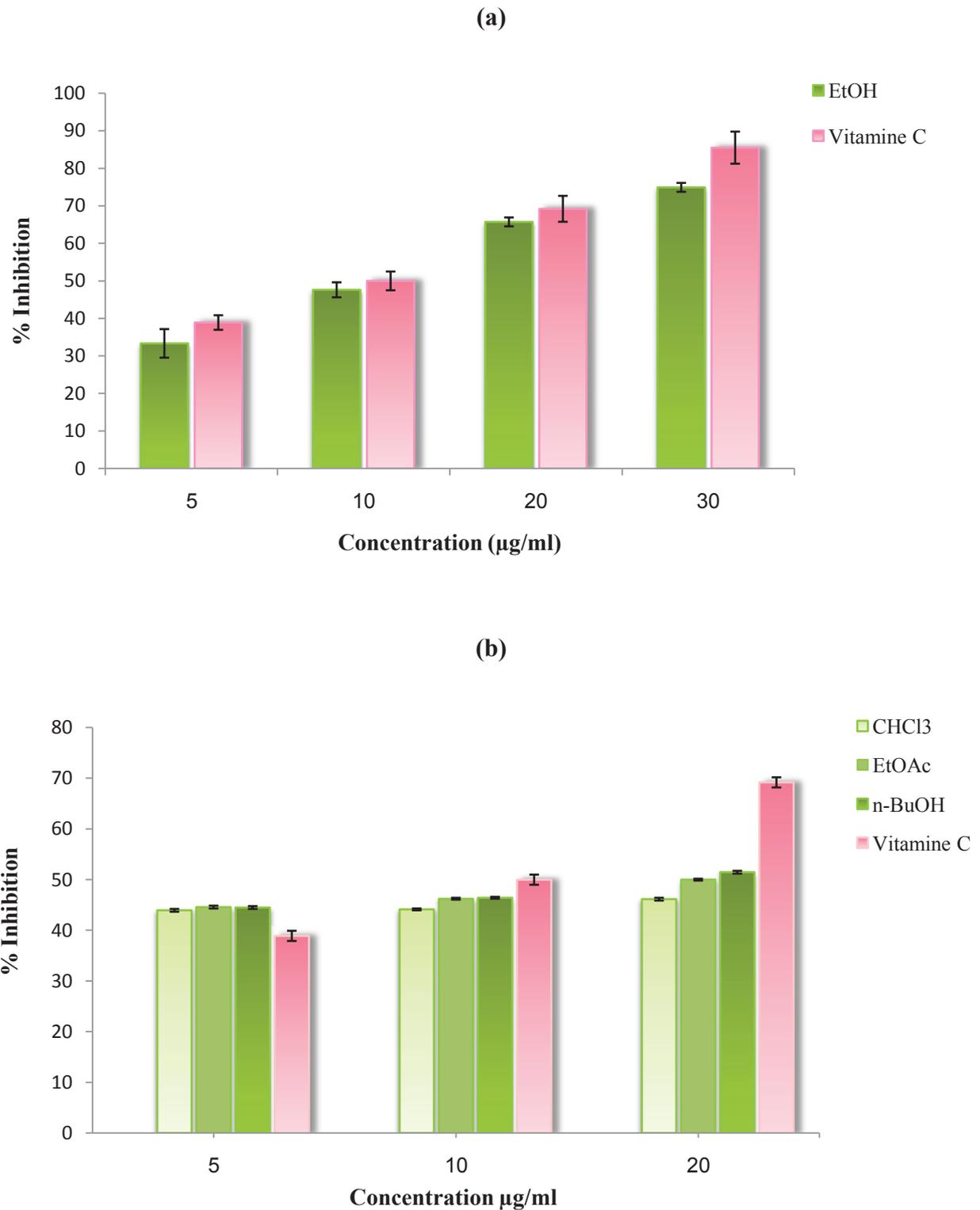
Une inhibition dose-dépendante du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) a été également déterminée avec l'extrait d'acétate d'éthyle, *n*-butanolique et chloroformique. Cependant l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanolique présentent un pouvoir antioxydant plus puissant que l'extrait chloroformique. Les concentrations inhibitrices médianes sont respectivement 20 ± 0.12, 16.72 ± 0.01 et 40.92 ± 0.76 µg / ml. Comparant à la vitamine C, les extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique montrent une activité antiradicalaire très intéressante (figure 25 (b), tableau 10).

#### 2.1.4.3 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO)

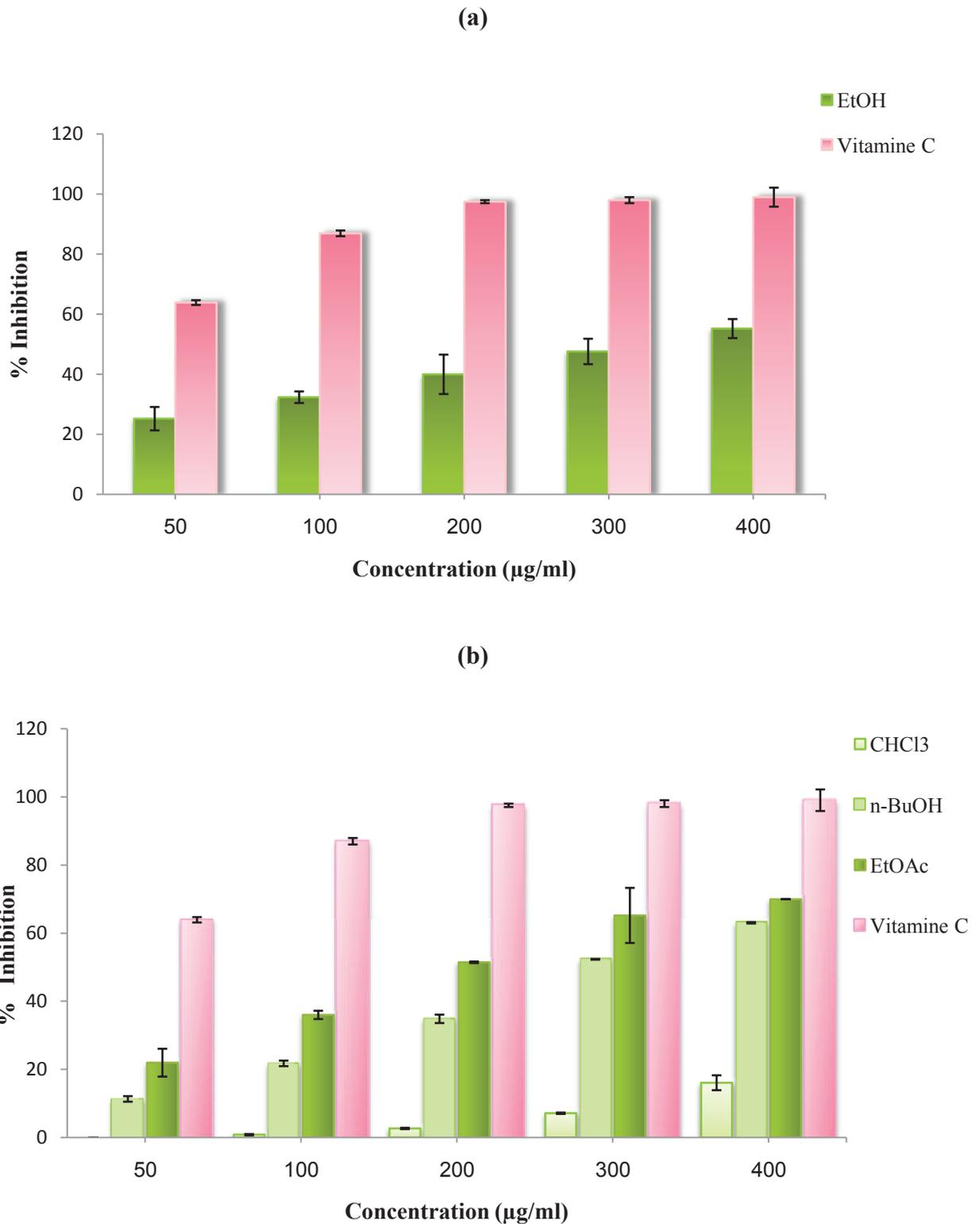
La capacité de thé vert à inhiber la peroxydation lipidique induite dans l'homogénat de vitellus d'œuf par le FeSO<sub>4</sub> a été évaluée. Les résultats obtenus montrent que le thé vert est capable aussi d'inhiber la peroxydation lipidique.

Aucune activité significative a été observé avec l'extrait chloroformique, mais une diminution dose-dépendante de la peroxydation lipidique a été observé avec l'extrait éthanolique brut (IC<sub>50</sub> = 333.29 ± 17.90 µg / ml), l'extrait d'acétate d'éthyle (IC<sub>50</sub> = 201.01 ± 2.55 µg / ml) et l'extrait *n*-butanolique (IC<sub>50</sub> = 302.18 ± 28.31 µg / ml) (figure 26, tableau 10).

Les pouvoirs d'inhibition de la peroxydation lipidique les plus élevés de l'extrait éthanolique (55.23%), *n*-butanolique (63%) et d'acétate d'éthyle (70%) sont observés à une concentration de 400 µg / ml, une concentration pour laquelle la vitamine C inhibe 99% de la peroxydation lipidique induite. L'effet des extraits de thé vert vis-à-vis de la peroxydation lipidique est considéré comme faible comparant à celle de la vitamine C (IC<sub>50</sub> = 20 ± 1.06 µg / ml), mais il reste important (figure 26, tableau 10).



**Figure 25:** L'activité antiradicalaire de thé vert vis à vis du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>). (a) L'activité antiradicalaire d'extrait éthanolique (EtOH) et de la vitamine C, (b) l'activité antiradicalaire d'extrait chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), d'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc), d'extrait *n*-butanolique (*n*-BuOH) et de la vitamine C. Les valeurs sont des moyennes ± écart type (*n* = 3).



**Figure 26:** Inhibition de la peroxydation lipidique par le thé vert. (a) effet d'extrait éthanolique (EtOH) et de la vitamine C, (b) effet d'extrait chloroformique ( $\text{CHCl}_3$ ), d'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc), d'extrait *n*-butanolique (*n*-BuOH) et de la vitamine C. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type ( $n = 3$ ).

**Tableau 10:** Les concentrations inhibitrices médianes (IC50) des extraits de thé vert et de la vitamine C vis-à-vis du radical DPPH, du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) et de la peroxydation lipidique. Les valeurs sont la moyenne ± SD (*n* = 3).

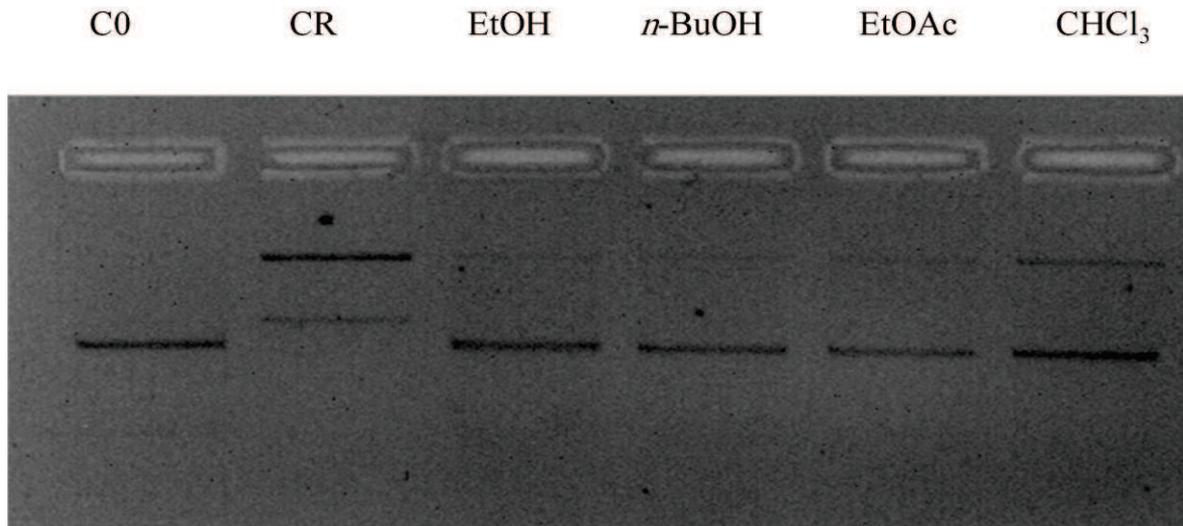
Extraits de thé vert/vitamine C	IC50 (µg / ml)		
	Piégeage du DPPH	Piégeage du OH <sup>•</sup>	Inhibition de LPO
EtOH	10.35±0.14	12.83±0.63	333.29±17.90
CHCl <sub>3</sub>	207.94 ± 3.12	40.92 ± 0.76	-
EtOAc	2.98 ± 0.32	20 ± 0.12	201.01 ± 2.55
<i>n</i> -BuOH	7.58 ± 0.74	16.72 ± 0.01	302.18 ± 28.31
Vitamine C	5 ± 0.1	10.32 ± 0.72	20 ± 1.06

#### 2.1.4.4 Inhibition des dommages oxydatifs de l'ADN

La capacité de thé vert à inhiber les dommages oxydatifs de l'ADN a été évaluée dans les différents extraits. Les résultats obtenus montrent que le thé vert est capable de protéger significativement l'ADN des dommages oxydatifs.

Avec une dose de 50 µg, l'extrait éthanolique brut, l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanolique assurent une protection complète de l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages oxydatifs causés par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) photolysé par rayonnement UV. Pour les trois extraits, une seule bande a été détectée dans l'électrophorèse sur gel d'agarose, identique à celle obtenue avec l'échantillon de contrôle non irradié (C0). Cette bande représente la forme native d'ADN circulaire super-enroulé. L'échantillon de contrôle irradié non traité (CR) montre deux bandes dans l'électrophorèse sur gel d'agarose différentes à celle obtenues avec le contrôle non irradié (C0). Ces deux bandes représentent des fragments d'ADN plasmidique endommagé par les radicaux hydroxyles (OH<sup>•</sup>) générés par la photolyse de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par rayonnement UV (figure 27).

Avec une dose de 50 µg, l'extrait chloroformique protège la plupart de la quantité de l'ADN plasmidique dans l'échantillon contre les dommages oxydatifs. Deux bandes sont obtenues dans l'électrophorèse sur gel d'agarose, une dense dans le même niveau de la bande obtenue avec le contrôle non irradié (C0) (ADN circulaire super-enroulé) et l'autre légère dans le même niveau de la bande obtenue avec le contrôle irradié non traité (CR) (d'ADN plasmidique endommagé) (figure 27).

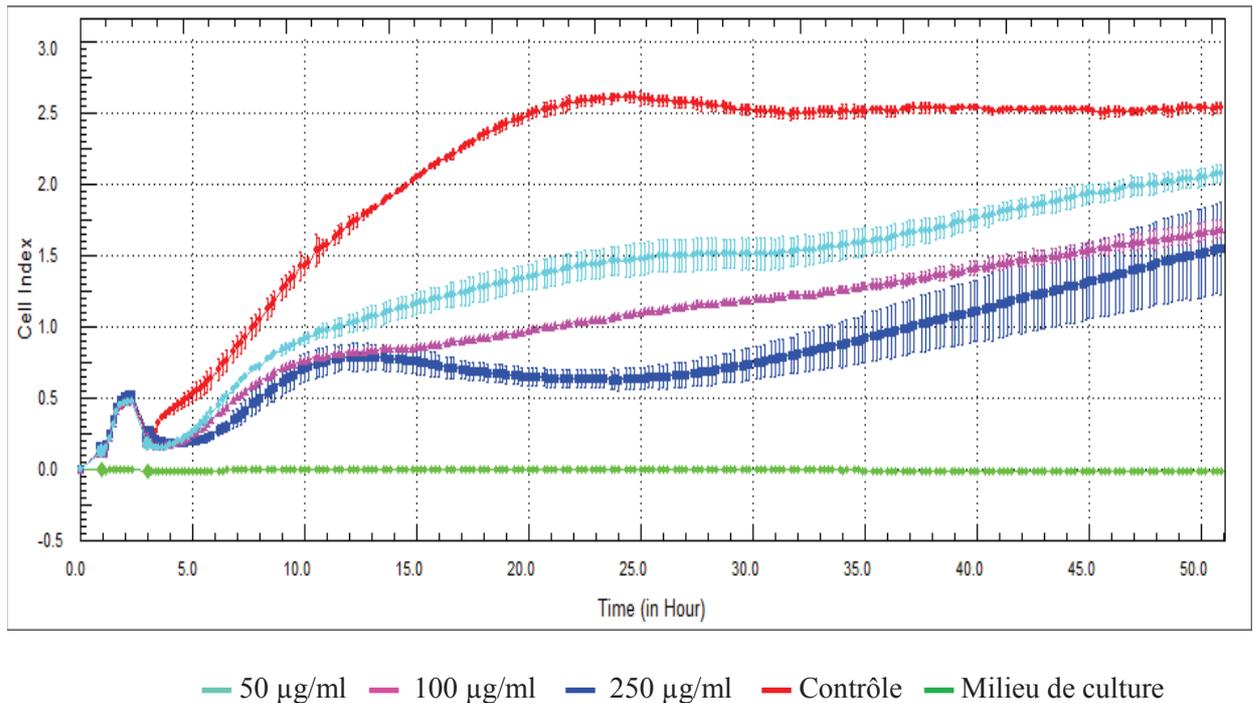


**Figure 27:** L'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose présentant l'effet des extraits de thé vert sur la protection de l'ADN plasmidique 46966 contre les dommages oxydatifs causés par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) photolysé par rayonnement UV. C0 = ADN non irradié non traité, CR = ADN irradié non traité, EtOH = échantillon d'ADN irradié traité par l'extrait éthanolique, *n*-BuOH = échantillon d'ADN irradié traité par l'extrait *n*-butanolique, EtOAc = échantillon d'ADN irradié traité par l'extrait d'acétate d'éthyle et CHCl<sub>3</sub> = échantillon d'ADN irradié traité par l'extrait chloroformique.

### 2.1.5 L'activité anticancéreuse de thé vert sur les cellules cancéreuses prostatiques

L'activité anticancéreuse de thé vert a été évaluée dans les différents extraits sur une lignée cellulaire de cancer de la prostate métastatique humaine PC-3. Les résultats obtenus montrent que le thé vert possède une activité anticancéreuse très significative.

Le suivi de la prolifération des cellules PC-3 en présence et en absence d'extrait éthanolique par l'analyseur de cellules en temps réel xCELLigence (RTCA) durant 51 h montre que l'extrait a une activité antiproliférative dose-dépendante intéressante contre les cellules PC-3 surtout pendant les 25 premières heures. Comparant au contrôle (prolifération des cellules PC-3 sans traitement) et au milieu de culture (niveau de prolifération est zéro), les meilleurs effets antiprolifératifs d'extrait sont observés à l'heure 25. En ce temps-là, la prolifération de 40%, 60% et 80% des cellules est inhibée respectivement par 50, 100 et 250 µg/ml d'extrait éthanolique. Cependant, après ce temps, les cellules ont recommencé à proliférer, ce qui peut être dû à la diminution de rapport des molécules bioactives dans l'extrait (figure 28).

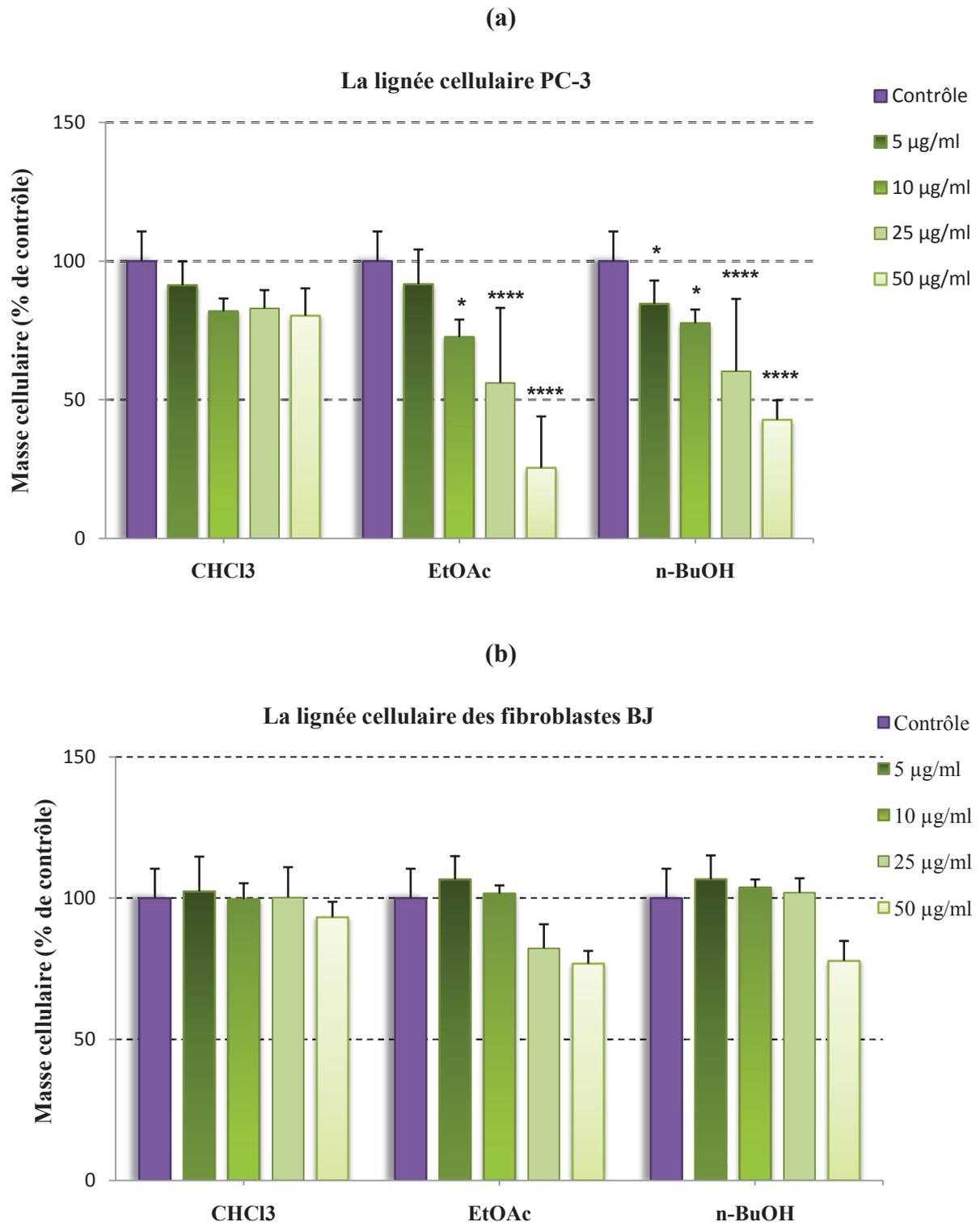


**Figure 28:** L'activité anticancéreuse de l'extrait éthanolique de thé vert sur la lignée cellulaire PC-3 ( $2.5 \times 10^4$  cellules / puits). Trois concentrations d'extrait ont été appliquées aux cellules représentées par des couleurs différentes (50, 100, 250 µg / ml). Chaque concentration a été testée en deux expériences et en trois répétitions ( $n = 3$ ) en utilisant l'instrument xCELLigence RTCA.

Utilisant la méthode de la sulforhodamine B (SRB), l'extrait d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique de thé vert ont présenté également une activité antiproliférative très significative contre la lignée cellulaire de cancer de la prostate métastatique humaine PC-3. Après 24 h de traitement avec ces extraits, des dose-dépendante toxicités ont été observées. La prolifération de 50% des cellules a été inhibée avec seulement 36.37 et 37.74 µg / ml d'extrait d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique respectivement (figure 29, a).

Les résultats de la méthode SRB montre également une diminution dose-dépendante dans la prolifération des cellules PC-3 après 24 h de traitement par l'extrait chloroformique, cependant cet effet n'est pas significatif (figure 29, a).

Contrairement les trois extraits de thé vert ne montrent aucune cytotoxicité sur les cellules normales. Après 24 h de traitement des cellules de fibroblastes BJ par les mêmes doses (5, 10, 25 et 50 µg/ml) des trois extraits de thé vert aucun effet significatif n'a été noté (figure 29, b).



**Figure 29:** L'activité anticancéreuse de l'extrait chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), l'extrait d'acétate d'éthyle (EtOAc), et l'extrait *n*-butanolique (*n*-BuOH) de thé vert sur la lignée cellulaire PC-3 (a) et la lignée cellulaire de fibroblastes BJ (b). La valeur de contrôle (véhicule seulement) a été déterminée comme 100% pour tenir compte de la prolifération différentielle des lignées cellulaires. Les données sont exprimées comme des moyennes ± SEM de quatre expériences différentes, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  par rapport aux contrôle, cellules non traitées.

### 2.1.6 L'effet de thé vert sur la condensation de la chromatine nucléaire et la polarisation mitochondriale

Afin d'étudier le mécanisme moléculaire de thé vert qui impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuse prostatique PC-3, observé précédemment, les lignées cellulaires PC-3 et BJ ont été traitées pendant 24 h avec 50 µg / ml d'extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique, extraits qui montrent les activités antiprolifératives les plus élevées.

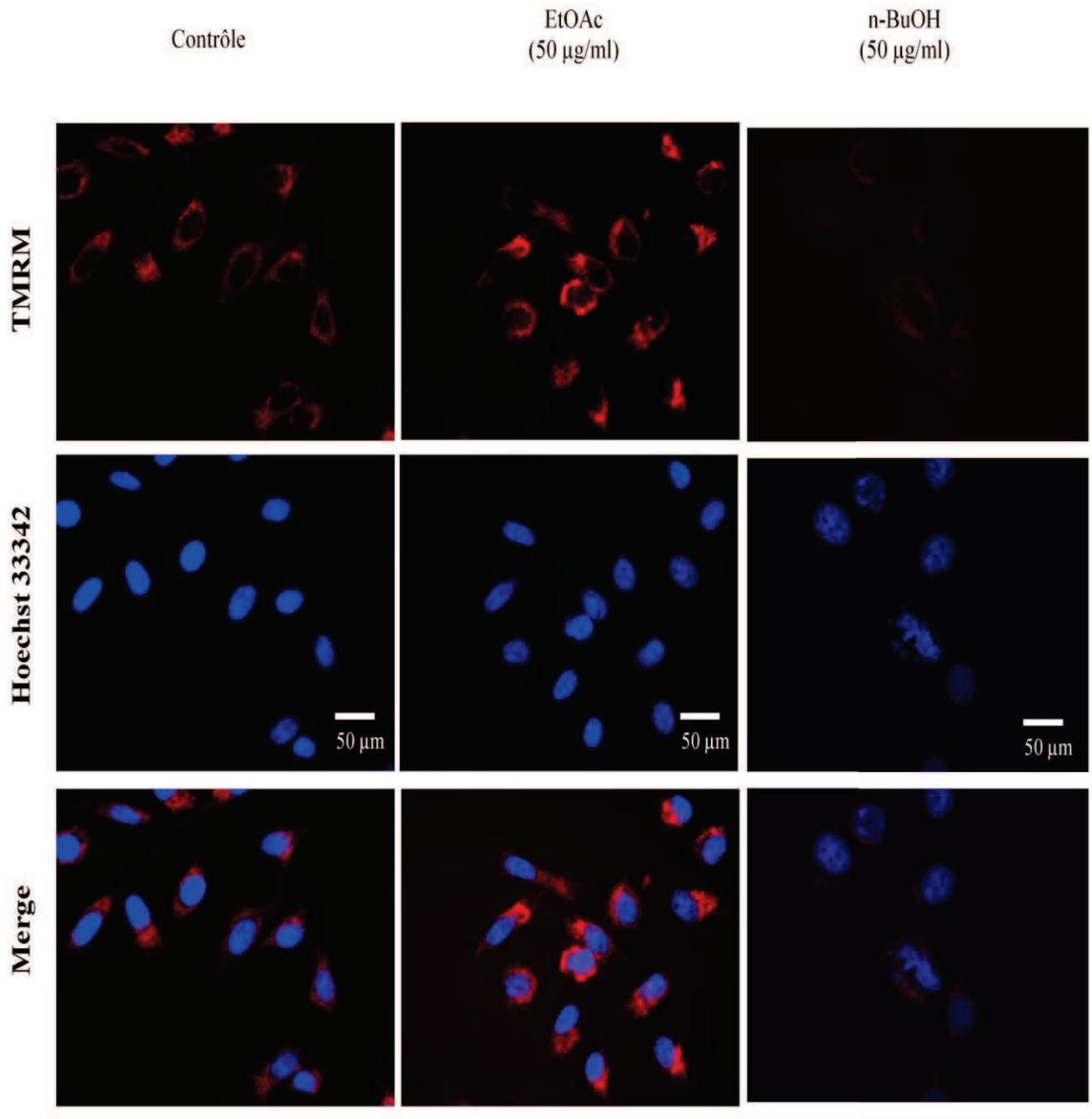
La dépolarisation mitochondriale et la signalisation apoptotique ont été évaluées utilisant la microscopie vitale avec la sonde fluorescente TMRM sensible au potentiel de membrane de la mitochondrie ( $\Delta\psi_m$ ), co-marquée avec la sonde nucléaire Hoechst 33342.

Comparant les images des cellules PC-3 traités avec les extraits de thé vert aux images des cellules non traités (contrôle), une dépolarisation mitochondriale et une condensation de la chromatine dans la lignée cellulaire PC-3 traité ont été observées (figure 30).

L'analyse des images et la mesure de la fluorescence TMRM ont confirmés que le traitement des cellules PC-3 par 50 µg/ml d'extrait d'acétate d'éthyle et d'extrait *n*-butanolique a provoqué une réduction significative du standard de déviation (SD) du signal TMRM, indiquant une redistribution du colorant de la mitochondrie dans le cytosol en réponse à la dépolarisation des membranes mitochondriales (figure 32, a). Ces résultats suggèrent que le thé vert inhibe la prolifération des cellules cancéreuses prostatique par voie apoptotique.

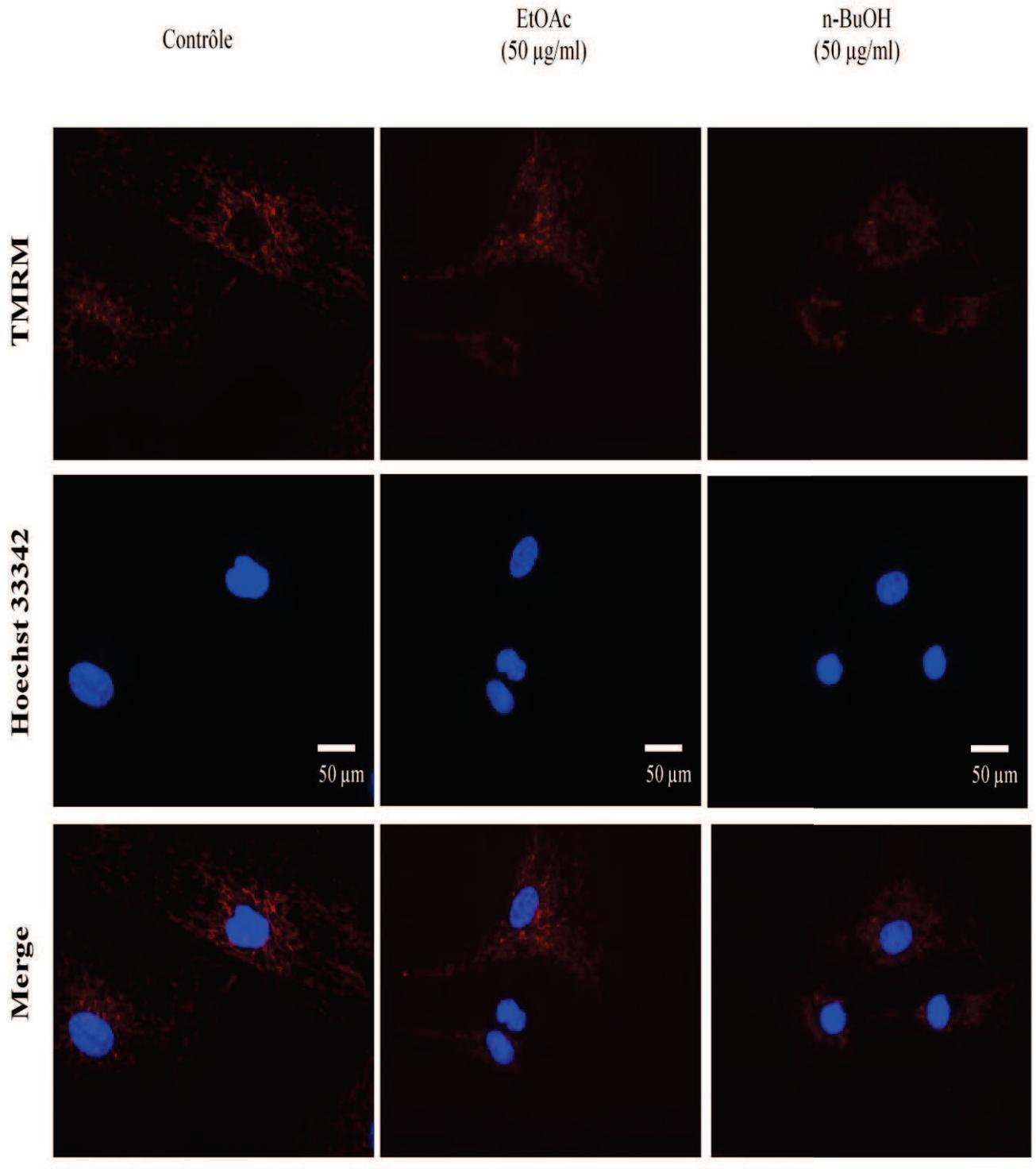
Comparant les images des cellules non tumoral de fibroblastes BJ traités avec les extraits de thé vert aux images des cellules BJ non traités (contrôle), aucune dépolarisation mitochondriale ou condensation de la chromatine dans les cellules a été notée (figure 31).

Des pixels très brillants sur les mitochondries ont été observés et la mesure du standard de déviation (SD) du signal TMRM ne montre aucune différence significative dans la fluorescence TMRM entre les cellules BJ traités et non traités par les extraits de thé vert (figure 32, b). Dans les deux groupes des cellules, la concentration de colorant en mitochondries provoquant un signal lumineux ponctué avec un standard de déviation de signal élevé à travers la cellule (figure 31).



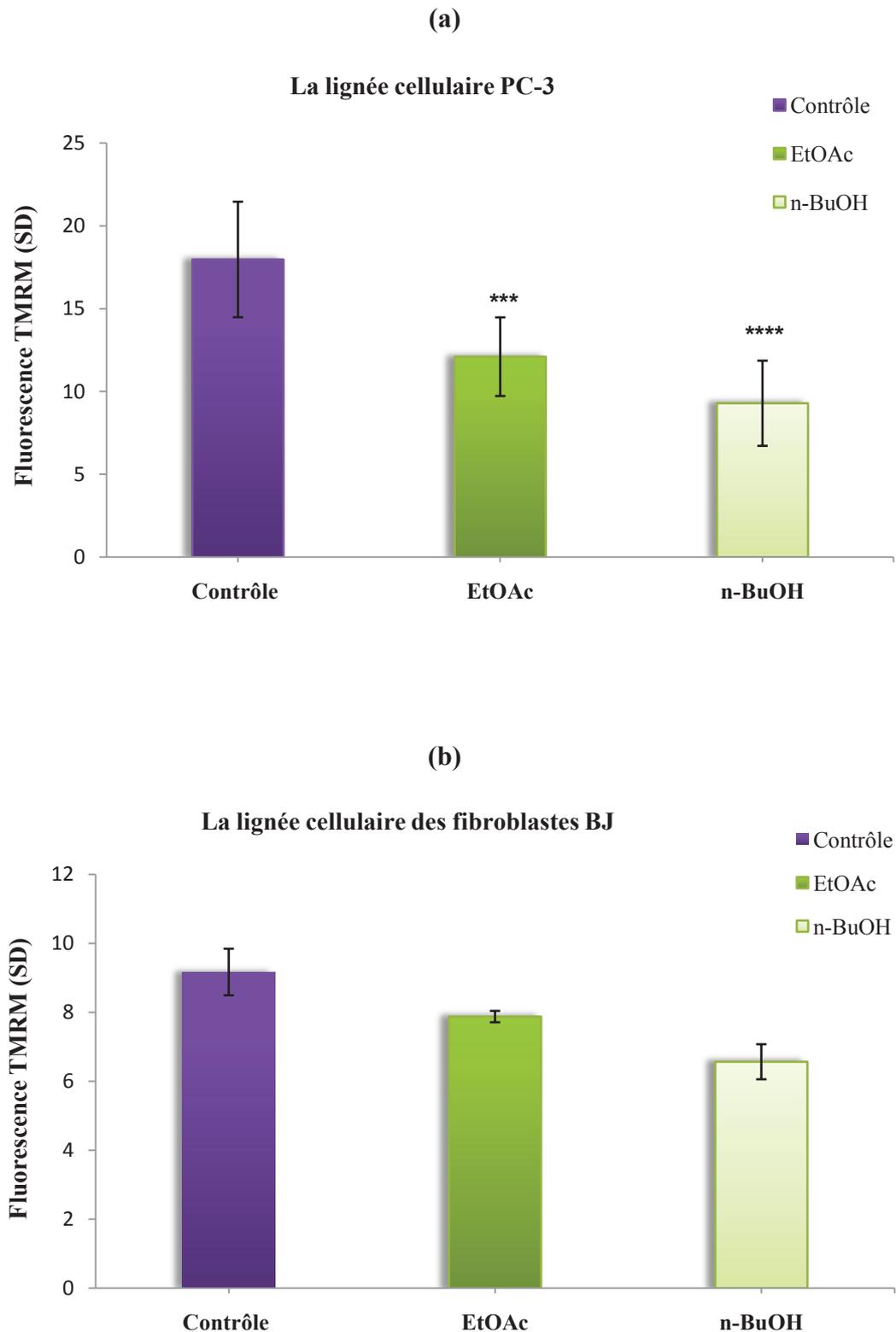
La lignée cellulaire PC-3

**Figure 30:** Effet d'extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc) et *n*-butanolique (*n*-BuOH) de thé vert sur la condensation de la chromatine nucléaire et la polarisation mitochondriale dans la lignée cellulaire PC-3. Les cellules ont été traitées uniquement avec du véhicule (contrôle) ou avec 50 µg / ml d'extrait de thé vert pendant 24 h.



La lignée cellulaire de fibroblastes BJ

**Figure 31:** Effet d'extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc) et *n*-butanolique (*n*-BuOH) de thé vert sur la condensation de la chromatine nucléaire et la polarisation mitochondriale dans la lignée cellulaire BJ. Les cellules ont été traitées uniquement avec du véhicule (contrôle) ou avec 50 µg / ml d'extrait de thé vert pendant 24 h.



**Figure 32:** Le potentiel membranaire mitochondrial évalué en tant que fluorescence relative TMRM (standard de déviation (SD) du signal TMRM) mesurée dans les lignées de cellules PC-3 (a) et BJ (b) avec et sans traitement par les extraits de thé vert. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences différentes indépendantes, (\*\*\*)  $p < 0.005$ , (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  par rapport aux contrôle, cellules non traitées.

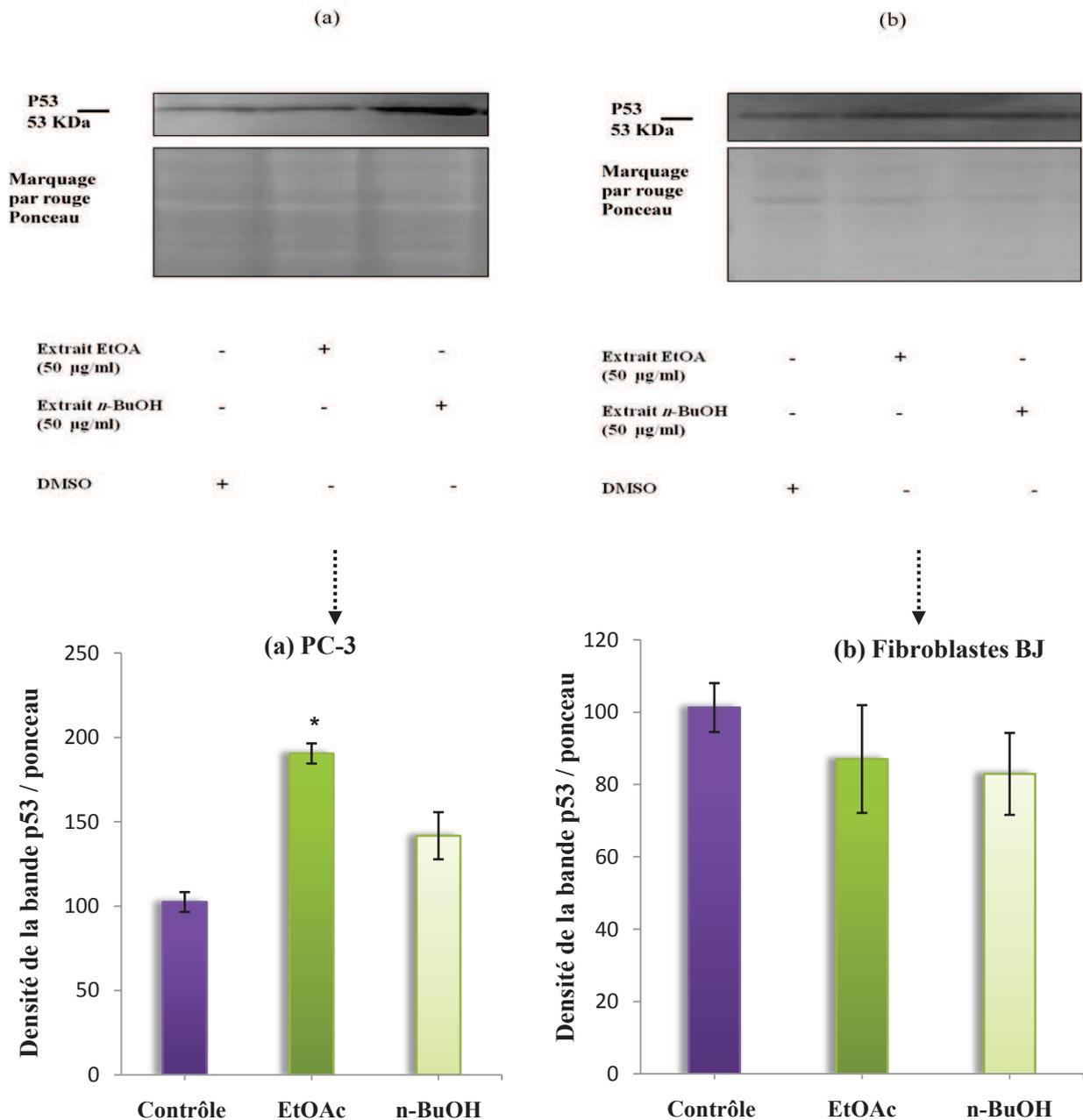
### 2.1.7 L'effet de thé vert sur la protéine p53

La teneur des lignées cellulaires PC-3 et BJ en protéines p53 a été identifiée par western blot après 24h de traitement par les extraits de thé vert.

L'analyse des résultats ne montre aucun changement significatif dans la teneur en protéine p53 dans la lignée cellulaire de fibroblastes BJ traitée par 50 µg/ml d'extrait d'acétate d'éthyle ou d'extrait *n*-butanolique (figure 33, b).

Cependant, une augmentation significative de la teneur en protéine p53 a été déterminée dans la lignée cellulaire PC-3 par rapport au contrôle après 24h de traitement par 50 µg/ml d'extrait d'acétate d'éthyle (figure 33, a).

Le traitement des cellules PC-3 par 50 µg/ml d'extrait *n*-butanolique augmente également la teneur de protéine p53 comparant au contrôle, cependant ces résultats ne sont pas significatives (Figure 33, a).



**Figure 33:** Effet de 24 h traitement par les extraits de thé vert sur la quantité cellulaire de p53. Les extraits cellulaires totaux des trois groupes différents de cellules PC-3 et BJ ont été collectés après traitement avec 0, 50 d'extrait d'EtOAc et 50 d'extrait de *n*-BuOH comme décrit dans la section Matériaux et Méthodes. Les images sont des expériences représentatives de trois essais différents produisant les mêmes résultats. Il est également représenté le marquage Ponceau respectif pour chaque buvardage western pour confirmer une charge de protéine égale. L'ordre des échantillons en blots est équivalent à ce qui est montré dans les graphiques. Les graphiques représentent l'analyse densitométrique des bandes, exprimée en pourcentage de chaque contrôle de différenciation. Les données sont exprimées en moyenne ± écart type. (\*)  $p < 0.05$  par rapport aux contrôle.

## 2.2 Etude *in vivo* (*in humaine*)

### 2.2.1 Caractéristiques générales de la population étudiée

Au début de l'étude, 87 patients PC ont accepté de participer et régulièrement reçu du thé vert. Après 6 mois, 17 patients ont été exclus de l'étude (6 patients sont décédés au cours de l'étude, 3 ont refusé de poursuivre l'étude après 3 mois et 8 n'ont pas bu de thé ou n'en ont bu que quelques fois pendant toute la période de l'analyse).

La cohorte étudiée se composait alors de 70 patients atteints de cancer de la prostate avec une moyenne d'âge de  $70.64 \pm 6.5$  ans et de taux moyen de PSA sérique de  $62.73 \pm 33.97$  ng / ml. Le score de Gleason au début de diagnostic était entre 5 et 7 dans 40% des cas et entre 8 et 10 dans 60% des cas (tableau 11).

Onze pour cent des cas ont subi une prostatectomie suivie d'une hormonothérapie, 11% ont subi une radiothérapie associée à l'hormonothérapie, 49% étaient sous traitement hormonal et 29% étaient sous chimiothérapie associée à l'hormonothérapie (tableau 11).

A la fin de la période de l'étude 120 témoins sains non fumeurs et non buveurs d'alcool liés aux cas en âge et en sexe ont été sélectionnés. Basant sur les questionnaires réalisés avec les participants, l'ensemble des témoins sont divisé en deux groupes (tableau 11):

- ▶ 1<sup>er</sup> groupe: constitue de 85 hommes avec une moyenne d'âge de  $68.5 \pm 6.56$  ans ( $p = 0.1169$ , comparant à l'âge des cas) qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé.
- ▶ 2<sup>ème</sup> groupe: constitue de 35 hommes avec une moyenne d'âge de  $68.81 \pm 6.42$  ans ( $p = 0.2537$ , comparant à l'âge des cas) qui boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour pendant au moins 1 an.

**Tableau 11:** Caractéristiques générales des cas et des témoins

	Patients, n (%)	Témoins-thé <sup>1</sup> , n (%)	Témoins+ thé vert <sup>2</sup> , n (%)
<b>N<sup>bre</sup> de participants</b>	70	85	35
<b>Moyenne d'âge ± écart type</b>	70.64 ± 6.5	68.5 ± 6.56	68.81 ± 6.42
<i>P</i> value <sup>a</sup>		0.1169 <sup>b</sup>	0.2537 <sup>c</sup>
<b>Moyenne de PSA ± écart type (ng/ml)</b>	62.73 ± 33.97	1.43 ± 0.92	1.27 ± 0.97
<i>P</i> value <sup>a</sup>		< 0.0001 <sup>b</sup>	< 0.0001 <sup>c</sup>
<b>Score de Gleason</b>			
5-7	28 (40)	-	-
8-10	42 (60)	-	-
<b>Traitement</b>			
Prostatectomie + hormonothérapie	8 (11)	-	-
Radiothérapie + hormonothérapie	8 (11)	-	-
Hormonothérapie	34 (49)	-	-
Chimiothérapie + hormonothérapie	20 (29)	-	-

<sup>1</sup> Témoins qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé; <sup>2</sup> Témoins boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour pendant au moins 1 an; <sup>a</sup> Basé sur le test *t* de Student; <sup>b</sup> Comparant les patients aux témoins qui n'ont jamais ou rarement bu du thé; <sup>c</sup> Comparant les patients aux témoins boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour pendant au moins 1 an; PSA: antigène spécifique de la prostate.

### 2.2.2 Effet de la consommation de thé vert sur le statut antioxydant

Le statut antioxydant des patients atteints de cancer de la prostate a été évalué avant et après la consommation de thé vert, en mesurant plusieurs paramètres antioxydants.

Les résultats obtenus avant la consommation de thé vert (T0) montrent que les patients atteints de cancer de la prostate comparant aux témoins qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé présentent des taux significativement altérés en glutathion réduit (GSH), en thiols totaux et des activités significativement diminuée de catalase et de glutathion peroxydase (GPx) au niveau d'érythrocytes.

Le taux de GSH est de  $20.79 \pm 4.32$  vs  $40.51 \pm 4.87$  mg / dl ( $p < 0.0001$ ), le taux des thiols totaux est  $5.64 \pm 0.81$  vs  $6.58 \pm 0.63$   $\mu\text{mol/gHb}$  ( $p < 0.0001$ ), l'activité de la catalase est de  $15.29 \pm 1.75$  vs  $23.84 \pm 2.03$  UI / gHb ( $p < 0.0001$ ) et l'activité du GPx est de  $17.61 \pm 3.14$  vs  $28.55 \pm 3.8$   $\mu\text{molGSH/g Hb}$  ( $p < 0.0001$ ) (figure 34, 35, 36 et 37) (tableau 12).

Basé sur les valeurs de référence du kit commercial (Spinreact, Espagne) (35 à 50 g/ml), les patients présentent un taux normal d'albumine ( $45.5 \pm 6.57$  g/l), mais comparant au groupe témoins utilisé dans cette étude cette valeur est semble plus faibles ( $54.39 \pm 7.27$  g/l,  $p < 0.0001$ ) (figure 38) (tableau 12).

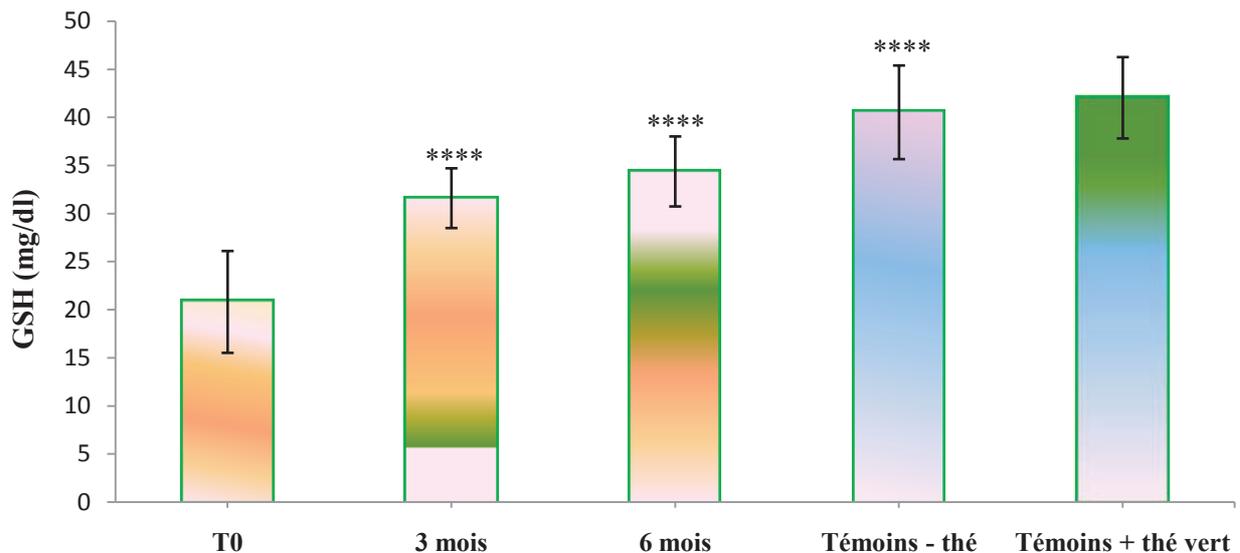
Aussi bien et en comparant les résultats des paramètres antioxydant des témoins qui boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour et ceux qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé, aucune différence significative n'a été observée au niveau du taux de GSH ( $42.02 \pm 4.23$  vs  $40.51 \pm 4.87$  mg/dl), de taux de l'albumine ( $55.64 \pm 7.25$  vs  $54.39 \pm 7.27$  g/l) et de l'activité du GPx ( $29.66 \pm 3.73$  vs  $28.55 \pm 3.8$   $\mu\text{molGSH/gHb}$ ) (figure 34, 35 et 38) (tableau 12).

Cependant un taux significativement plus élevé des thiols totaux ( $7.1 \pm 0.78$  vs  $6.58 \pm 0.63$   $\mu\text{mol/gHb}$ ,  $p < 0.01$ ) et une activité plus élevée de la catalase ( $25.94 \pm 1.81$  vs  $23.84 \pm 2.03$  UI/gHb,  $p < 0.005$ ) ont été noté chez le groupe de témoins qui boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour (figure 36, 37) (tableau 12).

Pendant une période de 3 mois la plupart des patients ont consommé 2 à 3 tasses de thé vert par jour. L'évaluation des paramètres antioxydants à la fin de cette période montre une augmentation significative du taux de GSH ( $31.58 \pm 2.57$  mg/dl,  $p < 0.0001$ ), de l'activité de catalase ( $17.23 \pm 1.51$  UI/gHb,  $p < 0.05$ ) et de l'activité du GPx ( $19.83 \pm 3.23$ ,  $p < 0.05$ ) (figure 34, 35, 36).

Mais aucune augmentation significative n'a été notée pour le taux de l'albumine ( $48.05 \pm 6.22$  g/l) ou des thiols totaux ( $6.06 \pm 0.89$   $\mu$ mol/gHb) (figure 37, 38) (tableau 12).

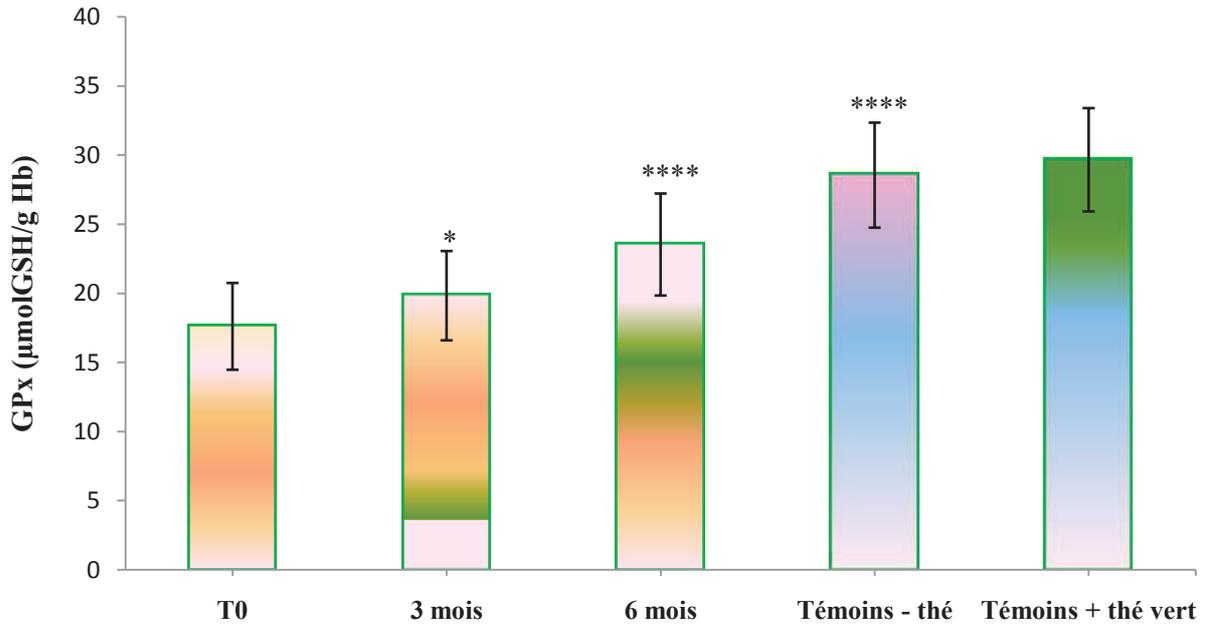
Après 6 mois de consommation de thé vert, une augmentation significative de tous les paramètres antioxydants a été révélée. En plus de l'augmentation la plus significative de taux de GSH ( $34.36 \pm 3.64$  mg/dl,  $p < 0.0001$ ), de l'activité de catalase ( $22.19 \pm 1.78$  UI/gHb,  $p < 0.0001$ ) et de l'activité du GPx ( $23.53 \pm 3.69$ ,  $p < 0.0001$ ), une augmentation significative de l'albumine ( $50.02 \pm 5.57$ ,  $p < 0.01$ ) et des thiols totaux ( $6.36 \pm 0.79$   $\mu$ mol/gHb,  $p < 0.01$ ) a été également observée (figure 34, 35, 36, 37 et 38) (tableau 12).



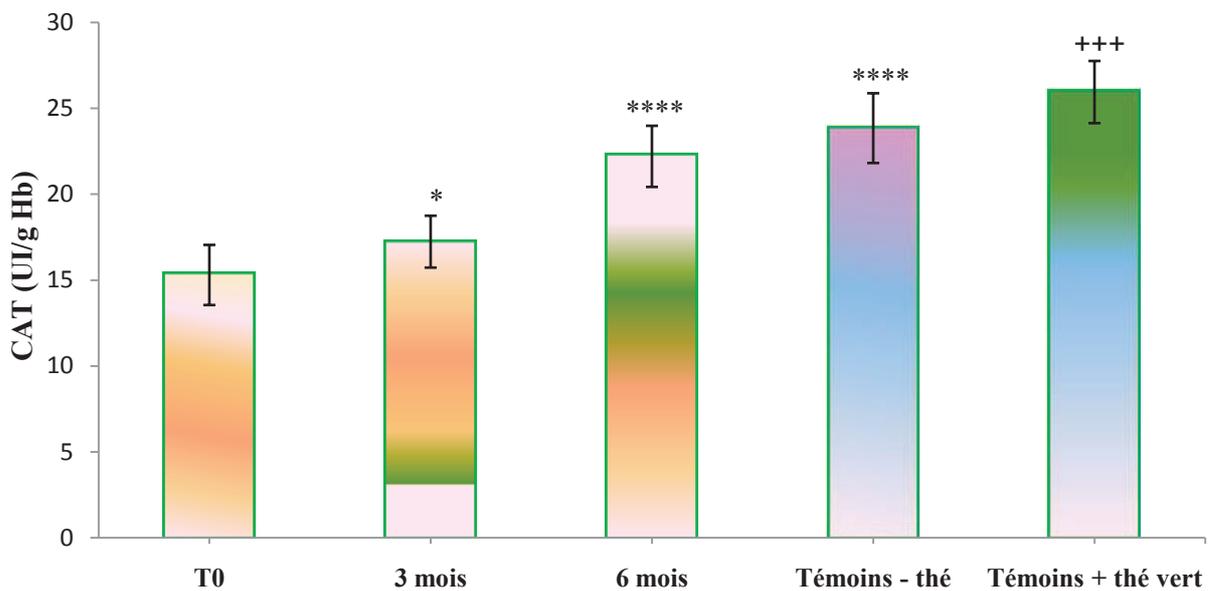
**Figure 34:** Effet de la consommation de thé vert sur le taux du glutathion réduit (GSH)

érythrocytaire chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  par rapport à T0.

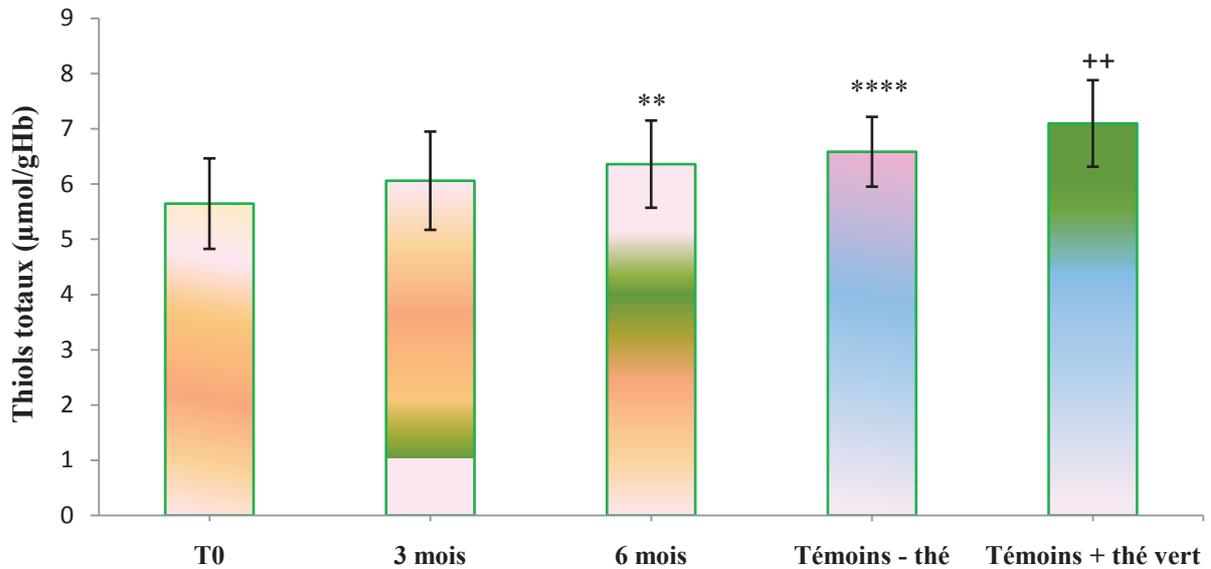
*NB: T0: patients avant la consommation de thé vert; 3 mois: patients après 3 mois de consommation de thé vert; 6 mois: patients après 6 mois de consommation de thé vert; Témoins – thé: témoins n'avaient jamais ou rarement bu du thé; Témoins + thé vert: témoins boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour.*



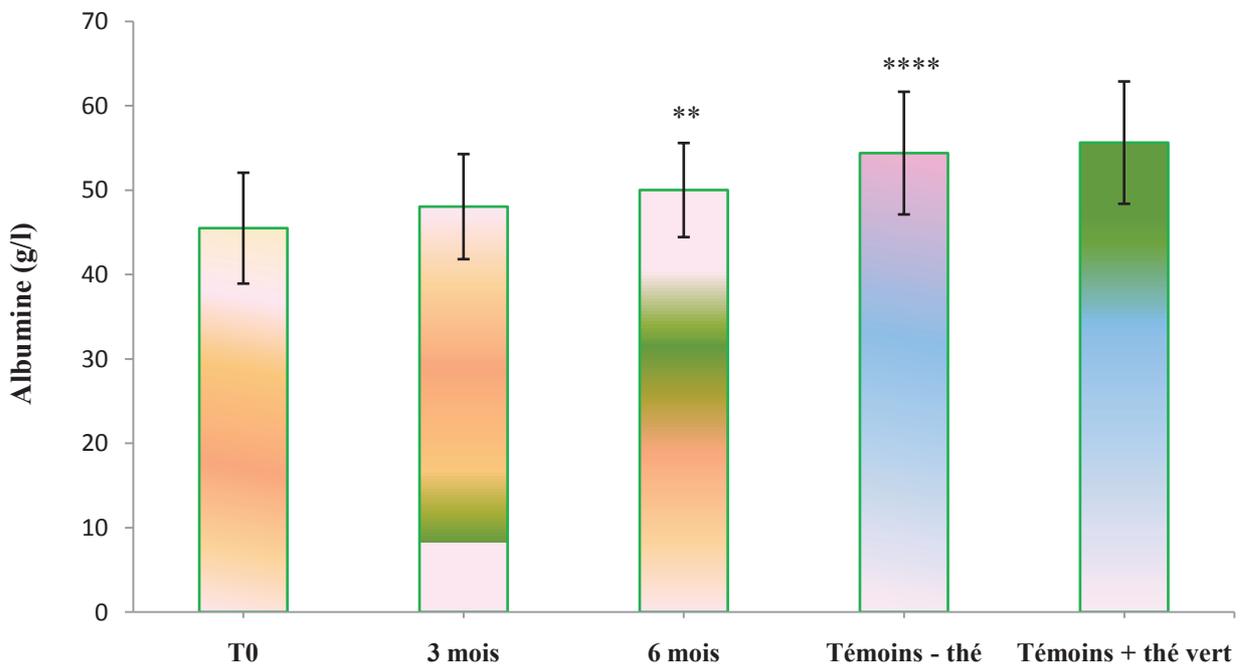
**Figure 35:** Effet de la consommation de thé vert sur l'activité du glutathion peroxydase (GPx) érythrocytaire chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*)  $p < 0.05$  et (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  par rapport à T0.



**Figure 36:** Effet de la consommation de thé vert l'activité de la catalase (CAT) érythrocytaire chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*)  $p < 0.05$  et (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  par rapport à T0, +++  $p < 0.005$  par rapport aux témoins – thé.



**Figure 37:** Effet de la consommation de thé vert sur le taux des thiols totaux érythrocytaire chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*\*)  $p < 0.01$  et (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  par rapport à T0, ++  $p < 0.01$  par rapport aux témoins – thé.



**Figure 38:** Effet de la consommation de thé vert sur le taux de l'albumine chez les patients atteints de cancer de la prostate et les témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*\*)  $p < 0.01$  et (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  par rapport à T0.

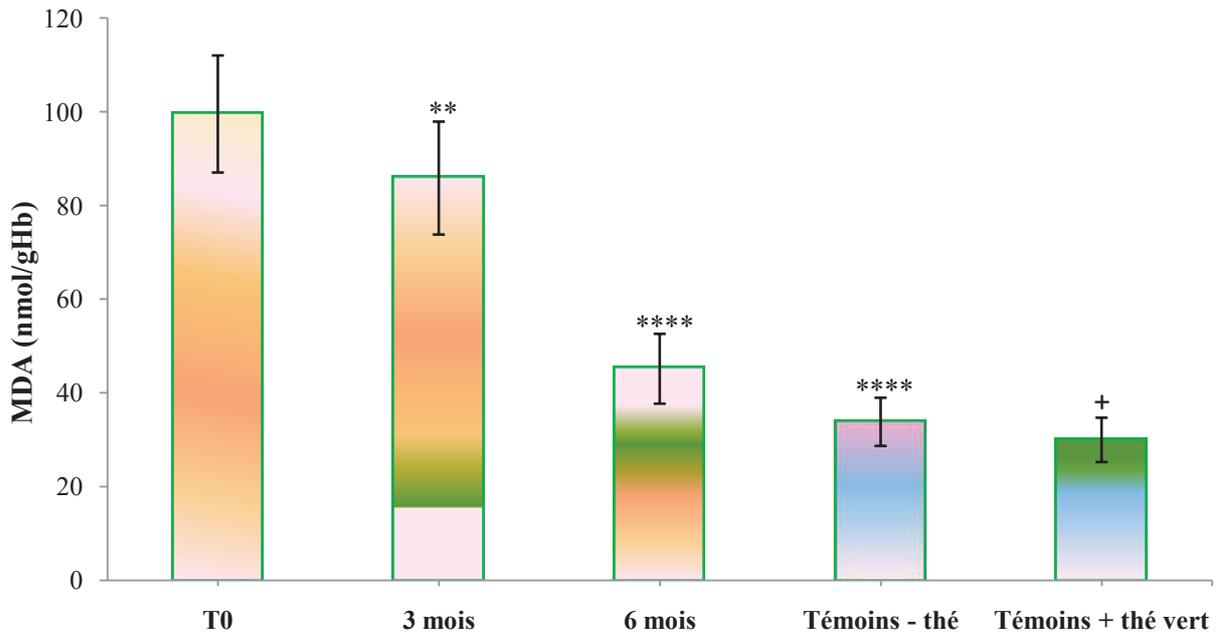
### 2.2.3 Effet de la consommation de thé vert sur le statut oxydant

Le statut oxydant des patients atteints de cancer de la prostate a été évalué avant et après la consommation de thé vert, en mesurant le MDA au niveau des érythrocytes et au niveau du plasma.

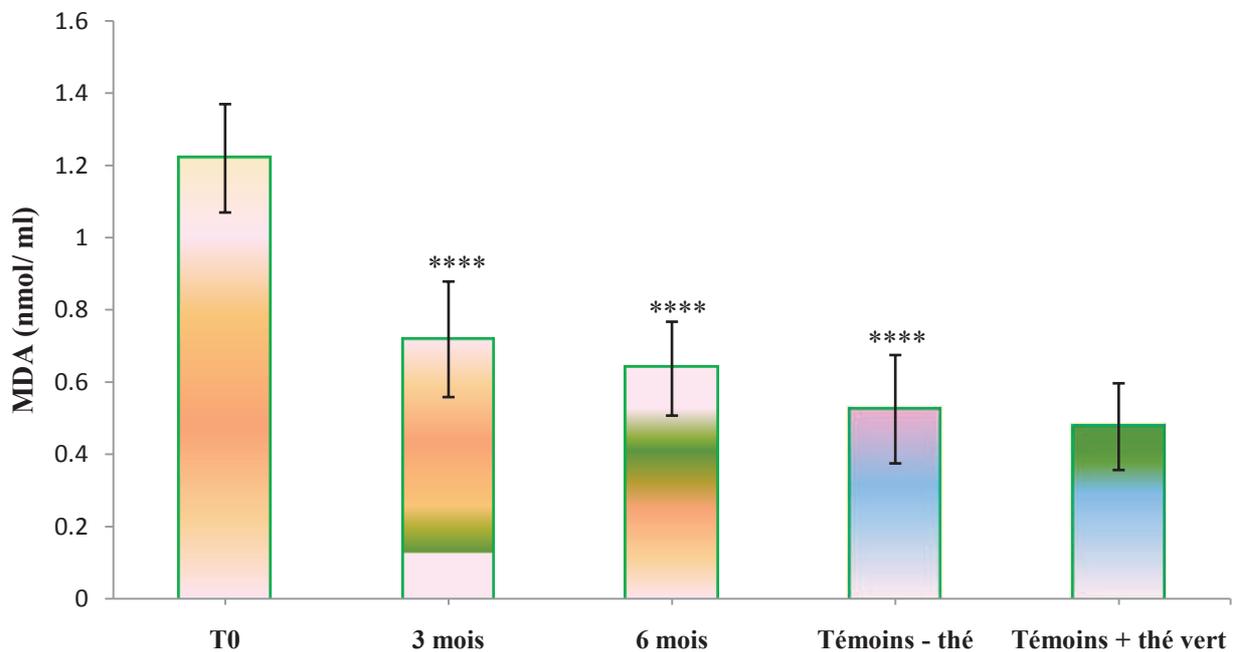
Les résultats obtenus avant la consommation de thé vert (T0) montrent que les patients atteints de cancer de la prostate comparant aux témoins qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé présentent des taux significativement élevés en MDA au niveau d'érythrocytes ( $99.52 \pm 12.49$  vs  $33.83 \pm 5.14$  nmol/gHb,  $p < 0.0001$ ) qu'au niveau du plasma ( $1.22 \pm 0.15$  vs  $0.52 \pm 0.15$  nmol/ml,  $p < 0.0001$ ) (figure 39, 40).

Comparant les résultats des témoins qui boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour et ceux qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé, aucune différence significative n'a été observée au niveau du taux de MDA au niveau du plasma ( $0.47 \pm 0.12$  vs  $0.52 \pm 0.15$  nmol/ml), mais un taux plus faible de MDA a été déterminé au niveau d'érythrocytes des témoins qui boivent habituellement de thé vert ( $29.98 \pm 4.73$  vs  $33.83 \pm 5.14$  nmol/gHb,  $p < 0.05$ ) (figure 39, 40) (tableau 12).

Le dosage de MDA après 3 mois de consommation de thé vert chez les patients montre une diminution significative en MDA au niveau d'érythrocytes ( $85.84 \pm 12.05$  nmol/gHb,  $p < 0.01$ ) qu'au niveau du plasma ( $0.71 \pm 0.16$  nmol/ml,  $p < 0.0001$ ) (figure 39, 40) (tableau 12). Après 6 mois de consommation de thé vert, les taux de MDA au niveau d'érythrocytes et au niveau du plasma diminuent à la moitié par rapport à T0 (avant la consommation de thé vert). Les valeurs moyennes observées sont respectivement  $45.16 \pm 7.45$  nmol/ml,  $p < 0.0001$  pour le MDA érythrocytaire et  $0.63 \pm 0.13$  nmol/ml,  $p < 0.0001$  pour le MDA plasmocytaire (figure 39, 40) (tableau 12).



**Figure 39:** Effet de la consommation de thé vert sur le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau d'érythrocytes des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*\*) $p < 0.01$  et (\*\*\*\*) $p < 0.0001$  par rapport à T0, + $p < 0.05$  par rapport aux témoins – thé.



**Figure 40:** Effet de la consommation de thé vert sur le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau du plasma des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*\*) $p < 0.01$  et (\*\*\*\*) $p < 0.0001$  par rapport à T0, + $p < 0.05$  par rapport aux témoins – thé.

#### 2.2.4 Effet de la consommation de thé vert sur la glycémie, le bilan lipidique et les protéines totales

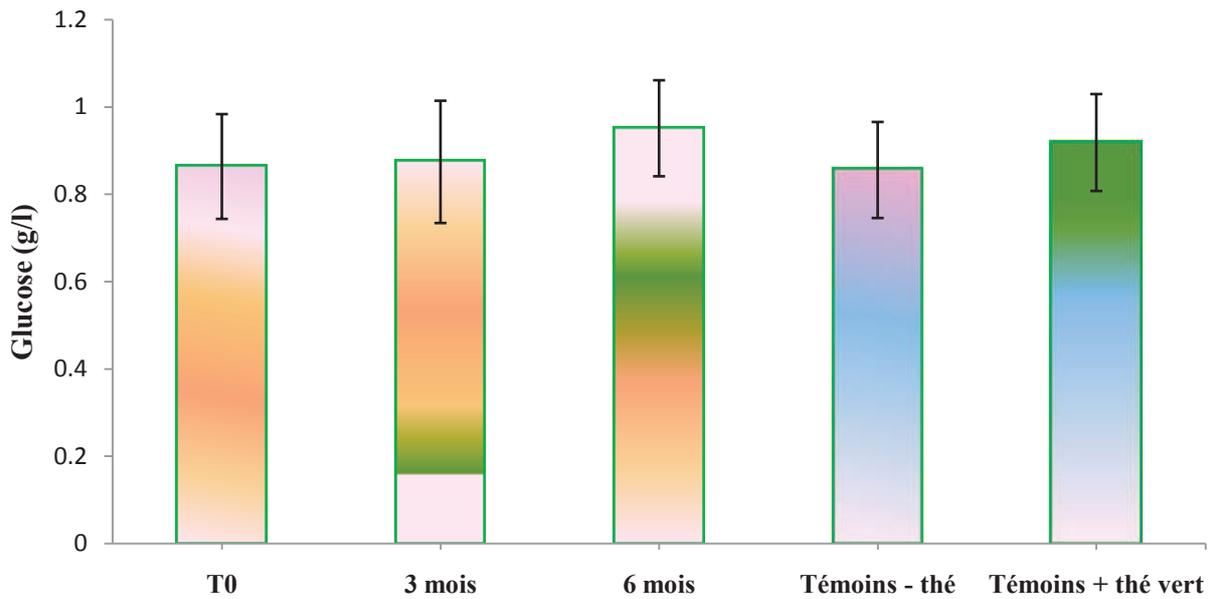
Le dosage de la glycémie, le bilan lipidique et les protéines totales est réalisé avant et après la consommation de thé vert, parallèlement avec le dosage des paramètres de stress oxydant. Les patients atteints de cancer de la prostate présentent avant la consommation de thé vert (T0) des taux normaux en glucose ( $0.86 \pm 0.12$  g/l) et en triglycérides ( $1.55 \pm 0.21$  g/l), basé sur les valeurs de référence des kits commerciaux (Spinreact, Espagne). La comparaison de ces résultats à ceux des témoins qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé ne montre également aucune différence significative (glucose  $0.85 \pm 0.11$  g/l et triglycérides  $1.44 \pm 0.23$  g/l) (figure 41, 42) (tableau 12).

La consommation de thé vert durant 6 mois ne montre aucun effet sur le taux de glucose ou de triglycérides chez les patients (figure 41, 42) (tableau 12).

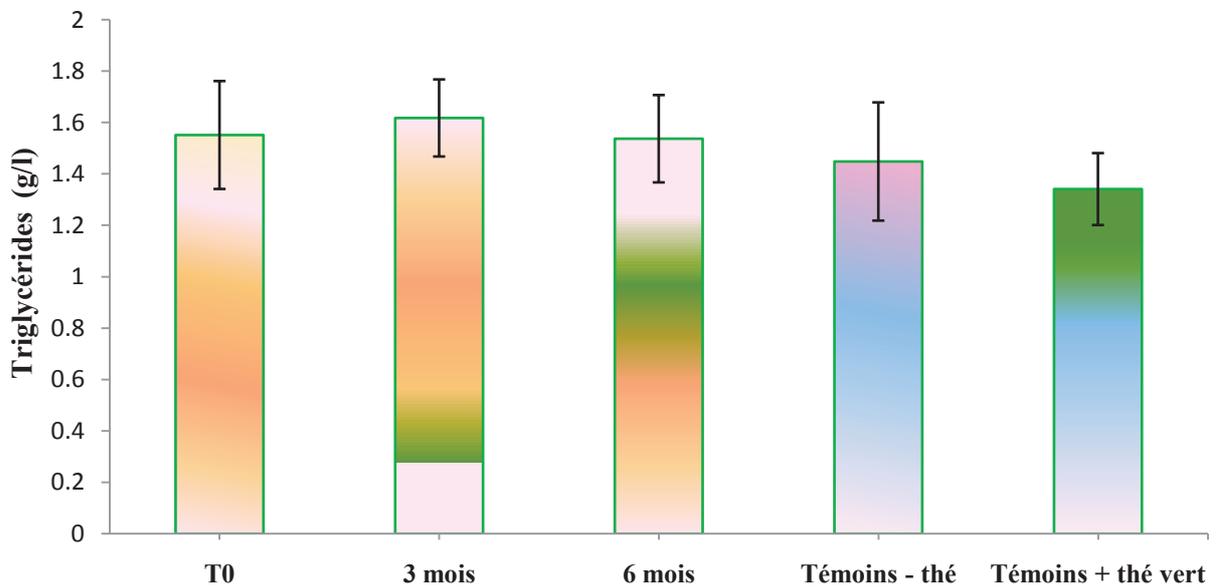
Les patients présentent également un taux normal en cholestérol total avant la consommation de thé vert (T0) ( $1.7 \pm 0.21$  g/l). Cependant cette valeur est semble plus élevé comparant à celui des témoins qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé ( $1.34 \pm 0.17$  g/l,  $p < 0.0001$ ). La consommation de thé vert durant 6 mois ne montre aucun effet sur le taux de cholestérol chez les patients (figure 43) (tableau 12).

Un taux normal de protéines totales a été déterminé chez les patients avant la consommation de thé vert (T0) ( $66.77 \pm 7.41$  g/l). Mais comparant au résultat des témoins qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé, ce taux est apparait faible ( $74.17 \pm 11.19$  g/l,  $p < 0.005$ ) (figure 44) (tableau 12).

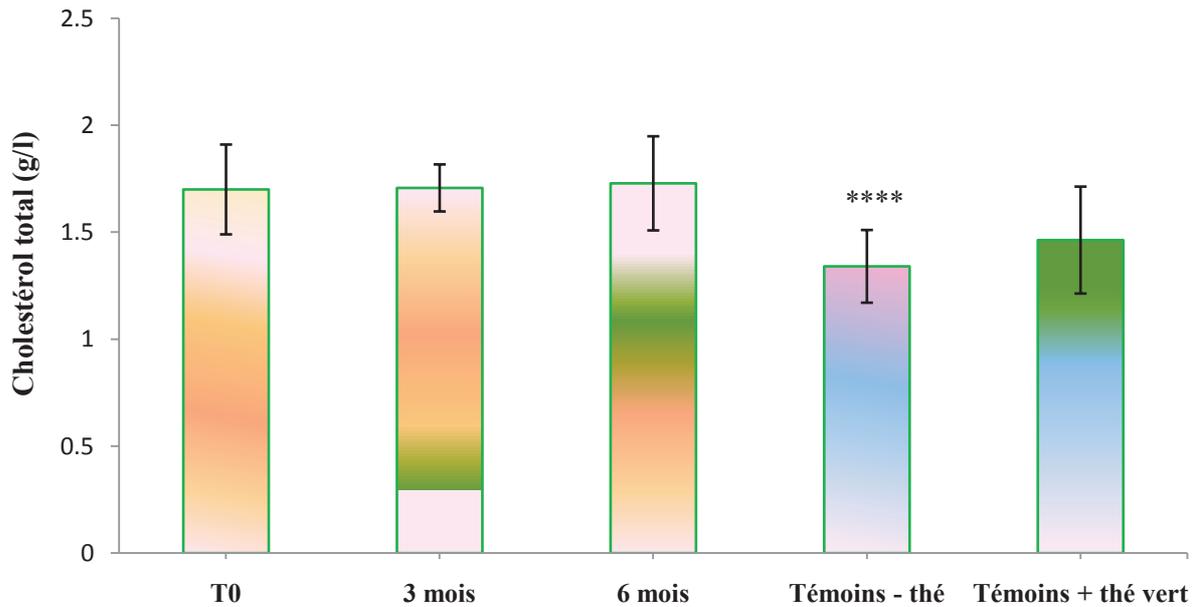
La consommation de thé vert durant 3 mois ne montre aucun effet sur le taux de protéines totales chez les patients ( $68.46 \pm 9.76$  g/l), mais après 6 mois de consommation de thé vert une augmentation significative du taux de protéines a été observée ( $72.93 \pm 10.2$  g/l,  $p < 0.01$ ) (figure 44) (tableau 12). Comparant les résultats des témoins qui boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour et ceux qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé, aucune différence significative n'a été observée au niveau du glucose ( $0.91 \pm 0.11$  vs  $0.85 \pm 0.11$  g/l), des triglycérides ( $1.34 \pm 0.14$  vs  $1.44 \pm 0.23$  g/l), du cholestérol ( $1.46 \pm 0.25$  vs  $1.34 \pm 0.17$  g/l) ou de protéines totales ( $75.55 \pm 11.43$  vs  $74.17 \pm 11.19$  g/l) (figure 41, 42, 43, 44) (tableau 12).



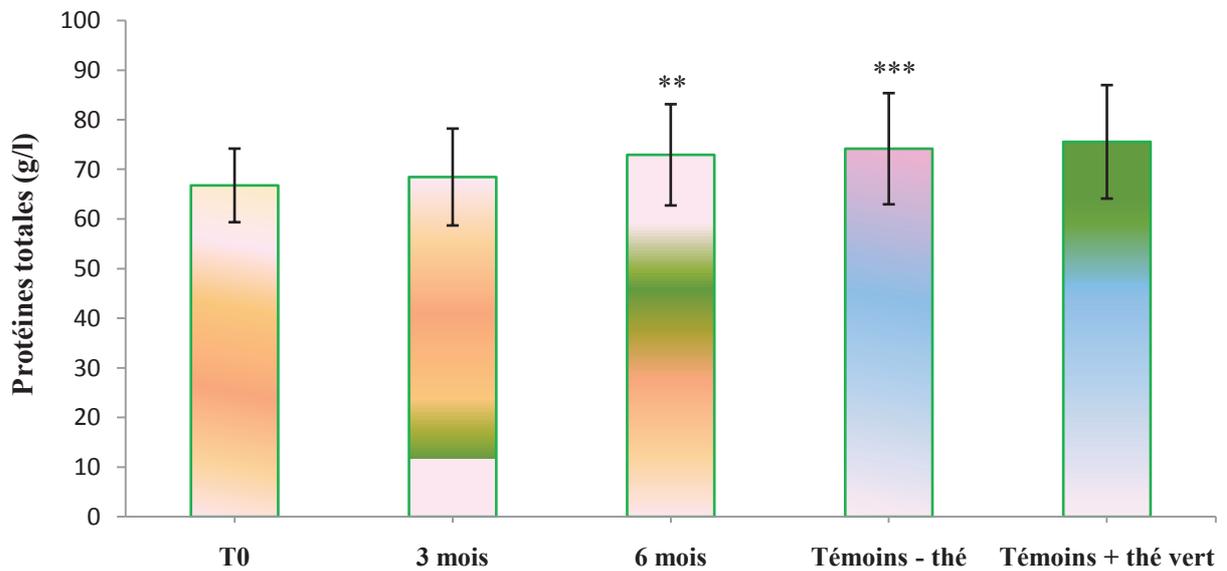
**Figure 41:** Effet de la consommation de thé vert sur la glycémie des patients atteints de cancer de la prostate et les témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences.



**Figure 42:** Effet de la consommation de thé vert sur le taux de triglycérides des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences.



**Figure 43:** Effet de la consommation de thé vert sur le taux de cholestérol total des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  par rapport à T0.



**Figure 44:** Effet de la consommation de thé vert sur le taux des protéines totales des patients atteints de cancer de la prostate et des témoins. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, (\*\*)  $p < 0.01$  et (\*\*\*)  $p < 0.005$  par rapport à T0.

**Tableau 12:** Tableau récapitulatif des différents paramètres chez les témoins et chez les patients atteints du cancer de la prostate avant et après la consommation.

Paramètres	Patients à T0	Patients à T = 3 mois	Patients à T = 6 mois	Témoins-thé	Témoins+ thé vert
<b>GSH érythrocytaire</b> (mg / dl)	20.79 ± 4.32	31.58 ± 2.57 ****	34.36 ± 3.64 ****	40.51 ± 4.87 ****	42.02 ± 4.23
<b>Thiols totaux érythrocytaire</b> (µmol/gHb)	5.64 ± 0.81	6.06 ± 0.89	6.36 ± 0.79 **	6.58 ± 0.63 ****	7.1 ± 0.78 ++
<b>Albumine</b> (g/l)	45.5 ± 6.57	48.05 ± 6.22	50.02 ± 5.57 **	54.39 ± 7.27 ****	55.64 ± 7.25
<b>CAT érythrocytaire</b> (UI/g Hb)	15.29 ± 1.75	17.23 ± 1.51 *	22.19 ± 1.78 ****	23.84 ± 2.03 ****	25.94 ± 1.81 +++
<b>GPx érythrocytaire</b> (µmolGSH/g Hb)	17.61 ± 3.14	19.83 ± 3.23 *	23.53 ± 3.69 ****	28.55 ± 3.8 ****	29.66 ± 3.73
<b>MDA érythrocytaire</b> (nmol/gHb)	99.52 ± 12.49	85.84 ± 12.05 **	45.16 ± 7.45 ****	33.83 ± 5.14 ****	29.98 ± 4.73 +
<b>MDA plasmocytaire</b> (nmol/ ml)	1.22 ± 0.15	0.71 ± 0.16 ****	0.63 ± 0.13 ****	0.52 ± 0.15 ****	0.47 ± 0.12
<b>Glucose</b> (g/l)	0.86 ± 0.12	0.87 ± 0.14	0.95 ± 0.11	0.85 ± 0.11	0.91 ± 0.11
<b>Triglycérides</b> (g/l)	1.55 ± 0.21	1.61 ± 0.15	1.53 ± 0.17	1.44 ± 0.23	1.34 ± 0.14
<b>Cholestérol total</b> (g/l)	1.7 ± 0.21	1.7 ± 0.11	1.72 ± 0.22	1.34 ± 0.17 ****	1.46 ± 0.25
<b>Protéines totales</b> (g/l)	66.77 ± 7.41	68.46 ± 9.76	72.93 ± 10.2 **	74.17 ± 11.19 ***	75.55 ± 11.43

T0: avant la consommation de thé vert; T = 3 mois: après 3 mois de consommation de thé vert; T = 6 mois: après 6 mois de consommation de thé vert; Témoins – thé: témoins n'avaient jamais ou rarement bu du thé; Témoins + thé vert: témoins boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour. Les valeurs sont des moyennes ± écart type de trois expériences, (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.005$  et (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  par rapport à T0, +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.005$  par rapport aux témoins – thé.

### 3. DISCUSSION

Une production accrue des ERO, une diminution de la capacité de défenses antioxydantes ou les deux combinés peuvent conduire à un état de stress oxydant dans les différents compartiments cellulaires (Sies, 1991). Un état de stress oxydant prolongé peut déclencher différents processus de signalisation cellulaire associés à l'initiation et au développement de nombreuses maladies, y compris le cancer de la prostate.

En effet la prostate est très vulnérable au stress oxydant et plusieurs mécanismes peuvent contribuer à l'augmentation de production des ERO dans cet organe incluant les mutations de l'ADN mitochondrial et nucléaire, les NADPH oxydases, les modulations génétiques, l'inflammation, le vieillissement et les hormones stéroïdiennes (Khandrika *et al.*, 2009). Les études ont suggéré que l'augmentation du stress oxydant est peut associée non seulement au développement de cancer de la prostate mais aussi à sa progression (Guéritat, 2015).

Plusieurs études d'observation et d'intervention ont étudié l'effet de certains antioxydants alimentaires sur la prévention ou la réduction du risque de développement ou de progression du cancer de la prostate. Il a été démontré que la supplémentation avec certains de ces antioxydants diminue le risque global de cancer. La plupart des études chez l'homme se sont concentrées sur les caroténoïdes, en particulier le bêta-carotène et le lycopène, les vitamines E et C, les sources diététiques de diverses substances phénoliques et les flavonoïdes. En général, les études ont donné des résultats incohérents, avec antioxydants individuels ayant été montré pour avoir un effet positif, négatif, ou aucune association avec le risque de cancer de la prostate (Vance *et al.*, 2013).

Dans la présente étude, nous avons évalué la capacité du thé vert, qui est très connu pour sa propriété antioxydante (Dutta *et al.*, 2013) à réduire le stress oxydant chez des patients de la population de l'Est Algérien atteints de cancer de la prostate. Un type de thé vert chinois très commercialisé en Algérie a été utilisé.

Pour la sécurité des patients et pour confirmer l'activité antioxydante / antiproliférative de ce thé vert, nous avons d'abord analysé sa composition et ses effets *in vitro*. Pour cela une extraction de thé vert a été réalisée dans le premier pas utilisant un mélange éthanol / eau afin d'obtenir un extrait brut de thé vert puis des solvants de polarité croissante (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc et *n*-BuOH) pour séparer les composés phénoliques et les flavonoïdes. La teneur de différents extraits en phénols et flavonoïdes, ainsi que leur activité antioxydante et antiproliférative ont été évalués.

Les résultats obtenus avec l'extrait éthanolique brut nous confirment que le thé vert chinois utilisé a un teneur important en phénols et en flavonoïdes et possède une activité antioxydante et antiproliférative significative.

Il est capable de piéger significativement le radical DPPH et montre une activité très élevée contre le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) qui est le radical le plus réactif et qui capable de provoquer des lésions cellulaires très agressives *in vivo*. Ce radical peut réduire les liaisons disulfures des protéines, en particulier de fibrinogène, conduisant à la formation des configurations anormales qui peuvent provoquer de nombreuses maladies comme l'athérosclérose, les troubles neurologiques et également le cancer (Lipinski, 2011).

Les résultats montrent également que le thé vert est capable d'inhiber la peroxydation lipidique et d'assurer une protection complète de l'ADN du dommage oxydatif causé par les radicaux hydroxyles (OH<sup>•</sup>) générés dans cette étude par la photolyse de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par rayonnement UV. De nombreuses études ont suggéré que les dommages oxydatifs de l'ADN peuvent être un grand facteur de risque pour une variété de maladies, y compris le cancer de la prostate. Un niveau élevé de radical 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) a été révélé dans les échantillons des patients atteints de cancer de la prostate par rapport aux témoins. Un traitement par hormonothérapie combiné avec des agents antioxydants a été conseillé pour inhiber la progression du cancer de la prostate via la diminution de stress oxydatif causé par les dommages oxydatifs de l'ADN (Miyake *et al.*, 2004).

L'extrait éthanolique de thé vert montre aussi une activité antiproliférative dose-dépendante significative contre la lignée cellulaire de cancer de la prostate métastatique humaine PC-3. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par de nombreuses autres études qui trouvent que le thé vert est un agent anticancéreux naturel puissant contre une variété de cancers comprenant de prostate, de poumon, de côlon, de l'estomac, de rein, de pancréas et des glandes mammaires (Yang *et al.*, 2011).

Ces effets bénéfiques de thé vert observés sont attribués généralement dans les différentes études à sa teneur élevée en phénols et en flavonoïdes, en particulier les catéchines (Dutta *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 1996). Utilisant l'HPLC-TOF / MS plusieurs composés phénoliques sont déterminés dans l'extrait éthanolique, non seulement les catéchines (Hastak *et al.*, 2003; Valcic *et al.*, 2011) mais également l'acide gallique en premier position (Yen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011), la rutine (Yang *et al.*, 2008), la quercétine (Nam *et al.*, 2016) et autres. Ces composés sont connus par leurs activités antioxydantes et antiprolifératives et tous ensemble peuvent fournir le maximum d'effet antioxydant et antiprolifératif observé de thé vert.

Ces résultats sont confirmés lors de l'évaluation de l'activité antioxydante et antiproliférative des différents extraits de thé vert qui contiennent des quantités et des types différents de composés phénoliques. L'extrait chloroformique (CHCl<sub>3</sub>) qui contient des quantités mineures de composés phénoliques et de flavonoïdes ne présente qu'une activité antioxydante très légère et aucune

activité antiproliférative contre la lignée cellulaire de cancer de la prostate métastatique humaine PC-3.

Cependant les extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique qui contiennent des quantités élevées en composés phénoliques et en flavonoïdes montrent une activité antioxydante et antiproliférative très élevées. En fait, l'acide gallique (Yen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011) et la rutine (Yang *et al.*, 2008) dans les deux extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique et les catéchines (Hastak *et al.*, 2003; Valcic *et al.*, 2011) dans l'extrait d'acétate d'éthyle sont présents avec des quantités importantes et ils peuvent être les composés qui donnent la plupart de l'activité antioxydante et antiproliférative observés par ces extraits.

De façon intéressante, les trois extraits de thé vert (l'extrait chloroformique, l'extrait d'acétate d'éthyle, et l'extrait *n*-butanolique) n'ont pas montré aucune cytotoxicité contre les cellules normales de fibroblastes BJ, ce qui confirme que la consommation de ce thé vert ne sera pas toxique pour les patients.

Selon les études, les polyphénols de thé vert et plus particulièrement les catéchines peuvent inhiber la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques via plusieurs mécanismes moléculaires (Gupta *et al.*, 2000; Hastak *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Siddiqui *et al.*, 2011). Il a été rapporté qu'elles sont capables d'induire la dérégulation et l'arrêt du cycle cellulaire (Gupta *et al.*, 2000), d'induire l'apoptose, de moduler la signalisation de NFκB, d'inhiber les voies d'inflammation (Hastak *et al.*, 2003) et d'inhiber l'activité des récepteurs de l'IGF-1 au niveau des cellules cancéreuses (Li *et al.*, 2007). En plus dans le cas de cancer de la prostate elles sont capables également d'interagir physiquement avec le domaine de la liaison du ligand de récepteur d'androgène en remplaçant le ligand par une affinité élevée (IC<sub>50</sub> pour EGCG: 0.4 μM) (Siddiqui *et al.*, 2011).

Dans la présente étude les extraits d'acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanolique de thé vert montrent les activités antiprolifératives les plus élevées contre les cellules cancéreuses prostatiques PC-3. Pour déterminer le mécanisme moléculaire impliqué par ces deux extraits dans l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques, les lignées cellulaires PC-3 et BJ ont été traitées avec 50 μg/ml d'extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique séparément.

Après 24 h les cellules sont visualisées à la microscopie vitale avec la sonde fluorescente TMRM sensible au potentiel de membrane de la mitochondrie ( $\Delta\psi_m$ ), co-marquée avec la sonde nucléaire Hoechst 33342. Les résultats montrent que les deux extraits de thé vert ne présentent aucun effet par rapport au contrôle dans la lignée cellulaire BJ mais ils provoquent une

dépolarisation mitochondriale significative et une condensation de la chromatine des cellules PC-3. Ces résultats suggérant que les deux extraits induisent une mort cellulaire apoptotique.

Afin de confirmer les résultats obtenus par la microscopie vitale, la teneur en protéine apoptotique p53 a été évaluée par western blot après le traitement des deux lignées cellulaires, PC-3 et BJ par la même concentration des extraits de thé vert et pendant la même période (24 h).

L'analyse des résultats montre que les extraits de thé vert ne provoquent aucun changement significatif dans la teneur en protéine p53 dans la lignée cellulaire BJ. Cependant, une augmentation significative de la teneur en p53 dans la lignée cellulaire PC-3 par rapport au contrôle a été observée après 24h de traitement par l'extrait d'acétate d'éthyle ce qui confirme les résultats observés par la microscopie vitale.

Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de catéchines dans cet extrait. Ces molécules sont capables d'induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses prostatiques à travers la stabilisation de p53 par une phosphorylation spécifique ce que provoque une régulation de WAF1 / p21 et Bax et un changement du rapport Bax / Bcl2 en faveur de l'apoptose (Hastak *et al.*, 2003). Il a été montré que les catéchines peuvent également induire l'apoptose par l'augmentation de la formation intracellulaire des ERO qui attaque la membrane mitochondriale provoquant sa dépolarisation indépendamment de la protéine Bcl2 ou p53 (Chung *et al.*, 2001).

Le traitement des cellules PC-3 avec l'extrait *n*-butanolique ne montre pas les mêmes résultats. Une augmentation non significative de la teneur en p53 dans la lignée cellulaire PC-3 par rapport au contrôle a été observée, ce qui suggère que cet extrait *n*-butanolique induit l'apoptose des cellules PC-3 observé sous microscope par un mécanisme indépendant à la protéine p53.

En effet l'extrait *n*-butanolique ne contient pas de catéchine mais il contient une quantité élevée d'acide gallique. Les études montrent que ce composé phénolique peut inhiber la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques par plusieurs mécanismes. Elle provoque des dommages au niveau de l'ADN des cellules cancéreuses prostatiques PC-3 et inhibe sa réparation (Liu *et al.*, 2013), induit l'arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques DU145 en phase G2/M et peut induire également l'apoptose de ces cellules, indépendamment de la protéine p53, par l'augmentation de la génération des ERO intracellulaire (Veluri *et al.*, 2006).

Dans l'ensemble, le thé vert chinois choisi dans cette étude présente une activité antioxydante puissante et une activité antiproliférative significative contre les cellules cancéreuses prostatiques. Ajoutant à ça il ne présente aucune toxicité pour les cellules normales. Ces activités sont contribuent principalement à sa teneur en flavonoïdes en particulier les catéchines mais également

au d'autres composés phénoliques comme l'acide gallique qui se trouve en grande quantité dans ce thé vert, la rutine et la quercétine.

Dans l'étude *in humaine*, 70 patients de la population de l'Est Algérien atteints de cancer de la prostate et 120 témoins ont participé à l'étude. L'évaluation de statut oxydant et antioxydant dans le sang des participants au début de l'étude montre la présence d'un stress oxydant élevé chez les patients atteints de cancer de la prostate par rapport aux témoins.

Les patients présentent un taux élevés de MDA au niveau de plasma qu'au niveau d'érythrocytes et des taux significativement altérés en glutathion réduit (GSH), en thiols totaux et des activités significativement diminuée de catalase et de glutathion peroxydase (GPx) au niveau des érythrocytes. Ils présentent un taux normal en albumine mais comparant aux témoins ce taux semble plus faible.

Ces résultats concordent avec ceux de nombreuses autres études (Srivastava *et al.*, 2005; Kotrikadze *et al.*, 2008; Sandhya *et al.*, 2010) et montrent que ce déséquilibre oxydant-antioxydant peut être l'un des principaux facteurs responsables au développement et à la progression de cancer de la prostate chez les hommes dans la population Algérienne.

Dans un revu récent l'analyse des résultats de 23 études cas-témoins réalisés sur le stress oxydant chez les patients atteints de cancer de la prostate a montré que ces patients présentent un profil élevé en stress oxydant et une altération des systèmes de défense antioxydants et a conclue que le MDA et 8-OHdG ainsi que les paramètres antioxydants SOD, CAT, GSH, GPx et les vitamines C et E peuvent être des biomarqueurs potentiellement prédictifs de cancer de la prostate (Oh *et al.*, 2016).

Plusieurs études montrent que le cancer de la prostate est accompagné d'une diminution de l'activité de GPx, SOD et CAT, et une augmentation de niveau des produits issue de la peroxydation lipidique comme le MDA (Khandrika *et al.*, 2009; Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009).

Une faible activité de la GPx est corrélée avec le risque de cancer de la prostate (Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009). L'affaiblissement de l'activité de la GPx érythrocytaire pourrait limiter la détoxification des niveaux élevés de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et ainsi induire la formation du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) à l'origine de l'augmentation des dommages oxydatifs (Srivastava *et al.*, 2005).

Il a été aussi rapporté que l'expression de SOD3 (qui est connu par sa propriété de protéger la surface de la cellule de stress oxydant) est réduite dans le tissu du cancer de la prostate (Khandrika *et al.*, 2009). En outre, sa surexpression peut inhiber la prolifération et l'invasion

cellulaire de la ligne cancéreuse prostatique humaine PC-3 par une surproduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui provoque la mort cellulaire via une accumulation de dommages à l'ADN (Kim *et al.*, 2014).

Il a été aussi noté que la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD) est fortement associée à la signification clinique du cancer de la prostate chez les hommes âgés de plus de 69 ans et il peut être un marqueur utile pour prédire le risque de progression du cancer de la prostate (Iguchi *et al.*, 2015).

Certaines études épidémiologiques trouvent que la consommation de thé vert peut réduire significativement le risque de cancer de la prostate dans différentes populations. La consommation de 3 tasses de thé vert en Chine du Sud-Est et de 5 tasses ou plus au Japon a diminué significativement le risque de cancer de la prostate dans ces deux populations (Jian *et al.*, 2004; Kurahashi *et al.*, 2008). Cependant, ces résultats restent en contradiction avec d'autres études qui n'ont montré aucune association entre la consommation de thé vert et le cancer de la prostate (Kikuchi *et al.*, 2006).

Dans la présente étude, nous avons trouvé que la consommation de 2 à 3 tasses par jour de thé vert pendant 3 mois est capable d'augmenter significativement le niveau de GSH et l'activité de catalase et de glutathion peroxydase (GPx) et de diminuer significativement le taux de MDA dans les érythrocytes que dans le plasma du patient atteints de cancer de la prostate.

Après 6 mois de consommation de thé vert, les résultats des patients deviennent proches de celui des contrôles qui n'ont jamais ou rarement bu du thé. Les patients présentent un taux plus élevé de GSH et des activités plus élevées de catalase et de glutathion peroxydase (GPx) en plus de l'augmentation significative des thiols totaux et de l'albumine notée. La consommation de thé vert montre également un effet très significatif sur la peroxydation lipidique, le taux de MDA diminué à un taux plus bas au niveau d'érythrocytes qu'au niveau de plasma.

Ces résultats montrent que le thé vert qui présente une activité antioxydante très puissante dans notre étude *in vitro*, peut également diminuer les marqueurs de stress oxydatif et améliorer le statut antioxydant des patients atteints de cancer de la prostate. En supposant que le sang peut être un proxy adéquat pour le tissu prostatique, il est probable que les effets antioxydants du thé vert déterminés peuvent empêcher significativement la progression de cancer de la prostate chez le groupe de patients étudié.

Ces effets bénéfiques de thé vert sur le statut oxydant/antioxydant des patients atteints de cancer de la prostate sont le plus souvent due à ses composés phénoliques. Il a été montré que les polyphénols de thé vert et surtout les catéchines sont capables de piéger les ERO et de chélate les métaux de transition, produits pendant toutes les phases de carcinogenèse (Siddiqui *et al.*, 2007).

Il a été rapporté également que l'EGCG lors un état d'un stress oxydatif cellulaire peut induire la phosphorylation de Nrf2 qui est un facteur de transcription joue un rôle central dans la réponse antioxydante permettant l'activation des enzymes antioxydantes (Na *et al.*, 2008).

Actuellement il n'y a eu que quelques études d'intervention évaluant l'effet du thé vert sur le traitement ou la prévention du cancer de la prostate chez les humains (Jatoi *et al.*, 2003; Bettuzzi *et al.*, 2006; McLarty *et al.*, 2009) et seulement deux entre eux ont trouvé des résultats encourageants et sont en lien avec nos résultats (Bettuzzi *et al.*, 2006; McLarty *et al.*, 2009).

L'étude de Bettuzzi *et al.*, (2006) a été la première étude montrant que les catéchines de thé vert sont des composés sans danger et très intéressante pour la chimioprévention du cancer de la prostate. Aucune modification significative du PSA n'a été observée, mais 33% d'inhibition de développement du cancer de la prostate a été observée chez un groupe de volontaires atteints de néoplasie intra-épithéliale prostatique de haut grade (HGPIIN) après 1 an de traitement quotidien avec des catéchines de thé vert. Les travaux de McLarty *et al.*, (2009) a soutenu également le rôle potentiel des polyphénols du thé dans le traitement ou la prévention du cancer de la prostate. Une supplémentation à court terme avec des doses quotidiennes de 1.3 g de catéchines de thé chez des patients atteints du cancer de la prostate a montré une diminution significative du valeur de PSA, du facteur de croissance des hépatocytes (HGF), du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1) et de la protéine 3 de liaison à l'IGF (IGFBP-3 ), sans élévation des enzymes hépatiques.

Nos résultats offrent des informations complémentaires sur l'efficacité du thé vert pour la gestion de cancer de la prostate chez l'homme grâce à sa capacité à réguler le stress oxydatif déterminé chez les patients dans notre et dans de nombreuses autres études (Srivastava *et al.*, 2005; Kotrikadze *et al.*, 2008; Sandhya *et al.*, 2010). La diminution de statut oxydant et l'amélioration de statut antioxydant chez les patients atteints de cancer de la prostate peut réduire la production des ERO exagérée et par conséquent réduire la progression de cancer de la prostate.

Il a été rapporté que les ERO peuvent induire l'activation de différentes voies de signalisation incluant les voies des MAPKs (Mitogen-activated proteins kinases) et la voie PI3K (la phosphatidylinositol-3-kinase)/ AKt (Liou *et al.*, 2010). Ces deux voies de signalisation se trouvent en effet suractivées dans le cancer de la prostate et elles peuvent être impliquées par conséquence dans les mécanismes d'angiogenèse et d'invasion facilitant la croissance et les métastases de cancer (Royuela *et al.*, 2002; Jendrossek *et al.*, 2008).

L'étude de Kumar *et al.*, (2008) a indiqué que la production des ERO est directement proportionnelle à la forme agressive de cancer de la prostate et que la thérapie antioxydante a

diminué l'expression d'Akt et modulé les activités des voies MAPK, retardant par conséquent la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques.

Selon les études, le thé vert peut porter plusieurs autres bénéfices pour la santé. Il peut diminuer les concentrations de triglycérides, de cholestérol total, le taux de LDL et augmenter le taux de HDL (Zhou *et al.*, 2016). Dans certaines études, le thé vert est identifié comme un modificateur important du diabète, et ses effets ont reçu une attention croissante compte tenu des résultats encourageants accumulés de la recherche expérimentale (Liu *et al.*, 2013).

Dans une autre étude, le traitement des rats âgés avec extrait de thé vert a entraîné une augmentation significative des taux de protéines totales, d'albumine, de globuline et a inversé significativement l'altération des fonctions hépatiques et rénales accompagnés de vieillissement (Gad *et al.*, 2013).

Dans la présente étude nous avons vérifié parallèlement l'effet de la consommation de thé vert sur la glycémie, le bilan lipidique et le taux de protéines totales chez les patients atteints de cancer de la prostate. Au début de l'étude les patients présentent des taux normaux en glucose, en triglycérides, en cholestérol total et en protéines totales. La comparaison de ces résultats à ceux des témoins qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé montre que les patients présentent un taux de cholestérol un peu élevé et un taux de protéines totales un peu plus bas.

La consommation de 2 à 3 tasses de thé vert pendant 6 mois ne montre aucun effet sur le taux de glucose, de triglycérides ou de cholestérol total mais elle augmente significativement le taux de protéines totales dans le plasma pour arriver à une valeur proche à celle des témoins. Cette augmentation de protéines totales est peut justifier par l'augmentation de l'albumine qui a été également noté après 6 mois de consommation de thé vert.

Ces résultats montrent que le thé vert ne provoque aucun danger pour les patients. Basant sur les résultats de protéines totales, il semble que la consommation de thé vert ne présente aucune toxicité hépatique mais au contraire elle peut peut-être l'améliorer (Gad *et al.*, 2013).

Aussi bien, nous avons également renforcé l'effet positif de la consommation de thé vert sur le stress oxydant chez l'homme, en comparant le statut oxydant et antioxydants des témoins qui n'avaient jamais ou rarement bu du thé à un groupe d'hommes sains qui boivent habituellement 1 à 3 tasses de thé vert par jour pendant une longue période de temps. Les résultats obtenus montrent que les hommes consomment habituellement le thé vert présentent au niveau d'érythrocytes un taux plus faible en MDA, un taux significativement plus élevé en thiols totaux et une activité plus élevée de la catalase.

Ces résultats montrent que la consommation de thé vert améliore le statut oxydant et antioxydants chez les hommes en bonne santé et suggèrent que sa consommation régulière peut réduire le stress oxydant produit pendant la vie et théoriquement diminuer ses effets négatifs qui peuvent être associés au développement de cancer de la prostate.

L'étude actuelle a révélé une augmentation du stress oxydant chez les patients atteints du cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien. Plus important encore, nous avons démontré ici que le thé vert commercial étudié qui riche en polyphénols et flavonoïdes et présentant de puissantes activités antioxydantes et anticancéreuses *in vitro* a considérablement diminué les marqueurs de stress oxydant et augmenté le statut antioxydant chez les patients atteints de cancer de la prostate. La consommation régulière de thé vert pendant une longue période peut protéger les individus des conséquences négatives du stress oxydatif produites pendant la vie.

### CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le cancer de la prostate constitue un problème de la santé publique dans le monde entier qu'en Algérie. Plusieurs facteurs peuvent contribuer au développement et à la progression de cette maladie.

Dans le présent travail nous avons analysé la relation entre l'âge, les habitudes alimentaires incluant la consommation de thé vert, le mode de vie, les antécédents familiaux et le risque de cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien et parallèlement nous avons évalué l'effet préventif de thé vert sur le cancer de la prostate dans cette population.

L'analyse de la relation entre les principaux facteurs de risque et de prévention cités dans la littérature et le risque de cancer de la prostate dans l'étude épidémiologique cas-témoins réalisée montre pour la première fois que le développement de cette maladie dans notre population peut être associé à l'âge, aux habitudes alimentaires, au mode de vie et aux antécédents familiaux du cancer de la prostate.

Le vieillissement est semble associé au risque de cancer de la prostate dans la population étudiée. Les hommes avec un âge de 50 ans et plus ont un risque élevé de cancer de la prostate.

Les hommes qui consomment des quantités élevés de viande rouge, de graisses saturées d'origine animale, de produits laitiers et qui ont des antécédents familiaux de cette maladie présentent un risque élevé de cancer de la prostate.

Contrairement à la plupart des études, la consommation d'alcool et le tabagisme sont déterminé dans notre étude d'être également parmi les principaux facteurs de risques de cancer de la prostate.

Aucune association n'a été déterminée entre le nombre, le type de repas (traditionnel ou de fast-food) consommés par jour, la consommation de poisson et le risque de cancer de la prostate dans la population algérienne.

Cependant la consommation élevée de fruits et de légumes semble avoir un effet protecteur de cette maladie dans notre population.

Les résultats montrent également que la plupart des hommes de la population étudié jamais ou rarement buvaient du thé vert et que seulement 2 et 5 % des cas et des témoins respectivement buvaient plus de 3 tasses par jour. Malgré que les résultats obtenus sont statistiquement dans les limites mais la consommation de thé vert semble avoir un effet protecteur 1 à 3 tasses et plus de 3 tasses de thé vert par jour peut diminuer respectivement 26 % et 49 % de risque de cancer de la prostate dans la population étudiée.

Les études montrent que le stress oxydant peut être le lien entre les différents facteurs de risque et le cancer de la prostate. Il peut participer non seulement dans le développement de cancer de la prostate mais également à sa promotion et sa progression.

Dans la présente étude, l'évaluation des différents paramètres de statut oxydant /antioxydant indique un stress oxydant élevé chez les patients atteints de cancer de la prostate et suggère que le stress oxydatif pouvait être associé au développement et à la progression du cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien.

Nous avons démontré également que le thé vert qui est riche en phénols et en flavonoïdes et qui présente des activités antioxydantes et anticancéreuses puissantes dans notre étude *in vitro* est capable de diminuer également les marqueurs de stress oxydant et d'augmenter significativement le taux des antioxydants chez les patients de la population de l'Est Algérien atteints de cancer de la prostate.

Une consommation régulière de thé vert peut prévenir de l'effet négatifs de stress oxydant et par conséquent de développement de cancer de la prostate dans notre population.

Devant les limites observées des traitements utilisés actuellement pour le cancer, la chimioprévention, notamment par la consommation des antioxydants et surtout le thé vert, semble être la stratégie la plus utile pour la prise en charge de cancer de la prostate qui est considéré comme un candidat idéal pour la chimioprévention en raison de sa période de latence élevée et parce qu'il est typiquement diagnostiqué chez les hommes de plus de 50 ans. Ainsi, même un léger retard dans la progression de cette maladie par la chimioprévention pourrait entraîner une réduction substantielle de l'incidence de la maladie et, plus important encore, améliorer la qualité de vie des patients.

Quelques limites sont observées dans la présente étude. La première est que nous ne pouvons pas mesurer les effets de consommation de thé vert directement dans le tissu de la glande prostatique. Pourtant que plusieurs autres études ont utilisé cette même approche. Cela n'a pas été possible dans notre étude en raison de préoccupations éthiques et de refus des patients de subir des biopsies répétées.

Des études supplémentaires chez des patients atteints de cancer de la prostate dans notre population sont nécessaires pour déterminer l'effet de la consommation de thé vert sur le stress oxydant dans la glande prostatique.

La deuxième et que notre étude épidémiologique cas-témoins qui a analysé la relation entre l'âge, les habitudes alimentaires, le mode de vie, les antécédents familiaux et l'incidence de cancer de la prostate a été réalisée que dans l'Est Algérien et sur un nombre limité des participants, une

étude épidémiologique plus vaste incluant des populations des différentes régions du pays est nécessaire pour mieux étudier les facteurs de risque de cancer de la prostate en l'Algérie.

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H.** Oral consumption of green tea polyphenols inhibits Insulin-Like Growth Factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer research*. 2004; 64(23): 8715-8722.

**Al-Awaida W, Akash M, Aburubaiha Z, Talib WH, Shehadeh H.** Chinese green tea consumption reduces oxidative stress, inflammation and tissues damage in smoke exposed rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2014; 17(10):740–746.

**Albrecht DS, Clubbs EA, Ferruzzi M, Bomser JA.** Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits PC-3 prostate cancer cell proliferation via MEK-independent ERK1/2 activation. *Chemico-biological interactions*. 2008; 171(1): 89-95.

**Allen NE, Sauvaget C, Roddam AW, Appleby P, Nagano J, Suzuki G, Koyama K.** A prospective study of diet and prostate cancer in Japanese men. *Cancer Causes and Control*. 2004; 15(9):911-920.

**Ambrosini GL, Fritschi L, De Klerk N H, Mackerras D, Leavy J.** Dietary patterns identified using factor analysis and prostate cancer risk: a case control study in Western Australia. *Annals of epidemiology*. 2008; 18(5), 364-370.

**Ananingsih VK, Sharma A, Zhou W.** Green tea catechins during food processing and storage: a review on stability and detection. *Food Research International*. 2013; 50(2): 469-479.

**Andersson SH, Cronholm T and Sjovall J.** Effects of ethanol on the levels of unconjugated and conjugated androgens and estrogens in plasma of men. *Journal of steroid biochemistry*. 1986; 24(6):1193-1198.

**Andersson SO, Wolk A, Bergstrom R, Giovannucci E, Lindgren C, Baron J, Adami HO.** Energy, nutrient intake and prostate cancer risk: a population-based case-control study in Sweden. *International Journal of Cancer*. 1996; 68(6):716-722.

**Arsova-Sarafinavska Z, Eken A, Matevska N, Erdem O, Sayal A, Savaser A, Sikole A.** Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clinical biochemistry*. 2009; 42(12):1228-1235.

**Asmus KD, Bonifacic M.** Free radical chemistry. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier; 2000, p: 3-53.

**Astill C, Birch MR, Dacombe C, Humphrey PG, Martin PT.** Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(11):5340–5347.

**Augustsson K, Michaud DS, Rimm EB, Leitzmann MF, Stampfer MJ, Willett WC, Giovannucci E.** A prospective study of intake of fish and marine fatty acids and prostate cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2003; 12(1): 64-67.

**Babior BM.** NADPH Oxidase: An Update. *Blood*. 1999; 93(5):1464-1476.

**Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC.** The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 1997; 37(8):693-704.

**Barba M, McCann SE, Schünemann HJ, Stranges S, Fuhrman B, De Placido S, Nochajski T.** Lifetime total and beverage specific-alcohol intake and prostate cancer risk: a case-control study. *Nutrition journal*. 2004; 3(1):23.

**Barnard RJ, Ngo TH, Leung PS, Aronson WJ and Golding LA.** A low-fat diet and/or strenuous exercise alters the IGF axis in vivo and reduces prostate tumor cell growth in vitro. *Prostate*. 2003;56(3):201-6.

**Bastide C, Bruyère F, Karsenty G, Guy L, Rozet F.** Le traitement hormonal du cancer de la prostate. *Progrès en urologie*. 2013; 23(15):1246-1257.

**Bastide C.** Techniques et complications de la prostatectomie totale. *Progrès en urologie*. 2009; 19(4): 269-273.

**Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, Castagnetti G, Peracchia G, Corti A.** Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer research*. 2006; 66(2), 1234-1240.

**Beutler E, Duron O, Kelly BM.** Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1963; 61:882–888.

**Biesalski HK.** Meat as a component of a healthy diet—are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?. *Meat science*. 2005; 70(3):509-524.

**Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC and Weigel NL.** Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology*. 2000; 141(1):10-7.

**Bostwick DG.** Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): current concepts. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1992; 50(16):10-19.

**Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I.** Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products*. 2001; 64(7):892–895.

**Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72:248–254.

**Brawer MK, Chetner MP, Beatie J, Buchner DM, Vessella RL, Lange PH.** Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen. *The Journal of Urology*. 1992; 147(3 Pt 2): 841–845.

**Breslow RA, Wideroff L, Graubard BI, Erwin D, Reichman ME, Ziegler RG, Ballard-Barbash R.** Alcohol and prostate cancer in the NHANES I epidemiologic follow-up study. *Annals of epidemiology*. 1999; 9(4):254-261.

**Brown MD, Hart CA, Gazi E, Bagley S, Clarke NW.** Promotion of prostatic metastatic migration towards human bone marrow stroma by Omega 6 and its inhibition by Omega 3 PUFAs. *British journal of cancer*. 2006; 94(6): 842–853.

**Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ.** Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348(17): 1625-1638.

**Cao Y, Ikeda I.** Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selenious ester and surfated xyloglucan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009; 45(3):231–235.

**Caporali A, Davalli P, Astancolle S, D'arca D, Brausi M, Bettuzzi S, Corti A.** The chemopreventive action of catechins in the TRAMP mouse model of prostate carcinogenesis is accompanied by clusterin over-expression. *Carcinogenesis*. 2004; 25(11): 2217-2224.

**Carrichon L.** Régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire-Mécanismes moléculaires de la super-activité oxydase du cytochrome b558 D-loopNox4-Nox2.Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2009.

**Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Pénicaud L, Casteilla L.** Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. *médecine/sciences*. 2006; 22(1), 47-53.

**Carrol P.** American Urological Association prostate-specific antigen best practice statement: 2009 update. 2009 [updated January 11, 2011].

**Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC.** Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *The Journal of urology*. 1993; 150(3):797.

**Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F.** International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *European Urology*. 2012; 61: 1079–1092.

**Chabory E.** Caractérisation fonctionnelle de la glutathione peroxydase 5 murine. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2009.

**Chao C, Haque R, Van Den Eeden SK, Caan BJ, Poon KYT, Quinn VP.** Red wine consumption and risk of prostate cancer: the California men's health study. *International Journal of Cancer*. 2010; 126(1):171–179.

**Chavarro JE, Stampfer MJ, Hall MN, Sesso HD, Ma J.** A 22-y prospective study of fish intake in relation to prostate cancer incidence and mortality. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 88(5):1297–1303.

**Chira K, Suh, JH, Saucier C, Teissèdre PL.** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. 2008; 6(2), 75-82.

**Choan E, Segal R, Jonker D, Malone S, Reaume N, Eapen L, Gallant V.** A prospective clinical trial of green tea for hormone refractory prostate cancer: an evaluation of the complementary/alternative therapy approach. *In Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2005; 23(2):108-113.

**Chung LY, Cheung TC, Kong SK, Fung KP, Choy YM, Chan ZY, Kwok TT.** Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life sciences*. 2001; 68(10):1207-1214.

**Chuu CP, Chen RY, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S.** Suppression of androgen receptor signaling and prostate specific antigen expression by (-)-epigallocatechin-3-gallate in different progression stages of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer letters*. 2009; 275(1): 86-92.

**Clairborne A.** Catalase activity, In: Greenwald R.A. (Ed), CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL. 1985; 283-284.

**Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL.** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92(1):61 –8.

**Collins MM, Stafford RS, O’Leary MP, Barry MJ.** How common is prostatitis? A national survey of physician visits. *The Journal of urology*. 1998; 159:1224–1228.

**Comba A, Lin YH, Eynard AR, Valentich MA, Fernandez-Zapico ME and Pasqualini ME.** Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2011; 30 (3-4):325-42.

**Connolly JM, Coleman M, Rose DP.** Effects of dietary fatty acids on DU-145 human prostate cancer cell growth in athymic nude mice. *Nutrition and Cancer*. 1997; 29: 114–119.

**Couto E, Boffetta P, Lagiou P, Ferrari P, Buckland G, Overvad K, Boutron-Ruault MC.** Mediterranean dietary pattern and cancer risk in the EPIC cohort. *British journal of cancer*. 2011; 104(9):1493-1499.

**Cross AJ, Peters U, Kirsh VA, Andriole GL, Reding D, Hayes RB, Sinha R.** A prospective study of meat and meat mutagens and prostate cancer risk. *Cancer research*. 2005; 65(24):11779-11784.

**D’Amico AV, Moul J, Carrol PR, Sun L, Lubeck D, Chen MH.** Cancer specific mortality after surgery or irradiation for patients with clinically localized prostate cancer managed during the prostate specific antigen era. *Journal of clinical oncology*. 2003; 21(11):2163-2172.

**D’Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R.** Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010; 11(4): 1321-1342.

**Day AJ, Gee JM, Dupont MS, Johnson IT, Williamson G.** Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology*. 2003; 65 (7):1199-1206.

**da Silva Pinto M.** Tea: A new perspective on health benefits. *Food Research International*. 2013; 53(2):558-567.

**Dai WS, Gutai JP, Kuller LH and Cauley JA.** Cigarette smoking and serum sex hormones in men. *American Journal of Epidemiology*. 1988; 128(4):796-805.

**Davalli P, Rizzi F, Caporali A, Pellacani D, Davoli S, Bettuzzi S, Brausi M, D'Arca D.** Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012; 2012.

**David Hoffmann FNIMH.** Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine. Inner Traditions/Bear & Co. 2003, p: 90-117.

**Davidson P, Gabbay J.** Should mass screening for prostate cancer be introduced at the national level?. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2004.

**Deneo-Pellegrini H, De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M.** Foods, nutrients and prostate cancer: a case-control study in Uruguay. *British Journal of Cancer*. 1999; 80 (3-4):591–597.

**Dennis LK.** Meta-analysis for combining relative risks of alcohol consumption and prostate cancer. *Prostate*. 2000; 42(1):56–66.

**Drabkin DL, Austin JH.** Spectrophotometric Studies: I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *Journal of Biological Chemistry*. 1932; 98(2):719–733.

**Draper HH, Hadley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1990; 186:421–431.

**Dunn SE, Kari FW, French J, Leininger JR, Travlos G, Wilson R, Barrett JC.** Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer research*. 1997; 57(21):4667-4672.

**Dutta AK, Siddiquee MA, Hossain S, Kabir Y.** Finlay green tea possesses the highest in vitro antioxidant activity among the 20 commercially available tea brands of Bangladesh. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013; 11(2):11–20.

**Edge SB, Compton CC.** The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology.* 2010; 17(6):1471-1474.

**Engeland A, Tretli S, Bjorge T.** Height, body mass index, and prostate cancer: a follow-up of 950000 Norwegian men. *British journal of cancer.* 2003; 89 (7): 1237-1242.

**Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP Grading Committee.** The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology.* 2005; 29(9):1228-1242.

**Epstein JI.** An update of the Gleason grading system. *The Journal of Urology.* 2010; 183(2):433-440.

**Erdman W J, Balentine JD, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly, Hollman JP, L –Keen C, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, WilliamsonG, Burrowes J.** Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.* 2007; 137(3):718-737.

**Etzioni R, Cha R, Feuer EJ, Davidov O.** Asymptomatic incidence and duration of prostate cancer. *American journal of epidemiology.* 1998; 148(8):775-785.

**Favier A.** Le stress oxydant. *L'actualité chimique.* 2003; 108.

**Favier A.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales pharmaceutiques françaises.* 2006; 64(6):390-396.

**Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.** GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

**Finley DS, Pouliot F, Miller DC, Belldegrun AS.** Primary and salvage cryotherapy for prostate cancer. *Urologic Clinics of North America.* 2010; 37(1): 67-82.

**Flohe L, Gunzler WA.** Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 1984; 105:114–121.

**Flora SJ, Mittal M, Mehta A.** Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*. 2008; 128(4):501-23.

**Forester SC, Lambert JD.** The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Molecular nutrition & food research*. 2011; 55(6):844-854.

**Fournier G, Valeri A, Mangin P, Cussenot O.** Cancer de la prostate. Epidémiologie. Facteurs de risques. Anatomopathologie. *Annales d'urologie*. 2004; 38 (5):187-206.

**Fournier G, Valeri A, Mangin P, Cussenot O.** Cancer de la prostate. Diagnostic et bilan d'extension. *Annales d'urologie*. 2004; 38(5):207-224.

**Fournier G, Valeri A, Mangin P, Cussenot O.** Cancer de la prostate. Traitement. *Annales d'urologie*. 2004; 38(5):225-258.

**Fradet Y, Meyer F, Bairati I, Shadmani R, Moore L.** Dietary fat and prostate cancer progression and survival. *European Urology*. 1999; 35(5-6):388-391.

**Freedland SJ, Aronson WJ.** Obesity and prostate cancer. *Urology*. 2005; 65(3):433-439.

**Freeman BA, Crapo JD.** Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1981; 256 (21):10986-10992.

**Gad SB, Zaghloul DM.** Beneficial effects of green tea extract on liver and kidney functions, ultrastructure, lipid profile and hematological parameters in aged male rats. *Global Vet*. 2013; 11(2):191-205.

**Gann PH, Hennekens CH, Sacks FM, Grodstein F, Giovannucci EL, Stampfer MJ.** Prospective study of plasma fatty acids and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994. 86(4): 281-286.

**Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C, Drouin G, Perrault JP, Howe GR.** Nutritional factors and prostate cancer: a case-control study of French Canadians in Montreal, Canada. *Cancer Causes & Control*. 1996; 7(4):428-436.

**Ghadirianl P, Howe G.R, Hislop T.G, Maisonneuve P.** Family history of prostate cancer: a multi-center case-control study in Canada. *International Journal of Cancer*. 1997;70(6):679-681.

**Ghedira K.** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 2005; 3(4):162-169.

**Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Colditz GA, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC.** Smoking and risk of total and fatal prostate cancer in United States health professionals. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 1999; 8(4):277-282.

**Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CG, Willett WC.** A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993; 85(19):1571-1579.

**Giovannucci E.** Dietary influences of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D in relation to prostate cancer: a hypothesis. *Cancer Causes Control*. 1998; 9(6):567-82.

**Gleason DF.** Classification of prostatic carcinomas. *Cancer chemotherapy reports*. 1966; 50(3):125-128.

**Gleason DF.** Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Human pathology*. 1992; 23(3):273-279.

**Glover FE Jr, Coffey DS, Douglas LL, Cadogan M, Russell H, Tulloch T, Baker TD, Wan RL, Walsh PC.** The epidemiology of prostate cancer in Jamaica. *The Journal of urology*. 1998; 159(6):1984-7

**GrÖnberg H, Damber L, Damber JE.** Total food consumption and body mass index in relation to prostate cancer risk: a case-control study in Sweden with prospectively collected exposure data. *Journal of Urology*. 1996; 155(3):969-974.

**Gross E.** Radiothérapie conformationnelle du cancer de Prostate. *Progrès en urologie*. 2011; 21(11): 801-807.

**Guéritat J.** Exercice physique et progression du cancer de la prostate: effets combinés avec la prise d'antioxydants naturels ou la radiothérapie externe: identification de voies de signalisation redox-dépendantes. Université de Rennes 2, 2015.

**Gunnell D, Oliver SE, Peters TJ, Donovan JL, Persad R, Maynard M, Holly JMP.** Are diet-prostate cancer associations mediated by the IGF axis? A cross-sectional analysis of diet, IGF-I and IGFBP-3 in healthy middle-aged men. *British Journal of Cancer*. 2003; 88(11):1682-6.

**Gupta S, Ahmad N, Nieminen AL, Mukhtar H.** Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 2000; 164 (1): 82–90.

**Gupta S, Hastak K, Ahmad N, Lewin JS, Mukhtar H.** Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 98(18):10350-10355.

**Haffner J, Potiron E, Bouyé S, Puech P, Leroy X, Lemaitre L, Villers A.** Peripheral zone prostate cancers: location and intraprostatic patterns of spread at histopathology. *The Prostate*. 2009; 69(3):276-282.

**Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP.** Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*. 2007; 62(10), 628-638.

**Harbowy ME, Balentine DA, Davies AP, Cai Y.** Tea chemistry. *Critical reviews in plant sciences*. 1997; 16(5):415-480.

**Harper CE, Patel BB, Wang J, Eltoum IA, Lamartiniere CA.** Epigallocatechin-3-Gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice: Mechanisms of action. *The Prostate*. 2007; 67(14): 1576-1589.

**Harrison R.** Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 33(6):774-797.

**Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H.** Role of p53 and NF- $\kappa$ B in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene*. 2003; 22(31): 4851-4859.

**Hollman PCH.** Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001. 81(9):842-852.

**Homma Y, Kondo Y, Kaneko M, Kitamura T, Nyou WT, Yanagisawa M, Kakizoe T.** Promotion of carcinogenesis and oxidative stress by dietary cholesterol in rat prostate. *Carcinogenesis*. 2004; 25(6):1011-1014.

---

**Hsing AW, McLaughlin JK, Schuman LM, Bjelke E, Gridley G, Wacholder S, Blot WJ.** Diet, tobacco use, and fatal prostate cancer: results from the Lutheran Brotherhood Cohort Study. *Cancer Research*. 1990; 50(21):6836-6840.

**Huang HT.** Fermentations and food science (vol. 6). Cambridge University Press. 2000, p 504

**Huncharek M, MuscatJ, Kupelnick B.** Dairy products, dietary calcium and vitamin D intake as risk factors for prostate cancer: a meta-analysis of 26,769 cases from 45 observational studies. *Nutrition and Cancer*. 2008; 60(4):421–441.

**Iguchi T, Wang CY, Delongchamps NB, Kato M, Tamada S, Yamasaki T, de la Roza G, Nakatani T, Haas GP.** Association of MnSOD AA Genotype with the Progression of Prostate Cancer. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0131325.

**Jain MG, Hislop GT, Howe GR, Ghadirian P.** Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: findings from case-control studies in Canada. *Nutrition and cancer*. 1999; 34(2):173-184.

**James PT, Rigby N, Leach R.** International Obesity Task Force. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2004; 11(1):3-8.

**Jatoi A, Ellison N, Burch PA, Sloan JA, Dakhil SR, Novotny P, Flynn PJ.** A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma. *Cancer*. 2003; 97(6), 1442-1446.

**Jendrossek V, Henkel M, Hennenlotter J, Vogel U, Ganswindt U, Müller I, Belka C.** Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples. *BJU international*. 2008; 102(3):371-382.

**Jessie BC, Sun CQ, Irons HR, Marshall FF, Wallace DC, Petros JA.** Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages. *Experimental gerontology*. 2001; 37(1):169– 174.

**Jian L, Xie LP, Lee AH, Binns CW.** Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *International journal of cancer*. 2004; 108(1):130-135.

**Jin RJ, Lho Y, Connelly L, Wang Y, Yu X, Saint Jean L, Case TC, Ellwood-Yen K, Sawyers CL, Bhowmick NA, Blackwell, Yull FE, Matusik RJ.** The nuclear factor- $\kappa$ B pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth. *Cancer research*. 2008; 68(16), 6762-6769.

**John EM, Stern MC, Sinha R, Koo J.** Meat consumption, cooking practices, meat mutagens, and risk of prostate cancer. *Nutrition and cancer*. 2011; 63(4):525-537.

**Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW.** Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*. 1979; 17(1):16–23.

**Kenfield SA, DuPre N, Richman EL, Stampfer MJ, Chan JM, Giovannucci EL.** Mediterranean diet and prostate cancer risk and mortality in the Health Professionals Follow-up Study. *European urology*. 2014; 65(5):887-894.

**Khan N, Mukhtar H.** Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer letters*. 2008; 269(2):269-280.

**Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK.** Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer letters*. 2009; 282(2):125-136.

**Kikuchi N, Ohmori K, Shimazu T, Nakaya N, Kuriyama S, Nishino Y, Tsuji I.** No association between green tea and prostate cancer risk in Japanese men: the Ohsaki Cohort Study. *British journal of cancer*. 2006; 95(3):371-373.

**Kim J, Mizokami A, Shin M, Izumi K, Konaka H, Kadono Y, Namiki M.** SOD3 acts as a tumor suppressor in PC-3 prostate cancer cells via hydrogen peroxide accumulation. *Anticancer research*. 2014. 34(6):2821-2831.

**Koh KA, Sesso HD, Paffenbarger Jr RS, Lee IM.** Dairy products, calcium and prostate cancer risk. *British Journal of Cancer*. 2006; 95(11):1582–1585.

**Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV.** Dietary fat and prostate cancer: current status. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999; 91(5):414-428.

**Koppenol WH.** The Haber-Weiss cycle—70 years later. *Redox Report*. 2001; 6(4):229-234.

**Kotrikadze N, Alibegashvili M, Zibzivadze M, Abashidze N, Chigogidze T, Managadze L, Artsivadze K.** Activity and content of antioxidant enzymes in prostate tumors. *Experimental Oncology*.2008; 30(3):244-247.

**Koutros S, Cross AJ, Sandler DP, Hoppin JA, Ma X, Zheng T, Sinha R.** Meat and meat mutagens and risk of prostate cancer in the Agricultural Health Study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2008; 17(1):80-87.

**Kuhn JM, Sibert L.** Les pathologies du vieillissement masculin. John Libbey Eurotext, Amazon France, 2002; p122

**Kumar S, Pandey AK.** Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013; 2013.

**Kurahashi N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane AS; Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group.** Dairy product, saturated fatty acid, and calcium intake and prostate cancer in a prospective cohort of Japanese men. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008; 17(4):930-937.

**Kurahashi N, Sasazuki S, Iwasaki M, Inoue M.** Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study. *American journal of epidemiology*. 2008; 167(1):71-77.

**Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, Ittmann M, Wheeler T, Jelinek J, Issa JP J.** Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clinical cancer research*. 2007; 13(13):3796-3802.

**Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS.** Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: Formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*.2002; 11(10): 1025-1032.

**Le Marchand L, Kolonel LN, Wilkens LR, Myers BC, Hirohata T.** Animal fat consumption and prostate cancer: a prospective study in Hawaii. *Epidemiology*. 1994; 5(3):276-82.

**Lesko SM, Rosenberg L, Shapiro S.**Family history and prostate cancer risk. *American journal of epidemiology*. 1996; 144(11):1041-1047.

**Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB.** Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 2014; 6(12):6020-6047.

**Li M, He Z, Ermakova S, Zheng D, Tang F, Cho YY, Bode AM.** Direct inhibition of insulin-like growth factor-I receptor kinase activity by (–)- epigallocatechin-3-gallate regulates cell transformation. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2007; 16(3):598-605.

**Lin YL, Juan IM, Chen YL, Liang YC, Lin JK.** Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996; 44(6):1387–1394.

**Lin ZX, Hoult JRS, Raman A.** Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 66(2):141–150.

**Liou GY, Storz P.** Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*. 2010; 44(5):479-496.

**Lipinski B.** Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2011; 2011.

**Liu K, Zhou R, Wang B, Chen K, Shi LY, Zhu JD, Mi MT.** Effect of green tea on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 17 randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*. 2013, 98(2): 340-348.

**Liu KC, Ho HC, Huang AC, Ji BC, Lin HY, Chueh FS, Chung JG.** Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells. *Environmental toxicology*. 2013; 28(10):579-587.

**Liu KC, Huang AC, Wu PP, Lin HY, Chueh FS, Yang JS, Chung JG.** Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and-9 signaling pathways. *Oncology reports*. 2011; 26(1):177.

**Lorenz M, Saretzki G, Sitte N, Metzkow S, Von Zglinicki T.** BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001 ; 31(6):824–831.

**Luscombe CJ, French ME, Liu S, Saxby MF, Jones PW, Fryer AA, Strange RC.** Prostate cancer risk: associations with ultraviolet radiation, tyrosinase and melanocortin-1 receptor genotypes. *British Journal of Cancer*. 2001; 85(10): 1504–1509.

**Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C.** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques, 2005.

**Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81(1): 230S-242S.

**Mao GD, Poznansky MJ.** Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS letters*. 1992; 305(3), 233-236.

**McGregor SE, Courneya KS, Kopciuk KA, Tosevski C, Friedenreich CM.** Case-control study of lifetime alcohol intake and prostate cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2013; 24 (3):451-461.

**McLarty J, Bigelow RL, Smith M, Elmajian D, Ankem M, Cardelli JA.** Tea polyphenols decrease serum levels of prostate-specific antigen, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor in prostate cancer patients and inhibit production of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in vitro. *Cancer Prevention Research*. 2009; 2(7):673-682.

**McNeal J.** Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *The Urologic clinics of North America*. 1990; 17(3): 477-86.

**McNeal JE.** The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*. 1981;2(1):35-49.

**Meng H, Hu W, Chen Z, Shen Y.** Fruit and vegetable intake and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2014; 10(2):133–140.

**Michaud DS, Augustsson K, Rimm EB, Stampfer MJ, Willet WC, Giovannucci E.A** prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes and Control*. 2001;12(6):557–567.

**Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Drai J, Thérond P.** Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Annales de Biologie Clinique*. 2008; 66 (6): 605-620.

**Minelli A, Bellezza I, Conte C, Culig Z.** Oxidative stress-related aging: a role for prostate cancer?. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1795(2):83–91.

**Mishra RK, Tewari AK.** Inflammation and Its role in prostate cancer. *Journal of Cancer Therapy*. 2014; 5(09):836.

**Mistry K, Cable G.** Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *The Journal of the American Board of Family Practice*. 2003; 16 (2):95-101.

**Mitrou PN, Albanes D, Weinstein SJ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Leitzmann MF.** A prospective study of dietary calcium, dairy products and prostate cancer risk (Finland). *International journal of cancer*. 2007; 120(11):2466-2473.

**Miyake H, Hara I, Kamidono S, Eto H.** Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. *The Journal of urology*. 2004; 171(4):1533-1536.

**Montironi R, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M.** Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nature clinical practice Urology*. 2007;4(6):321-332.

**Moran PS, O'Neill M, Teljeur C, Flattery M, Murphy L.A, Smyth G, Ryan M.** Robot-assisted radical prostatectomy compared with open and laparoscopic approaches: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Urology*. 2013; 20(3):312-321.

**Moreel X, Allaire J, Léger C, Caron A, Labonté MÈ, Lamarche B, Fradet V.** Prostatic and dietary omega-3 fatty acids and prostate cancer progression during active surveillance. *Cancer Prevention Research*. 2014; 7(7):766-776.

**Morganti G, Gianferrari L, Cresseri A, Arrigoni G, Lovati G.** Recherches clinico-statistiques et génétiques sur les néoplasies de la prostate. *Human Heredity*. 1956-57; 6(2): 304-305.

**Muanda F N.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Université Paul Verlaine-Metz, 2010, 55-86.

**Mukherjee P, Sotnikov AV, Mangian HJ, Zhou JR, Visek WJ, Clinton SK.** Energy intake and prostate tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor expression. *Journal of the National Cancer Institute.* 1999; 91(6):512-523.

**Muller RL, Faria EF, Carvalhal GF, Reis RB, Mauad EC, Carvalho AL, Freedland SJ.** Association between family history of prostate cancer and positive biopsies in a Brazilian screening program. *World journal of urology.* 2013; 31(5):1273-1278.

**Multigner L, Ndong JR, Oliva A, Blanchet P.** Polluants environnementaux et cancer de la prostate: données épidémiologiques. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* 2008; 36(9): 848-856.

**Na HK, Surh YJ.** Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology.* 2008; 46(4):1271-1278.

**Nag S, Beyer D, Friedland J, Grimm P, Nath R.** American Brachytherapy Society (ABS) recommendations for transperineal permanent brachytherapy of prostate cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.* 1999; 44(4):789-799.

**Nam JS, Sharma AR, Nguyen LT, Chakraborty C, Sharma G, Lee SS.** Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine. *Molecules.* 2016; 21(1):108.

**Namiki M, Akaza H, Lee SE, Song JM, Umbas R, Zhou L, Lee BC, Cheng C, Chung MK, Fukagai T.** Prostate cancer working group report. *Japanese Journal of Clinical Oncology.* 2010; 40(1):70-75.

**Namita P, Mukesh R, Vijay KJ.** Camellia Sinensis (green tea): a review. *Global Journal of Pharmacology.* 2012; 6(2):52-59.

**Nelson WG, DeWeese TL, DeMarzo AM.** The diet, prostate inflammation, and the development of prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2002; 21(1):3–16.

**Oh B, Figtree G, Costa D, Eade T, Hruby G, Lim S, Back M.** Oxidative stress in prostate cancer patients: A systematic review of case control studies. *Prostate international.* 2016; 4(3):71-87.

**Ohori M, Scardino PT, Lapin SL, Seale-Hawkins C, Link J, Wheeler TM.** The mechanisms and prognostic significance of seminal vesicle involvement by prostate cancer. *The American journal of surgical pathology.* 1993;17(12):1252–1261.

**Osegebe DN.** Prostate cancer in Nigerians: facts and non facts. *The Journal of urology*. 1997; 157(4):1340–1343.

**Otsuka T, Ogo T, Eto T, Asano Y, Suganuma M, Niho Y.** Growth inhibition of leukemic cells by (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea. *Life Sciences*. 1998; 63(16):1397–1403.

**Park SY, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN.** Fat and meat intake and prostate cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *International Journal of Cancer*. 2007; 121(6):1339–1345.

**Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC.** mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (USA)*. 2005; 102(3):719–724.

**Pezzato E, Sartor L, Dell'Aica I, Dittadi R, Gion M, Belluco C, Garbisa S.** Prostate carcinoma and green tea: PSA-triggered basement membrane degradation and MMP-2 activation are inhibited by (–) epigallocatechin-3-gallate. *International journal of cancer*. 2004; 112(5):787-792.

**Picard D.** The biochemistry of green tea polyphenols and their potential application in human skin cancer. *Alternative Medicine Review*. 1996; 1(1):31–42.

**Plaskon LA, Penson DF, Vaughan TL and Stanford JL.** Cigarette smoking and risk of prostate cancer in middle-aged men. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2003; 12(7):604-609.

**Platz EA, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Giovannucci E.** Alcohol intake, drinking patterns, and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study. *American Journal of Epidemiology*. 2004; 159(5):444-453.

**Preedy VR.** Tea in health and disease prevention. *Cooking / Beverages / Coffee & Tea*. Academic Press. 2012, p 19- 30.

**Qin LQ, Wang PY, Kaneko T, Hoshi K, Sato A.** Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer. *Medical Hypotheses*. 2004; 62(1):133-42.

**Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegou L.** Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011; 50(3):586-621.

**Rebillard X, Ruffion A.** Cryotherapie dans le traitement du cancer localisé de la prostate. *Progrès en Urologie*. 2005; 15:1135-1136.

**Rebillard X, Soulié M, Chartier-Kastler E, Davin JL, Mignard JP, Moreau JL, Coulange C.** High-intensity focused ultrasound in prostate cancer; a systematic literature review of the French Association of Urology. *BJU international*. 2008; 101(10): 1205-1213.

**Richman EL, Kenfield SA, Chavarro JE, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Willett WC, Chan, J. M.** Fat intake after diagnosis and risk of lethal prostate cancer and all-cause mortality. *JAMA internal medicine*. 2013; 173(14):1318-1326.

**Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacobs EJ, Chao A, Thun MJ.** Body mass index, height, and prostate cancer mortality in two large cohorts of adult men in the United States. *Cancer Epidemiology and Biomarkers Prevention*. 2001; 10(4):345-353.

**Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M.** MAP kinases and prostate cancer. *Journal of signal transduction*. 2012.

**Rohrmann S, Linseisen J, Key TJ, Jensen MK, Overvad K, Johnsen NF, Naska A.** Alcohol consumption and the risk for prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiology and Biomarkers Prevention*. 2008; 17(5):1282-1287.

**Rolfe DF, Brown GC.** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews*. 1997; 77(3): 731-758.

**Rota M, Scotti L, Turati F, Tramacere I, Islami F, Bellocco R, Bagnardi V.** Alcohol consumption and prostate cancer risk: a meta-analysis of the dose–risk relation. *European journal of cancer prevention*. 2012; 21(4):350-359.

**Royuela M, Arenas MI, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R.** Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Human Pathology*. 2002; 33(3):299–306.

**Russo A, Izzo AA, Cardile V, Borrelli F, Vanella A.** Indian medicinal plants as antiradicals and DNA cleavage protectors. *Phytomedicine*.2001; 8(2):125-132.

**Sainvitu P, Nott K, Richard G, Blecker C, Jérôme C, Wathelet JP, Paquot M, Deleu, M.** Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: a review. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement*. 2012; 16(1):115.

**Salomona L, Bastide C, Beuzeboc P, Cormier L, Fromont G, Hennequin C, Mongiat-Artus P, Peyromaure M, Ploussard G, Renard-Penna R, Rozet F, Azriac D, Colobyb P, Moliniéb V, Raveryb V, Rebillard X, Richaud P, Villers A, Soulié M, Les membres du CCAFU.** Recommandations en onco-urologie 2013 du CCAFU : Cancer de la prostate. *Progrès en Urologie*. 2013; 23:S69-S101.

**Sandhya B, Manoharan S, Sirisha Lavanya G, Ratna Manmohan C.** Lipid peroxidation and antioxidant status in prostate cancer patients. *Indian Journal of Science and Technology*. 2010; 3(1):83–86.

**Sang S, Lambert JD, Ho CT, Yang CS.** The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacological research*. 2011; 64(2):87-99.

**Scardino PT, Kelman J.** Dr. Peter Scardino's Prostate Book, Revised Edition: The Complete Guide to Overcoming Prostate Cancer, Prostatitis, and BPH. Penguin. Amazon France, 2010: p108-110.

**Schrader M, Fahimi HD.** Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2006; 1763(12), 1755-1766.

**Schuurman AG, Goldbohm RA, Dorant E, van den Brandt PA.**Vegetable and fruit consumption and prostate cancer risk: a cohort study in the Netherlands. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 1998; 7(8):673–680.

**Schuurman AG, van den Brandt PA, Dorant E, Brants HAM, Goldbohm RA.** Association of energy and fat intake with prostate carcinoma risk: results from the Netherlands Cohort Study. *Cancer*. 1999; 86(6):1019–1027.

**Scibior D, Czczot H.** Katalaza – budowa, właściwości, funkcje Catalase: structure, properties, functions. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2006; 60:170-180

**Sedlak J, Lindsay RH.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*. 1968; 25:192-205.

**Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H.** Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B-and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2004; 91(2):232-242.

**Siddiqui IA, Asim M, Hafeez BB, Adhami VM, Tarapore RS, Mukhtar H.** Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer. *The FASEB Journal*. 2011; 25(4): 1198-1207.

**Siddiqui IA, Saleem M, Adhami VM, Asim M, Mukhtar H.** Tea beverage in chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2007; 28(9):1392-1408.

**Siddiqui IA, Shukla Y, Adhami VM, Sarfaraz S, Asim M, Hafeez BB, Mukhtar H.** Suppression of NF $\kappa$ B and its regulated gene products by oral administration of green tea polyphenols in an autochthonous mouse prostate cancer model. *Pharmaceutical research*. 2008; 25(9): 2135-2142.

**Sies H.** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*. 1991; 91(3):31-38.

**Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM.** Methods in Enzymol: Oxidant and Antioxidants (Part A), Edited by M. I. S. John, N. Abelson, S. Helmut, Academic Press, 1999.

**Sinha R, Park Y, Graubard BI, Leitzmann MF, Hollenbeck A, Schatzkin A, Cross AJ.** Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States. *American journal of epidemiology*. 2009; 170(9):1165-1177.

**Soufir JC.** Sécrétions de l'appareil génital masculin et fertilité. *Médecine thérapeutique/Médecine de la reproduction, gynécologie et endocrinologie*. 2010; 12 (3): 216-224.

**Srivastava DSL, Mittal RD.** Free radical injury and antioxidant status in patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2005; 20(2):162-165.

---

**Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC.** Family history and the risk of prostate cancer. *The prostate*. 1990; 17(4):337-347.

**Stott-Miller M, Neuhouser ML, Stanford JL.** Consumption of deep-fried foods and risk of prostate cancer. *The Prostate*. 2013; 73(9):960-969.

**Szewczyk-Golec K, Tyloch J, Czuczejko J.** Antioxidant defense system in prostate adenocarcinoma and benign prostate hyperplasia of elderly patients. *Neoplasma*. 2015; 62(1):119–123.

**Szymanski KM, Wheeler DC, Mucci LA.** Fish consumption and prostate cancer risk: a review and metaanalysis, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010; 92(5):1223-1233.

**Tada M, Ichiishi E, Saito R, Emoto N, Niwano Y and Kohno M.** Myristic Acid, A Side Chain of Phorbol Myristate Acetate (PMA), Can Activate Human Polymorphonuclear Leukocytes to Produce Oxygen Radicals More Potently than PMA. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2009; 45(3):309-14.

**Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi K N, Rosenthal MA.** Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004; 351(15):1502-1512.

**Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, Murphy KC.** Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *Journal of Clinical Oncology*. 1996; 14(6):1756–1764.

**Thomas F, Patel S, Holly JM, Persad R, Bahl A, Perks CM.** Dihydrotestosterone sensitises LNCaP cells to death induced by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) or an IGF-i receptor inhibitor. *The Prostate*. 2009; 69(2):219-224.

**Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A.** Global Cancer Statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015; 65:87–108

**Tortora GJ, Derrickson B.** Principes d'anatomie et de physiologie. Chapitre 28: les systèmes génitaux. 4<sup>ème</sup> édition. Renouveau Pédagogique, Inc, Canada, 2007, p:1161-1162.

**Tripathi A, Fang W, Leong DT, Tan LT.** Biochemical studies of the lagunamides, potent cytotoxic cyclic depsipeptides from the marine cyanobacterium *Lynghya majuscula*. *Marine Drugs*. 2012; 10(5):1126–1137.

**Tsao R.** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2(12), 1231-1246.

**Tseng M, Breslow RA, Graubard BI, Ziegler RG.** Dairy, calcium, and vitamin D intakes and prostate cancer risk in the National Health and Nutrition Examination Epidemiologic Follow-up Study cohort. *The American journal of clinical nutrition*. 2005; 81(5):1147-1154.

**Uchiyama M, Mihara M.** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thriarbituric acid test. *Analytical biochemistry*. 1978; 86: 271-278.

**Udensi UK, Tchounwou PB.** Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2016; 35(1):139.

**Valcic S, Burr JA, Timmermann BN, Liebler DC.** Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (–)-epigallocatechin gallate and (–)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals. *Chemical Research in Toxicology*. 2000; 13(9):801–810.

**Valeri A, Drelon E, Azzouzi R, Delannoy A, Teillac P, Fournier G, Mangin P, Berthon P, Cussenot O.** Epidemiology of familial prostatic cancer: 4-year assessment of French studies. *Progres en urologie: journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*. 1999;9(4):672- 679.

**Valeri A, Mangin P.** Epidémiogénétique et diagnostic préclinique du cancer de la prostate. *Médecine thérapeutique*. 1998;4(5):359-368.

**Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007; 39(1):44-84.

**Vance TM, Su J, Fonham ETH, Koo SI, Chun OK.** Dietary antioxidants and prostate cancer: a review. *Nutrition and Cancer*. 2013; 65(6):793–801.

**Veluri R, Singh RP, Liu Z, Thompson JA, Agarwal R, Agarwal C.** Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing

growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2006; 27(7):1445-1453.

**Villers A, McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA.** The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma. *The Journal of urology*. 1989; 142(3):763–768.

**Vlajinac HD, Marinković JM, Ilić MD, Kocev NI.** Diet and prostate cancer: a case-control study. *European journal of cancer*. 1997; 33(1):101-107.

**Wallström P, Bjartell A, Gullberg B, Olsson H, Wirfält E.** A prospective study on dietary fat and incidence of prostate cancer (Malmö, Sweden). *Cancer Causes & Control*. 2007; 18(10):1107-1121.

**Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Yao WB.** In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry*. 2008; 106(3):888–895.

**Wang H, Provan GJ, Helliwell K.** Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Science & Technology*. 2000; 11(4):152-160.

**Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Stamey T.** Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *American journal of epidemiology*. 1995; 141(8):732-740.

**Wilson LB, McGrath BF.** Surgical pathology of the prostate: Review of 468 cases. *Journal of the American Medical Association*. 1911; 57(20):1601-1606..

**Wolff SP, Bascal ZA, Hunt JV.** Autoxidative glycosylation: free radicals and glycation theory. *Progress in clinical and biological research*. 1988; 304: 259-275.

**Yang CS, Wang H, Li GX, Yang Z, Guan F, Jin H.** Cancer prevention by tea: evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research*. 2011; 64(2):113-122.

**Yang J, Guo J, Yuan J.** In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT—Food Science and Technology*. 2008; 41(6):1060-1066.

**Ye J, Wang S, Barger M, Castranova V and Shi X.** Activation of androgen response element by cadmium: a potential mechanism for a carcinogenic effect of cadmium in the prostate.

## **Références bibliographiques**

---

*Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer.* 1999; 19(3):275-280.

**Yen GC, Duh PD, Tsai HL.** Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry.* 2002; 79(3):307–313.

**Yoshikawa T, Toyokuni S, YamamotoY, Naito Y.** Free radicals in Chemistry. *Biology and Medicine, OICA International, London;* 2000.

**Zangar RC, Davydov DR, Verma S.** Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology.* 2004; 199(3):316-331.

**Zhou J, Kong C, Hou X, Zhang Z, He F.** Green Tea Effects on the Levels of Serum Glucose and Lipid Profiles. *American Journal of Medical Sciences and Medicine.* 2016; 4(3):59-62.

**PUBLICATIONS:**



## In vitro Antioxidant, Inhibition of Oxidative DNA Damage and Antiproliferative Activities of Ethanolic Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract

Somia Lassed<sup>1,2</sup>, Amel Amrani<sup>1,2\*</sup>, Muhammed Altun<sup>3</sup>, Djamilia Zama<sup>1</sup>, Ibrahim Demirtas<sup>3</sup>, Fadila Benayache<sup>1</sup>, Samir Benayache<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Université Frères Mentouri Constantine, Constantine, Algérie.

<sup>2</sup>Laboratoire de physiologie Animale, Département de biologie Animale, Université Frères Mentouri Constantine, Constantine, Algérie.

<sup>3</sup>Plant Research Laboratory, Department of Chemistry, ÇankırıKaratekin University, Uluyazi Campus, Çankırı, Türkiye

\*Corresponding author's E-mail: [amrani.a@umc.edu.dz](mailto:amrani.a@umc.edu.dz)

Accepted on: 04-09-2015; Finalized on: 31-10-2015.

### ABSTRACT

Green tea is a famous beverage produced from the dry leaves of *Camellia sinensis*. It suggested that it has an important beneficial effect on human health. The present work aims to assess the total phenolic and flavonoids content and *in vitro* antioxidant, inhibition of oxidative DNA damage and antiproliferative activities of ethanolic green tea extract, as preliminary phase of our laboratory studies *in vivo*. Different methods were used; DPPH radical-scavenging, inhibition of lipid peroxidation, OH<sup>-</sup>-scavenging activity and DNA damage inhibition assays. In addition to antiproliferative activity which was evaluated using xCELLigence RTCA instrument. The extract presented high levels of phenolic compounds (700µg±1 µg of gallic acid equivalent/mg extract), flavonoids (33.74±0.05 µg of quercetin equivalent/mg extract), and 18 phenols were identified using HPLC-TOF/MS analysis. In DPPH free radical-scavenging assay, the extract showed remarkable activity; IC<sub>50</sub> value 10.35±0.14 µg/ml and the highest percentage of the inhibition was 96% similar to vitamin C in the same concentration 25 µg/ml. On the other hand, it exhibited the inhibition of lipid peroxidation with IC<sub>50</sub> value 333.29±17.90 µg/ml. The OH<sup>-</sup>-scavenging assay indicated that the ethanolic green tea extract had a significant effect on OH<sup>-</sup> radical; IC<sub>50</sub> value 12.83±0.63 µg/ml compared to ascorbic acid which was 10±0.72 µg/ml. The extract also exhibited a completed protection of plasmid DNA against oxidative damage and an interesting antiproliferative activity against PC3 cells. The results of this study confirmed that this ethanolic green tea extract is a potent source of beneficial antioxidant and anticancer.

**Keywords:** Green tea, Phenolic and flavonoid compounds, Antioxidant activity, Oxidative DNA damage inhibition, Antiproliferative activity.

### INTRODUCTION

For the past decades, oxidative stress has been increasingly recognized as a contributing factor in the genesis of chronic diseases as cancers and cardiovascular diseases<sup>1</sup>. Plant polyphenols are natural compounds and most of their pharmacological properties are considered to be due to their antioxidant activity. They are able to scavenge endogenously generated oxygen radicals formed by various xenobiotics; radiation etc<sup>2</sup> and they may reduce the risk of development of several diseases caused by oxidative stress<sup>3</sup>. Green tea which is the most popular consumed beverage after water, obtained from the dried leaves of *Camellia sinensis* plant is one of the natural source of polyphenols<sup>4</sup>. The data in the literature points to the possible role of green tea as a chemopreventive agent against different types of cancers and it suggests that much of its antiproliferative effects are mediated by its polyphenols constituents<sup>5-7</sup>.

It has also demonstrated other beneficial effects in studies of diabetes, Alzheimer's disease and obesity<sup>8-10</sup>. In the present study, we report the total phenolic and flavonoids content of a store Chinese green tea, usually used as beverage in Algeria, and we evaluated its antioxidant, inhibition of oxidative DNA damage and its antiproliferative activities *in vitro* to confirm their effect and as preliminary phase of our laboratory studies *in vivo*.

### MATERIALS AND METHODS

#### Green tea extraction

Store Chinese green tea leaves (2000 g) were macerated with EtOH/H<sub>2</sub>O (7:3 v/v) for 48 h three successive times. After filtration, the combined filtrates were concentrated in vacuum (up to 35°C).

#### Determination of total phenolic and flavonoid content

The total phenolic content of ethanolic green tea extract was determined using Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Singleton.<sup>11</sup> 100 µl of Folin-Ciocalteu and 1580 µL of distilled water were added successively to 20 µl of each green tea extract prepared in methanol (1 mg/ml). Three min later, 300 µl of sodium carbonate (20 %) was added. The test tubes were shaken for 2 h at room temperature. The absorbance was evaluated at 765 nm. The standard curve was prepared using gallic acid solutions (0 to 500 mg/ml) prepared in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:9 v/v). The concentration of total phenolic compounds was determined as µg of gallic acid equivalent (GAE) per mg of extract using the gallic acid curve equation: Absorbance = 0.001 x gallic acid (µg).

Although, the total flavonoid content of ethanolic green tea extract was determined according to the method of Wang<sup>12</sup>. 0.5 ml of 2% AlCl<sub>3</sub> was mixed with 0.5 ml of sample and incubated for 1h at room temperature. The



absorbance was measured at 420 nm. The concentration of flavonoid was calculated from standard quercetin graph equation: Absorbance = 0.034 x quercetin ( $\mu\text{g}$ ) + 0.015 and determined as  $\mu\text{g}$  of quercetin equivalent (QE) per mg of extract.

#### HPLC-TOF/MS analysis

For HPLC-TOF/MS analysis, stock solutions of the 23 phenolics (2,5 ppm) and dried crude extract (200 ppm) were prepared in methanol at room temperature. Samples were filtered passing through a PTFE (0,45  $\mu\text{m}$ ) filter by an injector to remove particulates.

Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System coupled with 6210 Time of Flight (TOF) LC/MS detector and ZORBAX SB-C18 (4,6x100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) column. Mobile phases A and B were ultra-pure water solution with 0.1% formic acid and acetonitrile, respectively. Flow rate was 0.6 ml/min and column temperature was 35°C. Injection volume was 10  $\mu\text{l}$ . Solvent program was as follow: 0–1 min 10% B; 1–20 min 50% B; 20–23 min 80% B; 23–25 min 10% B; 25–30 min 10% B. Retention times and  $m/z$  values of standard compounds were used on the determination step. Ionization mode of HPLC-TOF/MS instrument was ES (-) with gas temperature of 325 °C, gas flow of 10.0 l/min, and nebulizer of 40 (psi). Phenolic content of ethanolic green tea extract were determined making comparison retention times and  $m/z$  values of standard phenolic compounds.

#### Evaluation of the antioxidant activities

##### DPPH radical-scavenging activity assay

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging capacity of the ethanolic green tea extract was evaluated using the method described by Braca.<sup>13</sup> 3 ml of methanol DPPH solution (0.004%) were mixed with increasing concentrations (1, 2.5, 5, 10, 20, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of extract (dissolved in methanol). After 30 min incubation at room temperature, the absorbance was measured at 517 nm. Tests were carried out in triplicate and ascorbic acid was used as positive control.

The percentage of DPPH scavenging activity (I %) was calculated using the following equation (1):  $I\% = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$ . Where  $A_0$  is the absorbance of DPPH solution alone and  $A_1$  is the absorbance of DPPH solution + extract or vitamin C. The half inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) of the green tea extract was calculated from the graph plotted of inhibition percentage against extract concentration.

##### Inhibition of lipid peroxidation

The capacity of ethanolic green tea extract to inhibit lipid peroxidation was evaluated according to the modified protocol of Cao and Ikeda using egg *vitellose*<sup>14</sup>. 50  $\mu\text{l}$  of  $\text{FeSO}_4$  (0.07 M) was mixed with 10% egg *vitellose* homogenate to induce the lipid peroxidation then incubated with increasing concentration of green tea extract or vitamin C at 37°C. After 30 min incubation, 1ml

trichloroacetic acid 20% (TCA) and 1.5 ml thiobarbituric acid 1% (TBA) were added. The samples were mixed then incubated for 15 min at 95°C. After centrifugation (4000 rpm for 20 min), the resulting thiobarbituric reacting substance (TBARS) was measured in the supernatant at 532 nm. The lipid peroxidation inhibition was calculated as percentage (I %) according to equation (1). Where  $A_0$  is the absorbance of the control (without extract or vitamin C) and  $A_1$  is the absorbance of sample + extract or vitamin C.

##### OH<sup>-</sup>-scavenging activity assay

The OH<sup>-</sup>-scavenging capacity of green tea extracts was evaluated according to the literature procedure of Wang with few modifications<sup>12</sup>. 0.5 ml  $\text{FeSO}_4$  (8 mM) was added to 0.8 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6 mM) to generate the hydroxyl radicals by Fenton reaction followed by 0.5 ml distilled water, the various concentrations of ethanolic green tea extract or vitamin C (positive control) and 0.2 ml sodium salicylate (6 mM). The samples were mixed then incubated at 37 °C for 1h. The absorbance was measured at 562 nm. The scavenging was calculated using the following equation:  $I\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$ . Where  $A_0$  is the absorbance of the control (without extract or vitamin C),  $A_1$  is the absorbance of the extract or vitamin C addition and  $A_2$  is the absorbance without sodium salicylate.

##### DNA damage inhibition efficiency

The potential of ethanolic green tea extract to inhibit DNA damage was tested by photolyzing 46966 plasmid DNA (extracted from *Escherichia coli*) via UV radiation in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and performing agarose gel electrophoresis with the irradiated DNA<sup>15</sup>. Into two polyethylenes microcentrifuge tubes, 1  $\mu\text{l}$  aliquots of 46966 plasmid (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were added followed by 50  $\mu\text{g}$  of ethanolic green tea extract in one of the two tubes without the other which the irradiated control ( $C_R$ ). Then 4  $\mu\text{l}$  of 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added into two tubes, and then they were placed directly on the surface of a UV transilluminator (300 nm) during 10 mn at room temperature. In another tube, 1  $\mu\text{l}$  aliquot of 46966 plasmid DNA was placed and served as the non-irradiated control ( $C_0$ ). All the samples were run on 1% agarose gel and then photographed using a Lourmat gel imaging system (Vilber).

##### Evaluation of the anticancer activity using xCELLigence system

##### Cell culture and preparation of Cell Suspension

PC3 (prostate cancer) cells were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Sigma), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma, Germany) and 2% PenStrep solution (Sigma, Germany) at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere.

PC3 cells in the culture flask were detached from bottom of flask by 10 ml Trypsin-EDTA solution. After detachment, 10 ml of medium was added into the flask and mixed thoroughly. This suspension was transferred to



Falcon tubes and put in centrifuge. After this, supernatant was transferred onto the cells at the bottom of Falcon tube; 4 ml medium was added and mixed. Cell concentration of this cell suspension was measured by CEDEX HiRes Cell Counter which uses Trypan Blue.

#### Preparation of extract solution

Green tea extract was dissolved in DMSO to a final concentration of 20 mg/ml. 25 µl of this solution was mixed with 475 µl of medium.

#### Preparation of E-Plate 96 plate and treatment

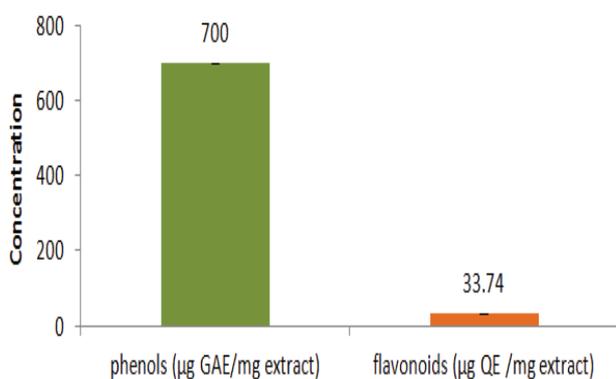
50 µl of medium was added into each wells of E-Plate 96 and the plate was left in sterile cabinet for 15 min., then in incubator for another 15 min. After this time, a background measurement was performed. Next 100 µl of the cell suspension ( $2.5 \times 10^4$  cells/100 µl) was added into wells – except last three; these were left without cells as only medium – and the plate left in the hood for 30 min. Then the plate was inserted to xCELLigence station in the incubator and a measurement was performed for 80 min. After this, 50, 20 and 10 µl of green tea extract solution was added into the wells respectively for 250, 100 and 50 µg/ml concentrations and the final volume were completed to 200 µl with medium. No extract solution was added into control and medium wells. Then the plate was inserted to xCELLigence station in the incubator and measurement for 48 h was started.

#### STATISTICAL ANALYSIS

Data are expressed as mean  $\pm$  SD and statistical interferences were based on student's test for mean values comparing green tea extract to standard using Graph Pad Prism version 6.

### RESULTS AND DISCUSSION

#### The total phenolic and flavonoid content



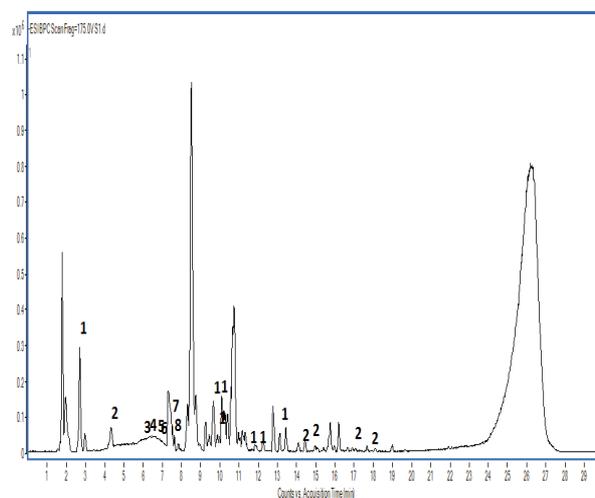
**Figure 1:** Total phenolic and flavonoid content of ethanolic green tea extract. Values are mean  $\pm$  SD (n=3).

Phenols and flavonoids are very important plant constituents. They are generally involved in the defense against ultraviolet radiation or aggression by pathogens<sup>2</sup>. Ethanolic green tea extract presented high levels of total phenolic and flavonoid compounds  $700 \pm 1$  µg of gallic acid

equivalent/mg extract and  $33.74 \pm 0.05$  µg of quercetin equivalent/mg extract respectively (Figure 1).

#### HPLC-TOF/MS analysis

HPLC-TOF/MS method has the potential to separate and determine phenolics distributed in plants. In this study phenolics and flavonoids content of ethanolic green tea extract were separated and detected based on comparison with 23 standard phenolic compounds. Among 23 standard phenolic compounds used, 18 were found in this green tea extract (Figure 2). Compared to the quantity of the total phenolic detected, this green tea showed a high quantity of gallic acid, rutin, catechin, quercetin, gentisic acid, vanilic acid, salicylic acid, low quantity of caffeic acid in addition to other phenolics with less quantity<sup>16</sup> (Table 1).



**Figure 2:** Chromatogram of ethanolic green tea extract. The chromatographic conditions are described under Materials and Methods. The numbers 1 to 23 are phenols and flavonoids detected in ethanolic green tea extract by HPLC-TOF/MS (Table 1).

#### Evaluation of the antioxidant activity

In the present study, the antioxidant activity of ethanolic green tea extract was evaluated using different assays. The free radical scavenging activity of this extract was evaluated through its ability to quench DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical. Figure 3 illustrated a significant dose dependent decrease in DPPH radical due to the scavenging ability of the extract. Compared to ascorbic acid ( $IC_{50} = 5 \pm 0.1$  µg/ml), ethanolic green tea extract showed a high activity ( $IC_{50} = 10.35 \pm 0.14$  µg/ml) and the highest percentage of the inhibition was 96% similar to vitamin C in the same concentration (25 µg/ml) (Figure 3).

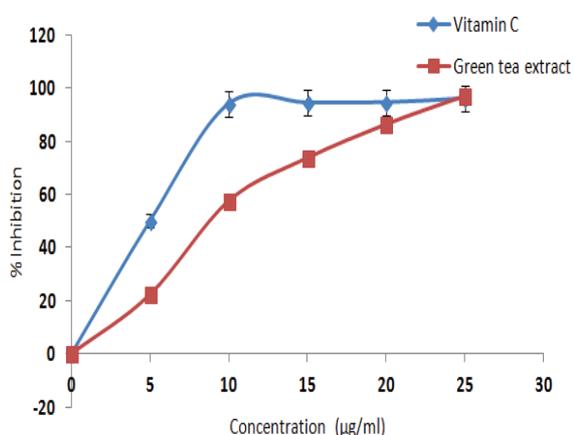
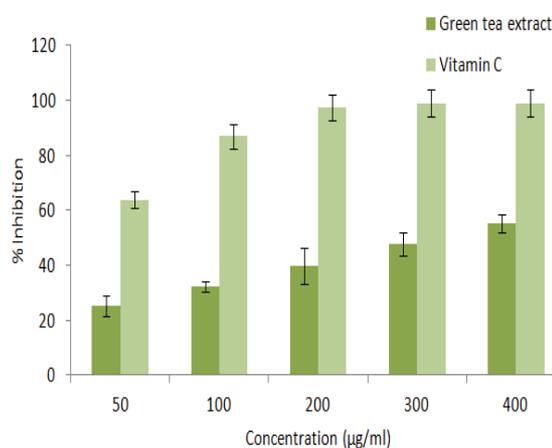
The inhibition of the lipid peroxidation in egg *vitellose* homogenate induced by  $FeSO_4$  system was also evaluated and the extract exhibited a remarkable effect (Figure 4) but it considered low ( $IC_{50} = 333.29 \pm 17.90$  µg/ml) compared to ascorbic acid ( $IC_{50} = 20 \pm 1.06$  µg/ml).

**Table 1:** The different phenols and flavonoids found in the green tea and their levels (expressed as mg per kg of dry leaves of green tea)

	Phenols	Retention time	mg phenolic/ kg plant
1	gallic acid	2.69	7473.79
2	gentisic acid	4.33	686.86
3	catechin	6.24	980.40
4	chlorogenic acid	6.34	123.98
5	4-hydroxybenzoic acid	6.8	8.16
6	protocatechuic acid	6.83	21.43
7	caffeic acid	7.61	34.10
8	vanilic acid	7.68	360.18
9	4-hydroxybenzaldehyde	9.08	0
10	rutin	9.67	2462.73
11	p-coumaric acid	10.01	72.09
12	ellagic acid	10.08	125.16
13	chicoric acid	10.25	0
14	ferulic acid	-	ND
15	hesperidin	-	ND
16	apigenin-7-glucoside	11.57	6.96
17	rosmarinic acid	12.11	4.73
18	protocatechuic acid ethyl ester	13.23	0
19	salicylic acid	13.37	233.45
20	resveratrol	14.37	1.03
21	quercetin	14.99	954.92
22	naringenin	17.04	9.51
23	kaempferol	17.94	26.18

ND: Not detected

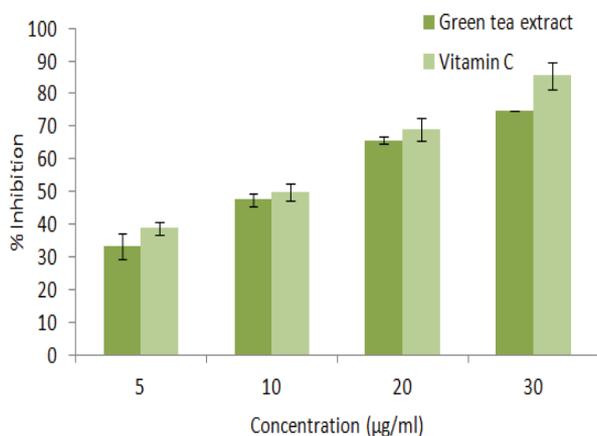
The hydroxyl radical can be formed by the Fenton reaction in the presence of reduced transition metals (such as  $Fe^{2+}$ ) and  $H_2O_2$ , which is known to be the most reactive of all the reduced forms of dioxygen and it is thought to initiate cell damage *in vivo*<sup>17</sup>. It can reduce disulfide bonds in proteins, specifically fibrinogen, resulting in their unfolding and scrambled refolding into abnormal configurations. The consequences of this reaction were observed in many diseases as cancer atherosclerosis and neurological disorders<sup>18</sup>.

**Figure 3:** DPPH scavenging activity of green tea extract and vitamin C. Values are mean  $\pm$  SD (n=3).**Figure 4:** The effect of ethanolic green tea extract and vitamin C on inhibition of  $FeSO_4$  induced lipid peroxidation of egg vitellose. Values are mean  $\pm$  SD (n=3).

The  $OH^\cdot$ -scavenging assay used in this study indicate that this green tea extract had a significant high effect against this potent radical ( $IC_{50}=12.83\pm 0.63 \mu g/ml$ ) compared to ascorbic acid ( $IC_{50}=10\pm 0.72 \mu g/ml$ ) and its effect was dose dependent (Figure 5).

The results of this study confirm that this green tea is a potent antioxidant. This potent antioxidant activity might result from its high contents of polyphenols and flavonoids especially catechins with 5,7-dihydroxyl groups on the A ring, di- or trihydroxyl groups on the B ring and D

ring in the case of catechingallate, which allow tea to react with the reactive oxygen species (superoxide radical, singlet oxygen, hydroxyl/peroxyl radical, peroxyxynitrite) and gave it a maximal of antioxidant activity<sup>19</sup>, gallic acid<sup>20</sup>, quercetin<sup>21</sup>, rutin<sup>22</sup> and the others (Table 1).



**Figure 5:** OH-scavenging activity of ethanolic green tea extract and vitamin C. Values are mean  $\pm$  SD (n=3).

#### DNA damage inhibition efficiency

Many studies suggested that oxidative DNA damage may be an important factor risk for a variety of diseases including cancer in different organs<sup>23,24</sup>, diabetes<sup>25</sup>, neurodegenerative diseases<sup>26</sup> and cardiovascular diseases<sup>27</sup>.

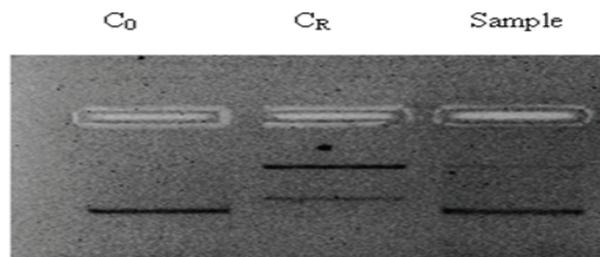
A high level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) radical was revealed in patients samples compared to healthy controls<sup>23,27</sup>. This radical used as biomarker of oxidative DNA damage produced by the bound of hydroxyl radical to C8 position of the guanine ring. The results of the current study showed that ethanolic green tea extract exhibited a completed protection of plasmid DNA against oxidative damage caused by UV-photolysed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a dose of 50 µg. UV-photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ethanolic green tea extract sample showed a single band in agarose gel electrophoresis as in C<sub>0</sub> (untreated non irradiated DNA). This band represented the native form of supercoiled circular DNA. However C<sub>R</sub> (untreated UV-irradiated DNA) showed two bands in agarose gel electrophoresis which indicated that the plasmid DNA was damaged by free radicals (OH<sup>•</sup>) generated by UV-photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 6).

This result agreed with the results of many other studies suggested that green tea can protect the DNA from the oxidative damage<sup>28-30</sup>.

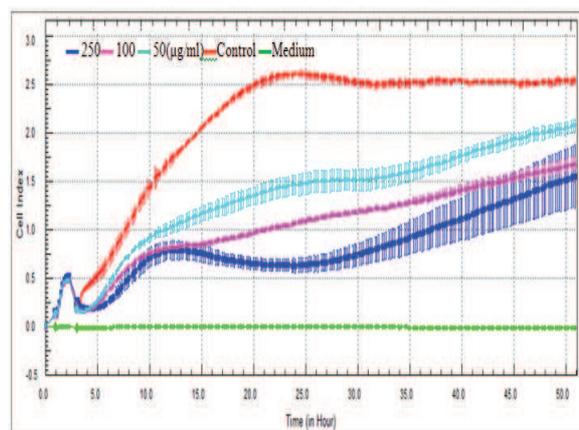
#### Evaluation of the anticancer activity

The anticancer activity of ethanolic green tea extract against PC3 cells was evaluated using xCELLigence RTCA instrument which allows as following the effect of the extract during all the 51 hours. The extract showed an interesting effect against PC3 cells especially during the first 24 h. The best effects observed compared to control

and medium were at 25 h where 80% of cells died with 250 µg/ml, 60% with 100 µg/ml and 40% with 50 µg/ml. However after this time the cells started to proliferate again, and this may be due to because of the low ratio of bioactive molecules in the extract (Figure 7). These results confirmed many other studies which stated that green tea is natural potent anticancer agent against a variety of human malignances including prostate, lung, colon, stomach, kidney, pancreas and mammary glands<sup>31</sup>. This beneficial effect has been attributed to the presence of high amounts of polyphenols, which are potent antioxidants especially catechins<sup>32</sup>.



**Figure 6:** Effect of ethanolic green tea extract on the protection of 46966 plasmid DNA against oxidative damage caused by UV-photolysed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. C<sub>0</sub>=untreated non irradiated DNA, C<sub>R</sub>=untreated UV- irradiated DNA and Sample= DNA UV-irradiated treated with ethanolic green tea extract.



**Figure 7:** Anticancer activities of ethanolic green tea extract against PC3 (2,5X10<sup>4</sup> cell/well) cell line. Each substance was tested twice in triplicates using xCELLigence RTCA instrument. Several extract concentrations were applied to the cells represented by different color (50, 100, 250 µg/ml).

#### CONCLUSION

The polyphenols are very important natural compounds. They offer great hope for the prevention of chronic human diseases. Their role in human health is still a fertile area of research. This current study confirmed that the green tea which usually consumed in our country is an essential natural source of polyphenols and flavonoids and a potent antioxidant and anticancer agent and these encouraging results may open the way for many studies *in vivo* in our laboratory.

## REFERENCES

- Young IS, Woodside JV, Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54, 2001, 76-86.
- Ames BN, Gold LS, Willett WC, The causes and prevention of cancer, *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, 92, 1995, 5258-5265.
- Wang HC, Brumaghim JL, Polyphenol compounds as antioxidants for disease prevention: reactive oxygen species scavenging, Enzyme regulation, and metal chelation mechanisms in *E. coli* and human cells, In *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, Andreescu S; Hepel, M, eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2011, 99-175.
- Wei H, Zhang X, Zhao JF, Wang ZY, Bickers D, Lebowitz M, Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by aqueous extracts from green and black teas, *Free Radicals Biology and Medicine*, 26, 1999, 1427-1435.
- Picard D, The biochemistry of green tea polyphenols and their potential application in human skin cancer, *Alternative Medicine Review*, 1, 1996, 31-42.
- Otsuka T, Ogo T, Asano Y, Suganuma M, Niho Y, Growth inhibition of leukemic cells by (-) epigallocatechingallate the main constituent of green tea, *Life Science*, 63, 1998, 1397-1403.
- Daniel SA, Elizabeth AC, Mario F, Joshua AB, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits PC-3 prostate cancer cell proliferation via MEK-independent ERK1/2 activation, *Chemico-Biological Interactions*, 171, 2008, 89-95.
- Sabu MC, Smitha K, Kuttan R, Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes, *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 2002, 109-116.
- Huang J, Wang Y, Xie Z, Zhou Y, Zhang Y, Wan X, The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies, *European Journal of Clinical Nutrition*. 68, 2014, 1075-87.
- Rezai-Zadeh K, Shytle D, Sun N, Mori T, Hou H, Jeannot D, Ehrhart J, Townsend K, Zeng J, Morgan D, Hardy J, Town T, Tan J, Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*, 25, 2005, 8807-14.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM, Methods in enzymol: oxidant and antioxidants In: Packer L, editor. (part A), San Diego, CA: Academic Press, 299, 1999, 152-178.
- Wang H, Dong Gao X, Zhou GC, Cai L, Yao WB, *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* Fruit, *Food Chemistry*, 106, 2008, 888-895.
- Braca A, DE Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I. Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*, *Journal of Natural Product*, 64, 2001, 892-895.
- Cao Y, Ikeda I, Antioxidant activity and antitumor activity (*in vitro*) of xyloglucan selenious ester and surfactated xyloglucan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 2009, 231-235.
- Russo A, Izzo AA, Cardile V, Borrelli F, Vanella A, Indian medicinal plants as antiradicals and DNA cleavage protectors, *Phytomedicine*, 8, 2001, 125-132.
- Graham HN, Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry, *Preventive Medicine*, 21, 1992, 334-350.
- Duan X, Wu G, Jiang Y, Evaluation of the antioxidant properties of litchi fruit phenolics in relation to pericarp browning prevention, *Molecules*, 12, 2007, 759-771.
- Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 2011, 809696.
- Valcic S, Burr JA, Timmermann BN, Liebler DC, Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechingallate and (-) epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals, *Chemical Research in Toxicology*, 13, 2000, 801-810.
- Kim YJ. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 2007, 1052-5.
- Zhang M, Swarts SG, Yin L, Liu C, Tian Y, Cao Y, Swarts M, Yang S, Zhang SB, Zhang K, Ju S, Olek DJ Jr, Schwartz L, Keng PC, Howell R, Zhang L, Okunieff P, Antioxidant properties of quercetin, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 701, 2011, 283-9.
- Yang J, *In vitro* antioxidant properties of rutin, *LWT - Food Science and Technology*, 41, 2008, 1060-1066.
- Kumar A, Pant MC, Singh HS, Khandelwal S, Assessment of the redox profile and oxidative DNA damage (8-OHdG) in squamous cell carcinoma of head and neck, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 8, 2012, 254-259.
- Kuo HW, Chou SY, Hu TW, Wu FY, Chen DJ. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients, *Mutation Research*, 631, 2007, 62-8.
- Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T, Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus, *Lancet*, 347, 1996, 444-445.
- Lezza A, Mecocci P, Cormio A, Flint Beal M, Cherubini A, Cantatore P, Senin U, Gadaleta MN, Area-specific differences in OH8dG and mtDNA4977 levels in Alzheimer disease patients and aged controls, *Journal of Anti-Aging Medicine*, 2, 1999, 209-215.
- Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, Southon S, Bellizzi M, Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates, *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12, 1998, 1397-1400.
- Hasegawa R, Chujo T, Sai-Kato K, Umemura T, Tanimura A, Kurokawa Y, Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane, *Food and Chemical Toxicology*. 33, 1995, 961-70.



29. Anderson RF, Fisher LJ, Hara Y, Harris T, Mak WB, Melton LD, Packer JE, Green tea catechins partially protect DNA from  $\cdot\text{OH}$  radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals, *Carcinogenesis*, 22, 2001, 1189-1193.
30. Kager N, Ferk F, Kundi M, Wagner KH, Misik M, Knasmüller S, Prevention of oxidative DNA damage in inner organs and lymphocytes of rats by green tea extract. *European Journal of Nutrition*, 49, 2010, 227-34.
31. Chung S. Yang, Hong Wang, GuangXun Li, Zhihong Yang, Fei Guan, Huanyu Jin, Cancer prevention by tea: evidence from laboratory studies, *Pharmacological Research*, 64, 2011, 113-122.
32. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H, Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate, *Cancer Research*, 66, 2006, 2500-5.

**Source of Support:** Nil, **Conflict of Interest:** None.



## Research Article

# Diet, Lifestyles, Family History, and Prostate Cancer Incidence in an East Algerian Patient Group

Somia Lassed,<sup>1,2</sup> Cláudia M. Deus,<sup>3</sup> Nuno Lourenço,<sup>4</sup> Abderrezak Dahdouh,<sup>5</sup>  
Albert A. Rizvanov,<sup>6</sup> Paulo J. Oliveira,<sup>3</sup> and Djamilia Zama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université des Frères Mentouri, Constantine, 25000 Constantine, Algeria

<sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie Animale, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri, Constantine, 25000 Constantine, Algeria

<sup>3</sup>Center for Neuroscience and Cellular Biology (CNC), University of Coimbra, UC Biotech Building, Biocant Park, 3060-197 Cantanhede, Portugal

<sup>4</sup>Department of Informatics Engineering, Center for Informatics and Systems of University of Coimbra (CISUC), Polo II-Pinhal de Marrocos, 3030 Coimbra, Portugal

<sup>5</sup>Clinic of Urology-Nephrology and Kidney Transplant Daksi, 25000 Constantine, Algeria

<sup>6</sup>Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Correspondence should be addressed to Djamilia Zama; [atrouzl@umc.edu.dz](mailto:atrouzl@umc.edu.dz)

Received 6 May 2016; Revised 2 September 2016; Accepted 20 September 2016

Academic Editor: Fabio Grizzi

Copyright © 2016 Somia Lassed et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Prostate cancer (PC) is the fourth most common cancer in men and the sixth leading cause of death in Algeria. To examine the relationship between lifestyle factors, including diet, and family history and PC risk, a case-control study was performed in an eastern Algerian population, comprising 90 patients with histologically confirmed PC and 190 controls. Data collection was carried out through a structured questionnaire and statistical analysis was performed to evaluate the different variables. The data showed that consumption of lamb and beef meat and high intake of animal fat and dairy products increased PC risk. Seven to thirteen vegetables servings per week and fourteen or more servings decreased PC risk by 62% and 96%, respectively. Seven to fourteen fruit servings per week decrease PC risk by 98%. Green tea consumption reduced the risk of PC but the results were statistically borderline. Increased risk was observed for individuals with family history of PC in first and in second degree. A positive strong association was also found for alcohol and smoking intake and a dose-response relationship existed for quantity and history of smoking. This study suggests that dietary habits, lifestyle factors, and family history have influence on the development of PC in Algerian population.

## 1. Introduction

After lung cancer, prostate cancer (PC) is the most common cancer among men, with nearly a million new cases diagnosed worldwide [1]. PC incidence varies more than 25-fold worldwide; the rates are highest in Australia/New Zealand, Northern America, and Western and Northern Europe (ASR 111.6, 97.2, 94.9 and 85.0 per 100,000, resp.) and relatively high in certain regions such as the Caribbean (79.8), Southern Africa (61.8), and South America (60.1), but it is low in Asian population with estimated rates of 10.5 and 4.5 in Eastern

and South-Central Asia [2]. According to GLOBOCAN 2012 database, PC in Algeria was the fourth most common cancer in men with 8.8 cases per 100,000 and the sixth leading cause of death with 4.9 deaths per 100,000. The incidence of PC in Algeria is considered as low when compared with some western countries such as Norway and Sweden (129.7 and 119.0 cases diagnosed and approximately 18 deaths per 100,000, resp.), but it is still high compared to many Asian countries especially China, Korea, and Bhutan (5.3, 3.2, and 1.2 cases diagnosed and 2.5, 1.3, and 0.7 deaths per 100,000, resp.) [2]. Numerous epidemiological studies showed that

the incidence of PC in Asian countries is low compared to the West. However, this incidence rapidly increases in Asian immigrants that have assimilated western diet and way of living, replacing soy, tea, fish, fruits, and vegetables consumption with red meat and fat-rich food [3]. Also, a study conducted in Western Australia described that the risk of PC and in particular aggressive PC increases significantly in about 80% of men who consume a western style diet [4]. The difference in PC rates may result in possible dietary, lifestyle, and environmental links to the development and progression of PC [5, 6]. Many epidemiological and case-control studies disclosed that some dietary factors such as animal fat [7], dairy products [8], and red meat [9] may increase the risk of PC [7–9], whereas intake of vegetables and fruit [10], fish [11], and green tea [12] appears to be potentially protective [10–12]. The aim of this study was to examine the relationship between dietary habits, family history of PC, alcohol, and smoking and PC risk in an East Algerian population.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Data Collection.** The present study was approved by the Ethics Committee of the EHS Daksi, which certified that the data collection was performed at the Department of Urology and Renal Transplant without any risk for patients. Data were derived from a case-control study of PC, performed between 2011 and 2013 in the east of Algeria. From 100 cases of histologically confirmed PC, followed at the service of urology and at the emergency department in Clinic of Urology-Nephrology and Kidney Transplant Daksi, Constantine, one patient refused to participate and 9 were too ill to be interviewed. The cohort investigated consisted of 90 patients with a median age of  $68.87 \pm 0.73$ , ranging from 50 to 88 years. The total Gleason score, serum PSA level at diagnosis, and primary treatment taken for each case were obtained from the medical record. Controls were men, residing in the same geographical area of cases without either PC or prostate diseases. Those with other malignancies were also excluded. Among 200 men selected, 10 refused to participate for different reasons. The final control group consisted of 190 men with a median age of  $67.13 \pm 0.72$ , ranging from 50 to 88 years. Sixty-one men were treated at the hospital for some urologic diseases (35 had kidney stone, 25 had urinary infection, and 10 had other diseases), 14 were men from the hospital staff invited to participate, and 115 were men selected in the blood sample collection room of the Laboratory of Biochemistry of Establishment Public Hospital of Chelghoum Laid city.

Data collection was carried out through an interview, using structured questionnaire, including information on sociodemographic characteristics, dietary habits, family history of PC, smoking, and alcohol consumption (see Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5730569>). All the interviews were filled face-to-face with case and control individuals. Questionnaire on dietary habits included questions about the frequency of intake of different food items during the past years. The first item was about the number of meals per day, followed by questions about

the consumption of fish and red meat (lamb and beef), by using the question “how many times per week or month,” and consumption of animal fat (from red meat) or dairy products (milk, cheese, and yogurt) by using the expressions “never, small, medium or great part.” In the latter, “small or medium part” of dairy products meant one cup of milk or/and some other product per day, and “great part” meant more than 2 cups of milk per day or/and a large amount of other product. Another question was related to total fruit and vegetables consumption by using the question “how many times per week. The last food-related item is regarded as green tea consumption by using the question “how many cups per day.” Participants were also asked about alcohol and smoking employing the terms “non-users,” “former users,” and “current users.” Former users were defined as those who had consumed alcoholic beverages or tobacco earlier in their life but not during the last years and current users were considered as those who actually still consume alcoholic beverages or tobacco. The total tobacco consumption was determined using pack-years unity. The original questionnaire is presented as supplementary material. All the participants were asked about their dietary habits 10 years prior to the study because the clinical PC has a long latency phase, during which the disease is histologically present and the remote dietary intake may be more important than recent dietary intake when predicting the risk of PC [13].

**2.2. Statistical Analyses.** The data from 90 PC cases and 190 controls were analyzed using Graph Pad Prism version 7. Firstly we started by analyzing if the samples follow a normal distribution. We relied on the Shapiro-Wilk test at a significance level of 0.05. The results showed that the data did not follow a normal distribution so all the tests from here on will assume nothing about the distribution of the data; that is, we will rely on nonparametric tests to analyze the data. To check whether there were statistically significant differences between the control and cases groups, we used the Mann-Whitney test for continuous variables, such as PSA values.

The remainder of the variables (different types of food consumption, family history of PC, smoking habits, and alcoholic consumption) were grouped into categories, corresponding to the different possible answers. The individual frequency of the answers was measured and stored in a contingencies table. All tables were analyzed using the chi-square test. To compute the confidence intervals of the odds ratio (OR) we used on the Woolf logit method.  $p_{\text{trend}}$  values were determined using the chi-square test for trend.

## 3. Results

The Gleason score at diagnosis was between 5 and 7 in 38% of cases and it was between 8 and 10 in 62% of cases. 12% of cases were oriented toward prostatectomy as initial treatment and 88% were oriented to start hormone therapy. There were no statistical significant differences in age between cases and controls ( $p = 0.101$ ). Moreover, the nonparametric test Kolmogorov-Smirnov showed that the ages of the two groups (control and cases) were taken from the same distribution. The median prostate-specific antigen (PSA) level was higher

TABLE 1: Prostate cancer cases and controls characterization.

	Cases, <i>n</i> (%)	Controls, <i>n</i> (%)	<i>p</i> value <sup>b</sup>
No. of subjects	90	190	
Mean age ± SD	68.87 ± 0.73 <sup>a</sup>	67.13 ± 0.72 <sup>a</sup>	0.1012
Mean PSA ± SD (ng/mL)	122 ± 22.04	1.71 ± 0.10	<0.0001****
Gleason score			
5–7	34 (38)	—	—
8–10	56 (62)	—	—
Primary treatment			
Prostatectomy	11 (12)	—	—
Hormone therapy	79 (88)	—	—
City of living			
Constantine	34 (38)	60 (32)	—
Mila	16 (18)	43 (23)	—
Guelma	4 (4)	10 (5)	—
Setif	5 (6)	12 (6)	—
Oum El Bouaghi	10 (11)	15 (8)	—
Jijel	8 (9)	19 (10)	—
Skikda	6 (7)	14 (7)	—
Bejaia	2 (2)	5 (3)	—
Tebassa	3 (3)	8 (4)	—
M'Sila	2 (2)	4 (2)	—

<sup>a</sup>Values are expressed as mean ± SD.

<sup>b</sup>Based on Mann-Whitney; PSA: prostate-specific antigen; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

in diseased individuals than in controls ( $p < 0.0001$ ). All the participants were living in the same geographical area distributed by different cities in the east of Algeria (Table 1).

Table 2 shows the odds ratio and the relative risk for the relationship between the intake of different food items and PC. When comparing men who ate more than three meals per day to men who consumed only two to three meals per day, no statistically significant associations were observed between numbers of meals consumed per day and PC risk. Also, no statistical association was found between fish consumption and PC, when comparing men who ate fish more than three times per month to those who had fish in their meals less than 2 times per month. A significant relationship between red meat consumption and PC risk was observed. A strong positive association ( $p < 0.0001$ ) between lamb consumption and PC was found. The odds ratio and the relative risk increased significantly with the increased lamb meat meals consumed per month. Compared to those who never or rarely consumed lamb, they were, respectively, 3.33 (1.74 to 6.37) and 2.46 (1.49 to 4.06),  $p = 0.0002$ , in those who consumed lamb between one to two times per month and were 4.99 (2.36 to 10.53) and 3.10 (1.84 to 5.24),  $p < 0.0001$ , in those who consumed lamb three times or more per month. A positive association was also found between beef consumption and PC ( $p_{\text{trend}} = 0.013$ ), but it was only significant in men who ate beef three times or more per month. Concerning animal fat derived from red meat consumption, a strong positive correlation was found ( $p_{\text{trend}} < 0.0001$ ). Increased risk was observed for men with high intake of animal fat compared to those who never eat

animal fat or just normally consumed a small part relative to the total of food intake daily [OR 7.38 (95% CI 3.87 to 14.06) and RR 3.02 (95% CI 2.17 to 4.20);  $p < 0.0001$ ]. The dairy product intake was also associated with PC risk. The risk increased significantly in men with high intake of dairy products compared to those who consumed just a small or medium part daily. Inverse strong association was observed between total fruit and total vegetables consumption and PC risk ( $p_{\text{trend}} < 0.0001$ ). The odds ratio and the relative risk decreased significantly with increased fruit and vegetables consumed per week. The results obtained showed that PC is less common in men who consumed vegetables 7 to 13 times per week and much less common for those who intake vegetables 14 or more times per week and fruit 7 to 14 times per week. Results concerning green tea consumption showed that PC risk decreased with the number of cups of green tea consumed per day. However, these results were not significant ( $p_{\text{trend}} = 0.07$ ), and OR and RR were, respectively, 0.64 (95% CI 0.36 to 1.15) and 0.74 (95% CI 0.48 to 1.12),  $p = 0.1569$ , for those who drank 1 to 3 cups per day, and they were 0.40 (95% CI 0.08 to 1.92) and 0.51 (95% CI 0.14 to 1.82),  $p = 0.2025$ , for individuals who had consumption of more than 3 cups per day.

The results in Table 3 indicate that a higher proportion of cases had a family history of PC (22%) compared to controls (4%). A statistically significant association between family history of PC in first degree (father or brother) and PC risk was observed. Men with a family history of PC in second degree (grandfather or uncle) were also at higher risk of getting PC. A positive strong correlation was observed between PC incidence and alcohol consumption ( $p < 0.0001$ ). The odds ratio and the relative risk for former users compared to nonusers were, respectively, 5.53 (95% CI 2.68 to 11.42) and 2.51 (95% CI 1.84 to 3.40). Also, smoking status showed a potent positive association between smoking and the risk of getting PC ( $p_{\text{trend}} < 0.0001$ ). The odds ratio and relative risk for former smokers compared to nonsmokers were, respectively, 3.17 (95% CI 1.76 to 5.69) and 2.27 (95% CI 1.47 to 3.50) and, for current smokers, the values were, respectively, 4.05 (95% CI 1.84 to 8.89) and 2.60 (95% CI 1.57 to 4.31). According to total tobacco consumption, we found a dose-response relation to PC risk which was 3.56-fold higher in men who consumed more than forty pack-years (more than 292 kg of tobacco) in their life (Table 3).

#### 4. Discussion

In this study, controls and PC-positive patients were collected in the same period and interviewed face-to-face using a structured questionnaire to decrease the probability of bias. Cases were interviewed only after the confirmation of their disease and controls were selected carefully and matched to disease cases based on age and region of residence. The use of past 10 years' dietary history is justified by the fact that PC has a long latency period (10 to 15 years) [13] and because dietary changes may have occurred after diagnosis of the disease, thus not reflecting the typical diet consumed before the onset of PC. Still, since this is a case-control study we cannot exclude a certain degree of recall bias [14].

TABLE 2: Association between the amount and kind of different food items and the risk of prostate cancer.

	Cases, n (%)	Controls, n (%)	Odds ratio <sup>a</sup>	95% CI <sup>a</sup>	Relative risk <sup>a</sup>	95% CI <sup>a</sup>	p value <sup>a</sup>
<i>Number of meals/day</i>							
2 to 3 meals	70 (78)	158 (83)	1				
>3 meals	20 (22)	32 (17)	1.41	0.75–2.63	1.25	0.84–1.86	0.3238
<i>Fish, time/month</i>							
0–2	55 (61)	118 (62)	1				
≥3	35 (39)	72 (38)	1.04	0.62–1.74	1.03	0.72–1.45	0.8957
<i>Red meat, time/month</i>							
<i>Lamb</i>							
0	17 (19)	95 (50)	1				
1-2	40 (44)	67 (35)	3.33	1.74–6.37	2.46	1.49–4.06	0.0002***
≥3	25 (28)	28 (15)	4.99	2.36–10.53	3.10	1.84–5.24	<0.0001****
<i>P</i> <sub>trend</sub> <sup>b</sup>			<0.0001****				
<i>Beef</i>							
0	16 (18)	57 (30)	1				
1-2	39 (43)	81 (43)	1.71	0.87–3.36	1.48	0.89–2.45	0.1394
≥3	35 (39)	52 (27)	2.39	1.19–4.83	1.83	1.11–3.03	0.0170*
<i>P</i> <sub>trend</sub> <sup>b</sup>			0.013*				
<i>Animal fat</i>							
Never or small part <sup>1</sup>	37 (41)	127 (67)	1				
Medium part <sup>1</sup>	10 (11)	43 (23)	0.79	0.36–1.74	0.83	0.44–1.56	0.7020
Great part <sup>1</sup>	43 (48)	20 (10)	7.38	3.87–14.06	3.02	2.17–4.20	<0.0001****
<i>P</i> <sub>trend</sub> <sup>b</sup>			<0.0001****				
<i>Dairy product</i>							
Small or medium part <sup>2</sup>	45 (50)	144 (76)	1				
Great part <sup>3</sup>	45 (50)	46 (24)	3.13	1.84–5.31	2.07	1.49–2.88	<0.0001****
<i>Total fruit, time/week</i>							
<2	17 (19)	4 (2)	1				
2–6	59 (66)	34 (18)	0.40	0.12–1.31	0.78	0.60–1.01	0.198
7–14	14 (15)	152 (80)	0.02	0.00–0.07	0.10	0.06–0.17	<0.0001****
<i>P</i> <sub>trend</sub> <sup>b</sup>			<0.0001****				
<i>Total vegetables, time/week</i>							
<7	18 (20)	7 (4)	1				
7–13	60 (67)	61 (32)	0.38	0.14–0.98	0.68	0.50–0.93	0.048*
≥14	12 (13)	122 (64)	0.03	0.01–0.10	0.12	0.06–0.22	<0.0001****
<i>P</i> <sub>trend</sub> <sup>b</sup>			<0.0001****				
<i>Green tea consumption, cups/day</i>							
<1	67 (75)	122 (64)	1				
1–3	21 (23)	59 (31)	0.64	0.36–1.15	0.74	0.48–1.12	0.1569
>3	2 (2)	9 (5)	0.40	0.08–1.92	0.51	0.14–1.82	0.2025
<i>P</i> <sub>trend</sub> <sup>b</sup>			0.07				

95% CI = 95% confidence interval. <sup>a</sup>Determined using the chi-square test. <sup>b</sup>Determined using the chi-square test for trend; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

<sup>1</sup>Relative to the total of daily food intake. <sup>2</sup>One cup of milk or/with some other product (cheese, yogurt) per day. <sup>3</sup>More than 2 cups of milk per day or/with a big quantity of other product (cheese, yogurt).

The number of meals taken per day, which can be an indicator of total energy intake, showed no association with the risk of PC in this study. Theoretically, high energy intake can play a relevant role in several neoplasms since it may stimulate the sympathetic nervous system and basal metabolism leading to increased IGF-1 release which increases cell proliferation automatically through the stimulation of mitosis [15].

Several case-control studies reported an association [16–18] or no association [19, 20] between increased PC risk and high energy intake.

Numerous epidemiological studies examined the relationship between fish consumption and PC. Although many suggested risk reduction associated with high intake, others are contradictory. A follow-up of 47,882 men during 12 years

TABLE 3: Association between family history of prostate cancer, alcohol consumption, and smoking habits and the risk of prostate cancer.

	Cases, n (%)	Controls, n (%)	Odds ratio <sup>a</sup>	95% CI <sup>a</sup>	Relative risk <sup>a</sup>	95% CI <sup>a</sup>	p value <sup>a</sup>
<i>Family history of prostate cancer</i>							
Absent	70 (78)	182 (96)	1				
In first degree	11 (12)	3 (1)	9.53	2.58–35.20	2.82	2.01–3.96	0.0002***
In second degree	9 (10)	5 (3)	4.68	1.51–14.45	2.31	1.49–3.58	0.0063**
$p_{\text{trend}}^b$			<0.0001****				
<i>Alcohol status</i>							
Nonusers	64 (71)	177 (93)	1				
Former users	26 (29)	13 (7)	5.53	2.68–11.42	2.51	1.84–3.40	<0.0001****
<i>Smoking status</i>							
Nonsmokers	22 (24)	99 (52)	1				
Former smokers	50 (56)	71 (37)	3.17	1.76–5.69	2.27	1.47–3.50	0.0001***
Current smokers	18 (20)	20 (11)	4.05	1.84–8.89	2.60	1.57–4.31	0.0006***
$p_{\text{trend}}^b$			<0.0001****				
<i>Total tobacco consumption, unity of pack-years</i>							
0	22 (24)	99 (52)	1				
1–9	9 (10)	20 (11)	2.02	0.81–5.04	1.70	0.88–3.30	0.1326
10–19	15 (17)	27 (14)	2.50	1.14–5.46	1.96	1.12–3.42	0.0311*
20–29	11 (12)	23 (12)	2.15	0.91–5.05	1.78	0.96–3.29	0.0964
30–39	9 (10)	8 (4)	5.06	1.75–14.59	2.91	1.62–5.23	0.0033**
≥40	24 (27)	13 (7)	8.30	3.66–18.83	3.56	2.28–5.57	<0.0001****
$p_{\text{trend}}^b$			<0.0001****				

95% CI = 95% confidence interval. <sup>a</sup>Determined using the chi-square test. <sup>b</sup>Determined using the chi-square test for trend; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

in the Health Professionals Study found that the consumption of more than three times per week of fish was associated with a reduced risk of PC. The strongest association was found for metastatic cancer (RR 0.56; 95% CI 0.37 to 0.86, compared with infrequent consumption, i.e., less than twice per month) [11]. Similarly, five or more servings of fish per week versus less than once was associated with a significant reduction in PC risk [21]. Also, a recent study suggested that prostate tissue  $\omega$ -3 fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA), are protective against PC progression in men with low risk for that disease [22]. However a meta-analysis study provided no strong evidence of a protective association of fish consumption with PC incidence [23]. No association was observed in our study between fish consumption and PC, which may be explained by the low levels of fish consumption, compared to other studies cited [11, 21].

Our study showed a strong association between red meat and high animal fat consumption and PC. Several previous studies examined the relationship between red meat and PC risk with conflicting results. Some studies suggested a positive association [9, 24, 25], whereas others have found no association [26, 27]. Among studies which suggested a positive association, a case-control study found that eating red meat (beef, lamb, or pork) at least 5 times per week increased the risk of PC incidence by 2.5-fold [9], which was confirmed by further studies [24]. The increased risk may stem from triggering of carcinogenesis by high fat content, formation of carcinogenic heterocyclic amines (HCAs) during cooking at high temperature, carcinogenic N-nitroso

compounds (NOCs), and the promotion of carcinogenesis by heme iron [25, 26], although infection by tumorigenic pathogens has been increasingly denoted as possible cause [28]. Animal fat was positively associated with PC risk in this study, in line with previous works [7, 29, 30] but not others [31, 32]. The prospective cohort study of Giovannucci et al. concluded that red meat and total fat consumption was directly related to the risk of advanced PC and the association of the latter was primarily due to animal fat. However, fat from dairy products (with the exception of butter) or fish was unrelated to the risk of PC [7]. Also in a prospective study, men in the lower tercile of saturated fat consumption compared to those in the upper tercile had three times the risk of dying from PC [29]. The link between dietary fat content and the development of PC is possibly related to the increase in sex hormone and IGF-1 concentration [33], alteration of cell membrane function, and modulation of metabolic processes [34] or to increased oxygen radicals generation [35].

Total dairy product intake was also positively associated with the risk of PC in this study. The relationship between PC and dairy products showed significant positive association [8, 36, 37], overall null association [38, 39], or an inverse association [40]. In the epidemiologic follow-up study, results were similar to ours, showing that men in the highest tercile for dairy food intake had a relative risk of 2.2 (95% CI 1.2 to 3.9;  $p_{\text{trend}} = 0.05$ ) compared with men in the lowest tercile [8]. However, in the majority of other studies the relative risk was lower, 1.63 (95% CI 1.14 to 2.32) and  $p_{\text{trend}} =$

0.01, in a population based prospective study performed with 43,435 Japanese men [36] and 1.26 (95% CI 1.04 to 1.51) and  $p_{\text{trend}} = 0.03$  in a large prospective study from Finland [37]. Several potential mechanisms explain the relationship between dairy product intake and the increased PC risk. First, the high level of calcium or phosphate content in plasma may lower intracellular bioactive metabolite of vitamin D, 1,25 dihydroxycholecalciferol concentration, [41] which is described to have an antiproliferative effect [42]. Second, higher intake of milk and calcium has been associated with increased plasma levels of IGF-1 [43]. Third, estrogen content in milk has been suggested also as possible explanation [44].

Among all food items studied, our study showed that total vegetables and fruit consumption presented a statistically significant protective effect on PC. These results support that high consumption of vegetables and fruit are associated with decreased risk of PC and are in agreement with the findings of a case-control study performed in Montevideo [10]. Nevertheless the finding in this context remains contradictory. Some studies suggested that total fruit or vegetable consumption may not exert a protective role [24, 45]. However, in another study a large fruit intake was associated with increased risk of PC [46].

Green tea polyphenols, especially catechins, inhibit carcinogenesis by different mechanisms [47] and in the majority of epidemiological studies a significant decrease in the risk of PC incidence was observed with increasing intake of green tea. In a case-control study in Southeast China, a consumption of 3 cups of green tea daily lowered the risk of PC [12]. In a large cohort study in Japan, only 5 or more cups per day reduced the risk of advanced PC [48]. Agreeing with some studies [49, 50], our results did not confirm the protective effect of green tea consumption. This can be explained by the fact that green tea is not a popular beverage in Algeria. The studied population reflected the fact that most of the studied individuals rarely or never drink green tea.

The family history of PC was another factor risk in the Algerian population studied. 22% of PC cases had a family history of PC, against only 4% of controls. Family history of PC has been examined in many studies and in different populations, with most studies finding a positive association [51–53]. Steinberg et al. observed increased PC risk among men whose first or second degree relatives also had PC [52]. In a multicenter case-control study performed in the US and Canada in Afro-American, Whites, and Asian-Americans, 13% of cases and 5% of controls reported a father, brother, or son with PC and family history association with a statistically significant 2- to 3-fold increase in risk in each of the three ethnic groups [53]. Also, in a recent study in Brazil, family history was also a PC risk factor [51]. In addition to the positive association found between family history and PC risk, the latter increased with the number of relatives affected [52].

Our results suggest that alcohol intake is associated with increased PC risk. No current users were found in the population studied since cases and control individuals never drink alcohol or just drank a few times during their youth, with the rest (29% cases and 7% controls) being former users. Most studies showed no association between

alcohol intake and PC [54–56] with a few studies reporting an inverse association [57, 58]. In a follow-up study of alcohol and PC, a significant inverse association was shown between distant past heavy drinking (25 drinks/week) and PC [58]. Similarly, an inverse association was observed in another study with the total number of drinking years but no association was found with lifetime intake of total and beverage specific ethanol [57]. In these studies, the protective role of alcohol observed has been interpreted by the finding that alcohol may increase metabolic clearance of testosterone [59]. Nevertheless, our study is comparable with many others supporting the hypothesis that alcohol increases PC risk. In a recent case-control study, current alcohol intake was not associated with PC but lifetime intake increased significantly the risk of both aggressive and nonaggressive PC [60] while, in the cohort of US health professionals, men who drank large amounts of alcohol in a short time were also found to be at higher risk of PC [61]. Other studies suggested that heavy alcohol consumers or alcohol abusers have higher PC incidence, with 4 alcoholic drinks per day being associated with about a 21% increased risk of PC [62]. In our study, we did not have enough information from all cases and controls to examine the association between the amount and the period of alcohol intake and PC risk.

In contrast to several studies which did not support that smoking is a factor risk of PC [17, 24, 55], we found out that smoking was associated with increased risk. Our results support the finding of other studies which found a positive association between smoking and PC risk. In the study of Plaskon et al. current smokers were associated with an increased risk in contrast to former smokers, with a dose-response relation noted between number of pack-years smoked and PC risk [63]. In another study, the relative risk for PC was significantly elevated among cigarette smokers but no clear dose-response relation for was observed [64]. Another study found that early (before age 30), late (within recent 10 years), and lifetime cumulative smoking history were unrelated to the risk of total PC. While men who had smoked 15 or more pack-years of cigarettes within the preceding 10 years were at higher risk of distant metastatic and fatal PC, the excess risk among smokers was eliminated after 10 years of quitting [65]. Two pathogenic mechanisms were proposed to link cigarette smoking and increased PC risk. The first one is related to carcinogenic substances found in cigarettes such as cadmium which can indirectly induce PC through the interaction with androgen receptor [66]. A second factor relates to the effect of smoking on sex hormones level. Male smokers are reported to have elevated level of circulating testosterone [67].

## 5. Conclusion

Our study indicates that dietary habits, family history of PC, alcohol intake, and smoking may influence the development of PC in East Algerian population. Risk factors for PC appeared to be the intake of red meat, high consumption of animal fat and dairy product, family history of PC, alcohol intake, and smoking. A protective effect was found for high intake of fruit and vegetables. Green tea reduced, although

not statistically significant, the risk of PC. However the number of meals intake per day and fish consumption was found to be independent factors for PC.

## Competing Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Authors' Contributions

Somia Lassed performed research study, collected and analyzed the data, and wrote the manuscript. Cláudia M. Deus, Albert A. Rizvanov, Nuno Lourenço, and Paulo J. Oliveira analyzed the data and revised the manuscript. Abderrezak Dahdouh and Djamila Zama designed and supervised the study and revised the manuscript.

## Acknowledgments

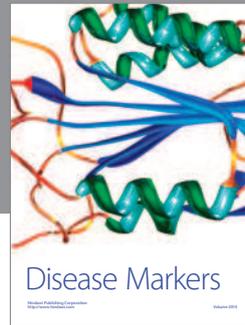
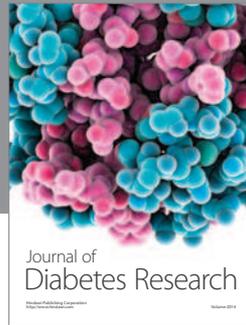
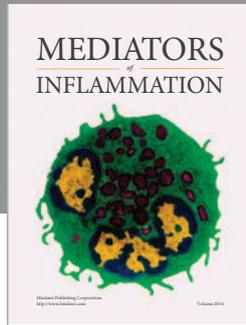
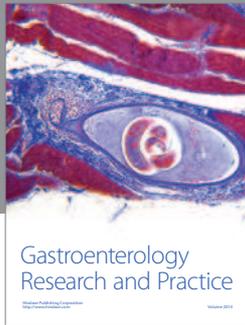
This study was supported financially by an individual Project (F0092012009) and research unit programmatic funding (VARENBIOMOL) at Constantine University, Algeria. The authors are grateful to all the staff of Clinic of Urology-Nephrology and Kidney Transplant in Daksi, Constantine, Algeria, and the staff at the Laboratory of Biochemistry of Establishment Public Hospital of Chelghoum Laid for their cooperation and valuable assistance.

## References

- [1] M. M. Center, A. Jemal, J. Lortet-Tieulent et al., "International variation in prostate cancer incidence and mortality rates," *European Urology*, vol. 61, no. 6, pp. 1079–1092, 2012.
- [2] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik et al., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide*, IARC Cancer Base No. 11, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2012, <http://globocan.iarc.fr>.
- [3] M. Namiki, H. Akaza, S. E. Lee et al., "Prostate cancer working group report," *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 40, supplement 1, Article ID hyq130, pp. i70–i75, 2010.
- [4] G. L. Ambrosini, L. Fritschi, N. H. de Klerk, D. Mackerras, and J. Leavy, "Dietary patterns identified using factor analysis and prostate cancer risk: a case control study in Western Australia," *Annals of Epidemiology*, vol. 18, no. 5, pp. 364–370, 2008.
- [5] A. W. Hsing, L. Tsao, and S. S. Devesa, "International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality," *International Journal of Cancer*, vol. 85, no. 1, pp. 60–67, 2000.
- [6] A. Wolk, "Diet, lifestyle and risk of prostate cancer," *Acta Oncologica*, vol. 44, no. 3, pp. 277–281, 2005.
- [7] E. Giovannucci, E. B. Rimm, G. A. Colditz et al., "A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 85, no. 19, pp. 1571–1579, 1993.
- [8] M. Tseng, R. A. Breslow, B. I. Graubard, and R. G. Ziegler, "Dairy, calcium, and vitamin D intakes and prostate cancer risk in the National Health and Nutrition Examination Epidemiologic Follow-up Study cohort," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, no. 5, pp. 1147–1154, 2005.
- [9] P. H. Gann, C. H. Hennekens, F. M. Sacks, F. Grodstein, E. L. Giovannucci, and M. J. Stampfer, "Prospective study of plasma fatty acids and risk of prostate cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 86, no. 4, pp. 281–286, 1994.
- [10] H. Deneo-Pellegrini, E. De Stefani, A. Ronco, and M. Mendilaharsu, "Foods, nutrients and prostate cancer: a case-control study in Uruguay," *British Journal of Cancer*, vol. 80, no. 3–4, pp. 591–597, 1999.
- [11] K. Augustsson, D. S. Michaud, E. B. Rimm et al., "A prospective study of intake of fish and marine fatty acids and prostate cancer," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 12, no. 1, pp. 64–67, 2003.
- [12] L. Jian, L. P. Xie, A. H. Lee, and C. W. Binns, "Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China," *International Journal of Cancer*, vol. 108, no. 1, pp. 130–135, 2004.
- [13] G. Soos, I. Tsakiris, J. Szanto, C. Turzo, P. G. Haas, and B. Dezso, "The prevalence of prostate carcinoma and its precursor in Hungary: an autopsy study," *European Urology*, vol. 48, no. 5, pp. 739–744, 2005.
- [14] L. N. Kolonel, A. M. Y. Nomura, and R. V. Cooney, "Dietary fat and prostate cancer: current status," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, no. 5, pp. 414–428, 1999.
- [15] S. E. Dunn, F. W. Kari, J. French et al., "Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice," *Cancer Research*, vol. 57, no. 21, pp. 4667–4672, 1997.
- [16] S.-O. Andersson, A. Wolk, R. Bergström et al., "Energy, nutrient intake and prostate cancer risk: a population-based case-control study in Sweden," *International Journal of Cancer*, vol. 68, no. 6, pp. 716–722, 1996.
- [17] H. Grönberg, L. Damber, and J.-E. Damber, "Total food consumption and body mass index in relation to prostate cancer risk: a case-control study in Sweden with prospectively collected exposure data," *Journal of Urology*, vol. 155, no. 3, pp. 969–974, 1996.
- [18] E. L. Richman, S. A. Kenfield, J. E. Chavarro et al., "Fat intake after diagnosis and risk of lethal prostate cancer and all-cause mortality," *JAMA Internal Medicine*, vol. 173, no. 14, pp. 1318–1326, 2013.
- [19] P. Ghadirian, A. Lacroix, P. Maisonneuve et al., "Nutritional factors and prostate cancer: a case-control study of French Canadians in Montreal, Canada," *Cancer Causes and Control*, vol. 7, no. 4, pp. 428–436, 1996.
- [20] A. G. Schuurman, P. A. van den Brandt, E. Dorant, H. A. M. Brants, and R. A. Goldbohm, "Association of energy and fat intake with prostate carcinoma risk: results from the Netherlands Cohort Study," *Cancer*, vol. 86, no. 6, pp. 1019–1027, 1999.
- [21] J. E. Chavarro, M. J. Stampfer, M. N. Hall, H. D. Sesso, and J. Ma, "A 22-y prospective study of fish intake in relation to prostate cancer incidence and mortality," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 88, no. 5, pp. 1297–1303, 2008.
- [22] X. Moreel, J. Allaire, C. Léger et al., "Prostatic and dietary omega-3 fatty acids and prostate cancer progression during active surveillance," *Cancer Prevention Research*, vol. 7, no. 7, pp. 766–776, 2014.
- [23] K. M. Szymanski, D. C. Wheeler, and L. A. Mucci, "Fish consumption and prostate cancer risk: a review and meta-analysis," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 92, no. 5, pp. 1223–1233, 2010.
- [24] L. Le Marchand, L. N. Kolonel, L. R. Wilkens, B. C. Myers, and T. Hirohata, "Animal fat consumption and prostate cancer:

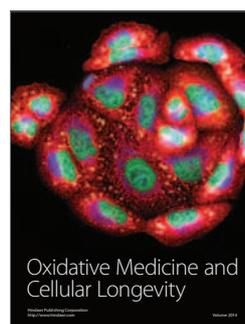
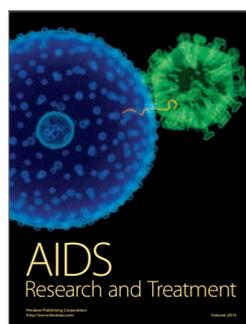
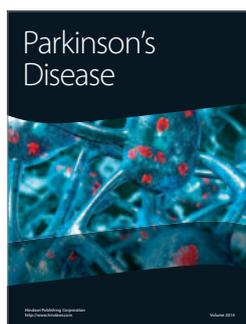
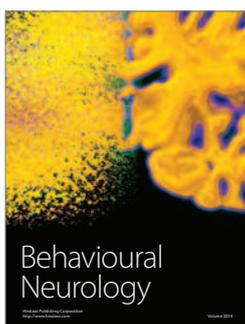
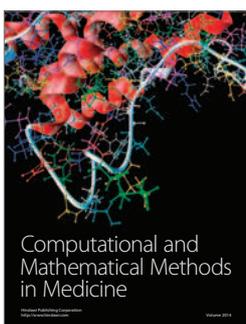
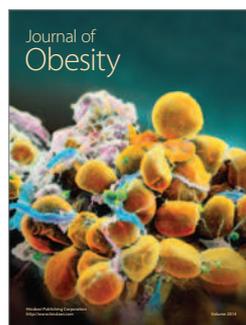
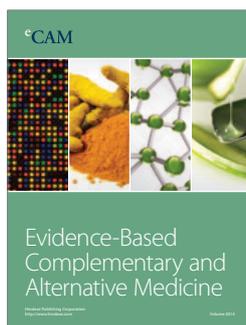
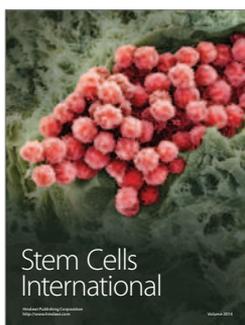
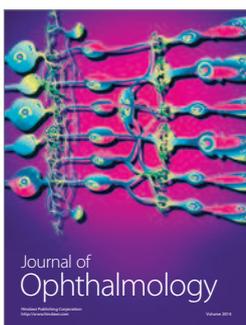
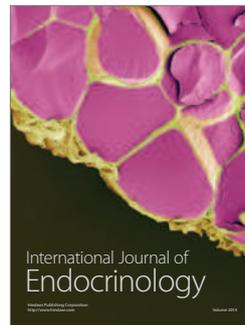
- a prospective study in hawaii," *Epidemiology*, vol. 5, no. 3, pp. 276–282, 1994.
- [25] R. Sinha, Y. Park, B. I. Graubard et al., "Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States," *American Journal of Epidemiology*, vol. 170, no. 9, pp. 1165–1177, 2009.
- [26] A. J. Cross, U. Peters, V. A. Kirsh et al., "A prospective study of meat and meat mutagens and prostate cancer risk," *Cancer Research*, vol. 65, no. 24, pp. 11779–11784, 2005.
- [27] D. S. Michaud, K. Augustsson, E. B. Rimm, M. J. Stampfer, W. C. Willet, and E. Giovannucci, "A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer," *Cancer Causes and Control*, vol. 12, no. 6, pp. 557–567, 2001.
- [28] H. zur Hausen, "Red meat consumption and cancer: reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 130, no. 11, pp. 2475–2483, 2012.
- [29] Y. Fradet, F. Meyer, I. Bairati, R. Shadmani, and L. Moore, "Dietary fat and prostate cancer progression and survival," *European Urology*, vol. 35, no. 5–6, pp. 388–391, 1999.
- [30] S. Koutros, A. J. Cross, D. P. Sandler et al., "Meat and meat mutagens and risk of prostate cancer in the agricultural health study," *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 17, no. 1, pp. 80–87, 2008.
- [31] S.-Y. Park, S. P. Murphy, L. R. Wilkens, B. E. Henderson, and L. N. Kolonel, "Fat and meat intake and prostate cancer risk: the Multiethnic Cohort Study," *International Journal of Cancer*, vol. 121, no. 6, pp. 1339–1345, 2007.
- [32] P. Wallström, A. Bjartell, B. Gullberg, H. Olsson, and E. Wirfält, "A prospective study on dietary fat and incidence of prostate cancer (Malmö, Sweden)," *Cancer Causes and Control*, vol. 18, no. 10, pp. 1107–1121, 2007.
- [33] R. J. Barnard, T. H. Ngo, P.-S. Leung, W. J. Aronson, and L. A. Golding, "A low-fat diet and/or strenuous exercise alters the IGF axis in vivo and reduces prostate tumor cell growth in vitro," *Prostate*, vol. 56, no. 3, pp. 201–206, 2003.
- [34] A. Comba, Y.-H. Lin, A. R. Eynard, M. A. Valentich, M. E. Fernandez-Zapico, and M. E. Pasqualini, "Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 30, no. 3–4, pp. 325–342, 2011.
- [35] M. Tada, E. Ichiishi, R. Saito, N. Emoto, Y. Niwano, and M. Kohno, "Myristic acid, a side chain of phorbol myristate acetate (PMA), can activate human polymorphonuclear leukocytes to produce oxygen radicals more potently than PMA," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 45, no. 3, pp. 309–314, 2009.
- [36] N. Kurahashi, M. Inoue, M. Iwasaki, S. Sasazuki, and S. Tsugane, "Dairy product, saturated fatty acid, and calcium intake and prostate cancer in a prospective cohort of Japanese men," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 17, no. 4, pp. 930–937, 2008.
- [37] P. N. Mitrou, D. Albanes, S. J. Weinstein et al., "A prospective study of dietary calcium, dairy products and prostate cancer risk (Finland)," *International Journal of Cancer*, vol. 120, no. 11, pp. 2466–2473, 2007.
- [38] M. Huncharek, J. Muscat, and B. Kupelnick, "Dairy products, dietary calcium and vitamin D intake as risk factors for prostate cancer: a meta-analysis of 26,769 cases from 45 observational studies," *Nutrition and Cancer*, vol. 60, no. 4, pp. 421–441, 2008.
- [39] K. A. Koh, H. D. Sesso, R. S. Paffenbarger Jr., and I.-M. Lee, "Dairy products, calcium and prostate cancer risk," *British Journal of Cancer*, vol. 95, no. 11, pp. 1582–1585, 2006.
- [40] H. D. Vlainac, J. M. Marinković, M. D. Ilić, and N. I. Kocev, "Diet and prostate cancer: a case-control study," *European Journal of Cancer—Part A*, vol. 33, no. 1, pp. 101–107, 1997.
- [41] E. Giovannucci, "Dietary influences of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D in relation to prostate cancer: a hypothesis," *Cancer Causes and Control*, vol. 9, no. 6, pp. 567–582, 1998.
- [42] S. E. Blutt, T. J. McDonnell, T. C. Polek, and N. L. Weigel, "Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2," *Endocrinology*, vol. 141, no. 1, pp. 10–17, 2000.
- [43] D. Gunnell, S. E. Oliver, T. J. Peters et al., "Are diet-prostate cancer associations mediated by the IGF axis? A cross-sectional analysis of diet, IGF-1 and IGFBP-3 in healthy middle-aged men," *British Journal of Cancer*, vol. 88, no. 11, pp. 1682–1686, 2003.
- [44] L.-Q. Qin, P.-Y. Wang, T. Kaneko, K. Hoshi, and A. Sato, "Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer," *Medical Hypotheses*, vol. 62, no. 1, pp. 133–142, 2004.
- [45] H. Meng, W. Hu, Z. Chen, and Y. Shen, "Fruit and vegetable intake and prostate cancer risk: a meta-analysis," *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, vol. 10, no. 2, pp. 133–140, 2014.
- [46] A. G. Schuurman, R. A. Goldbohm, E. Dorant, and P. A. van den Brandt, "Vegetable and fruit consumption and prostate cancer risk: a cohort study in the Netherlands," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 7, no. 8, pp. 673–680, 1998.
- [47] C. E. Harper, B. B. Patel, J. Wang, I. A. Eltoun, and C. A. Lamarinieri, "Epigallocatechin-3-gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice: mechanisms of action," *Prostate*, vol. 67, no. 14, pp. 1576–1589, 2007.
- [48] N. Kurahashi, S. Sasazuki, M. Iwasaki, and M. Inoue, "Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: A Prospective Study," *American Journal of Epidemiology*, vol. 167, no. 1, pp. 71–77, 2008.
- [49] N. E. Allen, C. Sauvaget, A. W. Roddam et al., "A prospective study of diet and prostate cancer in Japanese men," *Cancer Causes and Control*, vol. 15, no. 9, pp. 911–920, 2004.
- [50] N. Kikuchi, K. Ohmori, T. Shimazu et al., "No association between green tea and prostate cancer risk in Japanese men: the Ohsaki Cohort Study," *British Journal of Cancer*, vol. 95, no. 3, pp. 371–373, 2006.
- [51] R. L. Muller, E. F. Faria, G. F. Carvalhal et al., "Association between family history of prostate cancer and positive biopsies in a Brazilian screening program," *World Journal of Urology*, vol. 31, no. 5, pp. 1273–1278, 2013.
- [52] G. D. Steinberg, B. S. Carter, T. H. Beaty, B. Childs, and P. C. Walsh, "Family history and the risk of prostate cancer," *Prostate*, vol. 17, no. 4, pp. 337–347, 1990.
- [53] A. S. Whittemore, A. H. Wu, L. N. Kolonel et al., "Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada," *American Journal of Epidemiology*, vol. 141, no. 8, pp. 732–740, 1995.
- [54] C. Chao, R. Haque, S. K. Van Den Eeden, B. J. Caan, K.-Y. T. Poon, and V. P. Quinn, "Red wine consumption and risk of prostate cancer: the California men's health study," *International Journal of Cancer*, vol. 126, no. 1, pp. 171–179, 2010.
- [55] S. Rohrmann, J. Linseisen, T. J. Key et al., "Alcohol consumption and the risk for prostate cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition," *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 17, no. 5, pp. 1282–1287, 2008.

- [56] M. Rota, L. Scotti, F. Turati et al., "Alcohol consumption and prostate cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 21, no. 4, pp. 350–359, 2012.
- [57] M. Barba, S. E. McCann, H. J. Schünemann et al., "Lifetime total and beverage specific—alcohol intake and prostate cancer risk: a case-control study," *Nutrition Journal*, vol. 3, article 23, 2004.
- [58] R. A. Breslow, L. Wideroff, B. I. Graubard et al., "Alcohol and prostate cancer in the NHANES I epidemiologic follow-up study," *Annals of Epidemiology*, vol. 9, no. 4, pp. 254–261, 1999.
- [59] S. H. G. Andersson, T. Cronholm, and J. Sjövall, "Effects of ethanol on the levels of unconjugated and conjugated androgens and estrogens in plasma of men," *Journal of Steroid Biochemistry*, vol. 24, no. 6, pp. 1193–1198, 1986.
- [60] S. E. McGregor, K. S. Courneya, K. A. Kopciuk, C. Tosevski, and C. M. Friedenreich, "Case-control study of lifetime alcohol intake and prostate cancer risk," *Cancer Causes and Control*, vol. 24, no. 3, pp. 451–461, 2013.
- [61] E. A. Platz, M. F. Leitzmann, E. B. Rimm, W. C. Willett, and E. Giovannucci, "Alcohol intake, drinking patterns, and risk of prostate cancer in a Large Prospective Cohort Study," *American Journal of Epidemiology*, vol. 159, no. 5, pp. 444–453, 2004.
- [62] L. K. Dennis, "Meta-analysis for combining relative risks of alcohol consumption and prostate cancer," *Prostate*, vol. 42, no. 1, pp. 56–66, 2000.
- [63] L. A. Plaskon, D. F. Penson, T. L. Vaughan, and J. L. Stanfordz, "Cigarette smoking and risk of prostate cancer in middle-aged men," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 12, no. 7, pp. 604–609, 2003.
- [64] A. W. Hsing, J. K. McLaughlin, L. M. Schuman et al., "Diet, tobacco use, and fatal prostate cancer: results from the Lutheran Brotherhood Cohort study," *Cancer Research*, vol. 50, no. 21, pp. 6836–6840, 1990.
- [65] E. Giovannucci, E. B. Rimm, A. Ascherio et al., "Smoking and risk of total and fatal prostate cancer in United States health professionals," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 8, no. 4, part 1, pp. 277–282, 1999.
- [66] J. Ye, S. Wang, M. Barger, V. Castranova, and X. Shi, "Activation of androgen response element by cadmium: a potential mechanism for a carcinogenic effect of cadmium in the prostate," *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, vol. 19, no. 3, pp. 275–280, 2000.
- [67] W. S. Dai, J. P. Gutai, L. H. Kuller, and J. A. Cauley, "Cigarette smoking and serum sex hormones in men," *American Journal of Epidemiology*, vol. 128, no. 4, pp. 796–805, 1988.



# Hindawi

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



## Research Article

# Protective Effect of Green Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) against Prostate Cancer: From In Vitro Data to Algerian Patients

Somia Lassed,<sup>1,2,3</sup> Cláudia M. Deus,<sup>4</sup> Radja Djebbari,<sup>1,2</sup> Djamila Zama,<sup>1</sup> Paulo J. Oliveira,<sup>4</sup> Albert A. Rizvanov,<sup>5</sup> Abderrezak Dahdouh,<sup>3</sup> Fadila Benayache,<sup>1</sup> and Samir Benayache<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria

<sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie Animale, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria

<sup>3</sup>Clinic of Urology-Nephrology and Kidney Transplant Daksi, Constantine, Algeria

<sup>4</sup>CNC-Center for Neuroscience and Cellular Biology, UC-Biotech Building, Biocant Park, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>5</sup>Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Correspondence should be addressed to Paulo J. Oliveira; pauloliv@cnc.uc.pt

Received 1 August 2016; Revised 19 November 2016; Accepted 5 December 2016; Published 4 January 2017

Academic Editor: Michael Silbermann

Copyright © 2017 Somia Lassed et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Green tea (GT) has been studied for its effects as antioxidant and cancer-preventive agent. Epidemiological studies showed that GT consumption decreases the risk for prostate cancer (PC). To investigate whether erythrocyte oxidative stress (OS) is associated with PC and whether daily consumption of GT improves the oxidative phenotype, we performed a study in a group of Algerian PC patients, preceded by an in vitro study to characterize composition and antioxidant/antiproliferative activities of the GT used. This contained a high content of phenolic and flavonoid compounds, demonstrating in vitro antioxidant activity and significant antiproliferative effect on human prostate cancer PC-3 cell line. Seventy PC patients and 120 age-matched healthy subjects participated in the study, with glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and catalase activity evaluated before and after GT consumption. The results showed a reduced GSH and catalase activity and a high level of MDA in erythrocytes from PC patients. The consumption of 2-3 cups per day of GT during 6 months significantly increased GSH concentration and catalase activity and decreased MDA concentration. In conclusion, GT significantly decreased OS in Algerian PC patients. Regular consumption of GT for a long period may prevent men from developing PC or at least delay its progression.

## 1. Introduction

Prostate cancer (PC) is the second most common malignancy diagnosed in men and the fifth leading cause of mortality in the world. In fact, PC was one of the most frequently diagnosed male neoplasias and the sixth leading cause of death in Algeria in 2012 [1]. As in most cancers, the etiological factors of PC still remain poorly understood although many studies suggested that aging [2, 3], diet [4], and inflammation [5] are involved in PC development and progression, with oxidative stress possibly being a common link. In fact, several studies in humans showed significant alterations in oxidant-antioxidant balance in PC patients when compared to controls. Significant high levels of malondialdehyde,

ceruloplasmin, and lower levels of reduced glutathione and glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase activities were observed in PC patient blood [6–8].

Green tea, a beverage prepared from the dry leaves of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, has been extensively studied for its effect as a potent antioxidant [9, 10] and on cancer prevention [11–13]. Epidemiological studies found that green tea consumption may decrease the risk for PC [14, 15]. Using PC cell lines, it was demonstrated that green tea polyphenols, especially catechins, the major species, inhibit carcinogenesis through different mechanisms of action including induction of cell cycle arrest [16], apoptosis [17], inhibition of the insulin-like growth factor receptor [18] and androgen receptor downregulation by interaction with its ligand-binding

domain [19]. In many preclinical trials, the administration of an oral infusion of green tea catechins in TRAMP (transgenic adenocarcinoma of mouse prostate) mice confirmed the efficacy of green tea in decreasing PC progression [20, 21]. However, few studies were performed in human [22–24] with only a few finding encouraging results [22, 24].

The current study aimed to investigate whether PC was associated with increased oxidative stress in erythrocytes in a set of Algerian patients and whether green tea intake inversely correlated with oxidative stress, a possible factor involved in PC development and progression. We selected a popular type of commercial Chinese green tea in Algeria and measured its phenol and flavonoid content, as well as antioxidant and antiproliferative activities *in vitro*. In the follow-up translational step, we evaluated oxidative stress markers in peripheral blood in Algerian PC patients before and after green tea consumption.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Materials.** Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, D5648), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, 1640), penicillin, streptomycin, fetal bovine serum (FBS), and 0.25% Trypsin-EDTA were purchased from Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY). Sodium chloride (NaCl), sulforhodamine B sodium salt (SRB), Tris, and trypan-blue solution were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA). Ellman's Reagent (DTNB, D8130), thiobarbituric acid (TBA, T5500), L-glutathione reduced (GSH, G4251) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents and chemical compounds used were of the greatest degree of purity commercially available. In the preparation of every solution, including buffers, ultrapure distilled water (conductivity  $< 18 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), filtered by the Milli-Q from a Millipore (Billerica, MA) system, was always used in order to minimize as much as possible contamination with metal ions.

### 2.2. Experimental Approach: *In Vitro*

**2.2.1. Green Tea Extraction.** Two thousand grams of commercial Chinese green tea leaves of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze plant was macerated with EtOH/H<sub>2</sub>O (7 : 3 v/v) for 48 h three successive times. The combined filtrate was dried by evaporation and the ethanolic extract obtained was solubilized in 800 mL H<sub>2</sub>O. The aqueous filtrate was successively extracted with chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc), and *n*-butanol (*n*-BuOH). The organic phases were concentrated in vacuum to obtain the following extracts: (CHCl<sub>3</sub>) (4.7 g), EtOAc (27.66 g), and *n*-BuOH (46.31 g).

**2.2.2. Determination of Total Phenolic and Flavonoid Content.** The total phenolic content in green tea extracts (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, and *n*-BuOH) was measured using the method of Singleton et al. [25]. To 20  $\mu\text{l}$  of each green tea extract prepared in methanol (1 mg/ml), 100  $\mu\text{l}$  of Folin-Ciocalteu and 1580  $\mu\text{l}$  of distilled water were added successively, flowed three min later by 300  $\mu\text{l}$  of sodium carbonate (20%). Samples were stirred for 2 h at room temperature, and the absorbance was

then evaluated at 765 nm. The concentration of total phenolic compounds was determined as  $\mu\text{g}$  of gallic acid equivalent (GAE) per mg of extract using a standard curve which was prepared using gallic acid solutions (0 to 500 mg/ml) solubilized in MeOH/H<sub>2</sub>O (1 : 9 v/v).

The total flavonoid content in green tea extracts was determined according to the method of Wang et al. [26]. 0.5 ml of 2% AlCl<sub>3</sub> was mixed with 0.5 ml of sample. After 1 h incubation at room temperature, the absorbance was measured at 420 nm. The concentration of flavonoids was determined as  $\mu\text{g}$  of quercetin equivalent (QE) per mg of extract using standard quercetin calibration curve.

**2.2.3. HPLC-TOF/MS Analysis of Green Tea Extracts.** To analyze the phenolic content of the different green tea extracts, high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS) analysis was used. Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System was coupled to a 6210 time-of-flight (TOF) LC/MS detector and ZORBAX SB-C18 (4,6  $\times$  100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) column. The mobile phases A and B were ultrapure water solution with 0.1% formic acid and acetonitrile, respectively. Flow rate was 0.6 ml/min and column temperature was 35°C. The green tea extracts (200 ppm) and stock solutions of 23 standard phenolic compounds (2.5 ppm) were prepared in methanol at room temperature. The samples were filtered passing through a PTFE (0.45  $\mu\text{m}$ ) filter by an injector to remove particulates. The injection volume was 10 ml and the solvent program was as follows: 0 min 10% B; 0–1 min 10% B; 1–20 min 50% B; 20–23 min 80% B; 23–25 min 10% B; 25–30 min 10% B. The ionization mode of MS-TOF instrument was ES negative with gas temperature of 325°C, gas flow of 10.0 l/min, and nebulizer of 40 (psi). The phenolic content of green tea extracts was determined by comparing retention times and *m/z* values of green tea extracts and standard phenolic compounds.

### 2.2.4. Evaluation of the Antioxidant Activity

**(1) DPPH Radical-Scavenging Activity Assay.** The ability of green tea extracts to quench DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical was evaluated by the method of Braca et al. [27]. To increasing concentrations (1, 2.5, 5, 10, 20, and 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of methanol-dissolved extracts, 3 ml of methanol DPPH solution (0.004%) was added. Test tubes were incubated at room temperature for 30 min, and absorbance was then measured at 517 nm. Tests were carried out in triplicate and ascorbic acid was used as positive control. The percentage of DPPH scavenging activity (*I*%) was calculated using the following equation (1):

$$I\% = \left[ \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100, \quad (1)$$

where  $A_0$  is the absorbance of DPPH solution alone and  $A_1$  is the absorbance of DPPH solution + extract or vitamin C. The half inhibition concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of green tea extracts was calculated from the plot of percentage of inhibition against concentration of green tea extracts.

(2) *Inhibition of Lipid Peroxidation.* The lipid peroxidation assay was performed according to the modified protocol of Cao and Ikeda using egg *vitellolose* [28]. To evaluate the capacity of green tea extracts to inhibit lipid peroxidation, 0.5 ml of 10% egg *vitellolose* homogenate as lipid-rich media was mixed with 50  $\mu$ l of FeSO<sub>4</sub> (0.07 M) and then incubated with increasing concentrations of green tea extracts or vitamin C at 37°C for 30 min. After incubation, 1 ml TCA 20% (trichloroacetic acid) and 1.5 ml TBA 1% (thiobarbituric acid) were successively added. The samples were mixed and then heated for 15 min at 95°C. After centrifugation (400g for 20 min), the resulting thiobarbituric reacting substances (TBARS) were measured in the supernatant at 532 nm. The lipid peroxidation inhibition was calculated as percentage (*I*%) according to (1), where *A*<sub>0</sub> is the absorbance of the control (without extract or vitamin C) and *A*<sub>1</sub> is the absorbance of sample + extract or vitamin C.

### 2.2.5. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Green Tea Extracts

(1) *Cell Culture and Treatments.* The human metastatic prostate cancer cell line PC-3 [29] and human foreskin BJ fibroblasts [30], purchased from America Tissue Type Collection (Manassas, VA), were cultured in RPMI (1640) and DMEM (D5648) media, purchased from Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY), supplemented with 1.5 g/l sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml of penicillin, and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin in tissue-culture dishes at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. All cells were passaged by trypsinization when reaching 70–80% confluence and all experiments were performed in log-phase growth cultures. Green tea extracts (ChCl<sub>3</sub>, EtOAc, and *n*-BuOH) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at 4°C in the dark. The total volume of DMSO was always smaller than 0.1%, which had negligible effects in all experiments. Green tea extracts were directly added to the culture medium at the described concentrations. Vehicle controls received an equivalent amount of DMSO only.

(2) *Cell Proliferation Measurements.* The sulforhodamine B (SRB) assay was used to measure cell protein, which is dependent on the amount of cells in each well [31]. In the present study, we used both human foreskin BJ fibroblasts, which have a long lifespan and are commonly used as a nontumor control cell line [32, 33] and the human PC-3 cell line, commonly used as an *in vitro* model for PC studies [29]. Both cell lines were seeded in 48-well plates with a final volume of 500  $\mu$ l per well at a density of 10,000 and 20,000 cells per ml, respectively. The two cell lines were treated with increasing concentrations of green tea extracts (5, 10, 25, and 50  $\mu$ g/ml). Twenty-four hours after drug addition, the incubation medium was removed, wells rinsed with 1% PBS, and cells were fixed in 1% acetic acid in ice-cold methanol for at least one day. Cells were then incubated with 0.05% (w/v) SRB reagent dissolved in 1% acetic acid for 1 h at 37°C. Unbound dye was removed with 1% acetic acid. Dye bound to cell proteins was extracted with 10 mM Tris-base solution, pH 10. After SRB labeling, absorbance was measured at 540 nm

in a plate reader and the amount of dye released which is proportional to the number of cells present in the dish was measured [31]. The results were expressed as a percentage of control.

### 2.3. Human Studies

2.3.1. *Study Subjects.* Ninety patients diagnosed with histologically confirmed PC at the Clinic of Urology-Nephrology and Kidney Transplant Daksi, Constantine, Algeria, were interviewed and invited to participate in the study. Patients received oral and written information about the study and gave their written consent. Three patients refused to participate. Eighty-seven volunteers received the same brand of green tea after the evaluation of its antioxidant and cytotoxic effect (*in vitro* approach). The offered quantity of green tea was weighed and divided into doses of 2 g for each. Subjects were asked to drink 5 cups of green tea infusion per day for 6 months. Green tea was prepared every day at the same temperature (70–80°C), time of infusion (5 minutes), and concentration (2 g of tea leaves in 100 ml of water for each cup) [34]. The information about total Gleason score, serum PSA level at diagnosis, and primary treatment taken for patients were obtained from the medical record. No smoking or alcohol drinking age-matched 120 healthy subjects were selected carefully in the Clinic of Urology-Nephrology and Kidney Transplant Daksi, Constantine, Algeria, and in the blood sample collection room of the Laboratory of Biochemistry of Establishment Public Hospital of Chelghoum Laid City, Algeria. Controls were divided into two groups: green tea drinkers (*n* = 35) and nontea drinkers (*n* = 85). The Ethics Committee of the EHS Daksi certified that the data collection was performed at the Department of Urology and Renal Transplant without any risk for patients.

2.3.2. *Samples Collection and Preparation of Hemolysates.* Heparinized venous blood samples were collected after an overnight fast. Patients sample collection was at the beginning (*T* = 0), after green tea consumption (*T* = 3 months) (*T* = 6 months). Blood samples were immediately centrifuged at 300g for 15 min and then serum aliquots were removed and stored at –80°C until assayed. Erythrocytes were washed three times by centrifugation (300g, 15 min) in an ice-cold isotonic sodium chloride solution (1:10, v/v). The supernatant and buffy coat of white cells was carefully removed after each wash. A portion of the erythrocytes obtained were used for GSH determination, while the remaining was resuspended in the washing solution to give a 50% suspension. Hemolysis of the washed cell suspension was achieved by mixing 1 volume of cells with 9 volumes of cold distilled water. After removing the cell debris by centrifugation (300g, 15 min), the hemolysate obtained was used for determination of enzymatic activity of CAT and TBARS measurement. The hemoglobin content in the red blood cell lysate was measured according to the cyanmethemoglobin method using Drabkin's reagent [35].

2.3.3. *Biochemical Assays.* The GSH concentration was measured using the method described by Beutler et al. [36].

Briefly, 0.2 ml fresh erythrocytes pellet was added to 1.8 ml distilled water followed by 3 ml precipitating solution (1.65 g metaphosphoric acid, 0.2 g EDTA, and 30 g NaCl in 100 ml distilled water). The mixture was allowed to stand 5 min and centrifuged next (300g, 15 min). Eight ml of 0.3 mM disodium phosphate solution and 1 ml of DTNB were added to 2 ml of supernatant. A blank was prepared replacing erythrocytes for 0.2 ml of distilled water. GSH standard was prepared with 0.2 ml the glutathione solution, 8 ml of 0.3 mM disodium phosphate solution, and 1 ml of DTNB. The optical density was measured at 412 nm in a spectrophotometer.

Erythrocytes catalase (EC 1.11.1.6) activity was estimated in the hemolysate following the method of Greenwald (1985) [37] based on the scavenging of hydrogen peroxide (0.019 M) in the presence of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) by catalase present in the sample. Catalase activity was expressed as international unit per g hemoglobin (UI/gHb).

Lipid peroxidation in erythrocytes was evaluated by measuring malondialdehyde (MDA) in the hemolysate according to the double heating method (Draper and Hadley (1990)) [38]. This method is based on the reaction of lipid peroxides (MDA) with thiobarbituric acid (TBA, 0.67%) in acidic environment (TCA, 10%) at 90–100°C to form a pink pigment with absorption maximum at 532 nm. The concentration of MDA was calculated by the absorbance coefficient of MDA-TBA complex  $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  and was expressed in  $\mu\text{mol/gHb}$ .

### 3. Statistical Analysis

Sulfurhodamine B results were expressed as mean  $\pm$  SEM and multiple comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparisons test. Data from human studies were expressed as mean  $\pm$  SD and differences between the different groups were using a Student's *t* test. Significance was accepted with  $p < 0.05$ .

## 4. Results

### 4.1. In Vitro Characterization of Green Tea Composition and Activity

**4.1.1. Total Phenolic and Flavonoid Content of Green Tea Extracts.** Total phenolic and flavonoid content in the different green tea extracts obtained showed a high concentration of phenolic and flavonoid compounds especially in the EtOAc and *n*-BuOH extracts. The latter contained  $548.33 \pm 54.62$  and  $394.66 \pm 22.67 \mu\text{g}$  of gallic acid equivalent/mg extract of phenolic compounds and  $12.16 \pm 0.01$  and  $31.20 \pm 0.1 \mu\text{g}$  of quercetin equivalent/mg extract of flavonoid compounds, respectively. The  $\text{CHCl}_3$  extract contained minor amounts of phenolic and flavonoid compounds, namely,  $82.33 \pm 5.04 \mu\text{g}$  of gallic acid equivalent/mg extract of phenolic compounds and  $5.04 \pm 0.59 \mu\text{g}$  of quercetin equivalent/mg extract of flavonoid compounds (Figure 1).

**4.1.2. Evaluation of Phenolic Content of Green Tea Extracts Using HPLC-TOF/MS.** Analysis by HPLC-TOF/MS revealed

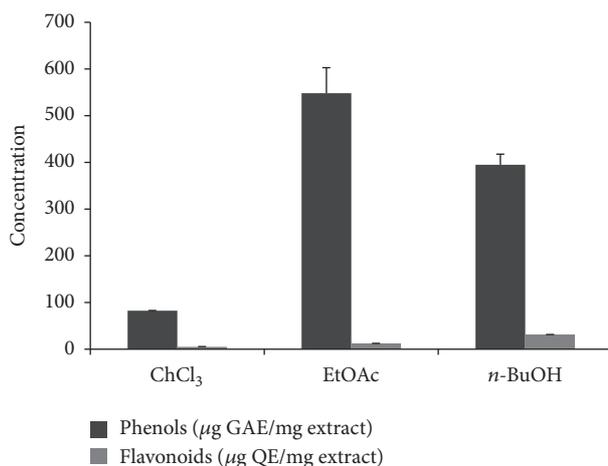


FIGURE 1: Total phenolic and flavonoid content of green tea extracts, measured as described in Materials and Methods. Concentrations of total phenolic compounds are expressed as  $\mu\text{g}$  of gallic acid equivalent (GAE) per mg of extract and total flavonoids are expressed as  $\mu\text{g}$  of quercetin equivalent (QE) per mg of extract. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

the presence of different phenols in the different green tea extracts. Using 23 standard phenolic compounds, seventeen different phenols were detected in the EtOAc and *n*-BuOH extracts. A high amount of gallic acid and catechins and relevant amounts of vanillic acid, salicylic acid, rutin, and *p*-coumaric acid were found in the EtOAc extract. The *n*-BuOH extract contains also a high amount of gallic acid followed by rutin, gentisic acid, salicylic acid, and chlorogenic acid. Fifteen phenols were detected in the  $\text{CHCl}_3$  extract although all present in small amounts (Figure 2, Table 1).

**4.1.3. Antioxidant Activity of Green Tea Extracts.** No significant antioxidant activity was observed for the  $\text{CHCl}_3$  extract but significant effects were found with EtOAc and *n*-BuOH extracts. Compared to vitamin C ( $\text{IC}_{50} = 5 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ ), EtOAc and *n*-BuOH extracts also significantly quenched the DPPH radical ( $\text{IC}_{50} = 2.98 \pm 0.32$  and  $7.58 \pm 0.74$ , resp.) and their effects were dose-dependent. The highest percentages of DPPH inhibition were, respectively, 93.4% and 93.2%, which were similar to vitamin C in the same concentration ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) (Figure 3(a), Table 2).

A dose-dependent decrease in lipid peroxidation was also observed with EtOAc ( $\text{IC}_{50} = 201.01 \pm 2.55 \mu\text{g/ml}$ ) and *n*-BuOH ( $\text{IC}_{50} = 302.18 \pm 28.31 \mu\text{g/ml}$ ) extracts, although the effects were not comparable to those of vitamin C ( $\text{IC}_{50} = 20 \pm 1.06 \mu\text{g/ml}$ ) (Figure 3(b), Table 2).

**4.1.4. Cytotoxicity of Green Tea Extracts on Human Prostate Cancer PC-3 Cell Line.** The results regarding cytotoxicity activity using the SRB assay indicated that green tea extracts showed significant antiproliferative activity against the human prostate cancer PC-3 cell line. Dose-dependent toxicity on that cell line was observed after 24 h treatment with EtOAc and *n*-BuOH extracts, with  $\text{IC}_{50}$  values of 36.37 and 37.74  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. However, no effects were

TABLE 1: The different phenols revealed in the green tea extracts and their levels (expressed as mg per kg of dry leaves of green tea).

Phenols	Phenolic content of green tea extracts (mg phenolic/kg plant)		
	CHCl <sub>3</sub> extract	EtOAc extract	<i>n</i> -BuOH extract
Gallic acid	0.25	777.93	1344.96
Gentisic acid	0.15	ND	102.14
Catechins	0.04	174.95	ND
Chlorogenic acid	ND	2.37	21.18
4-Hydroxybenzoic acid	0.31	ND	1.8
Protocatechuic acid	0.03	2.49	3.51
Caffeic acid	0.04	7.43	5.66
Vanillic acid	5.00	46.31	20.04
4-Hydroxybenzaldehyde	0.3	0	ND
Rutin	0.11	22.2	646.29
<i>p</i> -Coumaric acid	0.70	15.00	4.18
Ellagic acid	0.51	0.85	1.35
Chicoric acid	ND	0.2	0.67
Ferulic acid	ND	ND	1.92
Hesperidin	ND	0.65	2.5
Apigenin 7-glucoside	ND	0	1.96
Rosmarinic acid	0.03	0.237	ND
Protocatechuic acid ethyl ester	ND	0.05	0
Salicylic acid	6.5	34.69	21.23
Resveratrol	ND	ND	0.08
Quercetin	0.71	ND	ND
Naringenin	0.08	0.35	ND
Kaempferol	ND	ND	0.43

ND: not detected.

TABLE 2: IC<sub>50</sub> values of antioxidant activities of green tea extracts and vitamin C in DPPH and LPO assays, obtained from Figure 2 data. Values are mean ± SD (*n* = 3).

Extracts and standards	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	
	DPPH	LPO
CHCl <sub>3</sub>	207.94 ± 3.12	—
EtOAc	2.98 ± 0.32	201.01 ± 2.55
<i>n</i> -BuOH	7.58 ± 0.74	302.18 ± 28.31
Vitamin C	5 ± 0.1	20 ± 1.06

observed on the nontumor, control fibroblast BJ cell line with both extracts. No cytotoxicity effects were observed in any of the cell lines tested after 24 h treatment by increasing concentrations of CHCl<sub>3</sub> extract (Figure 4).

#### 4.2. Human Studies

**4.2.1. Study Subjects.** At the beginning of the study, 87 PC patients accepted to participate and regularly received green tea. After 6 months, 17 patients were excluded from the study

(6 patients died during the study, 3 refused to continue the study after 3 months, and 8 did not drink tea or drank it only a few times during the entire period of the analysis). The cohort investigated consisted then in 70 PC patients with median age of 70.64 ± 6.5 years and median serum PSA level of 62.73 ± 33.97 ng/ml. The Gleason score at diagnosis was between 5 and 7 in 40% of cases and between 8 and 10 in 60% of cases. Eleven percent of cases underwent prostatectomy followed by hormone therapy, 11% underwent radiotherapy associated with hormone therapy, 49% were under hormone therapy, and 29% were under chemotherapy associated with hormone therapy. Controls were 85 age-matched healthy subjects which never or rarely drank green tea (median age 68.5 ± 6.56 years, *p* = 0.1169) and 35 age-matched healthy subjects who normally drank 1 to 3 cups of green tea per day for at least 1 year (median age 68.81 ± 6.42 years, *p* = 0.2537) (Table 3).

**4.2.2. Level of Lipid Peroxidation and Antioxidants Status.** To assess oxidative stress in erythrocytes from PC patients, lipid peroxidation and antioxidants were measured in erythrocytes before starting the green tea drinking protocol (T<sub>0</sub>). Significant alterations in reduced glutathione (GSH) level and in catalase activity were observed and a high level of MDA was found in PC patient's erythrocytes as compared to controls that never or rarely drank tea. GSH (mg/dl) was 20.79 ± 4.32 versus 40.51 ± 4.87 (*p* < 0.0001), CAT (UI/gHb) was 15.29 ± 1.75 versus 23.84 ± 2.03 (*p* < 0.0001), and MDA (nmol/gHb) was 99.52 ± 12.49 versus 33.83 ± 5.14 (*p* < 0.0001) (Figure 5). No significant difference was observed in GSH level between control individuals who regularly drank 1 to 3 cups of green tea per day and those that never or rarely drank tea (42.02 ± 4.23 mg/dl versus 40.51 ± 4.87 mg/dl), but catalase activity was higher (25.94 ± 1.81 UI/gHb versus 23.84 ± 2.03 UI/gHb, *p* < 0.005) and MDA level was lower (29.98 ± 4.73 nmol/gHb versus 33.83 ± 5.14 nmol/gHb, *p* < 0.05) in those individuals drinking green tea (Figure 5).

After three months of green tea consumption (2 to 3 cups per day), the levels of lipid peroxidation and antioxidants in erythrocytes of PC patients were evaluated again. Significant increases in GSH level (to 31.58 ± 2.57 mg/dl, *p* < 0.0001) and in catalase activity (to 17.23 ± 1.51 UI/gHb, *p* < 0.05) were observed and a significant decrease in MDA level was found (to 85.84 ± 12.05 nmol/gHb, *p* < 0.01) (Figure 5).

After another three months of green tea drinking, reduced GSH significantly increased to 34.36 ± 3.64 mg/dl, *p* < 0.0001 and catalase activity to 22.19 ± 1.78 UI/gHb, *p* < 0.0001. Furthermore, MDA level further decreased to 45.16 ± 7.45 nmol/gHb, *p* < 0.0001 (Figure 5).

## 5. Discussion

The excessive production of ROS, unbalance in antioxidant defense systems, or both combined may cause oxidative stress in different cell compartments, triggering cell signaling processes associated with initiation and development of many diseases including PC. Evidence suggests that PC progress is associated with increased oxidative stress [39]. Several possible mechanisms may contribute to increased ROS

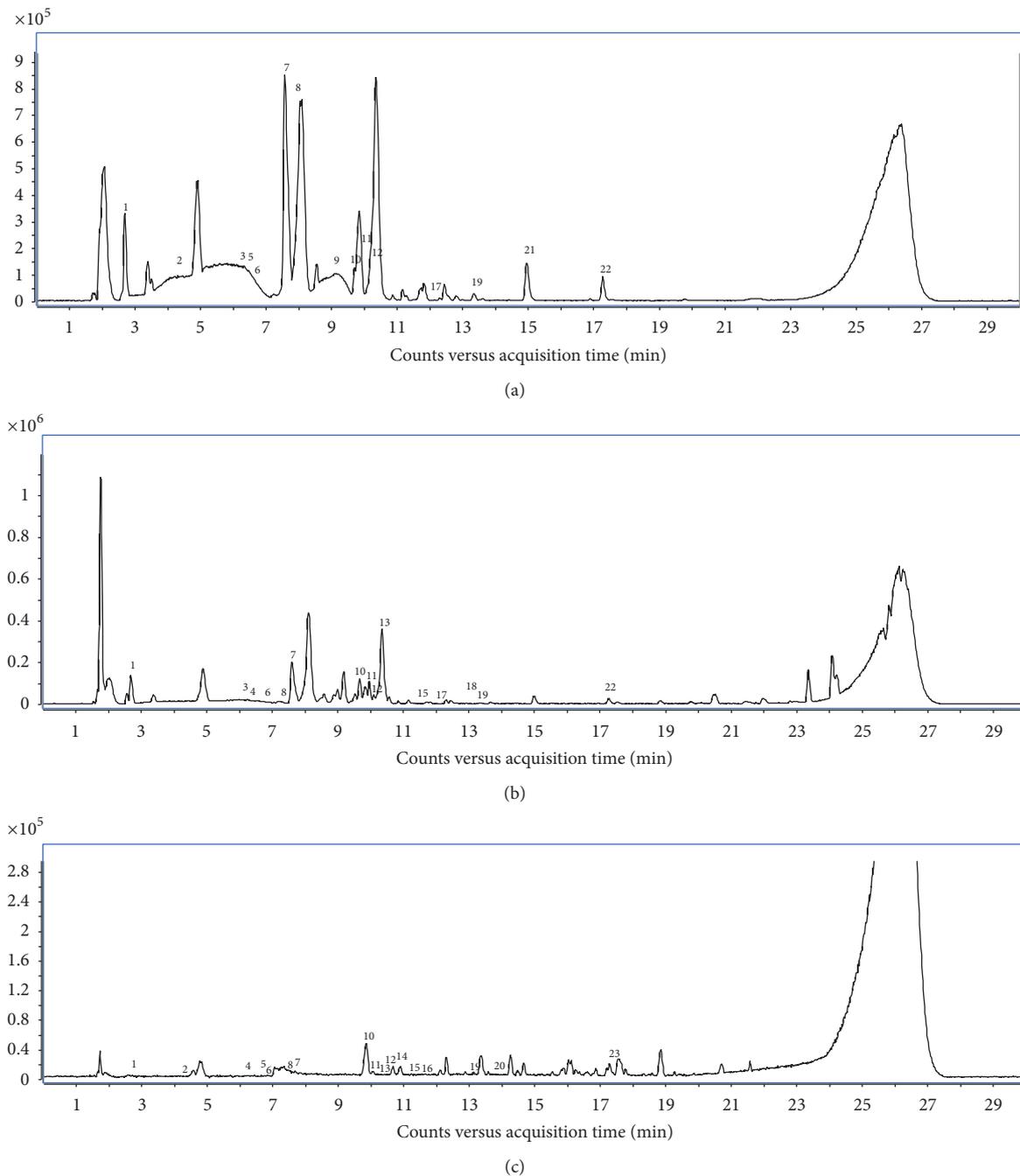


FIGURE 2: Chromatograms of green tea extracts. (a) Chromatogram of chloroformic ( $\text{CHCl}_3$ ) green tea extract. (b) Chromatogram of ethyl acetate ( $\text{EtOAc}$ ) green tea extract. (c) Chromatogram of *n*-butanol (*n*-BuOH) green tea extract. The chromatographic conditions were described in Materials and Methods. The phenols detected by HPLC-TOF/MS analysis are expressed as numbers from 1 to 23.

generation associated with PC development and progression including inflammation, diet, aging, NADPH oxidase, steroid hormones, and mitochondrial and nuclear DNA mutations [39]. A number of studies have investigated the effect of antioxidant supplements in preventing or reducing the risk of PC, although the results are still conflicting [40]. In the current study, we tested the capacity of green tea, described to have a general antioxidant property [10] to reduce oxidative

stress in PC patients. A group of Algerian patients with PC were tested with a commercial Chinese green tea. For the safety of patients and to confirm the antioxidant/anti-proliferative activity of the Chinese green tea used, we first investigated its composition and its effects *in vitro*. The commercial green tea used was first extracted using different solvents ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{EtOAc}$ , and *n*-BuOH), followed by evaluating phenolic and flavonoid content, as well as each extract

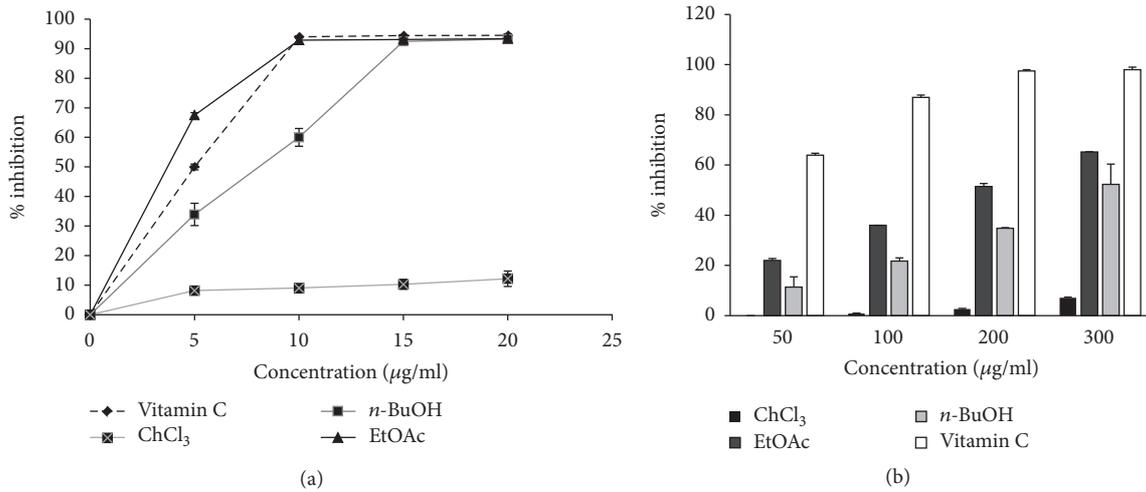


FIGURE 3: Antioxidant activity of green tea extracts. (a) DPPH scavenging activities of green tea extracts and vitamin C, measured as described in Materials and Methods. (b) Effect of green tea extracts and vitamin C on inhibition of FeSO<sub>4</sub>-induced lipid peroxidation of egg vitellose, measured as previously described in Materials and Methods. Values are mean ± SD (*n* = 3).

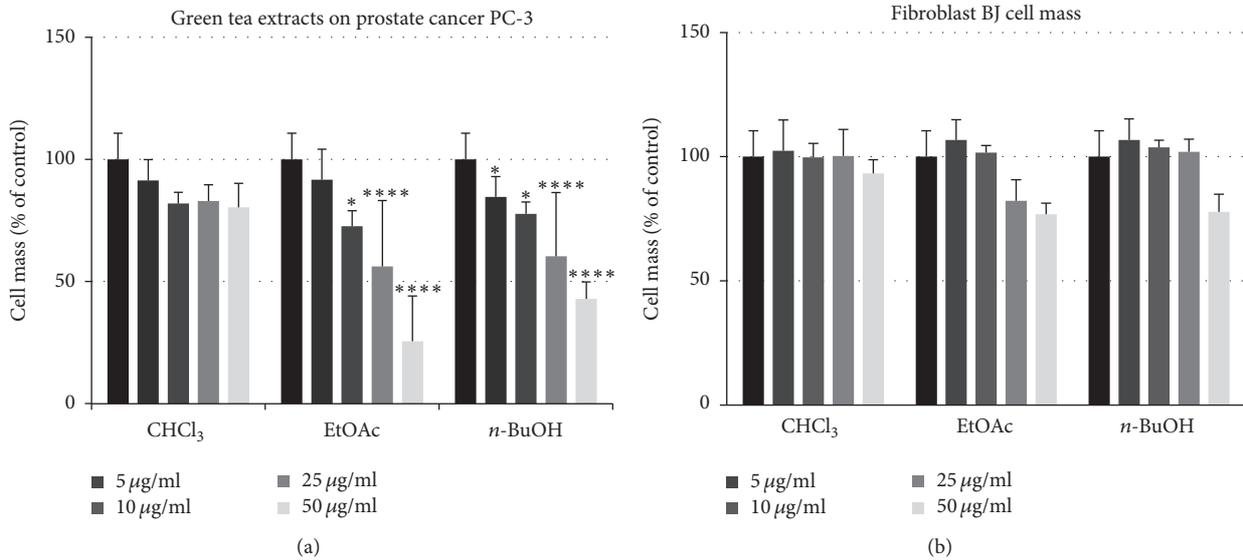


FIGURE 4: Effects of green tea extracts on prostate cancer PC-3 and fibroblast BJ cell mass. The control value (vehicle only) was determined as 100% to account for the differential proliferation of cell lines. Data are expressed as the means ± SEM of four different experiments, \* *p* < 0.05, \*\*\*\* *p* < 0.0001 versus control, nontreated cells.

antioxidant and antiproliferative activity. We confirmed here that the green tea used, namely, the extracts obtained, had significant antioxidant activity. Unlike the ChCl<sub>3</sub> extract which contained very few amounts of phenols and flavonoids, the EtOAc and n-BuOH extracts significantly quenched the DPPH radical and inhibited lipid peroxidation. In addition, these two latter extracts showed a significant antiproliferative effect against the human PC-3 prostate cancer cell line. The simultaneous antioxidant and antiproliferative effects observed may be ascribed to their rich content of phenols and flavonoids [10, 41]. In fact, gallic acid [42, 43] and rutin [44] in both EtOAc and n-BuOH extracts and catechins [17, 45] in the EtOAc extract are present within significant amounts

and are known for their antioxidant and antiproliferative activity. In fact, the literature demonstrates that often natural compounds can act as both antioxidants and anticancer agents, taking advantage of the particular redox environment and signaling pathways in cancer cells [46, 47]. Interestingly, all green tea extracts used did not show any cytotoxicity effect in the normal BJ fibroblasts, which was an indirect confirmation that the use of the green tea chosen was safe generally for patients.

Seventy PC patients and 120 age-matched healthy subjects participated in the current study. The evaluation of lipid peroxidation and the antioxidant markers in the subset of Algerian PC patient's erythrocytes at the beginning of the

TABLE 3: Patients and respective control data.

	Patients, <i>n</i> (%)	Controls-tea <sup>1</sup> , <i>n</i> (%)	Controls + green tea <sup>2</sup> , <i>n</i> (%)
No. of subjects	70	85	35
Mean age ± SD	70.64 ± 6.5	68.5 ± 6.56	68.81 ± 6.42
<i>p</i> value <sup>a</sup>		0.1169 <sup>b</sup>	0.2537 <sup>c</sup>
Mean PSA ± SD (ng/ml)	62.73 ± 33.97	1.43 ± 0.92	1.27 ± 0.97
<i>p</i> value <sup>c</sup>		<0.0001 <sup>b</sup>	<0.0001 <sup>c</sup>
Gleason score			
5–7	28 (40)	—	—
8–10	42 (60)	—	—
Treatment			
Prostatectomy + hormone therapy	8 (11)	—	—
Radiotherapy + hormone therapy	8 (11)	—	—
Hormone therapy	34 (49)	—	—
Chemotherapy + hormone therapy	20 (29)	—	—

<sup>1</sup>Control individuals who never or rarely drank tea; <sup>2</sup>control individuals who usually drank 1 to 3 cups of green tea per day; <sup>a</sup>based on unpaired *t* test; <sup>b</sup>comparing PC patients to control individuals who never or rarely drank tea; <sup>c</sup>comparing PC patients to controls who usually drank 1 to 3 cups of green tea per day; PSA = prostate-specific antigen.

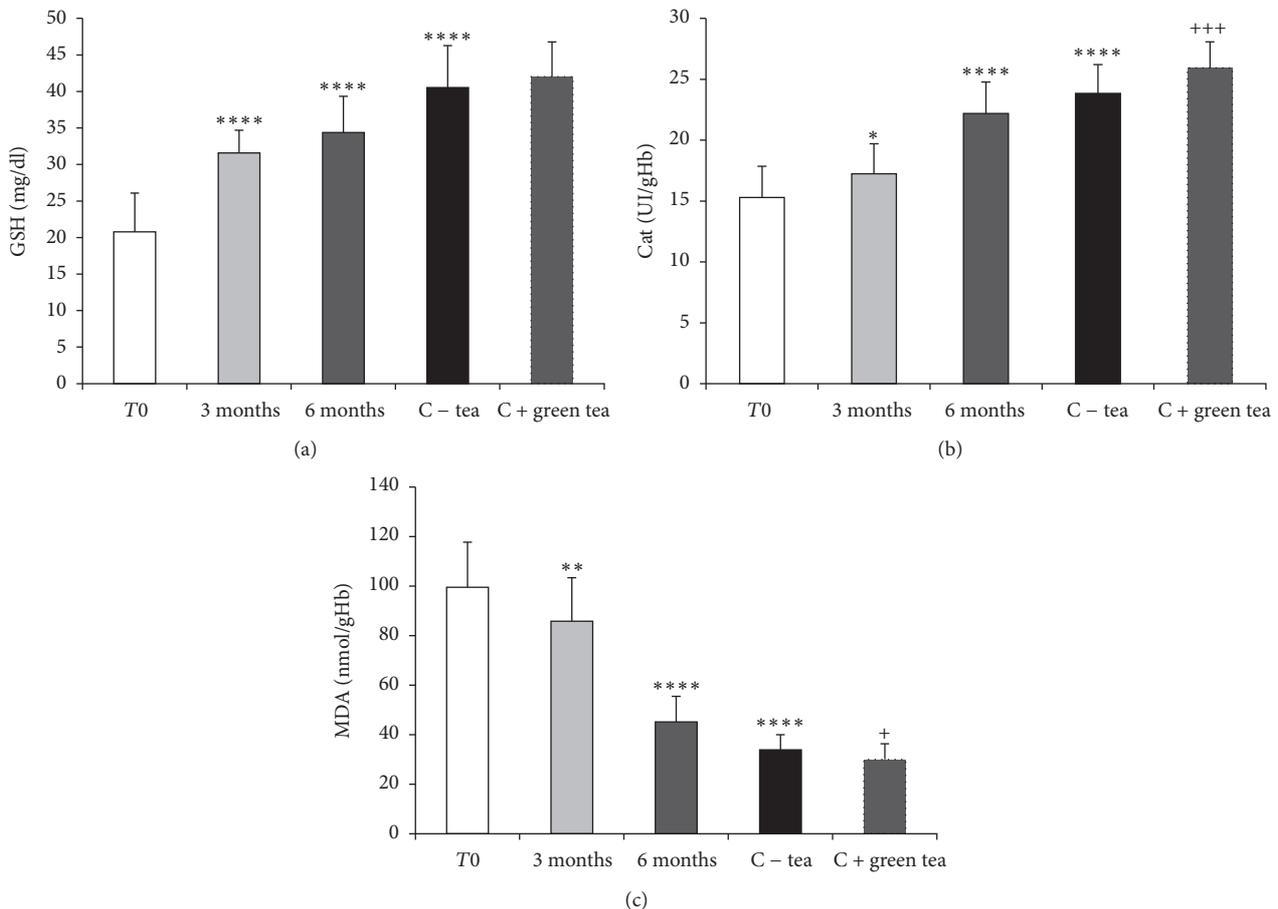


FIGURE 5: Effect of green tea consumption on lipid peroxidation and antioxidants status in erythrocytes from controls individuals and PC patients. (a) Effect of green tea consumption in erythrocytes GSH level in controls and PC patients. (b) Effect of green tea consumption in erythrocyte catalase activity in controls and PC patients. (c) Effect of green tea consumption in erythrocyte MDA level in controls and PC patients. T0: PC patients before green tea consumption; 3 months: PC patients after 3 months of green tea consumption; 6 months: PC patients after 6 months of green tea consumption; C - tea: control individuals who rarely or never drank tea; C + green tea: control individuals who usually drank 1 to 3 cups of green tea per day. Data are expressed as the means ± SD of three to four different experiments; \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, and \*\*\*\* *p* < 0.0001, compared to T0. +++ *p* < 0.005, + *p* < 0.05, compared to C - tea.

study showed the presence of increased oxidative stress, including increased MDA concentration and low levels of reduced glutathione (GSH) and catalase activity were measured when compared to the respective healthy controls. These results agree with many others studies [6, 8, 48] and confirmed that this oxidant-antioxidant imbalance may be one of the major factors responsible for PC development and progression in humans. A recent review with twenty three case-control studies focusing on the role of oxidative stress in PC patients also demonstrated increased oxidative stress profiles and impairment of antioxidant defense systems in PC patients, concluding that oxidative biomarkers MDA and 8OH-dg as well as antioxidant parameters SOD, CAT, GSH enzyme family, and vitamins C and E may be potentially predictive biomarkers of PC [49].

Some epidemiological studies found that green tea consumption decreases significantly the risk of PC in different populations. Consumption of 3 daily cups of green tea in southeast China and 5 or more cups in Japan significantly decreased the risk of PC in these two populations [14, 15]. However, these results are conflicting with other studies which did not show any association between green tea consumption and PC [48]. In the present study, we found that the consumption of 2 to 3 cups per day of green tea during 3 months can significantly increase the level of GSH and catalase activity and decreased the level of MDA in PC patient's erythrocytes. After 6 months of green tea consumption, results from PC patients became close to that of controls who never or rarely drank tea. Our data confirmed that the commercial green tea used, which showed a potent effect in our in vitro assays, decreased oxidative stress markers and improved the antioxidative status in erythrocytes from the PC population studied. Hypothesizing that erythrocytes may be an adequate proxy for the prostate tissue, it is likely that green tea antioxidant effects may prevent PC progression. These results are in line with the few studies performed so far in humans [22, 24]. The study of Bettuzzi et al. [22] was the first study showing that green tea catechins were safe and very effective for treating premalignant lesions before PC development. No significant change in PSA was observed but 33% of PC inhibition was observed in a group of volunteers with high grade prostate intraepithelial neoplasia (HGPIN) after 1 year of daily treatment with green tea catechins. The work by McLarty et al. supported a potential role of tea polyphenols in the treatment or prevention of PC. A significant decrease in serum level of prostate-specific antigen (PSA), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF-1), and IGF binding protein-3 (IGFBP-3) was observed with no elevation of liver enzymes in men with PC after a short-term supplementation with daily doses of polyphenon E (a total of 1.3 g of tea polyphenols) [24]. Our findings offer complementary information about the efficiency of green tea for PC management in human through its ability to regulate oxidative stress observed in PC patients in our and in many other studies [6, 8, 48]. Improving the antioxidant status in PC patients may reduce exaggerated ROS production and consequently reduce PC progression. It was previously reported that ROS activate different signaling pathways

including mitogen-activated protein kinase (MAPKs) and phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt [50]. These two signaling pathways were found to be overactivated in PC and are suggested to be involved in PC development and progression [51, 52]. The study of Kumar et al. indicated that ROS generation is directly proportional to aggressive phenotype of PC and that antioxidant therapy decreased Akt expression and modulated MAPKs activities, delaying the proliferation of PC cell lines [53].

In the present study, we also reenforced the positive effect of green tea consumption in oxidative stress in humans, by comparing lipid peroxidation and antioxidants in erythrocytes from controls that never or rarely drank tea to a group of healthy men that drink usually 1 to 3 cups of green tea per day for a long period of time. The results obtained showed that green tea consumption may also improve overall the antioxidative status in healthy men. This finding suggests that regular consumption of green tea may reduce the oxidative stress produced during life and theoretically decrease its negative effects.

These benefits of the green tea may be very interesting in the case of PC characterized by a long latency period. It is typically diagnosed in 50-year-old men or older [54], but in autopsy studies both PC and high grade intraepithelial neoplasia (HGPIN) are detected in the 3rd decade, showing a steady increase with age [55].

One limitation of the present study is that the effects of green tea in PC gland tissue were not directly measured. Whether the antioxidant/antiproliferative effects of green tea extracts observed in vitro also occur in the prostate tissue or whether the oxidative stress measured in erythrocytes is also observed in the prostate gland tissue from PC patients is not known. Still, several other studies used this same approach [56–58]. This was not possible due to ethical concerns and refusal of PC patients to suffer repeated biopsies. Further studies in PC patients are needed to determine the effect of the green tea consumption in the oxidative stress in PC gland.

## 6. Conclusion

The current study identified increased oxidative stress in erythrocytes from Algerian PC patients. More importantly, we demonstrated here a commercial green tea investigated rich in polyphenols and flavonoids and presenting potent antioxidant and anticancer activities in vitro significantly decreased oxidative stress markers in PC patients. Regular consumption of green tea for a long period may protect individuals from the negative consequences of oxidative stress produced during life.

## Additional Points

*Chemical Compounds Studied in This Article.* They are gallic acid (PubChem CID: 370); aluminum trichloride (PubChem CID: 24012); quercetin (PubChem CID: 5280343); 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (PubChem CID: 2735032); ascorbic acid (PubChem CID: 54670067); thiobarbituric acid (PubChem CID: 272368); penicillin (PubChem CID: 2349); streptomycin (PubChem CID: 19649); sulforhodamine B

(PubChem CID: 9916275); 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (PubChem CID: 6254).

## Disclosure

The funding agencies had no role in manuscript content or submission.

## Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' Contributions

Somia Lassed performed most of the experiments, analyzed results, generated figures, and wrote manuscript. Cláudia M. Deus and Radja Djebbari performed some experiments and analyzed the data. Paulo J. Oliveira designed some experiments and wrote part of the manuscript. Djamila Zama, Abderrezak Dahdouh, Fadila Benayache, and Samir Benayache conceived and supervised the study and designed experiments. All authors revised the final form of the manuscript.

## Acknowledgments

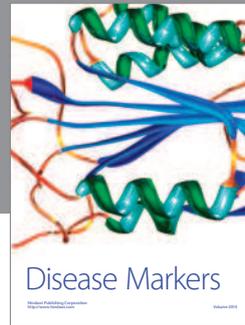
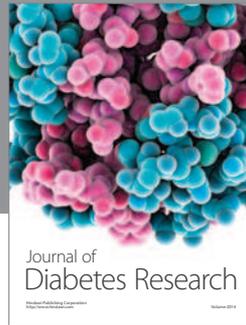
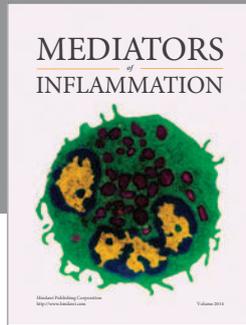
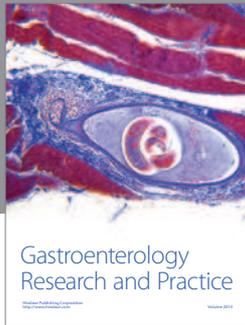
This work was funded by FEDER Funds through the Operational Programme Competitiveness Factors-COMPETE and national funds by FCT-Foundation for Science and Technology under Project PTDC/DTP-FTO/2433/2014. It is also supported by QREN Project 4832 with Reference CENTRO-07-ST24-FEDER-002008 financed through FEDER. This work was also financed by CNEPRU Project (F00920120093) and MESRS (DGRSDT). Albert A. Rizvanov was supported by Program of Competitive Growth of Kazan Federal University and subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities. The funding received did not generate any conflict of interest. We are thankful to Dr. Ibrahim Demirtas, from the Plant Research Laboratory, Department of Chemistry, ÇankırıKaratekin University, Uluyazi Campus, Çankırı, Turkey, for helping with HPLC assays.

## References

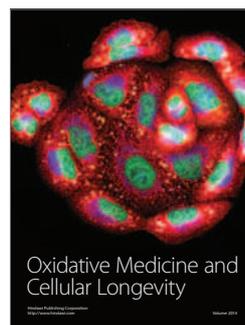
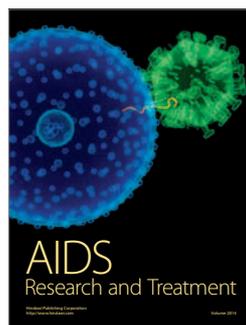
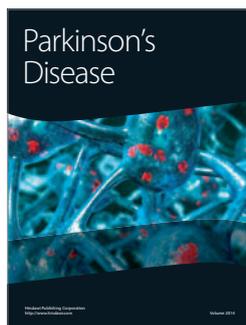
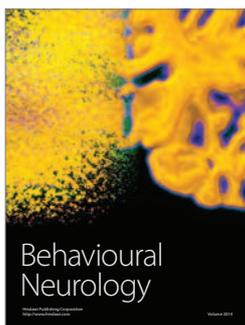
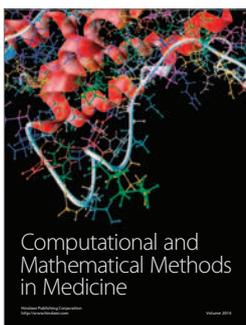
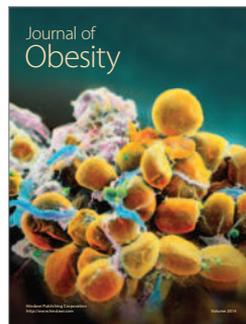
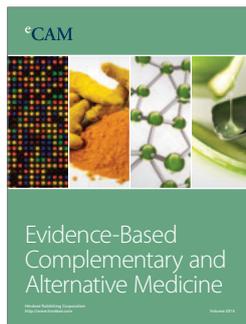
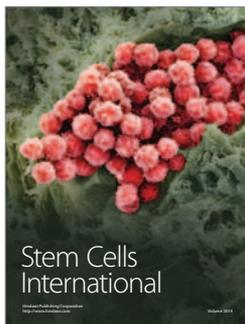
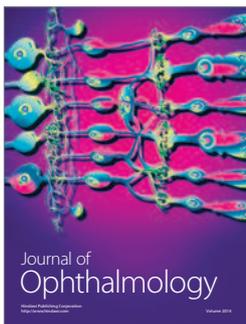
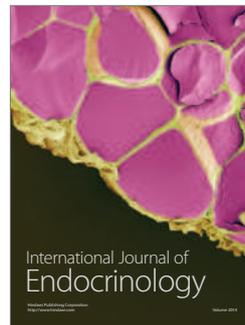
- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015.
- [2] B. Kwabi-Addo, W. Chung, L. Shen et al., "Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 13, pp. 3796–3802, 2007.
- [3] A. Minelli, I. Bellezza, C. Conte, and Z. Culig, "Oxidative stress-related aging: a role for prostate cancer?" *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1795, no. 2, pp. 83–91, 2009.
- [4] Y. Homma, Y. Kondo, M. Kaneko et al., "Promotion of carcinogenesis and oxidative stress by dietary cholesterol in rat prostate," *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 6, pp. 1011–1014, 2004.
- [5] W. G. Nelson, T. L. DeWeese, and A. M. DeMarzo, "The diet, prostate inflammation, and the development of prostate cancer," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 21, no. 1, pp. 3–16, 2002.
- [6] N. Kotrikadze, M. Alibegashvili, M. Zibribadze et al., "Activity and content of antioxidant enzymes in prostate tumors," *Experimental Oncology*, vol. 30, no. 3, pp. 244–247, 2008.
- [7] B. Sandhya, S. Manoharan, G. Sirisha Lavanya, and C. Ratna Manmohan, "Lipid peroxidation and antioxidant status in prostate cancer patients," *Indian Journal of Science and Technology*, vol. 3, no. 1, pp. 83–86, 2010.
- [8] D. S. L. Srivastava and R. D. Mittal, "Free radical injury and antioxidant status in patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer," *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 20, no. 2, pp. 162–165, 2005.
- [9] W. Al-Awaida, M. Akash, Z. Aburubaiha, W. H. Talib, and H. Shehadeh, "Chinese green tea consumption reduces oxidative stress, inflammation and tissues damage in smoke exposed rats," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 17, no. 10, pp. 740–746, 2014.
- [10] A. K. Dutta, M. A. Siddiquee, S. Hossain, and Y. Kabir, "Finlay green tea possesses the highest in vitro antioxidant activity among the 20 commercially available tea brands of Bangladesh," *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 11, pp. 11–20, 2013.
- [11] D. S. Albrecht, E. A. Clubbs, M. Ferruzzi, and J. A. Bomser, "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits PC-3 prostate cancer cell proliferation via MEK-independent ERK1/2 activation," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 171, no. 1, pp. 89–95, 2008.
- [12] T. Otsuka, T. Ogo, T. Eto, Y. Asano, M. Suganuma, and Y. Niho, "Growth inhibition of leukemic cells by (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea," *Life Sciences*, vol. 63, no. 16, pp. 1397–1403, 1998.
- [13] D. Picard, "The biochemistry of green tea polyphenols and their potential application in human skin cancer," *Alternative Medicine Review*, vol. 1, no. 1, pp. 31–42, 1996.
- [14] L. Jian, L. P. Xie, A. H. Lee, and C. W. Binns, "Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China," *International Journal of Cancer*, vol. 108, no. 1, pp. 130–135, 2004.
- [15] N. Kurahashi, S. Sasazuki, M. Iwasaki, M. Inoue, S. Tsugane, and J. S. Group, "Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study," *American Journal of Epidemiology*, vol. 167, no. 1, pp. 71–77, 2008.
- [16] S. Gupta, N. Ahmad, A.-L. Nieminen, and H. Mukhtar, "Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 164, no. 1, pp. 82–90, 2000.
- [17] K. Hastak, S. Gupta, N. Ahmad, M. K. Agarwal, M. L. Agarwal, and H. Mukhtar, "Role of p53 and NF- $\kappa$ B in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells," *Oncogene*, vol. 22, no. 31, pp. 4851–4859, 2003.
- [18] M. Li, Z. He, S. Ermakova et al., "Direct inhibition of insulin-like growth factor-I receptor kinase activity by (-)-epigallocatechin-3-gallate regulates cell transformation," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 16, no. 3, pp. 598–605, 2007.
- [19] I. A. Siddiqui, M. Asim, B. B. Hafeez, V. M. Adhami, R. S. Tarapore, and H. Mukhtar, "Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer," *FASEB Journal*, vol. 25, no. 4, pp. 1198–1207, 2011.

- [20] S. Gupta, K. Hastak, N. Ahmad, J. S. Lewin, and H. Mukhtar, "Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 18, pp. 10350–10355, 2001.
- [21] C. E. Harper, B. B. Patel, J. Wang, I. A. Eltoum, and C. A. Lamartiniere, "Epigallocatechin-3-gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice: mechanisms of action," *Prostate*, vol. 67, no. 14, pp. 1576–1589, 2007.
- [22] S. Bettuzzi, M. Brausi, F. Rizzi, G. Castagnetti, G. Peracchia, and A. Corti, "Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study," *Cancer Research*, vol. 66, no. 2, pp. 1234–1240, 2006.
- [23] A. Jatoi, N. Ellison, P. A. Burch et al., "A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma," *Cancer*, vol. 97, no. 6, pp. 1442–1446, 2003.
- [24] J. McLarty, R. L. H. Bigelow, M. Smith, D. Elmajian, M. Ankem, and J. A. Cardelli, "Tea polyphenols decrease serum levels of prostate-specific antigen, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor in prostate cancer patients and inhibit production of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in vitro," *Cancer Prevention Research*, vol. 2, no. 7, pp. 673–682, 2009.
- [25] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos, *Methods in Enzymol: Oxidant and Antioxidants (Part A)*, Edited by M. I. S. John, N. Abelson, S. Helmut, Academic Press, 1999.
- [26] H. Wang, X. D. Gao, G. C. Zhou, L. Cai, and W. B. Yao, "In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit," *Food Chemistry*, vol. 106, no. 3, pp. 888–895, 2008.
- [27] A. Braca, N. De Tommasi, L. Di Bari, C. Pizza, M. Politi, and I. Morelli, "Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*," *Journal of Natural Products*, vol. 64, no. 7, pp. 892–895, 2001.
- [28] Y. Cao and I. Ikeda, "Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selenious ester and sulfated xyloglucan," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 45, no. 3, pp. 231–235, 2009.
- [29] M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, and L. W. Jones, "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)," *Investigative Urology*, vol. 17, no. 1, pp. 16–23, 1979.
- [30] M. Lorenz, G. Saretzki, N. Sitte, S. Metzkwon, and T. Von Zglinicki, "BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 31, no. 6, pp. 824–831, 2001.
- [31] Z. X. Lin, J. R. S. Hoult, and A. Raman, "Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 66, no. 2, pp. 141–150, 1999.
- [32] S. Ali Azouaou, F. Emhemmed, N. Idris-Khodja et al., "Selective ROS-dependent p53-associated anticancer effects of the hypoxo-derivative rooperol on human teratocarcinoma cancer stem-like cells," *Investigational New Drugs*, vol. 33, no. 1, pp. 64–74, 2015.
- [33] A. Tripathi, W. Fang, D. T. Leong, and L. T. Tan, "Biochemical studies of the lagunamides, potent cytotoxic cyclic depsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*," *Marine Drugs*, vol. 10, no. 5, pp. 1126–1137, 2012.
- [34] C. Astill, M. R. Birch, C. Dacombe, P. G. Humphrey, and P. T. Martin, "Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 11, pp. 5340–5347, 2001.
- [35] D. L. Drabkin and J. H. Austin, "Spectrophotometric Studies. I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 98, no. 2, pp. 719–733, 1932.
- [36] E. Beutler, O. Duron, and B. M. Kelly, "Improved method for the determination of blood glutathione," *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 61, pp. 882–888, 1963.
- [37] R. A. Greenwald, *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, 1985.
- [38] H. H. Draper and M. Hadley, "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation," *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 421–431, 1990.
- [39] L. Khandrika, B. Kumar, S. Koul, P. Maroni, and H. K. Koul, "Oxidative stress in prostate cancer," *Cancer Letters*, vol. 282, no. 2, pp. 125–136, 2009.
- [40] T. M. Vance, J. Su, E. T. H. Fontham, S. I. Koo, and O. K. Chun, "Dietary antioxidants and prostate cancer: a review," *Nutrition and Cancer*, vol. 65, no. 6, pp. 793–801, 2013.
- [41] Y.-L. Lin, I.-M. Juan, Y.-L. Chen, Y.-C. Liang, and J.-K. Lin, "Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 6, pp. 1387–1394, 1996.
- [42] K.-C. Liu, A.-C. Huang, P.-P. Wu et al., "Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways," *Oncology Reports*, vol. 26, no. 1, pp. 177–184, 2011.
- [43] G.-C. Yen, P.-D. Duh, and H.-L. Tsai, "Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid," *Food Chemistry*, vol. 79, no. 3, pp. 307–313, 2002.
- [44] J. Yang, J. Guo, and J. Yuan, "In vitro antioxidant properties of rutin," *LWT—Food Science and Technology*, vol. 41, no. 6, pp. 1060–1066, 2008.
- [45] S. Valcic, J. A. Burr, B. N. Timmermann, and D. C. Liebler, "Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (–)-epigallocatechin gallate and (–)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 13, no. 9, pp. 801–810, 2000.
- [46] K.-A. Hwang and K.-C. Choi, "Anticarcinogenic effects of dietary phytoestrogens and their chemopreventive mechanisms," *Nutrition and Cancer*, vol. 67, no. 5, pp. 796–803, 2015.
- [47] H. Y. Khan, H. Zubair, M. F. Ullah, A. Ahmad, and S. M. Hadi, "A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols," *Current Drug Targets*, vol. 13, no. 14, pp. 1738–1749, 2012.
- [48] N. Kikuchi, K. Ohmori, T. Shimazu et al., "No association between green tea and prostate cancer risk in Japanese men: the Ohsaki Cohort Study," *British Journal of Cancer*, vol. 95, no. 3, pp. 371–373, 2006.
- [49] B. Oh, G. Figtree, D. Costa et al., "Oxidative stress in prostate cancer patients: a systematic review of case control studies," *Prostate International*, vol. 4, no. 3, pp. 71–87, 2016.

- [50] G.-Y. Liou and P. Storz, "Reactive oxygen species in cancer," *Free Radical Research*, vol. 44, no. 5, pp. 479–496, 2010.
- [51] V. Jendrossek, M. Henkel, J. Hennenlotter et al., "Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples," *BJU International*, vol. 102, no. 3, pp. 371–382, 2008.
- [52] M. Royuela, M. I. Arenas, F. R. Bethencourt, B. Fraile, and R. Paniagua, "Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate," *Human Pathology*, vol. 33, no. 3, pp. 299–306, 2002.
- [53] B. Kumar, S. Koul, L. Khandrika, R. B. Meacham, and H. K. Koul, "Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype," *Cancer Research*, vol. 68, no. 6, pp. 1777–1785, 2008.
- [54] J. P. Richie, W. J. Catalona, F. R. Ahmann et al., "Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination," *Urology*, vol. 42, no. 4, pp. 365–374, 1993.
- [55] P. T. Scardino, R. Weaver, and M. A. Hudson, "Early detection of prostate cancer," *Human Pathology*, vol. 23, no. 3, pp. 211–222, 1992.
- [56] A. Woźniak, R. Masiak, M. Szpinda et al., "Oxidative stress markers in prostate cancer patients after HDR brachytherapy combined with external beam radiation," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, Article ID 789870, 5 pages, 2012.
- [57] V. Battisti, L. D. K. Maders, M. D. Bagatini et al., "Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 65, no. 7, pp. 516–524, 2011.
- [58] Z. Arsova-Sarafinowska, A. Eken, N. Matevska et al., "Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer," *Clinical Biochemistry*, vol. 42, no. 12, pp. 1228–1235, 2009.



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<https://www.hindawi.com>



**ANNEXES**



---



---

- **Consommation de poisson, nombre de fois/mois :**

0       <1       1       2     3     4       > 1 fois/ semaine

- **Consommation de viande rouge, nombre de fois/mois:**

• Viandes de moutons:

0       <1       1 to 2     3 to 4       4       > 1 fois/semaine

• Viandes de veaux :

0       <1       1 to 2     3 to 4       4       > 1 fois /semaine

- **Consommation des graisses saturées (d'origine animale):**

Pas de consommation     Une petite consommation     Consommation moyenne

Consommation élevée

- **Consommation des produits laitiers:**

Une petite consommation (a)  Consommation moyenne (b)  Consommation élevée (c)

(a) Une seule tasse de lait ou d'autres produits (fromage, yaourt ..) par jour

(b) Une tasse de lait avec un autre produit (fromage, yaourt ..) par jour

(c) Plus de 2 tasses de lait par jour et / ou avec une grande quantité d'un autre produit (fromage, yaourt..).

- **Consommation des fruits, fois/semaine:**

< 2                                   2 to 6                                   7 to 14

- **Consommation des légumes, fois/semaine:**

< 7                                   7 to 13                                   ≥ 14

- **Consommation de thé vert, tasse/jour:**

0                                   < 1                                   1 to 3                                   > 3

**6. Habitudes toxiques :**

- Alcool

Jamais     Utilisateur actuel (pour combien d'années et combien de boisson / jour)

Ancien utilisateur (bu et arrêté pendant combien d'années et combien de boisson / jour)

- Tabac

Non fumeur     Fumeur actuel (Nombre de cigarette ou paquet par jour et pendant combien d'années)

Ancien fumeur (Nombre de cigarette ou paquet par jour et pendant combien d'années et arrêté depuis quand)

---

---

**Annexe 2** : Formulaire de consentement

---

**Encadreur: Mme ZAMA Djamila**

---

**Formulaire de consentement Libre et Eclairé de participation à un projet de recherche**

Je soussigne, Monsieur,.....certifie avoir reçu la note d'information concernant l'étude .....

Il m'a clairement été précisé que je suis ENTIEREMENT LIBRE D'ACCEPTER OU DE REFUSER DE PARTICIPER A CETTE RECHERCHE.

Je certifie avoirs compris l'objectif, et les modalités de cette étude. Je donne mon accord pour la participation à cette étude.

Enfin, j'ai compris que je ne recevrai aucune indemnité pour ma participation à cette étude.

Date et signature du patient, précédé de la mention « lu et approuvé »

.....

Nous vous remercions de l'aide que vous apportez ainsi à la recherche scientifique.

**Si la personne est inapte a lire et a écrire le français : le cas échéant,**

En l'absence d'autonomie de l'lecture et d'écrire de M ....., la tierce personne identifiée, atteste avoir personnellement et fidèlement lu au sujet la notice d'information et le présente formulaire de consentement, et recueilli son accord pour signer ici en son nom.

**Tierce personne :**

Mme, Mlle, M .....Signature.....

L'investigateur : Mme LASED Somia

**Annexe 3** : Attestation du Comité d'éthique de l'EHS Daksi.

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de la Santé, de la Population**  
**et de la Réforme Hospitalière**

**Direction de la Santé et de la Population**  
**De la Wilaya de Constantine**

**Etablissement Hospitalier Spécialisé**  
**Clinique d'Urologie-Néphrologie**  
**Daksi Constantine**

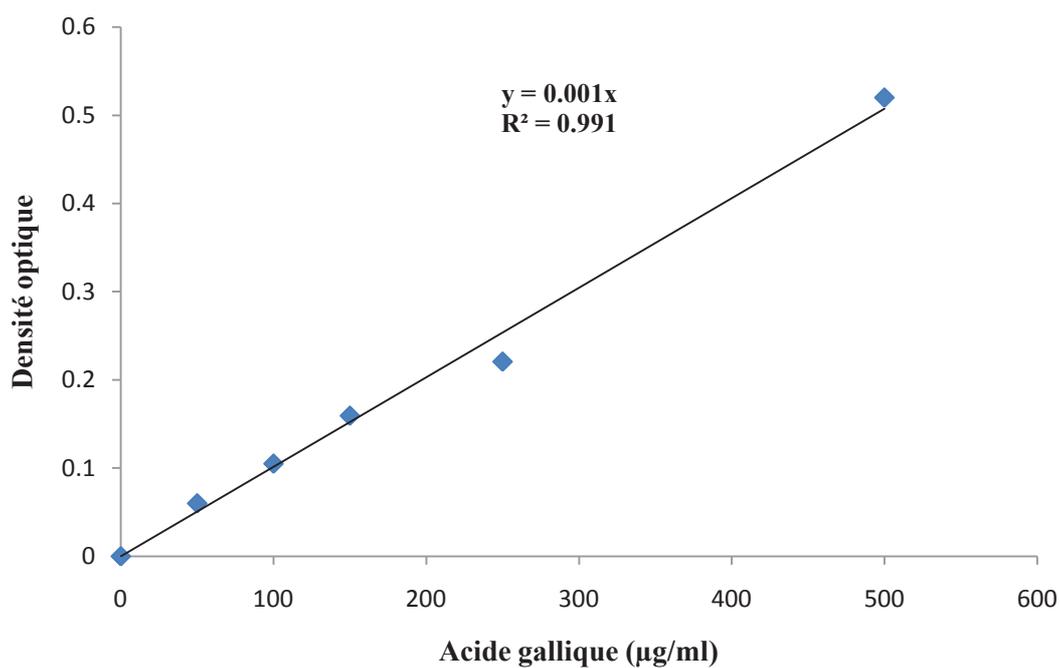
**ATTESTATION**

Le comité d'éthique de l'EHS Daksi, ayant suivi le travail de recherche de la doctorante LASED Soumaya, concernant le cancer de la prostate ;  
Atteste que la collection Data a été effectuée au niveau du service d'urologie et de Transplantation rénale de notre établissement et qu'aucun risque pour les malades n'a été noté.  
Dont attestation.

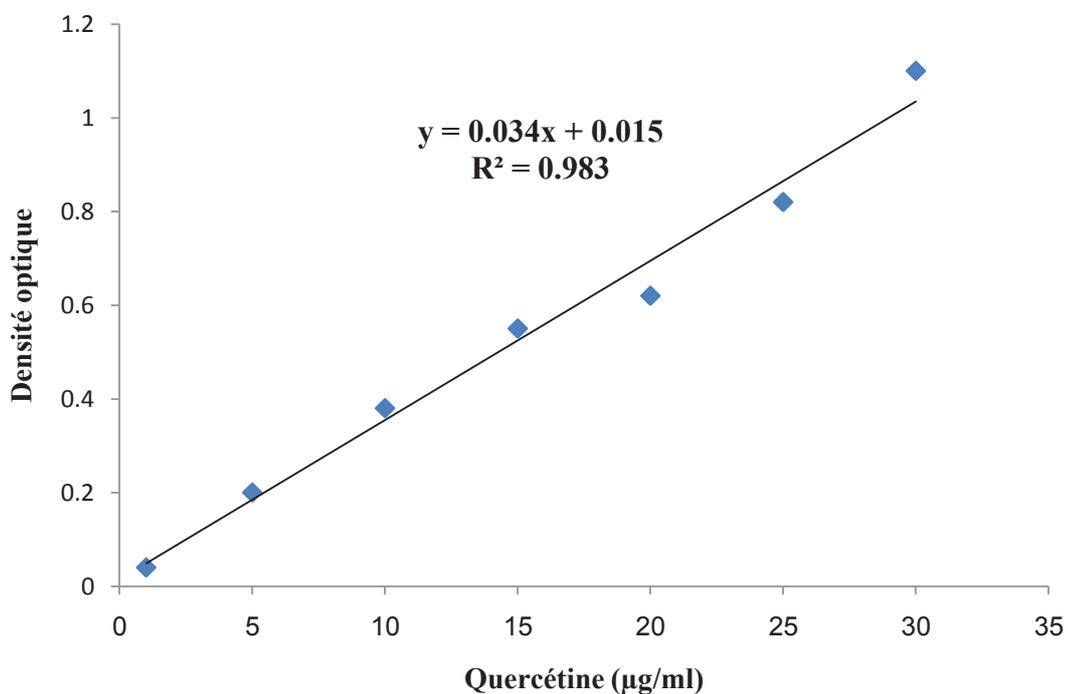
Constantine, Le 15 Mars 2015

**Le Président du Comité d'éthique**  
**Docteur A. BOUSSOUF**

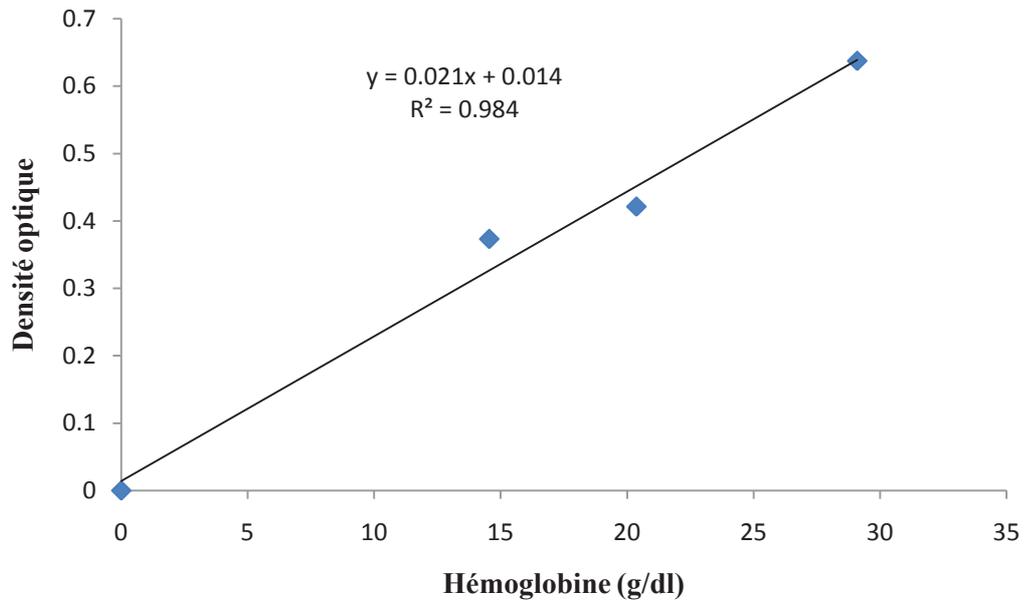
  
Etablissement Hospitalier Spécialisé  
Clinique d'Uro-Néphrologie et de  
Transplantation Rénale - Daksi  
Dr. BOUSSOUF AHMED  
Maître Assistant En Chirurgie  
Urologique

**Annexe 4 :**

**Figure 1 :** Courbe étalon du dosage des phénols totaux (acide gallique comme standard), (Moyenne de 3 essais).



**Figure 2 :** Courbe étalon du dosage des flavonoïdes (quercétine comme standard), (Moyenne de 3 essais).



**Figure 3 :** Courbe étalon du dosage d'hémoglobine dans les érythrocytes (Moyenne de 3 essais).

## RESUMÉ

En Algérie, le cancer de la prostate est le quatrième cancer le plus fréquent chez les hommes et la sixième cause de décès. La présente étude est visée à déterminer la relation entre l'âge, le mode de vie, les antécédents familiaux et les habitudes alimentaires incluant la consommation de thé vert et le risque de cancer de la prostate et d'évaluer l'effet préventif de thé vert sur le cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien.

L'approche épidémiologique réalisée sur un échantillon représentatif d'une population de l'Est Algérien constitue de 90 patients atteints de cancer de la prostate et 190 témoins, montre que le vieillissement, la consommation de la viande de mouton et de veau et la consommation élevée des graisses saturées et de produits laitiers augmentent le risque de cancer de la prostate. Par contre la consommation de 7 à 13 portions de légumes par semaine et 14 portions ou plus diminuent respectivement 62 % et 96 % du risque de cancer de la prostate. De même, la consommation de 7 à 14 portions de fruits par semaine diminue 98% ce risque. La consommation de thé vert a réduit le risque de cancer de la prostate, mais les résultats étaient statistiquement limités. Un risque élevé a été observé chez les patients ayant des antécédents familiaux de cancer de la prostate. Une association positive a été également trouvée pour l'alcool et la consommation de tabac et une relation dose-réponse a été déterminée pour le nombre de paquet-année du tabac fumées. Notre étude d'intervention réalisée sur 70 patients atteints de cancer de la prostate et 120 témoins de la population de l'Est Algérien et qui précède d'une étude *in vitro* montre que le stress oxydatif pouvait être associé au développement et à la progression du cancer de la prostate dans notre population. La consommation de thé vert, riche en phénols et en flavonoïdes et a des activités antioxydantes et anticancéreuses puissantes dans notre étude *in vitro* peut avoir un effet protecteur contre cette pathologie via la réduction de stress oxydant. La consommation de 2 à 3 tasses de thé vert par jour pendant 6 mois augmente significativement le taux de GSH, de thiols totaux et l'activité de catalase et de GPx et diminue significativement le taux de MDA dans le sang des patients atteints de cancer de la prostate. Elle améliore également le taux de l'albumine et de protéines totales dans le plasma.

Devant les limites des traitements utilisés actuellement pour le cancer, la chimioprévention reste la seule solution. Une consommation régulière de thé vert pendant une longue période peut prévenir contre le développement de cancer de la prostate ou au moins de retarder sa progression.

**Mots clés:** Cancer de la prostate, stress oxydant, thé vert, chimioprévention, Algérie

## ABSTRACT

In Algeria, prostate cancer is the fourth most common cancer and the sixth leading cause of death in men. The objective of the current study is to determine the relationship between lifestyle factors, family history, diet including green tea consumption and the risk of prostate cancer and to evaluate the preventive effect of green tea on prostate cancer in the East Algerian population.

The epidemiological approach carried out on a representative sample of East Algerian population consists of 90 patients with prostate cancer and 190 controls shows that ageing, consumption of lamb and beef and high intake of animal fat and dairy products increase the risk of prostate cancer. Contrary, 7 to 13 servings of vegetables per week and 14 servings or more decrease 62% and 96% of the risk of prostate cancer respectively. Also, the consumption of 7 to 14 servings of fruit per week decreases 98% of the risk. Consumption of green tea reduced the risk of prostate cancer, but the results were statistically limited. A high risk has been observed in men with a family history of prostate cancer. A positive association was also found for alcohol and smoking intake and a dose-response relationship existed for quantity and history of smoking. Our intervention study include 70 patients with prostate cancer and 120 controls of East Algerian population and which precedes by an *in vitro* study shows that oxidative stress can be associated with the development and progression of prostate cancer in our population. Also, the consumption of green tea which is rich in phenols and flavonoids and which exhibits potent antioxidant and anti-cancer activities in our *in vitro* study can have a protective effect against this disease via the reduction of oxidative stress. Consumption of 2 to 3 cups of green tea per day for 6 months significantly increases the level of GSH, total thiols and catalase and GPx activity and significantly decreases the level of MDA in the blood of patients with prostate cancer. In addition it also improves the level of albumin and total protein in plasma.

Faced to the limitations of the treatments currently used for cancer, chemoprevention remains the only solution. Regular consumption of green tea for a long period may prevent men from developing prostate cancer or at least delay its progression.

**Key words:** Prostate cancer, oxidative stress, green tea, chemoprevention, Algeria

## ملخص:

في الجزائر، سرطان البروستاتا هو رابع أكثر أنواع السرطان شيوعا عند الرجال والسبب الرئيسي السادس للوفاة. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد العلاقة بين نمط الحياة، التاريخ العائلي لهذا المرض، النظام الغذائي بما في ذلك استهلاك الشاي الأخضر وخطر الإصابة بسرطان البروستاتا. بالإضافة إلى تقييم الأثر الوقائي للشاي الأخضر من سرطان البروستاتا عند عينة من سكان الشرق الجزائري.

أجريت الدراسة الوبائية على عينة تمثيلية من سكان الشرق الجزائري والتي تضم 90 مريضا يعانون من سرطان البروستاتا و 190 شاهد. بينت هذه الدراسة أن الشيوخة، استهلاك لحوم الأغنام والعجول والاستهلاك العالي للدهون المشبعة ومنتجات الألبان يزيد من خطر الإصابة بسرطان البروستاتا. بينما ان تناول 7 إلى 13 حصة من الخضار في الأسبوع و تناول 14 حصة أو أكثر يؤدي إلى انخفاض خطر الإصابة بسرطان البروستاتا بنسبة تقدر ب 62% و 96% على التوالي. كما يؤدي تناول من 7 إلى 14 حصة من الفواكه في الأسبوع إلى انخفاض خطر الإصابة بسرطان البروستاتا بنسبة تقدر ب 98%. كذلك يؤدي استهلاك الشاي الأخضر إلى التخفيض من خطر الإصابة بسرطان البروستاتا، غير أن هذه النتائج كانت محدودة إحصائيا. أيضا لوحظ وجود خطر كبير لدى الرجال الذين لديهم تاريخ عائلي للإصابة بسرطان البروستاتا كما تم العثور على علاقة إيجابية للكحول والتبغ مع خطر الإصابة بهذا المرض و تم تحديد علاقة جرعة- استجابة بين كمية التبغ المدخنة و خطر الإصابة بسرطان البروستاتا.

بينت دراستنا التدخلية و التي اجريت على 70 مريضا بسرطان البروستاتا و 120 شاهدا من سكان الشرق الجزائري والتي سبقتها دراسة خارج الكائن الحي أن الإجهاد التأكسدي يمكن أن يترافق مع تشكل و تطور سرطان البروستاتا لدى شعبنا. فلستهلاك الشاي الأخضر الغني بالفينولات والفلافونيدات و انه مضاد قوي للأكسدة و للسرطان (كما بينت الدراسة المخبرية) يمكن أن يكون له تأثير وقائي ضد هذا المرض عن طريق الحد من الإجهاد التأكسدي. فيؤدي استهلاك 2 إلى 3 أكواب من الشاي الأخضر يوميا لمدة 6 أشهر إلى زيادة كبيرة في مستوى الجلوتاثيون، مجاميع الثيول الكلي ونشاط انزيمات الكاتالاز و الجلوتاثيون بيروكسيداز (GPx) كما يقل بشكل ملحوظ من مستوى MDA في دم المرضى الذين يعانون من سرطان البروستاتا. بالإضافة إلى ذلك فإنه يحسن مستوى الألبومين والبروتين الكلي في البلازما. أمام المفعول المحدود للعلاج المستعمل في مرض السرطان حاليا، تبقى الوقاية الكيماوية هي الحل الوحيد. فللاستهلاك المنتظم للشاي الأخضر و لفترة طويلة يمكن أن يحمي الرجال من تشكل سرطان البروستاتا أو على الأقل تأخير تقدمه.

**المفيدات الاستدلالية:** سرطان البروستاتا، الإجهاد التأكسدي، الشاي الأخضر، الوقاية الكيماوية، الجزائر

**Nom: LASSED**

**Prénom: SOMIA**

**L'effet préventif des flavonoïdes et des phénols de thé vert (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) sur le cancer de la prostate chez une population de l'Est Algérien: étude épidémiologique et étude expérimentale *in vitro* et *in humaine***  
**Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3<sup>ème</sup> cycle**

**RESUMÉ**

En Algérie, le cancer de la prostate est le quatrième cancer le plus fréquent chez les hommes et la sixième cause de décès. La présente étude est visée à déterminer la relation entre l'âge, le mode de vie, les antécédents familiaux et les habitudes alimentaires incluant la consommation de thé vert et le risque de cancer de la prostate et d'évaluer l'effet préventif de thé vert sur le cancer de la prostate dans la population de l'Est Algérien.

L'approche épidémiologique réalisée sur un échantillon représentatif d'une population de l'Est Algérien constitue de 90 patients atteints de cancer de la prostate et 190 témoins, montre que le vieillissement, la consommation de la viande de mouton et de veau et la consommation élevée des graisses saturées et de produits laitiers augmentent le risque de cancer de la prostate. Par contre la consommation de 7 à 13 portions de légumes par semaine et 14 portions ou plus diminuent respectivement 62 % et 96 % du risque de cancer de la prostate. De même, la consommation de 7 à 14 portions de fruits par semaine diminue 98% ce risque. La consommation de thé vert a réduit le risque de cancer de la prostate, mais les résultats étaient statistiquement limités. Un risque élevé a été observé chez les patients ayant des antécédents familiaux de cancer de la prostate. Une association positive a été également trouvée pour l'alcool et la consommation de tabac et une relation dose-réponse a été déterminée pour le nombre de paquet-année du tabac fumées. Notre étude d'intervention réalisée sur 70 patients atteints de cancer de la prostate et 120 témoins de la population de l'Est Algérien et qui précède d'une étude *in vitro* montre que le stress oxydatif pouvait être associé au développement et à la progression du cancer de la prostate dans notre population. La consommation de thé vert, riche en phénols et en flavonoïdes et a des activités antioxydantes et anticancéreuses puissantes dans notre étude *in vitro* peut avoir un effet protecteur contre cette pathologie via la réduction de stress oxydant. La consommation de 2 à 3 tasses de thé vert par jour pendant 6 mois augmente significativement le taux de GSH, de thiols totaux et l'activité de catalase et de GPx et diminue significativement le taux de MDA dans le sang des patients atteints de cancer de la prostate. Elle améliore également le taux de l'albumine et de protéines totales dans le plasma.

Devant les limites des traitements utilisés actuellement pour le cancer, la chimioprévention reste la seule solution. Une consommation régulière de thé vert pendant une longue période peut prévenir contre le développement de cancer de la prostate ou au moins de retarder sa progression.

**Mots clés:** Cancer de la prostate, stress oxydant, thé vert, chimioprévention, Algérie