



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Xénobiotiques et biothérapies

Thème

Etude De L'effet Préventif Des Omégas Trois Contenus Dans L'huile De Poisson Contre Une Cancérogenèse Chimique Expérimentale Induite Par Le 7-12 Diméthyl-Benz-Antracene, Un Xénobiotique Impliqué Dans L'induction Du Carcinome Spinocellulaire

Présentée par : Mlle CHENITI Hayeme

Membres de Jury

| | | |
|---------------------|-----------------|--|
| Directrice de thèse | KADI Assia | MCA., Université Badji Mokhtar - Annaba |
| Présidente | BOUMENDJEL Amel | Prof., Université Badji Mokhtar - Annaba |
| Examinatrice | SOBHI Widad | Prof., centre de recherche en biotechnologie - Constantine |
| Examinatrice | BOUFERMES Radia | MCA., Université Badji Mokhtar - Annaba |

Année universitaire : 2024-2025

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail de recherche :

*A mes **chers** parents,*

*Pour leur amour et leur soutien, véritables piliers de ma
détermination.*

*A ma sœur **Soumaya**,*

*A mes frères, **Housseem** et **Kheireddine**,*

Pour leur complicité et leur encouragement constants

*A ceux qui, par leur présence, ont éclairé mon chemin et
qui, encore aujourd'hui illuminent mon parcours...*

A ceux qui me font fleurir, à eux qui se reconnaîtront...

Hayeme CHENITI

Remerciements

وَرَبِّكَ شُكْرًا يَحِبُّ الشَّاكِرِينَ

Avant tout, je rends grâce à **ALLAH**, souverain en puissance et en miséricorde, pour la force et l'endurance qu'il m'a accordées afin de porter ce travail à son aboutissement.

Au terme de ce travail, il m'est essentiel d'exprimer toute ma gratitude à :

Dr. KADI Assia, ma directrice de thèse, d'avoir accepté de me guider avec bienveillance tout au long de cette quête académique. Je lui suis infiniment reconnaissante, non seulement pour la richesse de son encadrement scientifique, la pertinence de ses conseils et ses orientations éclairées, mais aussi pour ses valeurs humaines admirables qui ont rendu ce parcours encore plus enrichissant et inspirant.

Pr. BOUMENDJEL Amel, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury et également d'avoir ancré en moi les fondements de la pensée scientifique. Au-delà de son rôle de pédagogue, je tiens à souligner ses qualités humaines exceptionnelles. Je lui suis redevable pour l'influence qu'elle a eue sur mon parcours.

Pr. SOBHI Widad, professeure au C.R.B.T., pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'évaluer ce travail de recherche malgré ses nombreuses responsabilités.

Dr. BOUFERMES Radia, maître de conférences -A à U.B.M.A., pour le privilège qu'elle m'a accordé en consentant à examiner ce modeste manuscrit.

Pr. MESSAREH Mahfoud, directeur du Laboratoire de recherche (LBTE), pour son accueil au sein de son laboratoire, son engagement et ses précieux conseils. Ce fut un honneur de pouvoir bénéficier de son expertise et sa bienveillance.

Dr. KADI Yacine et **Dr. KHERFI Hind**, médecins anatomopathologiste, pour leur apport précieux dans l'interprétation de la partie histologique. La pertinence de leurs conseils a apporté une réelle valeur ajoutée à cette recherche. Je leur suis profondément reconnaissante pour le temps qu'ils ont consacré pour ce travail.

M^{lle} AGRED Rym, ingénieure de laboratoire au C.R.B.T., non seulement pour ses compétences scientifique et son partage de savoir-faire, mais aussi pour ses valeurs humaines et son soutien moral. Sincère reconnaissance.

Dr. CHENIKI Rachid, médecin chef du service d'anatomopathologie El-bouni, pour son accueil chaleureux et son aide précieuse dans la réalisation de la technique d'histologie.

Pr. AMOURA Kamel, médecin chef du laboratoire de biochimie au centre anti centre, CHU Ibn Rochd-Annaba, pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire.

Dr. KHALDI Taha, maître de recherche au C.R.B.T., pour son esprit scientifique et son aide, ses précieux conseils ainsi que pour ses qualités humaines.

M^{lles} BOUKHARI Asma, DJERADI Meriem et MELLITI Hanene, étudiantes de master, pour leurs sérieux durant la réalisation du protocole expérimental ainsi que pour leurs qualités humaines admirables.

Toute l'équipe des **doctorants** du laboratoire de recherche de Biochimie et Toxicologie Environnementale, ceux du C.R.B.T., et chaleureusement **mes collègues** de palliasse pour la bonne ambiance et le sens de partage.

En fin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers l'ensemble des **professeurs** qui ont guidé mon parcours scolaire et académique avec dévouement et rigueur ainsi qu'à **toute personne** ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de recherche.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Résumé..... | IX |
| Abstract..... | X |
| ملخص..... | XI |
| Liste des figures..... | XII |
| Liste des tableaux..... | XV |
| Liste des abréviations..... | XVI |
| Glossaire d'histologie..... | XXI |
| Introduction..... | 1 |
| Chapitre 01 Peau et carcinome spinocellulaire, anatomie et dynamique..... | 4 |
| 1. Anatomie de la peau..... | 5 |
| 1.1. Epiderme..... | 5 |
| 1.2. Jonction dermo-épidermique ou lame basale..... | 8 |
| 1.3. Derme..... | 8 |
| 1.4. Hypoderme..... | 9 |
| 2. Fonctions de la peau..... | 9 |
| 3. Cancers de la peau..... | 10 |
| 3.1. Tumeurs cutanées prédominantes..... | 11 |
| 3.2. Tumeurs cutanées rares..... | 11 |
| 4. Le Carcinome spinocellulaire cutané (CSCc)..... | 12 |
| 4.1. Origine et caractéristiques..... | 12 |
| 4.2. Mécanismes de transformation des kératinocytes en CSCc..... | 12 |
| 4.3. Approches préventives et thérapeutiques..... | 13 |
| 4.4. Modèles expérimentaux (in vivo)..... | 13 |
| 5. Les étapes de la cancérogénèse..... | 15 |
| 5.1. Agents de la cancérogénèse chimique..... | 17 |
| Chapitre 02 Biologie de la cellule cancéreuse..... | 21 |
| 1. Origine de l'oncogénèse..... | 22 |
| 1.1. L'initiation tumorale..... | 22 |
| 1.2. La progression tumorale..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Cycle cellulaire..... | 24 |
| 2.1. Déroulement du cycle cellulaire..... | 25 |
| 2.2. Dérégulation du cycle cellulaire..... | 26 |
| 3. prolifération et survie cellulaire..... | 26 |
| 3.1. Activation des voies de signalisation prolifératives..... | 26 |
| 3.2. Résistance à l'apoptose..... | 30 |
| 4. Stress oxydatif..... | 32 |
| 5. Métabolisme énergétique..... | 33 |
| 6. Inflammation chronique et angiogenèse tumorale..... | 34 |
| 7. Echappement immunitaire des cellules cancéreuses..... | 35 |
| Chapitre 03 L'huile de poisson..... | 38 |
| 1. Généralités..... | 39 |
| 2. Production de l'huile de poisson..... | 40 |
| 3. Composants de l'huile de poisson..... | 41 |
| 3.1. Les acides gras (AG)..... | 41 |
| 3.2. Les acides gras saturés..... | 41 |
| 3.3. Les acides gras insaturés..... | 41 |
| 4. Structure et métabolisme des acides gras polyinsaturés (AGPI)..... | 42 |
| 5. Activités biologiques des AGPI..... | 45 |
| 5.1. Fluidité de la membrane cellulaire..... | 45 |
| 5.2. Activités anti inflammatoire..... | 46 |
| 5.3. Maintien du système nerveux..... | 47 |
| 5.4. Maintien du système cardiovasculaire..... | 48 |
| 5.5. Activités anti-cancéreuse..... | 50 |
| Objectifs de la recherche..... | 53 |
| Chapitre 04 Mise au point du modèle expérimental de carcinome spinocellulaire..... | 57 |
| 1. Matériel et méthodes..... | 58 |
| 1.1. Protocole expérimental de carcinogénèse chimique..... | 58 |
| 1.2. Etude morphologique..... | 59 |
| 1.3. Sacrifice et prélèvement des organes..... | 60 |
| 1.4. Numération cellulaire..... | 61 |
| 1.5. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)..... | 61 |

| | |
|--|-----------|
| 1.6. Etude histologique..... | 61 |
| 2. Résultats..... | 64 |
| 2.1. Etude macroscopique..... | 64 |
| 2.2. Variation histologiques..... | 65 |
| 2.3. Variations hématologiques..... | 68 |
| 2.4. Variations de la lactate déshydrogénase..... | 68 |
| 3. Discussion..... | 69 |
| 4. Conclusion..... | 73 |
| Chapitre 05 Evaluation du potentiel préventif de l'huile de poisson dans un modèle expérimental de carcinome spinocellulaire..... | 74 |
| 1. Matériels et méthodes..... | 75 |
| 1.1. Protocole expérimental..... | 75 |
| 1.2. Sacrifice et prélèvement des organes..... | 78 |
| 1.3. Numération cellulaire..... | 79 |
| 1.4. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)..... | 79 |
| 1.5. Dosage des protéines totales..... | 69 |
| 1.6. Etude histologique..... | 80 |
| 1.7. Etude des paramètres oxydants..... | 80 |
| 1.8. Etude des paramètres antioxydants..... | 81 |
| 1.9. Etude de l'expression sérique du TNF α | 81 |
| 1.10. Etude de l'expression génique des gènes NF-kB1 et NF-kB2..... | 83 |
| 1.11. Analyses statistiques..... | 90 |
| 2. Résultats..... | 91 |
| 2.1. Etude morphologique..... | 91 |
| 2.2. Etude hématologique et biochimique..... | 93 |
| 2.3. Etude anatomopathologique..... | 95 |
| 2.4. Etude de variations des paramètres oxydants..... | 99 |
| 2.5. Etude de variations des paramètres antioxydants..... | 101 |
| 2.6. Etude de variations de l'expression sérique TNF α | 103 |
| 2.7. Etude de variations de l'expression génique des NF-KB1 et NF-KB2..... | 104 |
| 3. Discussion..... | 105 |
| Conclusion et perspectives..... | 119 |

| | |
|---|-----|
| Références bibliographiques..... | 121 |
| Activités et production scientifique..... | 145 |

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer les mécanismes chimiopréventifs de l'huile de poisson, administrée à différentes doses et par différentes voies, dans un modèle expérimental de carcinogenèse cutanée précédemment établi. Ce modèle repose sur l'induction d'une tumeur cutanée par le 7,12-diméthylbenz[*a*]anthracène (DMBA) et l'huile de croton chez des souris Swiss albinos.

Soixante-dix souris ont été réparties en dix groupes, incluant des témoins et des groupes recevant l'huile de poisson par voie orale ou application topique, avec ou sans induction de carcinogenèse. Les effets chimiopréventifs ont été évalués par une analyse morphologique et histologique des papillomes cutanés, complétée par une numération sanguine et une analyse biochimique du LDH. L'implication synergique du TNF- α et du NF- κ B a été étudiée par un dosage ELISA et l'analyse de l'expression génique des sous-unités de NF- κ B par qRT-PCR. En parallèle, les variations des marqueurs moléculaires et enzymatiques du stress oxydatif ont été examinées. L'analyse anatomopathologique a révélé la présence d'un carcinome spinocellulaire cutané invasif chez les souris soumises uniquement à la cancérogenèse. Les groupes traités par voie orale (500 mg/kg/jour) ou application topique n'ont présenté aucun signe de cancer, contrairement aux souris ayant reçu une administration orale à 50 mg/kg/jour, où aucun effet protecteur n'a été observé. La supplémentation à 250 mg/kg/jour a, quant à elle, conduit à l'apparition d'une malignité de bas grade. Les traitements oraux (250 et 500 mg/kg/jour) et topiques à l'huile de poisson ont significativement réduit le développement tumoral, tout en améliorant l'homéostasie systémique chez les souris ayant subi l'induction de la carcinogenèse. Ces résultats indiquent que l'huile de poisson possède des effets chimiopréventifs dose-dépendants, avec une administration orale aussi efficace qu'une application topique, à condition d'utiliser une posologie appropriée. Le développement du carcinome spinocellulaire cutané a été associé à un stress oxydatif, ainsi qu'à une activation de la voie canonique NF- κ B1, sans modification de la voie alternative NF- κ B2, et à une inflammation médiée par le TNF- α . Les effets chimioprotecteurs de l'huile de poisson semblent résulter d'une régulation négative de la voie NF- κ B, probablement due à une boucle de rétro-régulation induite par une inflammation chronique intense, modulée par le TNF- α .

Nos résultats renforcent l'intérêt croissant pour l'huile de poisson en tant qu'agent chimiopréventif naturel, capable de freiner le développement du cancer de la peau par des mécanismes inflammatoires et pro-apoptotiques. Grâce à ses propriétés régulatrices sur les voies moléculaires clés de la cancérogenèse, il pourrait être considéré comme un candidat sérieux pour une approche préventive contre le carcinome spinocellulaire cutané. Ces résultats ouvrent ainsi la voie à de futures investigations cliniques visant à valider son potentiel en tant que traitement préventif officiel contre le cancer de la peau.

Mots-clés : DMBA ; Huile de croton ; Carcinome spinocellulaire cutané ; Huile de poisson ; Inflammation ; NF- κ B ; Stress-oxydant ; Hémostasie systémique.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the chemopreventive mechanisms of fish oil, administered at varying doses and by different routes, in a previously established experimental model of skin carcinogenesis. This model is based on the induction of a skin tumor by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and croton oil in Swiss albino mice.

Seventy mice were divided into ten groups, including control groups and groups receiving fish oil either orally or topically, with or without carcinogenesis induction. The chemopreventive effects were evaluated through a morphological and histological analysis of skin papillomas, complemented by a blood count and a biochemical analysis of LDH levels. The synergistic involvement of TNF- α and NF- κ B was studied through an ELISA assay and the analysis of the gene expression of NF- κ B subunits by qRT-PCR. In parallel, the variations in molecular and enzymatic markers of oxidative stress were examined. The histopathological analysis revealed the presence of invasive cutaneous squamous cell carcinoma in mice subjected solely to carcinogenesis. The groups treated either orally (500 mg/kg/day) or topically showed no signs of cancer, in contrast to the mice that received an oral administration of 50 mg/kg/day, which showed no protective effect. Supplementation at 250 mg/kg/day, however, resulted in the development of a low-grade malignancy. Oral treatments (250 and 500 mg/kg/day) and topical treatments with fish oil significantly reduced tumor development and improved systemic homeostasis in mice subjected to carcinogenesis induction. These results indicate that fish oil possesses dose-dependent chemopreventive effects, with oral administration being as effective as topical application, provided that an appropriate dosage is used. The development of cutaneous squamous cell carcinoma has been associated with oxidative stress, as well as the activation of the canonical NF- κ B1 pathway, without modification of the alternative NF- κ B2 pathway, and TNF- α -mediated inflammation. The chemoprotective effects of fish oil appear to result from negative regulation of the NF- κ B pathway, likely due to a feedback loop induced by intense chronic inflammation, modulated by TNF- α .

Our results further reinforce the growing interest in fish oil as a natural chemopreventive agent, capable of slowing the development of skin cancer through inflammatory and pro-apoptotic mechanisms. Due to its regulatory effects on key molecular pathways involved in carcinogenesis, fish oil could be considered a strong candidate for a preventive approach against cutaneous squamous cell carcinoma. These findings pave the way for future clinical investigations aimed at validating its potential as an official preventive treatment for skin cancer.

Keywords : DMBA; croton oil ; Cutaneous squamous cell carcinoma ; Fish oil ; Inflammation ; NF- κ B ; Oxidative stress ; Systemic homeostasis.

ملخص

هدف هذه الدراسة هو تقييم الآليات الكيميائية الوقائية لزيت السمك، المعطى بجرعات مختلفة ومن خلال طرق متعددة، في نموذج تجريبي لسرطان الجلد تم تطويره سابقاً. يعتمد هذا النموذج على تحفيز الورم الجلدي باستخدام 7,12-ديميثيلبنزين أنثراسين (DMBA) وزيت الكروتون لدى فئران سويسرية ألبينو.

تم تقسيم سبعين فأراً إلى عشر مجموعات، بما في ذلك مجموعات الشاهد والمجموعات التي تلقت زيت السمك عن طريق الفم أو بالتطبيق الموضعي، مع أو بدون تحفيز السرطان. تم تقييم التأثيرات الكيميائية الوقائية من خلال تحليل مورفولوجي والنسجي للزوائد الجلدية، مكملاً بتحليل تعداد خلايا الدم وتحليل كيميائي حيوي للـLDH. تم دراسة التداخل التآزري لـTNF- α وNF- κ B من خلال اختبار ELISA وتحليل التعبير الجيني للوحدات الفرعية NF- κ B باستخدام qRT-PCR. في الوقت نفسه، تم فحص التغيرات في المؤشرات الجزيئية والإنزيمية للإجهاد التأكسدي.

كشفت دراسة الانسجة عن وجود سرطان الجلد الخلوي الحرشي الغازي لدى الفئران المعرضة فقط لتحفيز السرطان. لم تظهر المجموعات التي تم علاجها عن طريق الفم (500 ملغ/كغ/يوم) أو التطبيق الموضعي أي علامات على السرطان، على عكس الفئران التي تلقت جرعة فموية تبلغ 50 ملغ/كغ/يوم، حيث لم يُلاحظ أي تأثير وقائي. من ناحية أخرى، أدى العلاج بجرعة 250 ملغ/كغ/يوم إلى ظهور سرطان منخفض الدرجة. نتائجننا سجلت كذلك ان العلاجات الفموية (250 و500 ملغ/كغ/يوم) والعلاج الموضعي بزيت السمك قللت بشكل كبير من تطور الورم، بينما حسنت التوازن الحيوي لدى الفئران التي خضعت لتحفيز السرطان. تشير هذه النتائج إلى أن زيت السمك يمتلك تأثيرات كيميائية وقائية تعتمد على الجرعة، مع كون الطريق الفموي فعال بنفس قدر التطبيق الموضعي، بشرط استخدام جرعة مناسبة. تم ربط تطور سرطان الجلد الخلوي الحرشي بالإجهاد التأكسدي، بالإضافة إلى تنشيط المسار NF- κ B1 التقليدي، دون تغيير المسار البديل NF- κ B2، وكذلك التهاب بواسطة TNF- α . يبدو أن التأثيرات الكيميائية الوقائية لزيت السمك تنجم عن تنظيم سلبي لمسار NF- κ B، على الأرجح بسبب حلقة تغذية راجعة ناتجة عن التهاب مزمن حاد، يتم تنظيمه بواسطة TNF- α .

تعزز نتائجننا الاهتمام المتزايد بزيت السمك كعامل كيميائي وقائي طبيعي قادر على كبح تطور سرطان الجلد من خلال آليات التهابية ومؤيدة للاستماتة الخلوية. بفضل خصائصه التنظيمية على المسارات الجزيئية الرئيسية في السرطان، يمكن اعتباره مرشحاً جاداً لنهج وقائي ضد سرطان الجلد الخلوي الحرشي. وبالتالي، تفتح هذه النتائج الطريق لدراسات سريرية مستقبلية تهدف إلى التحقق من إمكاناته كعلاج وقائي رسمي ضد سرطان الجلد.

كلمات مفتاحية: DMBA ; زيت الكروتون ; سرطان الجلد الخلوي الحرشي ; زيت السمك ; NF- κ B ; التهاب الإجهاد التأكسدي ; التجلط الدموي الجهازى.

Liste des figures

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Figure 01 | Organisation générale de la peau | 05 |
| Figure 02 | Populations cellulaires composant l'épiderme | 08 |
| Figure 03 | Coupe histologique d'une peau humaine saine (coloration H/E) | 09 |
| Figure 04 | Tumeurs malignes prédominantes de la peau | 11 |
| Figure 05 | Nodule érythémateux cutané typique d'un carcinome spinocellulaire cutané | 12 |
| Figure 06 | Trois étapes de cancérogenèse chimique | 16 |
| Figure 07 | 7,12-diméthylbenz[a]anthracène | 17 |
| Figure 08 | Origine et dispersion environnementale du DMBA | 18 |
| Figure 09 | <i>Croton tiglium</i> | 18 |
| Figure 10 | 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) | 19 |
| Figure 11 | Effet du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate sur les marqueurs d'inflammation et le stress oxydatif | 19 |
| Figure 12 | Progression tumorale par sélection clonale | 24 |
| Figure 13 | Cycle cellulaire et points de contrôles et restriction | 25 |
| Figure 14 | Voie de signalisation des MAP-kinases, avec les voies RAS-RAF-MEK-ERK. | 27 |
| Figure 15 | Vue d'ensemble de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR | 28 |
| Figure 16 | Voies de signalisation NF-κB canonique et non canonique | 29 |
| Figure 17 | Balance entre la vie et la mort cellulaire | 31 |
| Figure 18 | Rôle du stress oxydatif dans la tumorigenèse | 32 |
| Figure 19 | Dérégulation du métabolisme énergétique d'une cellule tumorale | 34 |
| Figure 20 | Inflammation chronique, angiogenèse et invasion tumorale | 35 |
| Figure 21 | Mécanismes d'échappement immunitaire des cellules tumorales | 37 |
| Figure 22 | Etapas de production de l'huile de poisson raffinée et purifiée | 41 |
| Figure 23 | Structures chimiques des acides gras dérivés de l'huile de poisson | 43 |
| Figure 24 | Absorption des acides gras polyinsaturés par les chylomicrons | 44 |
| Figure 25 | Incorporation des acides gras oméga trois à la membrane cellulaire | 46 |
| Figure 26 | Régulation de la réponse inflammatoire par inactivation de la voie NF-κB par les oméga trois | 47 |
| Figure 27 | Voies de signalisation influencée par AGPI ω-3 dans le système nerveux | 48 |

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Figure 28 | Effet antiagrégant des EPA dans le traitement de pathologies cardiovasculaires | 49 |
| Figure 29 | Activités anticancéreuses des AGPI omégas trois | 52 |
| Figure 30 | Schéma récapitulatif du protocole expérimental de la mise au point d'un modèle animal de carcinome spinocellulaire cutané chez la souris swiss albinos | 55 |
| Figure 31 | Schéma récapitulatif du protocole expérimental de l'effet préventif de l'huile de poisson chez un modèle animal de carcinome spinocellulaire | 56 |
| Figure 32 | Schéma simplifié des groupes expérimentaux du protocole de mise au point de la carcinogénèse chimique par le couple DMBA/huile de croton | 59 |
| Figure 33 | Schéma simplifié des étapes de réalisation de la technique histologique et coloration standard (Hématoxyline - Eosine) | 63 |
| Figure 34 | Aspect macroscopique du développement de papillomes chez tous les groupes de souris après 21 semaines d'expérimentation | 64 |
| Figure 35 | Coupes histologiques cutanées des différents groupes expérimentaux | 67 |
| Figure 36 | Variations de concentration de la LDH sérique chez les souris des groupes expérimentaux | 69 |
| Figure 37 | Huile de poisson utilisée dans le protocole expérimental d'évaluation du potentiel préventif contre le CSCc | 75 |
| Figure 38 | Schéma récapitulatif du protocole expérimental. | 78 |
| Figure 39 | Courbe d'étalonnage BSA | 80 |
| Figure 40 | Etapes de réalisation du dosage du TNF- α par la technique ELISA | 82 |
| Figure 41 | Courbe d'étalonnage du TNF- α | 82 |
| Figure 42 | Etapes d'extraction des ARN totaux, par le NucleoZOL, à partir de fragments cutanés | 84 |
| Figure 43 | Synthèse de l'ADNc à partir des ARN totaux extraites de fragments cutanés | 86 |
| Figure 44 | Etapes de la qRT-PCR en temps réel quantitative utilisant de SYBR Green | 89 |
| Figure 45 | Description macroscopique des papillomes et de l'aspect cutané après 16 semaines d'expérimentation | 91 |
| Figure 46 | Variations des concentrations de la LDH sérique chez les souris des groupes témoins et traitées | 95 |
| Figure 47 | Images microscopiques d'échantillons cutanés des cinq lots témoins | 97 |

| | | |
|------------------|---|------------|
| Figure 48 | Images microscopiques de coupes d'échantillons cutanés des cinq lots DMBA et traités à l'huile de poisson | 98 |
| Figure 49 | Variations de concentration des biomarqueurs de stress oxydatif | 100 |
| Figure 50 | Variations de concentration des antioxydants enzymatiques | 102 |
| Figure 51 | Variations des concentrations du TNF α sérique chez les souris des groupes témoins et traitées | 103 |
| Figure 52 | Variations des taux d'expression génique des sous unités NF-KB1 et NF-KB2 par qRT-PCR | 104 |

Liste des tableaux

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Tableau 01 | Facteurs de risque influençant l'initiation de tumeurs cutanées | 10 |
| Tableau 02 | Indicateurs morphométriques de la formation de papillomes | 60 |
| Tableau 03 | Etapas de réalisation des coupes histologiques par la coloration standard (Hématoxyline - Eosine) | 62 |
| Tableau 04 | Effet de la variation de la dose et de la fréquence d'application de DMBA dans l'induction de papillomes cutanés chez des souris swiss albinos | 65 |
| Tableau 05 | Evolution partielle des paramètres hématologiques (numération des GB et GR) dans les différents groupes expérimentaux | 68 |
| Tableau 06 | Composants du mix réactionnel pour la synthèse du premier brin d'ADNc d'ARNm à partir de 1000 ng d'ARN | 85 |
| Tableau 07 | Composants du SYBR Green Master Mix pour qRT-PCR | 87 |
| Tableau 08 | Séquences et températures de fusion (T_m) de paires d'amorces codant pour les gènes de β -actin, NF-kB1 et NF-kB2 | 87 |
| Tableau 09 | Composition du mix réactionnel pour une amplification Q-rt PCR d'un échantillon d'ADNc en système SybrGreen | 88 |
| Tableau 10 | Programme thermique spécifique aux paires d'amorces | 88 |
| Tableau 11 | Cycle réalisé pour l'analyse des courbes de fusion | 88 |
| Tableau 12 | Effet de l'administration orale et cutanée de l'huile de poisson sur le développement de papillomes induits par le couple DMBA/HC chez des souris swiss albinos | 92 |
| Tableau 13 | Variation des paramètres hématologiques des groupes témoins et traités | 94 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------|---|
| A | Adénine |
| ACID | Severe Combined Immuno Depression |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| ADNdb | ADN double brin |
| AG | Acide gras |
| AGL | Acide gras libre |
| AGMI | Acides gras mono-insaturé |
| AGPI | Acides gras poly-insaturé |
| Akt | AK strain transforming |
| AMPC | Adénosine monophosphate cyclique |
| AMPK | AMP-activated protein kinase |
| ANOVA | Analyse de la variance |
| AOPP | Advanced Oxidation Proteins Products |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ARNm | Acide ribonucléotidique messenger |
| ARNt | Acides ribonucléiques total |
| ATP | Adénosine Triphosphate |
| BAFF | B-cell activating factor |
| Bax | Bcl-2-Associated X |
| Bcl2 | B-cell /lymphoma 2 |
| BSA | Bovine serum albumin |
| Cas9 | CRISPR Associated protein 9 |
| CAT | Catalase |
| CD4 | Cluster de différenciation 4 |
| CD8 | Cluster de différenciation 8 |
| CDK | Kinases dépendantes à des cyclines |
| CMH I | Complexe majeur d'histocomptabilité I |
| COX | Cyclooxygénase |
| CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| CSCc | Carcinome spinocellulaire cutanée |
| PD1 | Neuroprotectine D1 |

| | |
|---------------|---|
| DAMP | Damage Associated Molecular Pattern |
| DFSP | Dermatofibrosarcome protubérant |
| DG | Diglycéride |
| DHA | Docosahexaenoic acid |
| DHP | Deoxyhypusine synthase |
| DMBA | 7,12-DiMéthylBenz[a]Anthracène |
| DNase | Deoxyribonuclease |
| dTTP | Deoxythymidine triphosphate |
| EDRF | Endothelium-Derived Relaxing Factor |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| EPA | Eicosapentaenoic acid |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinases |
| ERK1 | Kinases régulées par signal extracellulaire |
| ERO | Dérivés réactifs de l'oxygène |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| FNS | Numération de la formule sanguine |
| G2-M | Second Gap phase of mitosis |
| GB | Globule blanc |
| GCLM | Glutamate-cystéine ligase modifier subunit |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| GLC | Gouttelettes lipidiques cytoplasmiques |
| GLUT1 | Transporteur du glucose type 1 |
| GMPc | Guanosine monophosphate cyclique |
| GPCR | G protein-coupled receptors |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| GSH | Glutathione reductase |
| GSR | Glutathione-disulfide reductase |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| GTPase | Guanosine triphosphate phosphatase |
| HAP | Hydrocarbure aromatique polycyclique |
| HC | Hydrocarbon |
| HDL | High-density lipoproteins |
| HOCl | Acide hypochloreux |
| HP | Huile de poisson |
| HPV | Human Papillomavirus |

| | |
|---|---|
| Hras-1 | Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog 1 |
| IKK2 | Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta |
| IL-1β | Interleukine 1 bêta |
| IL-6 | Interleukine 6 |
| IL-8 | Interleukine 8 |
| IκB | IkappaB kinase |
| IκBα | Inhibitor of kB |
| JNK1 | Protéine kinase N-terminale de c-Jun |
| LDH | Lactate Déshydrogénase |
| LDL | low-density lipoprotein |
| LOX | Lipoxygénase |
| LPL | Lipoprotéines lipases |
| LPO | Lipid peroxidation |
| LYM | Lymphocytes |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MDA | Malondialdéhyde |
| MEC | Matrice extracellulaire |
| MEK | Mitogen/extracellular signal-regulated kinase |
| MG | Monoglycéride |
| MMP | Métalloprotéinases de la matrice |
| mTOR | Mechanistic target of rapamycin |
| NAD⁺ | Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide réduit |
| NF-κB | Nuclear factor-kappa B |
| NIK | NF-kB inducing kinase |
| NO | Azote |
| NO₂ | Dioxyde d'azote |
| OH | Hydroxyle |
| ONOO | Peroxynitrite |
| P21 | Protéine régulatrice du cycline |
| P50 | Sous unité NF-Kb 1 |
| P52 | Sous unité NF-Kb 2 |
| p53 | Tumor protein p53 |
| P65 | Sous unité NF-Kb Rel A |
| PAM | Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Patterns |

| | |
|----------------|--|
| PANC-1 | Pancreatic cancer cell line 1 |
| PC | Phosphatidylcholine |
| PCO | Protéines carbonylées |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PD-1 | Programmed death 1 |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| PD-L1 | Programmed death ligand 1 |
| PE | Phosphatidyléthanolamine |
| PGE2 | Prostaglandine 2 |
| PGE3 | Prostaglandine 3 |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinase |
| PKC | Protéine kinase C |
| POS | Osteoblast specific factor |
| PPAR | Peroxisome proliferator-activated receptor |
| PRb | Protéine rétinoblastome |
| PS | Phosphatidylsérine |
| PTEN | Phosphatase and TENsin homolog |
| Raf | Rapidly Accelerated Fibrosarcoma |
| RAF | Rapidly accelerated fibrosarcoma |
| Rb | Rétinoblastome |
| RCC | Renal cell carcinoma |
| RelA | Rela proto-oncogene homolog A |
| RelB | Rela proto-oncogene homolog B |
| RNS | Reactive nitrogen species |
| ROS | Reactive oxygen species |
| ROX | Référence passive du colorant |
| RTK | Récepteur tyrosine kinase |
| RT-qPCR | Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction |
| SCC | Squamous Cell Carcinoma, carcinome à cellules squameuses |
| SOD | Superoxide dismutase |
| T | Thymine |
| TBS | Tris Buffered Saline |
| TG | Triglycéride |
| TGF-β | Transforming growth factor |
| TLR | Toll-like receptor |

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| T_m | Température de fusion |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TNFR | Tumor necrosis factor receptor |
| TNF-α | Tumor necrosis factor alpha |
| TPA | 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate |
| TRADD | TNFR1-Associated Death Domain protein |
| TRAF-1 | TNF receptor-associated factor 1 |
| TXA₂ | Thromboxane A ₂ |
| UDG | Uracile ADN glycosylase |
| UI | Unité Internationale |
| UTP | Uridine triphosphate |
| UV | Ultraviolet |
| UVB | Ultraviolet B |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |
| ω-3 | Oméga-3 |

Glossaire d'histologie

| | |
|-----------------------------------|---|
| Anisocaryose | Variation anormale de la taille des noyaux des cellules dans un même tissu. |
| Anisocytose | Variation anormale de la taille des cellules dans un même tissu. |
| Basophilie | Capacité d'un élément cellulaire à se colorer intensément à l'hématoxyline par richesse en acides nucléiques. |
| Capsule tumorale | Une fine couche de tissu fibreux qui entoure la tumeur, formant une sorte de coque entre la tumeur et les tissus environnants. |
| Cellule atypique | Une cellule qui présente des caractéristiques anormales, par rapport aux cellules normales du même tissu. |
| Dysplasie | Anomalie du développement cellulaire caractérisée par des altérations de la taille, de la forme ...etc. |
| Hyperkératose | Epaississement anormal de la couche cornée de la peau. |
| Hyperplasie | Augmentation de nombres de cellules dans un tissu par prolifération cellulaire. |
| Noyau apoptotique | Noyau de cellule en cours d'apoptose. |
| Noyau mitotique | Noyau de cellule en cours de mitose. |
| Noyau pycnotique | Noyau condensé, petit, et très basophile (observé lors des étapes terminales de mort cellulaire). |
| Nucléole proéminent | Nucléole de grande taille. |
| Stroma fibro-inflammatoire | Tissu de soutien qui montre une fibrose : présence de tissu conjonctif dense, riche en fibres de collagènes, avec la présence de cellules inflammatoires. |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cancer constitue l'une des principales causes de mortalité dans le monde, avec près de 10 millions de décès recensés en 2022 selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). La répartition des cancers les plus fréquents diffère selon le sexe : le cancer du sein et celui du col de l'utérus prédominent chez la femme, tandis que les cancers de la prostate et du poumon sont les plus courants chez l'homme (GCO, 2022). En Afrique, les données disponibles révèlent une incidence croissante des cancers cutanés non mélanocytaires, principalement liée à une exposition solaire importante. Parmi ces cancers, le carcinome spinocellulaire cutané (CSCc) représente la deuxième forme la plus fréquente, après le carcinome basocellulaire cutané (CBCc) (Derancourt, 2019).

Le CSCc est une tumeur maligne qui se développe principalement à partir des kératinocytes de l'épiderme. Plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques favorisent son apparition, notamment l'âge, l'exposition aux rayons ultraviolets et l'exposition à certains produits chimiques (Elaine N. Marieb, 2019). La carcinogenèse chimique cutanée, induite par le 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) en association avec l'huile de croton, suit généralement trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. Ce modèle expérimental reproduit fidèlement les mécanismes impliqués dans le développement naturel du CSCc humain (A. Y. Yang et al., 2014). Cet enchaînement implique de multiples modifications génétiques ainsi que des altérations des voies moléculaires et cellulaires (Tandukar et al., 2024).

Une fois initié, le processus néoplasique devient difficile à contrôler en raison de la plasticité cellulaire et des mécanismes d'échappement tumoral. Par ailleurs, les stratégies thérapeutiques actuelles induisent souvent des effets secondaires ainsi qu'une toxicité systémique limitant à la fois leur efficacité et leur tolérance (Tetterton-Kellner et al., 2024). De ce fait, la prévention de la carcinogénèse constitue un axe stratégique majeur en oncologie. Dans cette perspective, l'identification de molécules dotées de propriétés biologiques capables d'interrompre les phases précoces du processus tumoral constitue une alternative prometteuse.

Dans ce contexte, les recherches récentes se concentrent sur l'identification de biomolécules et l'étude de leurs propriétés biologiques. Parmi elles, les oméga-3 (ω -3), en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), suscitent un intérêt croissant. Ces acides gras polyinsaturés (AGPI) proviennent principalement des organismes marins, notamment les poissons, qui les accumulent à partir des micro-algues et du plancton

(de Magalhães et al., 2016). L'huile de poisson constitue une source concentrée en EPA et en DHA. Grâce à leurs structures, ces derniers jouent un rôle clé dans la régulation transcriptionnelle de facteurs nucléaires impliqués dans l'inflammation, l'apoptose et la prolifération cellulaire. Ils agissent comme inhibiteur de la voie de signalisation de plusieurs récepteurs, notamment ceux de l'interleukine-1 (IL-1), de l'interleukine-6 (IL-6) et du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), modulant ainsi l'expression de gènes associés, notamment celui du NF- κ B (Bazan et al., 2011; Serhan, 2014).

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets préventifs des ω -3 contenus dans l'huile de poisson sur le développement d'une cancérogenèse chimique cutanée induite par l'initiateur DMBA et le promoteur huile de croton. Dans cette optique, nous avons d'abord mis au point un modèle expérimental de CSCc adapté à notre souche locale de souris Swiss albinos, en explorant les effets des variations de dose et de fréquence d'administration du carcinogène DMBA. Le modèle final a été sélectionné sur la base des résultats morphologiques, histologiques et biochimiques.

Une fois le modèle établi, nous avons évalué les effets de l'huile de poisson en fonction de la dose et de la voie d'administration. L'impact du traitement a été analysé à travers plusieurs paramètres, incluant les caractéristiques morphologiques et histologiques de la peau, ainsi que les paramètres hématologiques, biochimiques et moléculaire.

Ainsi, nous avons exposé notre thèse en développant méthodiquement, en chapitres, les éléments suivants :

- ⇒ La structure de la peau et les mécanismes de développement du carcinome CSCc.
- ⇒ La biologie de la cellule cancéreuse et les mécanismes de développement tumoral.
- ⇒ La composition de l'huile de poisson ; le métabolisme et les activités biologiques des omégas trois de type (EPA) et (DHA).

La partie expérimentale se divise en deux volets:

- ⇒ La mise au point du modèle expérimental de CSCc (évaluation des paramètres : morphologique, anatomopathologique, hématologique et biochimique intervenant dans le processus d'induction tumorale).
- ⇒ L'étude de l'effet de la dose et la voie d'administration de l'huile de poisson dans la prévention contre un modèle de CSCc expérimental (évaluation morphologique des

papillomes, histologique de la peau, hématologiques et biochimiques via étude de biomarqueurs de stress oxydatif, marqueur d'inflammation, TNF- α , ainsi que l'expression génique des sous unités NF-kB.

CHAPITRE I

*PEAU ET CARCINOME SPINOCELLULAIRE,
ANATOMIE ET DYNAMIQUE*

CHAPITRE I Peau et carcinome spinocellulaire, anatomie et dynamique.

1. Anatomie de la peau

La peau constitue la composante membraneuse du système tégumentaire, recouvrant la majeure partie de la surface corporelle. Chez un adulte, la peau recouvre une superficie d'environ 1.8 m² et présente une masse d'environ 2700 g, ces valeurs sont susceptibles de varier en fonction de la morphologie et de la physiologie de l'individu. Son épaisseur, qui oscille généralement entre 1 et 2 millimètres, peut être modulée selon les régions du corps (elle est plus fine au niveau des paupières et plus épaisse au niveau des paumes des mains et des plantes des pieds). La température cutanée se situe habituellement entre 32 et 36°C, avec certaines zones du corps, comme les orteils, présentant des températures plus basses que le reste de l'organisme). La surface de la peau porte une charge électrique négative, propriété qui contribue à la formation d'un manteau acide protecteur contre les agents pathogènes. La peau se compose de plusieurs couches distinctes allant de l'intérieur vers l'extérieur : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Ces couches lui confèrent l'ensemble de ses propriétés fonctionnelles et mécaniques (figure 01) (Pierre Kamina, 2009; Marieb, 2019).

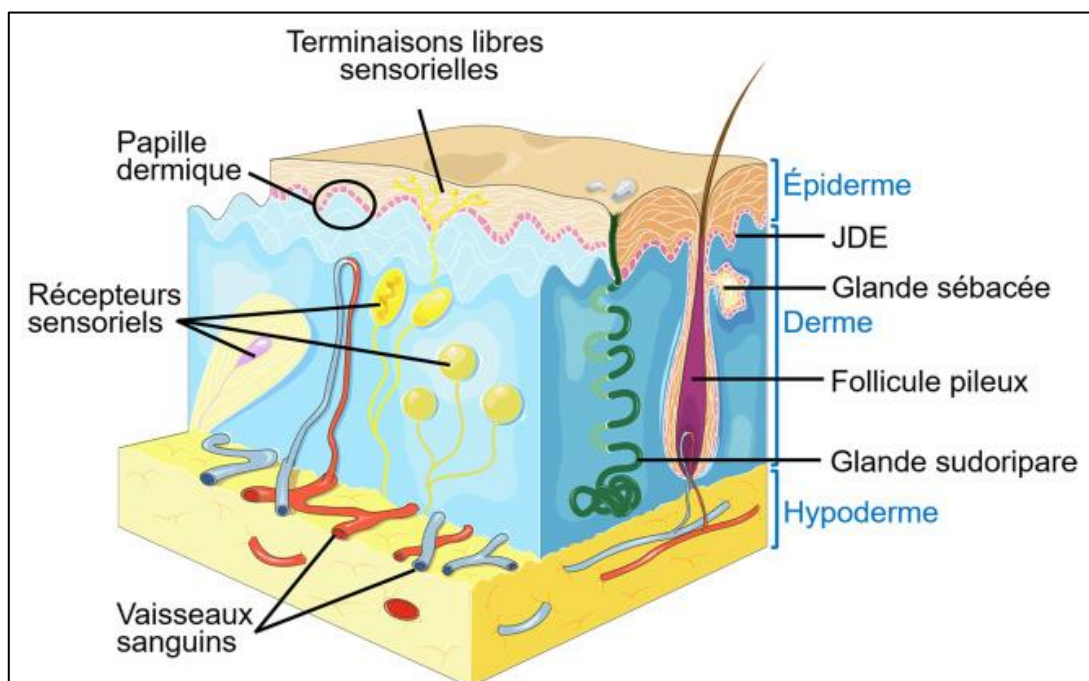


Figure 01 Organisation générale de la peau (Bessaguet et al., 2022)

1.1. Epiderme

L'épiderme représente la couche la plus superficielle de la peau, il est formé d'un épithélium pavimenteux pluristratifié épais de 0,04 à 0,4 millimètres. Sa structure stratifiée et dynamique,

se renouvelle environ tous les 28 jours, lui permettant d'assurer à la fois des fonctions de barrière, sensorielles et immunitaires. Il se compose de cinq couches distinctes qui contiennent quatre types de cellules : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (figure 02). Il est important de noter que l'épiderme est non vascularisé, et que ses couches profondes reçoivent les nutriments et l'oxygène par diffusion depuis le derme sous-jacent, qui est richement vascularisé (Elaine N. Marieb, 2019).

1.1.1. Cellules de l'épiderme

L'épiderme est formé essentiellement par quatre types de cellules : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (figure 02).

- **Kératinocytes** : représentent 80 à 90 % des cellules, ce sont les principales unités constituant l'épiderme. Leur rôle principal consiste à produire de la kératine, une protéine fibreuse qui confère aux cellules de l'épiderme leurs propriétés protectrices. Ces cellules sont liées les unes aux autres par des desmosomes et elles ont la capacité de se diviser de façon quasi continue par mitose au niveau de la couche la plus profonde de l'épiderme, la couche basale. Au fur et à mesure de leur migration de la couche basale vers la couche cornée, les kératinocytes subissent une série de transformations : prolifération, différenciation, kératinisation et finalement desquamation.
- **Mélanocytes** : ce sont des cellules épithéliales spécialisées dans la synthèse de la mélanine. De forme étoilée, elles possèdent de nombreux prolongements facilitant le transfert de la mélanine vers les kératinocytes voisins. La mélanine s'accumule sur la surface du noyau des kératinocytes lui offrant ainsi une protection contre les effets des ultraviolets.
- **Cellules de Langerhans (macrophages intra-épidermiques)** : ce sont des macrophages produits dans la moelle osseuse. Elles contribuent à l'immunocompétence de la peau en présentant les antigènes aux lymphocytes T, assurant ainsi le rôle de barrière immunitaire.
- **Cellules de Merkel (épithélioïdocytes)** : jouent le rôle de récepteur sensoriel du toucher, elles se trouvent au niveau de la jonction de l'épiderme et du derme. Elles sont associées à une terminaison nerveuse sensitive en forme de disque appelée disque de Merkel (Elaine N. Marieb, 2019; Yousef et al., 2025).

1.1.2. Couches de l'épiderme

- Couche basale (*stratum basale*) : appelée aussi couche germinative, elle représente la fondation vivante de l'épiderme et se trouve en contact direct avec la membrane basale. Elle se compose principalement d'une seule épaisseur de cellules, constituée de kératinocytes dont la majorité est en prolifération. Cette structure contient également entre 10 à 25 % de mélanocytes.
- Couche épineuse (*stratum spinosum*) : majoritairement composée de kératinocytes, ces cellules présentent une forme légèrement aplatie et irrégulière, et elles renferment un réseau de filaments intermédiaires qui traversent le cytosol pour se rattacher au desmosomes.
- Couche granuleuse (*stratum granulosum*) : composée de 3 à 5 strates, elle représente une étape clé dans la maturation des kératinocytes, marquant la transition entre des kératinocytes vivants et actifs à des cellules mortes et cornifiées. L'accumulation des granules de kératohyalines dans le cytoplasme des kératinocytes leur donne un aspect granuleux visible au microscope, d'où l'appellation « couche granuleuse ».
- Couche cornée (*stratum corneum*) : se trouve au sommet de l'épiderme, elle se compose de 20 à 30 strates de cellules kératinisées ou cornées (cornéocytes) aplaties et ressemblent à des écailles (squames). La kératine et les membranes plasmiques épaissies protègent la peau en lui offrant une protection contre les agressions extérieures. En outre, le glycolipide contenu entre les cornéocytes imperméabilise cette couche en formant un film hydrolipidique (Marieb, 2019).

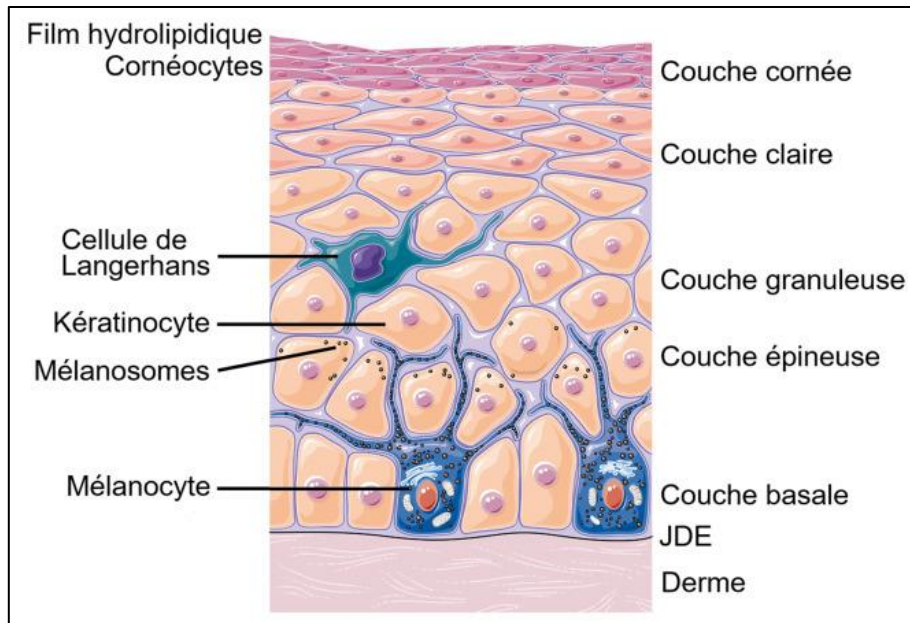


Figure 02 Populations cellulaires composant l'épiderme (Bessaguet et al., 2022)

1.2. Jonction dermo-épidermique ou lame basale

La lame ou la membrane basale, assure l'adhésion entre le derme et l'épiderme permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments. Lors de la stratification de l'épiderme, les kératinocytes qui prolifèrent restent attachés à la membrane basale permettant la migration des cellules filles dans les couches supérieures de l'épiderme (Bessaguet et al., 2022).

1.3. Derme

Un tissu conjonctif dense dont l'épaisseur varie entre 0.5 à 2.5 mm, le derme est situé entre l'épiderme et l'hypoderme, il est constitué principalement de matrice extracellulaire (MEC) et de fibroblastes. Il se divise en deux compartiments essentiels :

- Le derme papillaire : superficiel, comprends les papilles dermiques et assure les échanges et la nutrition de l'épiderme,
- Le derme réticulaire : plus profond, qui confère à la peau sa résistance, son élasticité et sa capacité d'extension (figure 03).

Le derme est richement vascularisé et innervé, il contient des cellules mobiles (leucocytes et macrophages) qui participent à la défense immunitaire. La substance fondamentale de la MEC, composée d'eau et de macromolécules, tels que l'acide hyaluronique, joue un rôle clé dans l'hydratation. Parmi ses fonctions, le derme agit comme un réservoir d'eau, un tissu de soutien

et une source de nutriments pour l'épiderme. Il contribue également à la protection mécanique et immunitaire de la peau. (Elaine N. Marieb, 2019; Mohamed & Hargest, 2022).

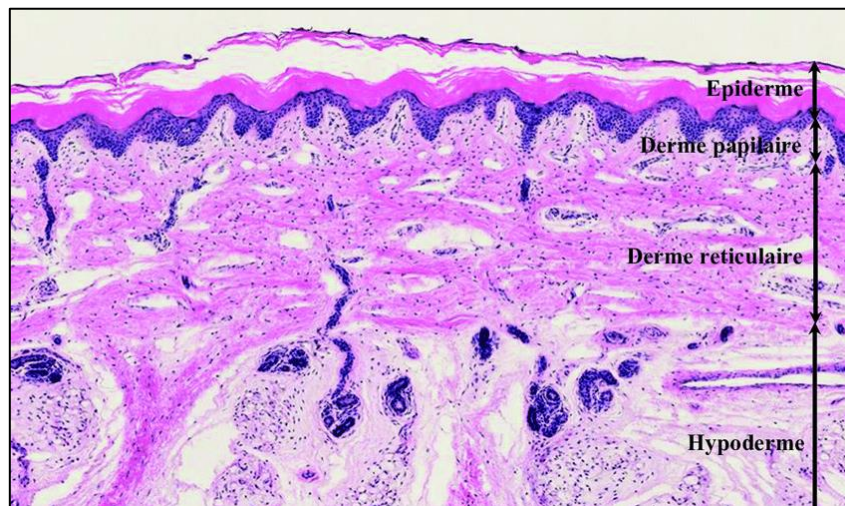


Figure 03 Coupe histologique d'une peau humaine saine (coloration H/E) (Ganier, 2018)

1.4. Hypoderme

Représente la couche la plus profonde de la peau, l'hypoderme est principalement composé de tissu adipeux, richement vascularisé et innervé, qui joue un rôle clé dans l'amortissement des pressions et des glissements, ainsi que dans la répartition des charges. En plus de son rôle de stockage calorifique, il contribue à la thermorégulation et à l'équilibre hydrique de l'organisme (Mohamed & Hargest, 2022).

2. Fonctions de la peau

La peau assure de nombreux rôles essentiels à la santé et exerce une influence sur le métabolisme de l'organisme. Cet organe polyvalent, agit comme une barrière physique et chimique en protégeant l'organisme contre les agressions mécaniques, les agents chimiques et microbiologiques, tout en assurant la transmission de stimuli sensoriels. De plus, la régulation de la température corporelle s'exerce via la transpiration et la modulation vasculaire dermique, contribuant à l'homéostasie interne. La peau contribue également à la synthèse de la vitamine D sous l'effet des rayons ultraviolets, favorisant ainsi le métabolisme osseux et modulant le système immunitaire. Grâce à sa capacité de régénération, combinée à l'activité des glandes sébacées, la peau permet non seulement la cicatrisation des lésions, mais aussi participe à l'élimination de certains déchets métaboliques (Marieb, 2019).

3. Cancers de la peau

Un cancer de la peau se définit comme toute transformation maligne des cellules constitutives du tissu cutané, résultant d'une prolifération cellulaire anormale et incontrôlée conduisant à la formation de tumeurs. Plusieurs facteurs environnementaux, génétiques et biologiques peuvent favoriser l'initiation et la croissance des cancers, le tableau ci-dessous (tableau 01) représente l'ensemble de facteurs déclenchant ce type de tumeurs cutanées (Hands & Moy, 2020; Varshney et al., s. d.; Wunderlich et al., 2024).

Tableau 01 Facteurs de risque influençant l'initiation de tumeurs cutanées.

| Facteurs extrinsèques | Facteurs intrinsèques |
|---|--|
| - Exposition cumulative au soleil. | - Phototype de la peau (peau claire). |
| - Exposition aux polluants, produits chimiques, rayons UV synthétiques et radiation isolante. | - Prédisposition génétique (antécédents familiaux). |
| - Mode de vie (alimentation, tabagisme...). | - Immunosuppression (VIH / transplantation d'organes). |
| - Infection virale au HPV. | - Maladies auto-immunes. |
| | - Inflammation chronique et stress oxydatif. |

En fonction du tissu atteint et du type de cellules transformées, on distingue deux grands types histologiques de cancers :

- **Les carcinomes** : sont les cancers les plus fréquents et se développent à partir des cellules des tissus épithéliaux, qui recouvrent la peau, les muqueuses et les organes internes. Ils incluent, par exemple, les carcinomes basocellulaires et épidermoïdes de la peau.
- **Les sarcomes** : sont des cancers plus rares qui touchent les tissus conjonctifs, tels que les os, les muscles, les cartilages et les tissus adipeux. Leur origine et leur évolution diffèrent de celles des carcinomes, nécessitant des approches thérapeutiques spécifiques.

3.1. Tumeurs cutanées prédominantes

- Carcinome basocellulaire : provient des cellules basales de l'épiderme, il présente une phase de croissance lente avec un faible potentiel de métastase (figure 04).
- Carcinome spinocellulaire : il se développe à partir des kératinocytes différenciés de la couche épineuse de l'épiderme.
- Mélanome : Représentant la forme la plus dangereuse des tumeurs cutanées. Il naît des mélanocytes et se développe généralement à partir d'un grain de beauté (naevus). Le mélanome est généralement classé parmi les carcinomes car il affecte l'épiderme. Cependant, en raison de son comportement très agressif et de sa forte capacité à métastaser, il est souvent considéré comme un type de cancer distinct des carcinomes et des sarcomes (Elaine N. Marieb, 2019).

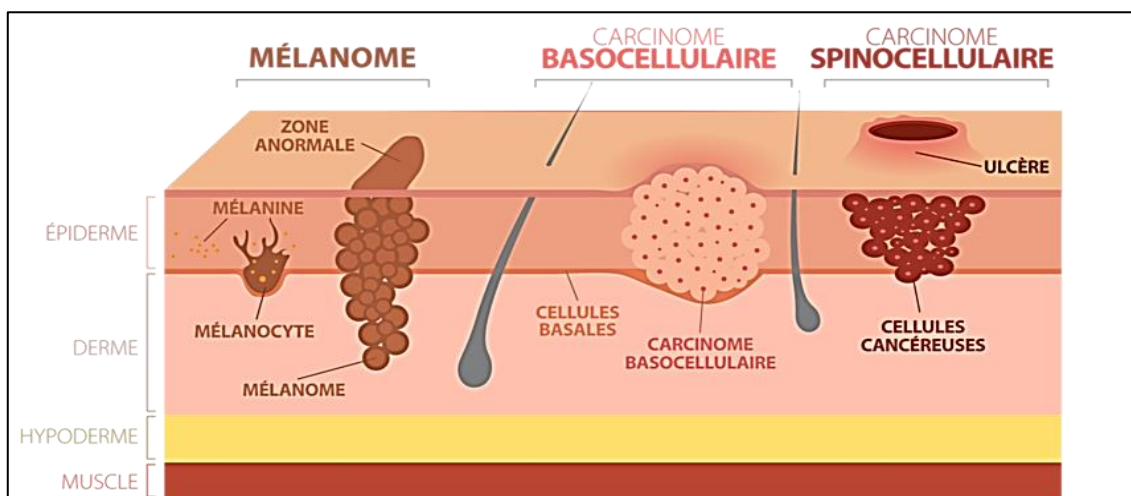


Figure 04 Tumeurs malignes prédominantes de la peau (Brancati, 2024).

3.2. Tumeurs cutanées rares

- Dermatofibrosarcome protubérant (DFSP) : c'est un sarcome cutané caractérisé par une croissance locale progressive et une forte tendance aux récurrences locales après excision.
- Carcinome à cellules de Merkel : il se développe à partir de cellules neuroendocrines cutanées (cellules de Merkel). Ce type de cancer est souvent diagnostiqué à un stade avancé.
- Tumeur annexielle : elle regroupe diverses néoplasies affectant les glandes sébacées, sudoripares ou folliculaires (Garcia et al., 2021).

- Lymphome cutané : c'est un cancers lymphoïde qui se caractérise par une infiltration atypique de lymphocytes transformées dans le derme (Chuang et al., 1990).

4. Le Carcinome spinocellulaire cutané (CSCc)

4.1. Origine et caractéristiques

Le CSCc est une tumeur maligne qui se développe à partir de kératinocytes situés dans la couche épineuse de l'épiderme. Son incidence est plus importante chez les individus à peau claire et les personnes âgées. Il peut se développer de novo suite à l'exposition chronique aux rayons UV solaires ou bien progressivement à partir de lésions précancéreuses telles que la kératose actinique. Cliniquement, le CSCc se manifeste souvent sous forme de nodules érythémateux ou plaque squameuses, parfois ulcérées, avec une surface rugueuse et hyperkératosique (figure 05). Il est principalement localisé sur des zones chroniquement exposées au soleil telles que le visage, le cou, dorsum des mains et avant-bras. Bien que souvent indolore au début, le CSCc peut devenir douloureux, notamment lorsqu'il envahit profondément le derme (Fania et al., 2021; Martillo et al., 2024).



Figure 05 Nodule érythémateux cutané typique d'un CSCc (Bouharissa, 2017)

4.2. Mécanismes de transformation des kératinocytes en CSCc

La transformation maligne des kératinocytes dans un CSCc implique plusieurs étapes :

- Accumulation de mutations : les dommages répétés de l'ADN, notamment induits dans la majorité des cas par les UV, provoquent des mutations cumulatives dans les gènes régulateurs du cycle cellulaire des kératinocytes. La mutation du gène suppresseur p53 est souvent considérée comme un événement précoce majeur.
- Dérégulation du cycle cellulaire : les kératinocytes transformés échappent aux mécanismes naturels de réparation et de l'apoptose entraînant ainsi une prolifération incontrôlée. Des

modifications épigénétiques et une inflammation chronique favorisent la transformation maligne.

- Modification de l'architecture cellulaire : histologiquement, les cellules tumorales présentent une disposition désorganisée sous forme d'amas ou de cordons infiltrant, rompant la stratification épithéliale habituelle (signe de transformation maligne). Cependant, ces cellules conservent toujours certains traits de leur lignée d'origine en montrant des signes de différenciation kératocyttaire suivie parfois par des corpuscules de kératine dans les amas cellulaires (Welzel, 2019; Tandukar et al., 2024).

4.3. Approches préventives et thérapeutiques

Le traitement du CSCc comporte de multiples facettes et implique une combinaison de mesures préventives, d'interventions chirurgicales et de thérapies systémiques. Les stratégies préventives sont cruciales, en particulier pour les sujets à haut risque, afin de prévenir l'apparition de lésions précancéreuses. Parmi ces mesures figurent : l'application d'un écran solaire, le port de vêtements protecteurs, l'évitement de l'exposition au soleil aux heures les plus intenses (entre 10 h et 16 h), ainsi que des examens dermatologiques réguliers (Li et al., 2024).

Quant aux approches thérapeutiques, le choix du traitement dépend de plusieurs paramètres, notamment la taille, la localisation, l'agressivité histologique de la lésion ainsi que l'état général du patient. Parmi ces stratégies : les traitements chirurgicaux (excision chirurgicale standard et la chirurgie micrographique de Mohs) ; les thérapies locales dans le cas de lésions actiniques ; les thérapies systémiques telles que la chimio et la radiothérapie ciblées, l'immunothérapie ainsi que les thérapies à ciblage moléculaire (Singh et al., 2024; Taher et al., 2024).

4.4. Modèles expérimentaux (*in vivo*)

À ce jour, aucune méthode alternative ne peut se substituer entièrement à l'étude chez l'animal. L'efficacité d'une molécule pharmaceutique ou bio-thérapeutique doit être évaluée dans un contexte physiologique. En effet, les études précliniques sur l'animal permettent d'obtenir des informations sur l'activité anti-tumorale en termes de prolifération cellulaire, d'angiogenèse, de métastase, d'apoptose et de différenciation, ce qu'une étude *in vitro* ne peut fournir simultanément. Cependant, Bien que les modèles animaux soient précieux pour évaluer l'efficacité des traitements dans un contexte proche de celui de l'humain, ils ne reproduisent pas fidèlement le microenvironnement tumoral des CSCc humains, ce qui limite leur valeur

prédictive (Kumah & Bibee, 2023). Ces modèles permettent également d'étudier les étapes cruciales de la cancérogénèse à savoir : l'initiation, la promotion, la progression et les métastases. Ils permettent d'évaluer l'efficacité des méthodes d'interventions thérapeutiques dans un contexte biologique.

Le choix du modèle animal dépend de la problématique de recherche, avec des options allant de la carcinogénèse induite chimiquement aux souris génétiquement modifiées ou aux modèles de xéno greffe. Il existe plusieurs modèles animaux de cancérogénèse cutanée :

- Modèle induit par les rayons UV

Les modèles murins exposés aux rayons UV synthétiques ont été développés pour mimer le CSCc déclenché par exposition chronique aux rayons UV solaires. Ce protocole est basé sur le principe d'irradiation par exposition aux UVB (290-320 nm) plusieurs fois par semaine dans une première phase, ensuite, les fréquences d'exposition augmentent progressivement afin d'arriver au stade du CSCc. La distance entre la source UV et la peau, le temps d'exposition et l'intensité lumineuse sont soigneusement calibrés afin de garantir la fiabilité et comparabilité des résultats. Ces modèles sont particulièrement précieux pour étudier le rôle des dommages à l'ADN induits par les UV et des modifications épigénétiques, telles que les altérations de la méthylation de l'ADN et les altérations du gène suppresseur p53 (Burns et al., 2013; Meyer et al., 2024)

- Modèle de souris génétiquement modifiés

Ces modèles murins constituent des outils puissants pour étudier le rôle des altérations génétiques spécifiques dans le CSCc. Un exemple notable est le modèle knock-out induit par l'inactivation somatique des gènes suppresseurs de tumeurs *p53* et *Rb* (*Rétinoblastome*), qui entraîne une prolifération et une angiogénèse accrues, en raison de l'activation de la voie du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR/Akt). Il existe aussi le modèle transgénique où le gène *ras* impliqué dans les cancers de la peau est surexprimé (Martínez-Cruz et al., 2008; Paramio, 2023).

- Modèle de xéno greffe

Les cellules tumorales humaines sont immortelles et ont la capacité de croître après transplantation, cette caractéristique est appelée transmissibilité, c'est ce qui nous permet de réaliser des xéno greffes. Pour éviter le phénomène de rejet, ces greffes sont réalisées sur des

animaux présentant un déficit immunitaire sévère telle que les souris nude athymique ou des souris ACID (Severe Combined Immuno Depression) (Delehedde, 2006).

- Modification du génome par CRISPR/Cas9

Ce modèle repose sur l'intégration de technologie CRISPR/Cas9 pour cibler et perturber plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs chez les souris, entraînant le développement de papillomes. Cette approche facilite l'ingénierie de modifications génétiques spécifiques *in vivo*, fournissant des informations sur la base moléculaire du CSCc (Syu et al., 2023).

- Modèle de cancérogénèse chimique

La cancérogénèse induite chimiquement est l'une des méthodes les plus utilisées afin d'étudier le CSCc. Ce modèle d'induction à deux étapes implique l'application d'un cancérogène, le plus souvent le 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA), en tant d'initiateur, suivi d'un promoteur tumoral, tel que l'huile de croton ou bien le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Cette approche induit de manière fiable des papillomes bénins évoluant vers des CSCc chez des rongeurs, le plus souvent des souris. Ce modèle est utile pour étudier les modifications génétiques et moléculaires associées à l'initiation et à la progression tumorales (Mardaryev, 2020).

5. Les étapes de la cancérogénèse

La cancérogénèse est un processus pathologique en plusieurs étapes qui conduit à la transformation progressive d'une cellule normale en cellule tumorale. Ce processus se déroule en trois phases principales (figure 06). La cellule tumorale acquiert alors des caractéristiques spécifiques, notamment : une prolifération indépendante des signaux de croissance, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs entraînant une prolifération illimitée (perte de la sénescence), une résistance à l'apoptose, la capacité à induire l'angiogenèse, ainsi que des propriétés d'invasion et de dissémination métastatique (D & Ra, 2011).

- L'initiation : est un processus génétique irréversible conduisant à l'émergence de cellules préneoplasiques suite à l'exposition à un agent initiateur (Mirunalini & Susmitha, 2023). Les altérations génétiques et épigénétiques qui en résultent peuvent induire une activation constitutive des signaux de prolifération, l'inactivation des régulateurs négatifs du cycle cellulaire, une résistance aux signaux d'apoptose, des modifications du métabolisme

énergétique, une instabilité génétique, un échappement à la surveillance immunitaire, ainsi qu'une capacité accrue à favoriser la néo-angiogenèse et les réactions inflammatoires.

- La promotion : est un processus non génétique et réversible, caractérisé par l'expansion clonale des cellules préalablement initiées. Cette phase conduit à la formation de cellules transformées sous l'effet d'un agent promoteur, dont l'action doit être répétée et rapprochée dans le temps après l'exposition à l'agent initiateur (Em & Mg, 2007; Oliveira, 2016).
- La progression : est un processus génétique irréversible marquant l'évolution de la tumeur vers un stade plus agressif. Lorsqu'une tumeur est éloignée de la circulation sanguine et ne reçoit pas un apport suffisant en nutriments et en oxygène, sa croissance est limitée, constituant ainsi une barrière naturelle contre le développement tumoral. En revanche, si la tumeur induit une angiogenèse, elle favorise la formation d'un réseau vasculaire tumoral désorganisé et anarchique, permettant une croissance rapide et l'invasion des tissus environnants, menaçant ainsi l'organe atteint. L'angiogenèse est donc l'un des premiers indicateurs du passage de la phase de promotion à la phase de progression tumorale. Cette progression s'accompagne d'une capacité accrue des cellules cancéreuses à envahir et à migrer vers d'autres tissus via la circulation sanguine ou lymphatique, favorisant ainsi la formation de métastases (Jouanneau et al., 1994; Mardaryev, 2020).

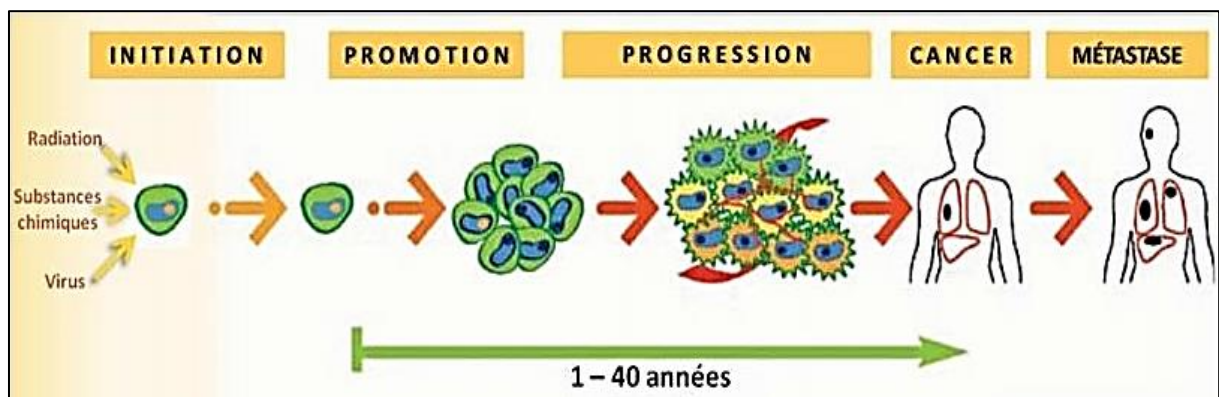


Figure 06 Etapes de cancérogenèse chimique (Béliveau & Gingras, 2007)

5.1. Agents de la cancérogénèse chimique

- Le 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA)

Le DMBA est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) appartenant à la famille des polluants organiques persistants (figure 07). Il est reconnu pour ses propriétés cancérogènes et est couramment utilisé en recherche expérimentale comme agent initiateur et promoteur dans les modèles de cancérogénèse chimique.

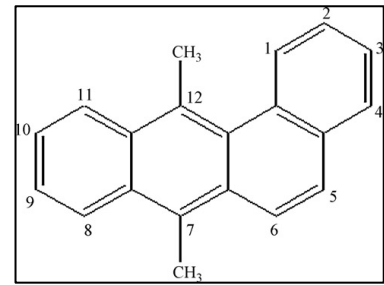


Figure 07 7,12-diméthylbenz[a]anthracène

Lorsqu'il est appliqué par voie topique sur une peau rasée, il induit une série d'altérations moléculaires qui miment les processus de transformation cellulaire observés dans le développement du cancer humain. Le DMBA est un cancérogène indirect qui nécessite une activation métabolique pour exercer son effet mutagène. Une fois métabolisé par les enzymes du cytochrome P450, il génère des adduits mutagènes qui entraînent des mutations génétiques irréversibles affectant ainsi les gènes clés impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, comme le gène ras, favorisant ainsi la transformation maligne des cellules exposées (Mirunalini & Susmitha, 2023; Reed et al., 2018). La toxicité du DMBA varie selon la voie d'exposition. Il est particulièrement dangereux par contact cutané, où il pénètre l'épiderme et initie des mutations génétiques. Lorsqu'il est chauffé à des températures supérieures à 300°C, comme c'est le cas dans les processus industriels ou la combustion de matières organiques, il se volatilise et devient un polluant atmosphérique sous forme de particules fines inhalables. L'exposition chronique à ces vapeurs toxiques, notamment chez les travailleurs exposés aux fumées industrielles ou aux émissions de tabac, est associée à un risque accru de cancer du poumon en plus des cancers cutanés (Hait, 2012; Song et al., 2017). En d'autres termes, bien que le DMBA soit principalement utilisé en laboratoire pour induire des tumeurs expérimentales, il est aussi présent dans l'environnement sous forme de polluant atmosphérique issu de la combustion incomplète des hydrocarbures fossiles, des incendies de forêts, des émissions industrielles, la fumée de cigarette (Mirunalini & Susmitha, 2023) (figure 08). Par conséquent, certaines populations professionnelles y sont particulièrement exposées.

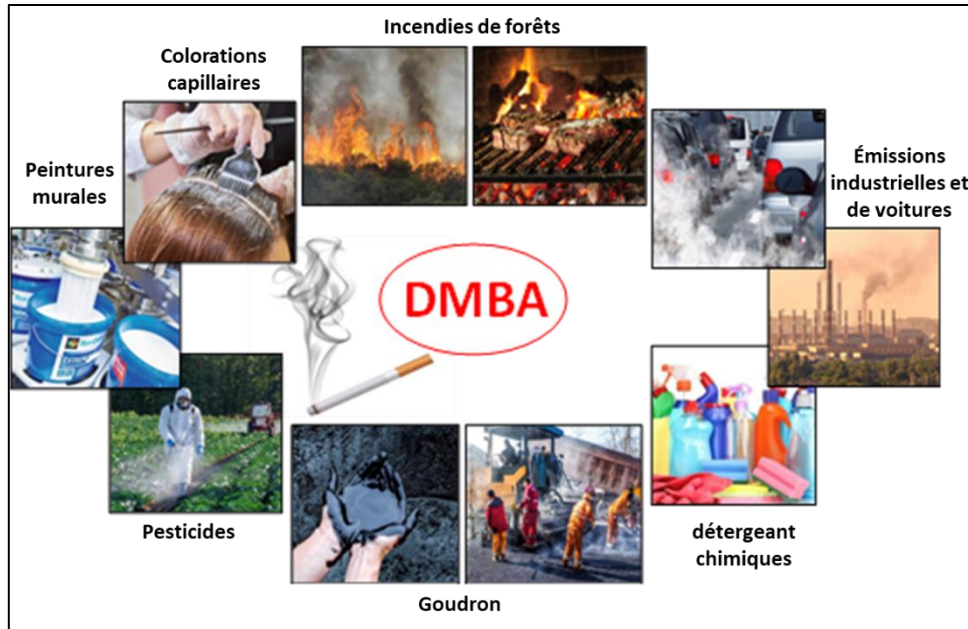


Figure 08 Origine et dispersion environnementale du DMBA

- L'huile de croton

Extraite des graines de *Croton tiglium* (figure 09), est une substance visqueuse de couleur jaunâtre à brunâtre. Connue pour ses propriétés irritantes et toxiques. En médecine traditionnelle asiatique, elle a été utilisée à très faibles doses comme purgatif, malgré son potentiel hautement irritant et dangereux. Son usage est aujourd'hui strictement limité à la recherche, compte tenu de ses effets inflammatoires et promoteurs de cancer. Elle est utilisée en laboratoire comme agent promoteur de tumeur dans les modèles expérimentaux de cancérogenèse cutanée. Son effet tumorigène repose principalement sur la présence de 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), un puissant activateur de la signalisation cellulaire impliqué dans la prolifération et la survie des cellules (figure 10) (Aboulthana et al., 2024).



Figure 09 *Croton tiglium*

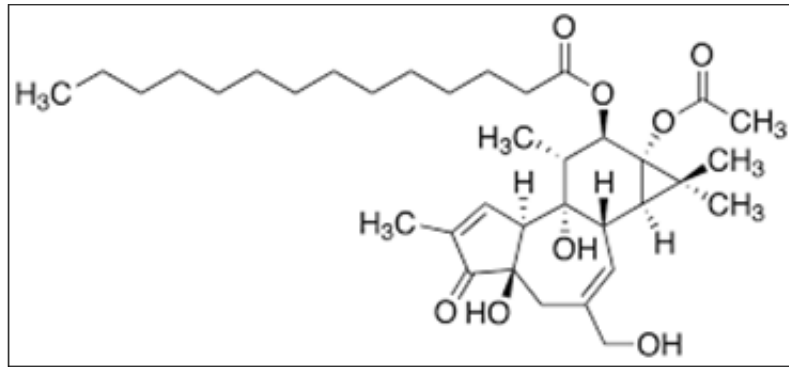


Figure 10 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA)

Le TPA est un puissant promoteur tumoral qui induit le stress oxydatif et l'inflammation, deux processus clés dans la cancérogenèse. Il augmente la peroxydation lipidique (LPO) et altère les niveaux d'antioxydants endogènes, conduisant à une activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPK. Cette activation favorise l'expression de médiateurs inflammatoires tels que COX-2, TNF- α , IL-6 et IL-1 β , qui stimulent la prolifération cellulaire et inhibent l'apoptose (Khan et al., 2013). Aussi, le TPA active la protéine kinase C (PKC) (figure 11), une enzyme clé dans la régulation du cycle cellulaire, de l'angiogenèse et de l'inflammation. Cette activation favorise la prolifération des kératinocytes, l'accumulation de mutations génétiques et la résistance à l'apoptose, créant un microenvironnement favorable à l'expansion clonale des cellules transformées (Kolb & Davis, 2004).

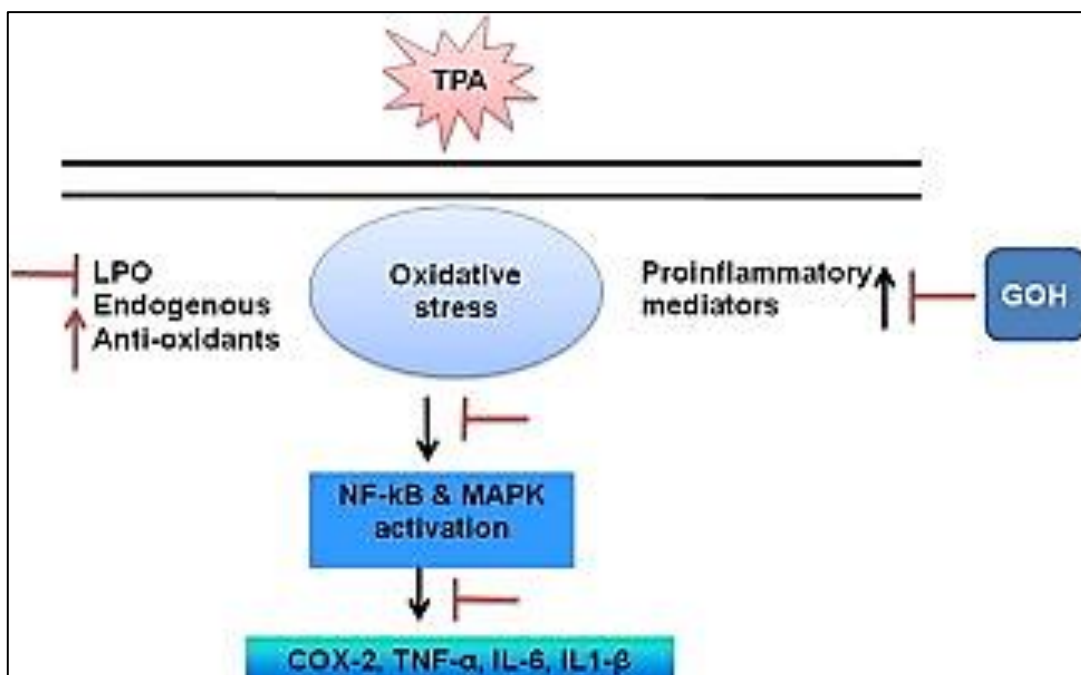


Figure 11 Effet du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate sur les marqueurs d'inflammation et le stress oxydatif (Khan et al., 2013)

L'effet promoteur de l'huile de croton dépend fortement de la dose et de la fréquence d'application. Lorsqu'elle est appliquée de manière répétée sur la peau rasée des souris après un traitement initiateur (comme le DMBA), elle entraîne le développement progressif de papillomes, qui peuvent évoluer en CSCc (DiGiovanni, 1992).

CHAPITRE II

BIOLOGIE DE LA CELLULE CANCEREUSE

Chapitre II Biologie de la cellule cancéreuse.

1. Origine de l'oncogenèse

1.1. L'initiation tumorale

La transformation des cellules normales en cellules tumorales est un processus complexe médié par des agents mutagènes et promoteurs (extrinsèques ou bien intrinsèques). Cette transformation est caractérisée principalement par des altérations génétiques spécifiques offrant aux cellules de nouvelles capacités.

Les mutations génétiques à l'origine de l'oncogenèse peuvent activer des oncogènes, entraînant une stimulation excessive de la croissance cellulaire. Elles peuvent aussi inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs, qui jouent normalement un rôle clé dans le freinage de la prolifération cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN. Un déséquilibre entre ces deux types de gènes conduit à une prolifération cellulaire incontrôlée, marquant le début de la progression tumorale. (Kovalchuk, 2016).

1.1.1. Mutations génétiques

Les mutations génétiques varient non seulement selon le type de cancer, mais aussi en fonction de la nature de l'agent initiateur. Dans le cas du CSCc, une large gamme de mutations a été identifiée. Toutefois, la plupart sont considérées comme des mutations "passagères", n'apportant que peu ou pas d'avantage sélectif, et ayant un impact limité sur la progression tumorale. En revanche, un sous-ensemble de ces altérations correspond à des "mutations motrices", qui favorisent la tumorigenèse en influençant des processus clés tels que le destin cellulaire, la croissance, la survie ou encore le maintien de l'intégrité génomique (C. A. Harwood et al., 2016). Parmi ces mutations motrices :

Le gène P53 : C'est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers humains. Il code une phosphoprotéine de 53 kDa qui joue un rôle central dans la régulation du cycle cellulaire, la sénescence, la réparation de l'ADN et l'apoptose en réponse au stress cellulaire. La protéine p53 transmet les signaux induits par le stress vers différentes réponses cellulaires antiprolifératives, principalement en régulant l'expression de gènes cibles au niveau transcriptionnel (Benjamin & Ananthaswamy, 2007; Kandoth et al., 2013).

Le gène H-ras : Le mutant H-ras est reconnu comme un oncogène moteur dans environ un tiers des cancers humains. Il appartient à la superfamille canonique des GTPases, qui

jouent un rôle central dans la transmission des signaux mitogènes (Malumbres & Barbacid, 2003; Wennerberg et al., 2005). Ces enzymes alternent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Sous sa forme active, Ras-GTP interagit avec divers effecteurs en aval, activant ainsi des réseaux de signalisation impliqués dans la régulation de l'expression génique, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Hobbs et al., 2016).

Le gène EGFR : le gène EGFR code pour le récepteur transmembranaire EGFR qui, lorsqu'il est activé par des facteurs de croissance, stimule des voies de signalisation intracellulaires responsables de la prolifération cellulaire, la survie, la migration et l'angiogenèse. Lorsque l'oncogène subit une mutation, ces altérations provoquent une activation constitutive du récepteur, même en l'absence de ligands (Hedberg et al., 2022).

1.2. La progression tumorale

Au cours de la progression tumorale, une tumeur évolue à partir d'une cellule transformée jusqu'à l'acquisition d'un phénotype agressif et potentiellement métastatique. Ce processus s'accompagne de changements morphologiques, moléculaires et fonctionnels (Hedberg et al., 2022). Pour favoriser la survie et la prolifération des cellules présentant un avantage sélectif — comme une croissance rapide ou une résistance à l'apoptose — un mécanisme de sélection clonale s'installe au sein de la tumeur. Dès l'apparition de la mutation initiatrice, une population monoclonale de cellules transformées se constitue. Avec le temps, certaines de ces cellules accumulent de nouvelles mutations, donnant naissance à des sous-clones génétiquement distincts. Ceux qui présentent des caractéristiques adaptatives (prolifération accrue, résistance aux signaux apoptotiques, capacité d'évasion immunitaire, etc.) sont favorisés par les pressions sélectives de l'environnement tumoral. Ainsi, les clones les mieux adaptés prennent progressivement le dessus, tandis que d'autres restent minoritaires (figure 12). (Reeves et al., 2018; Talmadge, 2007).

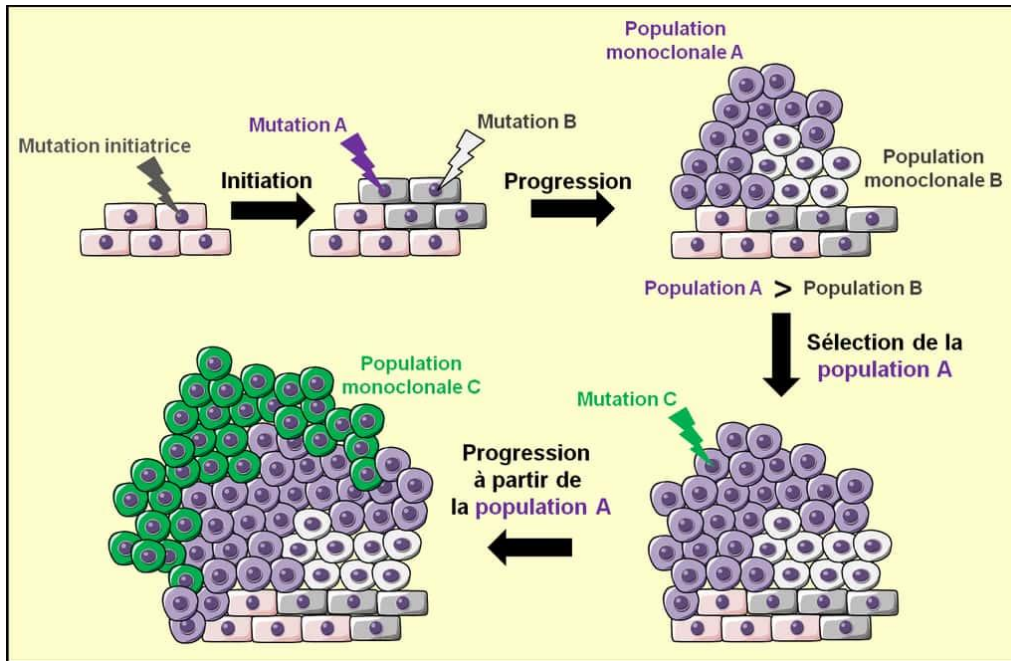


Figure 12 Progression tumorale par sélection clonale (Ségala, 2012)

2. Cycle cellulaire

La prolifération cellulaire repose sur une succession d'étapes ordonnées, permettant à une cellule de croître, de répliquer son ADN, puis de se diviser en deux cellules filles. Ce processus est appelé cycle cellulaire. Il comprend quatre phases séquentielles : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la phase M (Figel & Fenstermaker, 2018). L'intégrité de ce cycle est assurée par plusieurs points de contrôle, ou « checkpoints », ainsi qu'un point de restriction, qui permettent de détecter et de corriger d'éventuelles anomalies — notamment les mutations génétiques — avant que la cellule ne s'engage de façon irréversible dans la division :

- **Point de restriction G1 (R point)** : Situé en fin de phase G1, ce point détermine si la cellule s'engage dans le cycle cellulaire ou reste en quiescence (phase G0). Il intègre des signaux externes (comme les facteurs de croissance) et internes (comme l'intégrité de l'ADN). Une fois ce point franchi, la cellule est irréversiblement engagée vers la division (figure 13).
- **Checkpoint G1/S** : Avant l'entrée en phase S, ce point de contrôle vérifie que l'ADN est intact et exempt de dommages avant d'autoriser la réplication.
- **Checkpoint G2/M** : Il s'assure que l'ADN a été fidèlement et complètement répliqué, et que toutes les réparations ont été effectuées avant l'entrée en mitose.

- **Checkpoint M (spindle assembly checkpoint, SAC)** : Pendant la mitose, ce point garantit une répartition équitable des chromosomes entre les cellules filles (Figel & Fenstermaker, 2018).

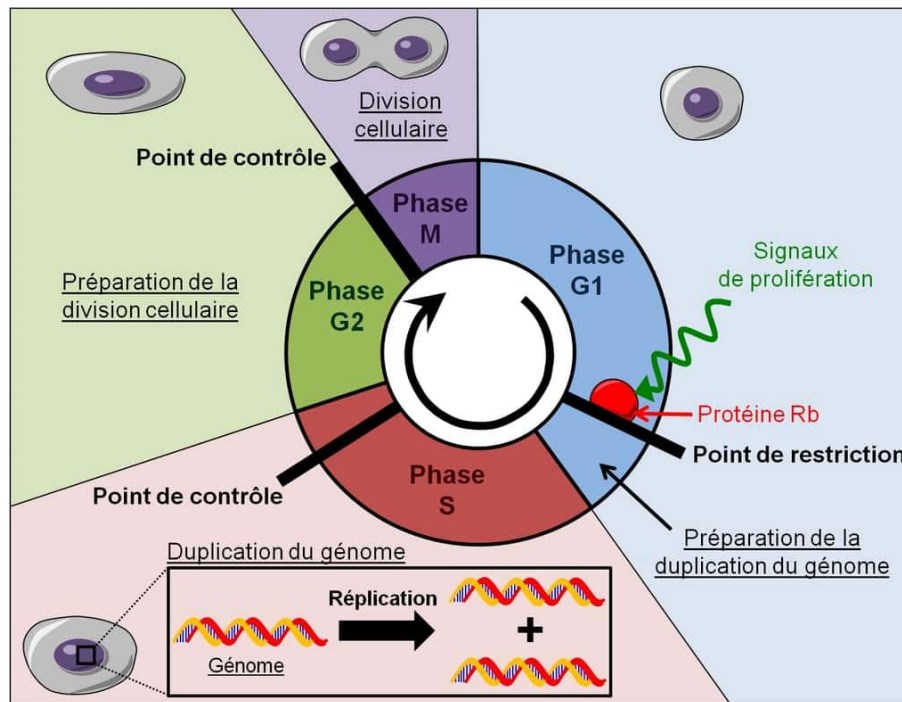


Figure 13 Cycle cellulaire et points de contrôles et restriction (Ségala, 2012)

2.1. Déroulement du cycle cellulaire

Au cours de la phase G1, la protéine du rétinoblastome (pRb), gardienne du point de restriction (RP), contrôle l'entrée en phase S en régulant l'activité du facteur de transcription E2F. En début de G1, la pRb est active et liée à E2F, inhibant ainsi la transcription des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN. Lorsque la cellule progresse dans G1, les kinases dépendantes des cyclines D (CDK4/6) phosphorylent la pRb, ce qui libère E2F et permet l'activation des gènes impliqués dans l'entrée en phase S.

En phase S, des protéines de contrôle comme la pRb et la p53 participent à des voies interconnectées régulant la transition G1/S et la réponse aux dommages de l'ADN. En réponse au stress ou aux lésions de l'ADN, p53 induit l'expression de p21, un inhibiteur des CDK, entraînant un arrêt du cycle cellulaire. Ce blocage temporaire permet à la cellule de réparer les dommages avant de poursuivre la réplication.

La phase S est suivie par la phase G2, puis la mitose (phase M). À la jonction G2/M, un point de contrôle crucial vérifie que l'ADN a été intégralement répliqué et qu'il ne présente pas d'erreurs avant d'autoriser l'entrée en mitose (Engeland, 2022; Santiago-Cardona, 2012).

2.2. Dérégulation du cycle cellulaire

Les altérations génétiques lors de l'initiation tumorale perturbent profondément le contrôle du cycle cellulaire par divers mécanismes. L'activation de l'oncogène H-ras entraîne une activation constitutive des voies de signalisation en aval, telles que la voie MAPK, qui favorisent une augmentation de l'activité des CDK et l'hyperphosphorylation de la pRb, entraînant ainsi une prolifération cellulaire incontrôlée (Santiago-Cardona, 2012). De même, une mutation du gène suppresseur de tumeur p53 entraîne un dysfonctionnement de l'activité protéique de p21. En l'absence de ce régulateur, les cellules présentant des altérations génétiques et peuvent continuer à se diviser, ce qui favorise l'accumulation d'autres mutations génétiques (Engeland, 2022). Les mutations du gène EGFR entraînent une activation autonome et constitutive du récepteur EGFR induisant une hyperactivité des effecteurs en aval de la voie mitogène et, par conséquent, une hyperactivation des CDK et une prolifération cellulaire incontrôlée (Lui & Grandis, 2002).

3. prolifération et survie cellulaire

3.1. Activation des voies de signalisation prolifératives

L'activation anormale de plusieurs voies mitogènes par les cellules cancéreuses, favorisent leur prolifération et leur survie. Ces voies mitogènes ne fonctionnent pas de manière isolée, mais forment plutôt un réseau complexe d'interaction permettant aux cellules tumorales de contourner les mécanismes de contrôle normaux et de soutenir leur croissance agressive. Les principales voies impliquées sont :

3.1.1. Voie Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK)

Cette voie est déclenchée par l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), tels que l'EGFR, en réponse à des facteurs de croissance auto-sécrétés ou produits par des cellules voisines. L'activation des RTK entraîne le recrutement et l'activation de la protéine Ras. Une fois activée, Ras stimule la kinase Raf, qui à son tour active MEK, lequel phosphoryle ERK. La protéine ERK phosphorylée migre alors vers le noyau, où elle induit la transcription de gènes favorisant la prolifération cellulaire (pro-mitotiques) et inhibant l'apoptose. Des mutations activatrices du gène Ras peuvent entraîner une activation constitutive de cette

cascade, favorisant une prolifération cellulaire incontrôlée et contribuant ainsi à la tumorigénèse.

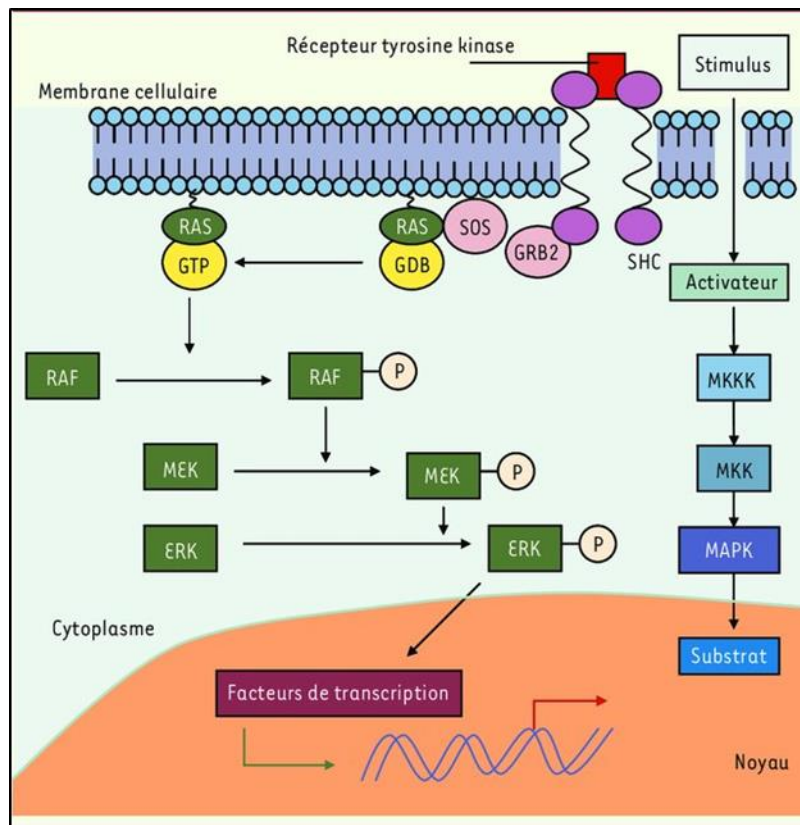


Figure 14 Voie de signalisation des MAP-kinases, avec les voies RAS-RAF-MEK-ERK. MAPK : mitogen-activated protein kinases ; MKK(K) : mitogen-activated protein kinase (kinase) ; RTK : receptor tyrosine kinase ; SH2 : sequence homology 2 (Dalle et al., 2006)

3.1.2. Voie PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR est généralement initiée par l'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) en réponse à un facteur de croissance. Cette activation entraîne la stimulation de la PI3K, qui catalyse la production de PIP3. Ce second messager recrute alors la kinase Akt à la membrane plasmique, où elle est activée. Une fois activée, Akt stimule mTOR, un régulateur central du métabolisme cellulaire et de la synthèse des protéines, tout en inhibant plusieurs effecteurs pro-apoptotiques (figure 15). Des altérations telles que des mutations de PI3K ou la perte de PTEN — un inhibiteur physiologique de cette voie peuvent conduire à une activation excessive du signal mitogène.

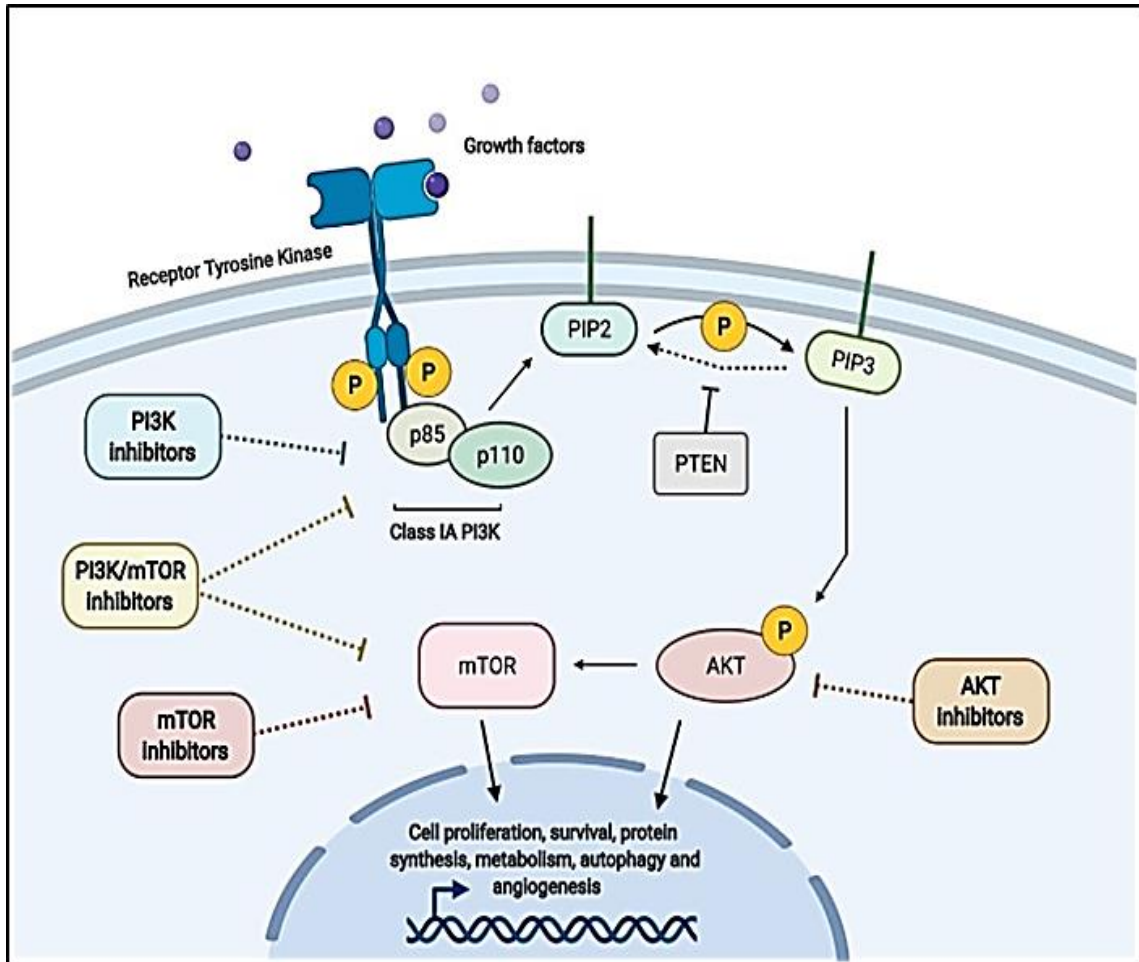


Figure 15 Vue d'ensemble de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (van der Ploeg et al., 2021).

3.1.3. Voie NF- κ B

La famille NF- κ B se compose de cinq sous-unités : RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 (NF- κ B1) et p52 (NF- κ B2). Il existe deux voies de signalisation NF- κ B : la voie canonique et la voie non canonique (ou alternative).

Dans la voie canonique, les dimères de NF- κ B (RelA/p50 et c-Rel/p50) sont liés à I κ B α dans le cytoplasme. Une stimulation par des cytokines, des facteurs de croissance ou des stress cellulaires tels que le stress oxydatif, les radiations ou des agents génotoxiques induit la phosphorylation d'IKK2, qui phosphoryle à son tour I κ B α . Après la dégradation de I κ B α via une polyubiquitination, les dimères NF- κ B sont libérés et transloquent vers le noyau, où ils se fixent à des séquences spécifiques de l'ADN, induisant la transcription de gènes anti-apoptotiques et favorisant ainsi la croissance tumorale.

Dans la voie non canonique, la kinase inductrice de NF- κ B (NIK) interagit avec le facteur associé au récepteur du TNF 3 (TRAF3) dans le cytoplasme. La stimulation par des membres de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF), tels que la lymphotoxine β , provoque la translocation membranaire de ce dimère, entraînant la dégradation de TRAF3, la phosphorylation de NIK, puis celle d'IKK1 par NIK. Dans le cytoplasme, RelB est associé à P100 (le précurseur de p52), jouant un rôle d'inhibiteur, ou à la fois à P100 et à p50. IKK1 phosphoryle P100, déclenchant un traitement protéasomal qui entraîne soit la dégradation complète de P100 et la libération du dimère RelB/p50, soit une dégradation partielle libérant le dimère RelB/p52. Enfin, la translocation nucléaire de ces dimères NF- κ B libérés (RelB/p50, RelB/p52) induit la transcription de gènes cibles (figure 16) (Baud & Jacque, 2008 ; Deka & Li, 2023).

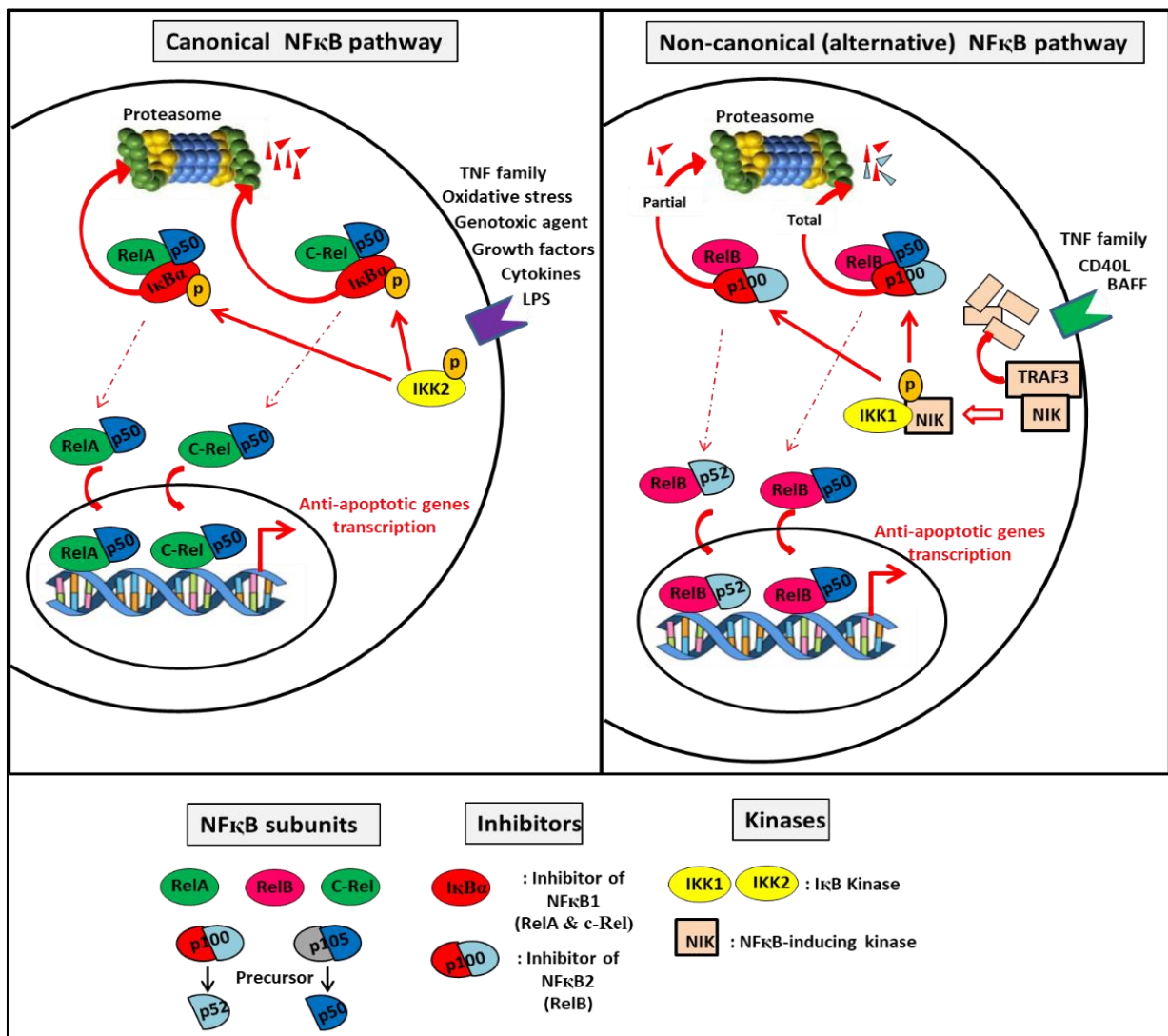


Figure 16 Voies de signalisation NF- κ B canonique et non canonique (Cheniti et al., 2025)

3.1.3.1. Mécanismes d'activation de la voie canonique NF- κ B1

a. Activation directe

- Cytokines pro-inflammatoires Ces cytokines comme le TNF- α et IL-1 β se lient directement à leurs récepteurs TNFR et IL-1R. Cette liaison entraîne le recrutement d'adaptateurs spécifique (tels que TRADD et TRAF) qui, à leur tour, activent le complexe IKK qui phosphoryle alors l'inhibiteur I κ B déclenchant ainsi une cascade de signalisation permettant la transcription des gènes NF- κ B1.
- Récepteurs Toll-like (TLRs) Les TLRs, en réponse aux DAMPs, recrutent des adaptateurs comme MyD88. La cascade qui s'ensuit converge directement sur l'activation du complexe IKK, aboutissant à la dégradation d'I κ B et à la libération de NF- κ B1 (Deka & Li, 2023).

b. Activation indirecte

- Voie Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) : Les altérations oncogéniques, telles qu'une mutation Ras ou une surexpression de facteurs de croissance, activent directement cette cascade. Par des signaux de cross-talk, les signaux émanant de cette voie peuvent stimuler indirectement le complexe IKK, renforçant ainsi l'activation de NF- κ B1.
- Récepteurs de croissance et la cascade PI3K/Akt : La PIP3 générée suite à une activation par un RTK comme EGFR, active Akt, qui à son tour, par une série d'intermédiaires, favorise l'activation du complexe IKK. Ce relais aboutit à la phosphorylation d'I κ B et à la libération de NF- κ B1 (Deka & Li, 2023).
- Stress cellulaire (oxydatif, hypoxique, dommages à ADN) : Les cellules tumorales subissent divers stress qui activent des kinases de stress (telles que MAPK). Ces kinases, en modulant l'activité de l'IKK, conduisent indirectement à l'activation de la voie NF- κ B1.
- Boucles autocrines et paracrines : Une activation initiale du NF- κ B, entraîne la transcription de cytokines pro-inflammatoires qui, une fois sécrétées, peuvent agir sur les récepteurs présents sur la même cellule (autocrine) ou sur les cellules voisines (paracrines). Ce renforcement en boucle maintient l'activation persistante du complexe IKK et, par conséquent, de NF- κ B.

3.2. Résistance à l'apoptose

La régulation fine du mécanisme d'apoptose est assurée par l'interaction antagoniste entre les protéines de la famille Bcl-2. Parmi-elles, Bcl-2 agit comme un facteur anti-apoptotique, tandis que Bax est pro-apoptotique (figure 17). Dans le cancer, un déséquilibre marqué en faveur de

Bcl-2 est souvent observé, permettant aux cellules tumorales d'échapper à la mort cellulaire programmée et de poursuivre leur prolifération. Il existe plusieurs mécanismes conduisant à un déséquilibre défavorable de cette régulation :

3.2.1. La surexpression de Bcl-2

L'amplification du gène codant pour Bcl-2 ou une régulation transcriptionnelle aberrante (sous l'influence de voie PI3K/Akt ou NF- κ B) peut augmenter la concentration de la protéine Bcl-2. Cette augmentation accroît la capacité de de la cellule à neutraliser l'action de Bax, empêchant ainsi l'activation de la cascade apoptotique malgré la présence de signaux pro-apoptotiques.

3.2.2. Réduction ou inactivation de Bax

L'installation de mutations dans le gène codant pour Bax ou une régulation négative conduisant à une diminution de son expression réduisent la sensibilité de la cellule aux signaux apoptotiques. En absence d'une activité de Bax, la formation de pores mitochondriaux est compromise, empêchant la libération de cytochrome C et ainsi l'initiation de l'apoptose.

3.2.3. Régulation post-traductionnelle

Des modifications comme la phosphorylation ou l'ubiquitination peuvent altérer la stabilité ou la capacité d'interaction de Bcl-2 ou de Bax, renforçant ainsi la tendance des cellules cancéreuses à survivre aux agressions (Adams & Cory, 2007; Xu & Ye, 2022).

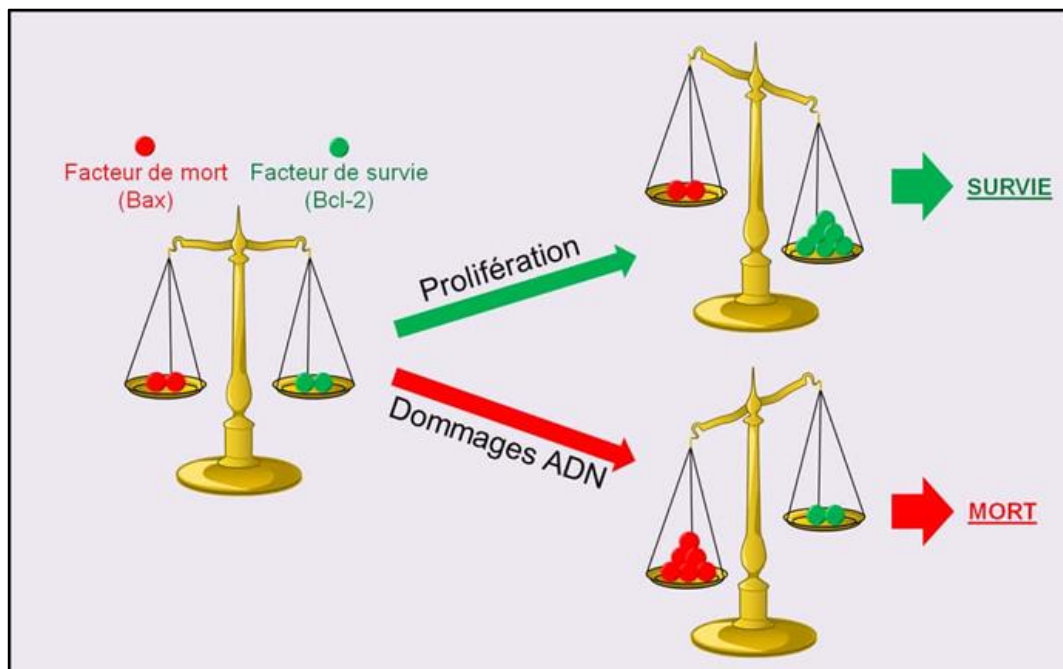


Figure 17 Balance entre la vie et la mort cellulaire (Ségala, 2012).

4. Stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène ROS jouent un rôle central dans la carcinogenèse en induisant des dommages directs à l'ADN. Ces dommages directs incluent, entre autres, des cassures de brins d'ADN, ce qui peut affecter les niveaux d'expression des gènes clés. La modification de l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (figure 18). De plus, à des concentrations faibles à modérées, ces molécules agissent également comme des messagers dans la régulation de la prolifération cellulaire (Klaunig & Wang, 2018; Kuo et al., 2022).

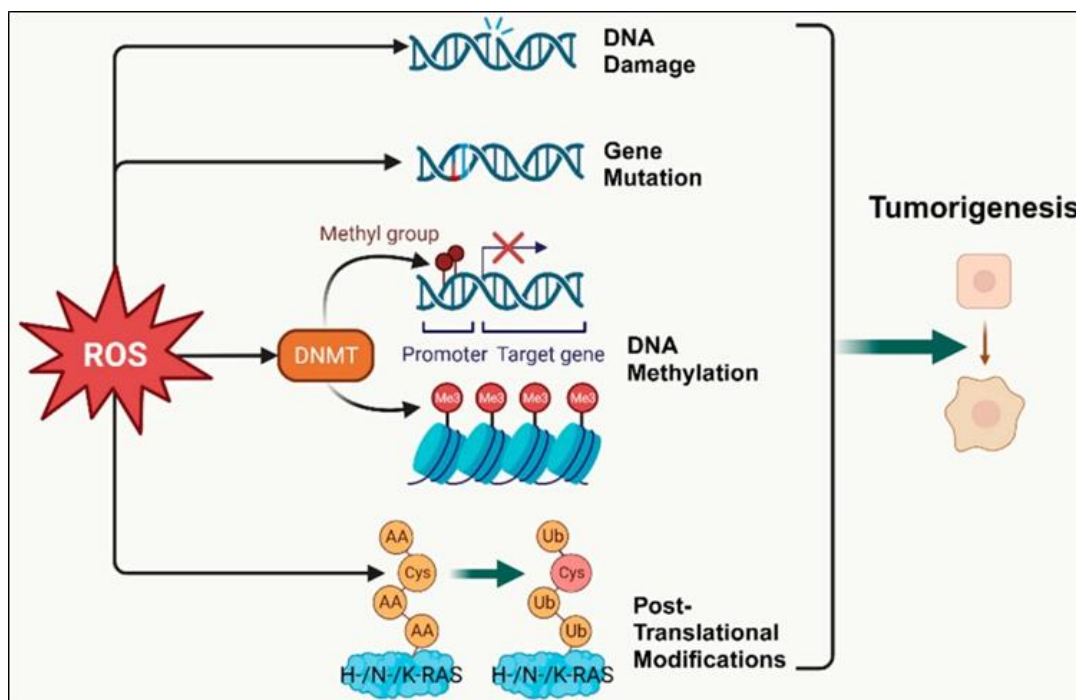


Figure 18 Rôle du stress oxydatif dans la cancérogenèse (K. Li et al., 2024)

Le stress oxydatif intervient à toutes les étapes de la transformation cellulaire. Dès la phase d'initiation, l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) provoque des dommages directs à l'ADN, conduisant à l'apparition de mutations et d'altérations structurales. Au cours de la phase de progression, l'action persistante des ROS induit de nouvelles modifications génétiques dans les cellules déjà altérées, renforçant ainsi leur potentiel tumorigène (Jelic et al., 2021)

L'élévation du niveau des ROS participe également à l'angiogenèse en activant plusieurs voies de signalisation clés. En particulier, l'activation des voies PI3K/Akt/mTOR et MAPK conduit

à la stimulation du facteur de transcription NF- κ B. Ce dernier régule l'expression de nombreuses cytokines et prostaglandines, établissant un microenvironnement inflammatoire favorable à la néoangiogenèse et à la dissémination métastatique (Zahra et al., 2021; Iqbal et al., 2024).

Par ailleurs, les cellules cancéreuses produisent elles-mêmes un excès de ROS, en grande partie en raison de leur métabolisme altéré et de dysfonctionnements mitochondriaux. Ce déséquilibre entre la production de ROS et la capacité des systèmes antioxydants engendre un stress oxydatif persistant. Il s'installe ainsi une boucle de rétroaction positive, dans laquelle les altérations génétiques induites par les ROS favorisent leur propre production par les cellules tumorales, contribuant à la progression de la tumeur et au développement des métastases (Chengizkhan et al., 2021).

5. Métabolisme énergétique

Afin de répondre aux exigences métaboliques liées à leur prolifération rapide et à leur survie dans des environnements hostiles, les cellules cancéreuses adoptent des stratégies énergétiques distinctes de celles des cellules normales. Bien que la phosphorylation oxydative mitochondriale soit nettement plus efficace pour produire de l'ATP (jusqu'à 36 molécules par molécule de glucose), elle ne fournit pas directement les précurseurs nécessaires à la biosynthèse intensive requise pour la croissance tumorale rapide, tels que les acides nucléiques, les acides aminés et les lipides. Pour répondre à ces besoins, les cellules tumorales réorientent leur métabolisme énergétique en privilégiant la voie anaérobie, même en présence d'oxygène, un phénomène connu sous le nom d'effet Warburg (figure 19) (H. Sun et al., 2019).

Cette reprogrammation métabolique s'accompagne d'une surexpression des transporteurs de glucose (notamment GLUT1), facilitant une captation accrue de glucose. Une fois internalisé, le glucose est rapidement dégradé en pyruvate via la glycolyse, un processus qui ne génère que 2 molécules d'ATP par glucose, mais qui fournit des intermédiaires essentiels à la biosynthèse cellulaire. Plutôt que d'entrer dans la mitochondrie pour être entièrement oxydé, le pyruvate est majoritairement converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). Cette conversion permet de régénérer le NAD⁺, indispensable pour maintenir le flux glycolytique. Le lactate ainsi produit est ensuite exporté hors de la cellule, ce qui entraîne une acidification du microenvironnement tumoral. Cette acidification facilite l'invasion des tissus environnants par les cellules tumorales et contribue à créer un environnement immunosuppresseur, défavorable à

la reconnaissance et à l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire. (H. Sun et al., 2019).

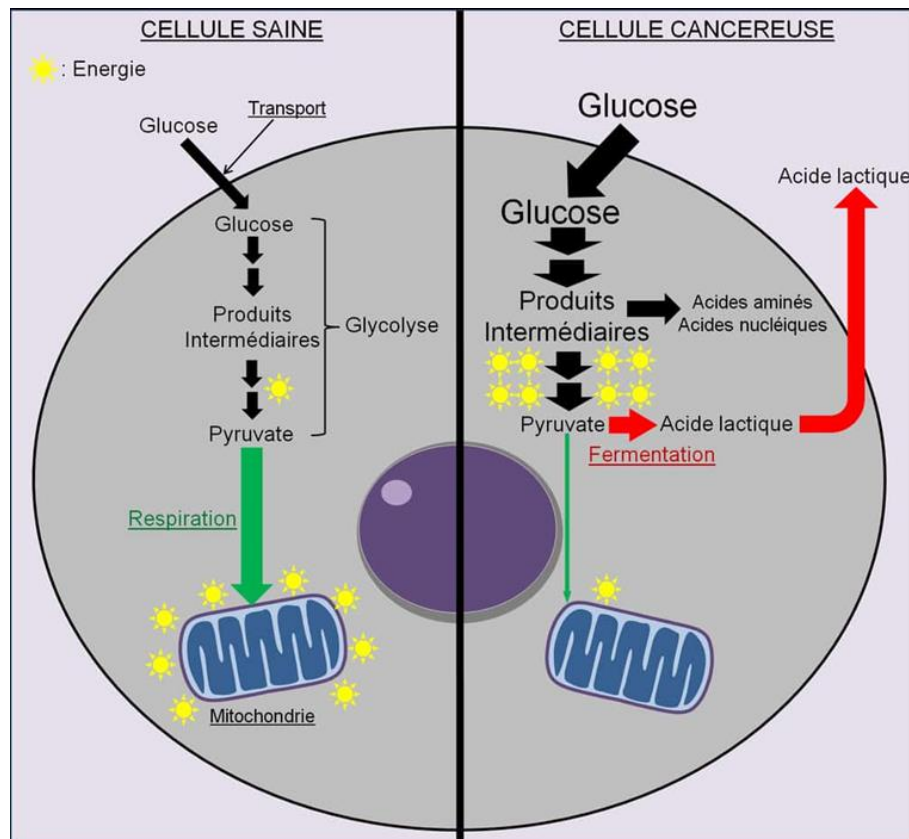


Figure 19 Dérégulation du métabolisme énergétique d'une cellule tumorale (Ségala, 2012).

6. Inflammation chronique et angiogenèse tumorale

L'inflammation chronique s'installe lorsque les cellules immunitaires, en particulier les macrophages, détectent la présence de cellules cancéreuses. Cette reconnaissance repose sur la détection de signaux moléculaires caractéristiques des cellules tumorales, tels que les antigènes tumoraux ou les motifs associés aux dommages cellulaires (DAMPs). En réponse, les macrophages s'activent et libèrent de manière soutenue des médiateurs pro-inflammatoires, notamment le $\text{TNF-}\alpha$, l'IL-1 et l'IL-6. Ces cytokines entretiennent l'activation continue de voies de signalisation, comme $\text{NF-}\kappa\text{B}$, induisant la surexpression de gènes qui inhibent l'apoptose, favorisent la prolifération cellulaire et soutiennent la survie tumorale (Landskron et al., 2014).

Au sein du microenvironnement tumoral, l'inflammation chronique joue un rôle ambivalent et complexe. D'un côté, elle crée un environnement favorable à la croissance tumorale par le biais d'un réseau dynamique d'interactions entre les cellules cancéreuses et divers types cellulaires, tels que les macrophages associés aux tumeurs (TAMs), les fibroblastes associés au cancer (CAF), et les cellules endothéliales. De l'autre, elle stimule l'angiogenèse en induisant la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF, facilitant ainsi la néoformation de vaisseaux sanguins et l'approvisionnement accru en oxygène et en nutriments. Par ailleurs, l'inflammation chronique augmente l'expression de métalloprotéinases matricielles (MMPs), des enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. Cette déstructuration tissulaire facilite l'invasion tumorale et la dissémination des cellules cancéreuses vers les tissus adjacents, constituant une étape clé du processus métastatique (figure 20) (Ono, 2008).

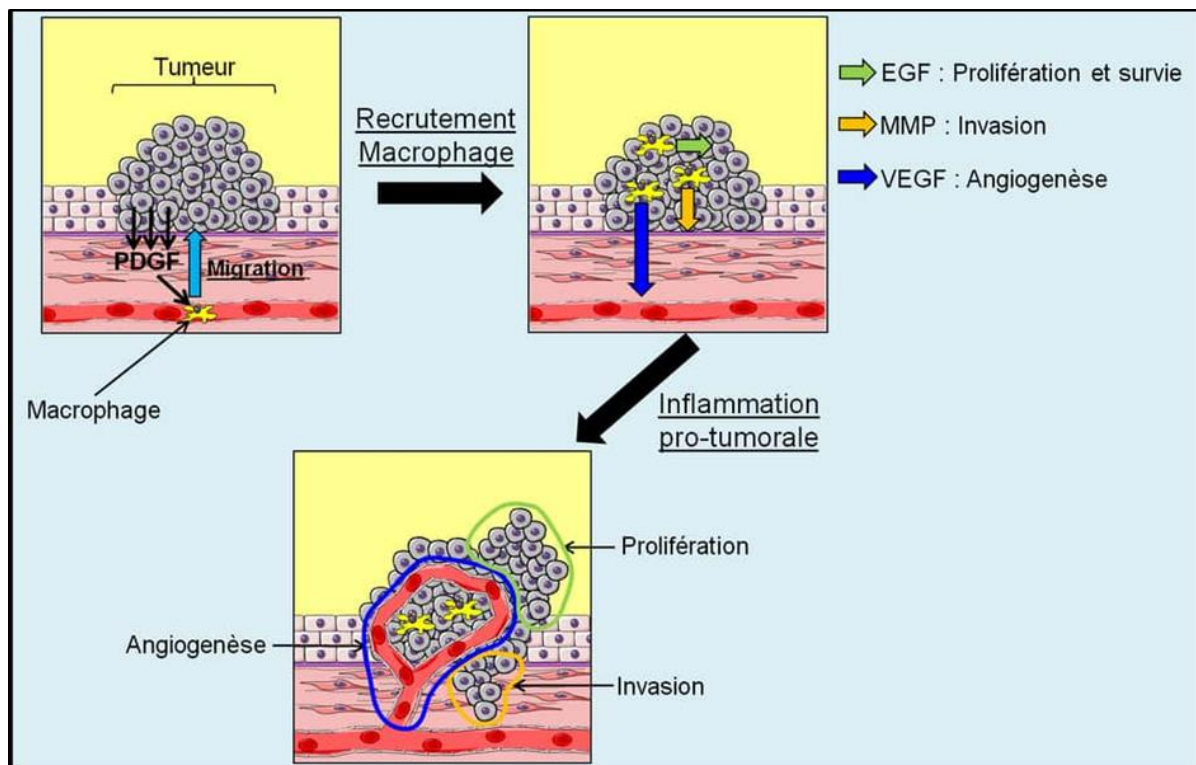


Figure 20 Inflammation chronique, angiogenèse et invasion tumorale (Ségala, 2012)

7. Echappement immunitaire des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de contourner les défenses de l'organisme grâce à un processus évolutif nommé évasion immunitaire ou bien immuno-édition. Lors de la phase initiale dite élimination, le système immunitaire repère et détruit la majorité des cellules

transformées. Cependant, cette pression sélective favorise la survie de certaines cellules possédant des altérations qui réduisent leur reconnaissance immunitaire. Ces cellules résistantes entrent alors dans une phase d'équilibre, pendant laquelle elles continuent de subir des modifications jusqu'à ce qu'elles deviennent capables de contourner complètement la surveillance immunitaire, aboutissant à la phase d'échappement tumoral (Pak et al., 2014).

Pour parvenir à cet échappement, les cellules tumorales mettent en œuvre plusieurs stratégies qui interagissent et se renforcent mutuellement. Parmi ces stratégies :

Modification de l'expression antigénique : Les cellules cancéreuses ont la capacité de diminuer ou perdre l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Cela rend les cellules moins visibles aux lymphocytes T cytotoxiques, qui dépendent de la présentation des antigènes pour reconnaître et éliminer les cellules anormales (figure 21) (Spranger et al., 2013).

Création d'un microenvironnement immunosuppresseur En sécrétant des cytokines telles que le TGF- β , IL-10, les cellules tumorales instaurent un environnement hostile pour les cellules effectrices immunitaires. Ce microenvironnement favorise le recrutement de cellules immunosuppressives, telles que les lymphocytes T régulateurs et les macrophages, qui inhibent l'activité anti-tumorale (Gupta et al., 2023).

Expression de ligands inhibiteurs L'une des stratégies majeures utilisées par les cellules tumorales pour échapper à la réponse immunitaire consiste à surexprimer certains ligands inhibiteurs, tels que PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1). En se liant à son récepteur PD-1 (Programmed Death-1) exprimé à la surface des lymphocytes T, PD-L1 induit un signal inhibiteur qui bloque l'activation de ces cellules effectrices. Cette interaction entraîne une réduction de leur prolifération, une diminution de la sécrétion de cytokines, et peut conduire à un état d'épuisement fonctionnel des lymphocytes T. Ainsi, même en présence d'une infiltration immunitaire, les cellules tumorales parviennent à neutraliser l'action cytotoxique des lymphocytes T, favorisant leur propre survie et la progression de la tumeur (Spranger et al., 2013).

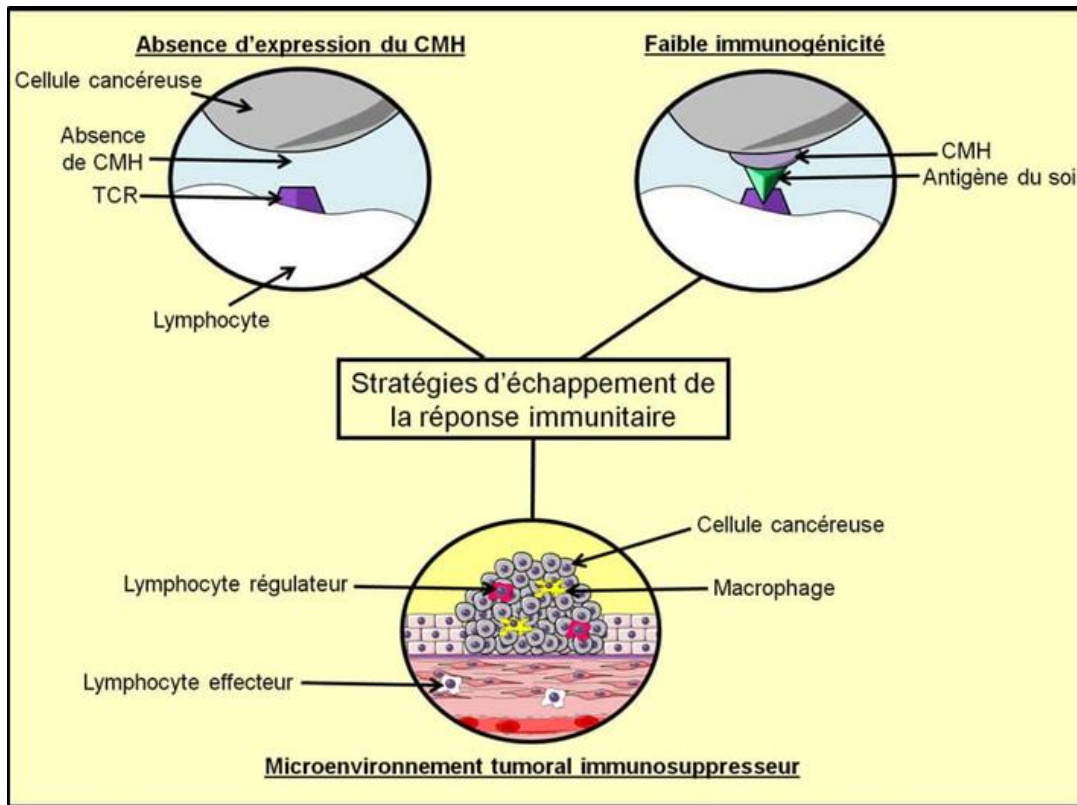


Figure 21 Mécanismes d'échappement immunitaire des cellules tumorales (Ségala, 2012).

CHAPITRE III

L'HUILE DE POISSON

Chapitre III L'huile de poisson.

1. Généralités

La consommation de poissons et de leurs dérivés occupe une place importante dans les habitudes alimentaires et thérapeutiques à travers l'histoire. Dans l'Égypte antique, l'huile de poisson servait à traiter les maladies oculaires. De plus, au Moyen âge, les poissons constituaient un aliment de base pour les populations défavorisées, et étaient particulièrement appréciés dans les régions méditerranéennes. Quant à l'huile de foie de poisson, elle était consommée par les pêcheurs à travers l'Europe, l'Afrique et l'Asie pour traiter différents types de maladies (Lister, 2008). Au XXe siècle, l'huile de poisson a connu un essor grâce aux recherches ayant mis en lumière ses bienfaits pour la santé cardiovasculaire, en particulier chez les populations Inuits, ce qui a conduit à une prise de conscience accrue du potentiel des oméga-3 (Freitas & Campos, 2019).

Les formules de l'huile de poisson sont obtenues à partir de diverses espèces de poissons telles que la sardine, le saumon, le thon et la morue polaire (Vaska et al., 2023). L'utilisation de petits poissons pélagiques dans la production de l'huile de poisson présente des avantages notables, notamment une valeur nutritionnelle élevée, une efficacité de conversion accrue et une durabilité renforcée de l'espèce. Leur position basse dans la chaîne alimentaire se traduit par une accumulation réduite de toxines et de métaux lourds, ce qui garantit une huile plus pure et plus sûre pour la consommation (Thilsted, 2010).

Les poissons sauvages tels que les anchois, les sardines et les chinchards sont principalement utilisés pour produire l'huile de poisson (Hashim et al., 2021). Les poissons d'élevage tels que le saumon et le thon rentrent aussi dans cette production. Les poissons sauvages offrent généralement des niveaux plus élevés d'acides gras oméga-3 en raison de leur alimentation variée. Cependant, certains poissons d'élevage, comme le saumon atlantique australien, peuvent dépasser leurs homologues sauvages en termes de teneur en oméga-3 (Marak et al., 2020; Zhang et al., 2024). Selon la région d'extraction, l'huile de poisson extraite de la chair de poisson présente des concentrations plus élevées en acide gras ω -3 que à l'huile de foie de poisson, qui est extraite de la région hépatique et caractérisée par sa teneur en vitamines A et D (Shahidi, 2007).

2. Production de l'huile de poisson

L'industrie halieutique représente un marché mondial majeur englobant la transformation de produits marins en divers sous-produits tels que les filets de poisson, les conserves de chair, la farine de poisson et l'huile de poisson destinée aux secteurs pharmaceutique, cosmétique et animal (Jimenez-Champi et al., 2024).

Les techniques d'extraction d'huile à partir des poissons vont de méthodes traditionnelles, comme la cuisson et la presse, à des méthodes modernes telles que l'hydrolyse enzymatique et l'extraction par ultrasons ou par micro-ondes. Les méthodes traditionnelles sont économiques mais peuvent affecter la qualité du produit. Les techniques modernes, par contre, offrent une meilleure pureté, mais à un coût plus élevé (Bonilla-Méndez et al., 2018).

L'huile brute obtenue par extraction renferme diverses impuretés, dont la nature dépend de la technique d'extraction adaptée. Afin de rendre cette huile comestible, un processus de purification est nécessaire afin d'éliminer les impuretés tout en préservant les composants à effets avantageux tels que les ω -3 (Crexi et al., 2010). Les méthodes de raffinage sont spécifiquement conçues pour maximiser la rétention de ces composants bénéfiques tout en minimisant la perte d'huile (figure 22) (Vaisali et al., 2015).

Après extraction et raffinage, un passage à une étape de purification est essentiel dans le but d'éliminer les molécules moins actives et faire concentrer les AGPI de type ω -3. Cette approche permet l'obtention d'une huile de haute qualité, offrant ainsi des doses thérapeutiques plus efficaces pour les applications médicales et nutritionnelles (Šimat et al., 2019). Les méthodes de purification se basent sur le principe de séparation des ω -3 des autres molécules. Cette séparation est réalisée par différentes techniques telles que la distillation moléculaire (séparation en fonction de poids moléculaire), la complexation à l'urée (chélation des acides gras saturés et mono-insaturés), l'hydrolyse enzymatique et ré-estérification (hydrolyse des triglycérides spécifiques et formation de triglycérides à base de EPA et DHA) ainsi que l'extraction par le CO_2 supercritique (fractionnement des acides gras sous haute pression) (Bonilla-Méndez et al., 2018).

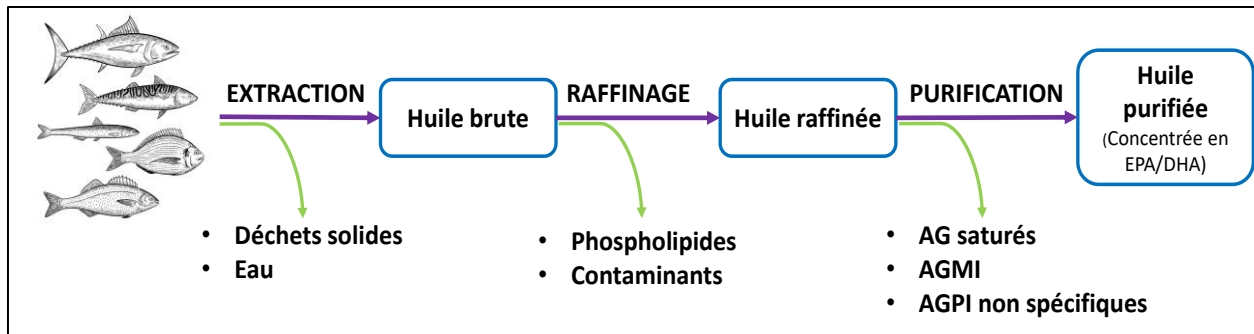


Figure 22 Etapes de production de l'huile de poisson raffinée et purifiée

3. Composants de l'huile de poisson

L'huile de poisson est une huile riche en vitamines, telles que la vitamine A, la vitamine D et la vitamine E (Butt & Salem, 2016). Elle contient aussi des composants bioactifs, à savoir : du cholestérol, des lipides neutres tels que les acides gras libres, les monoglycérides, les diglycérides et les triglycérides, des phospholipides et des stérylesters (Km et al., 1990 ; Porojnicu et al., 2008). La composition et les proportions de ces molécules varient selon le type de poisson, l'environnement aquatique (eau douce ou marine) (Osman et al., 2001).

3.1. Les acides gras (AG)

Ces molécules sont présentes à la fois sous forme de lipides neutres et d'acides libres. La composition typique en acides gras dans l'huile de poisson peut être divisée en acides gras saturés, acides gras mono-insaturés et acides gras polyinsaturés (Huang et al., 2018).

3.2. Les acides gras saturés

Les principaux acides gras saturés présents dans l'huile de poisson comprennent : l'acide myristique (14:0), l'acide palmitique (16:0), l'acide stéarique (18:0) et l'acide béhénique (22:0) (Loftsson et al., 1995).

3.3. Les acides gras insaturés :

3.3.1. Les acides gras mono-insaturés (AGMI)

Sont présents dans l'huile de poisson, ils contiennent une double liaison et comprennent : l'acide myristoléique (14:1 ω 5), l'acide palmitoléique (16:1 ω 7), l'acide oléique (18:1 ω 9), l'acide eicosénoïque (20:1 ω 9), l'acide gadoléique (20:1 ω 11), l'acide érucique (22:1 ω 9) et l'acide catoléique (22:1 ω 11).

3.3.2. Les acides gras poly-insaturés (AGPI)

Sont présents dans l'huile de poisson, ils contiennent deux doubles liaisons ou plus et comprennent : l'acide linoléique (LA, 18:2 ω 6), l'acide α -linoléique (ALA, 18:3 ω 3), le DHA (22:6 ω 3) et l'EPA (22:5 ω 3). La teneur en AGPI des poissons marins est supérieure à celle des poissons d'eau douce (Osman et al., 2001). L'huile de poisson marin contient généralement un nombre considérable d'AGPI avec des chaînes plus longues (> 20 atomes de carbone), tandis que l'huile de poisson de l'eau douce révèle le plus d'AGPI avec des chaînes plus courtes (< 20 atomes de carbone) (Saify et al., 2000).

4. Structure et métabolisme des acides gras polyinsaturés (AGPI)

Structurellement, les acides gras sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée avec un groupe carboxyle (COOH) et un groupe méthyle (CH₃) aux extrémités opposées (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015). L'absence de double liaison dans la chaîne hydrocarbonée dénote un acide gras saturé, tandis que la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons est caractéristique d'un acide gras insaturé. Pour les AGMI et les AGPI, la convention courante décrit les acides gras insaturés en fonction de la position de la première double liaison par rapport au carbone de l'extrémité méthyle (« ω » ou « n »). Il existe deux sous-classes d'AGPI, les acides gras ω -3 et ω -6. Les acides gras ω -3 contiennent la première double liaison entre les troisième et quatrième carbones de l'extrémité méthyle et sont classés comme acides gras à longue chaîne en raison de la longueur de la chaîne hydrocarbonée (figure 23) (Bowen et al., 2016).

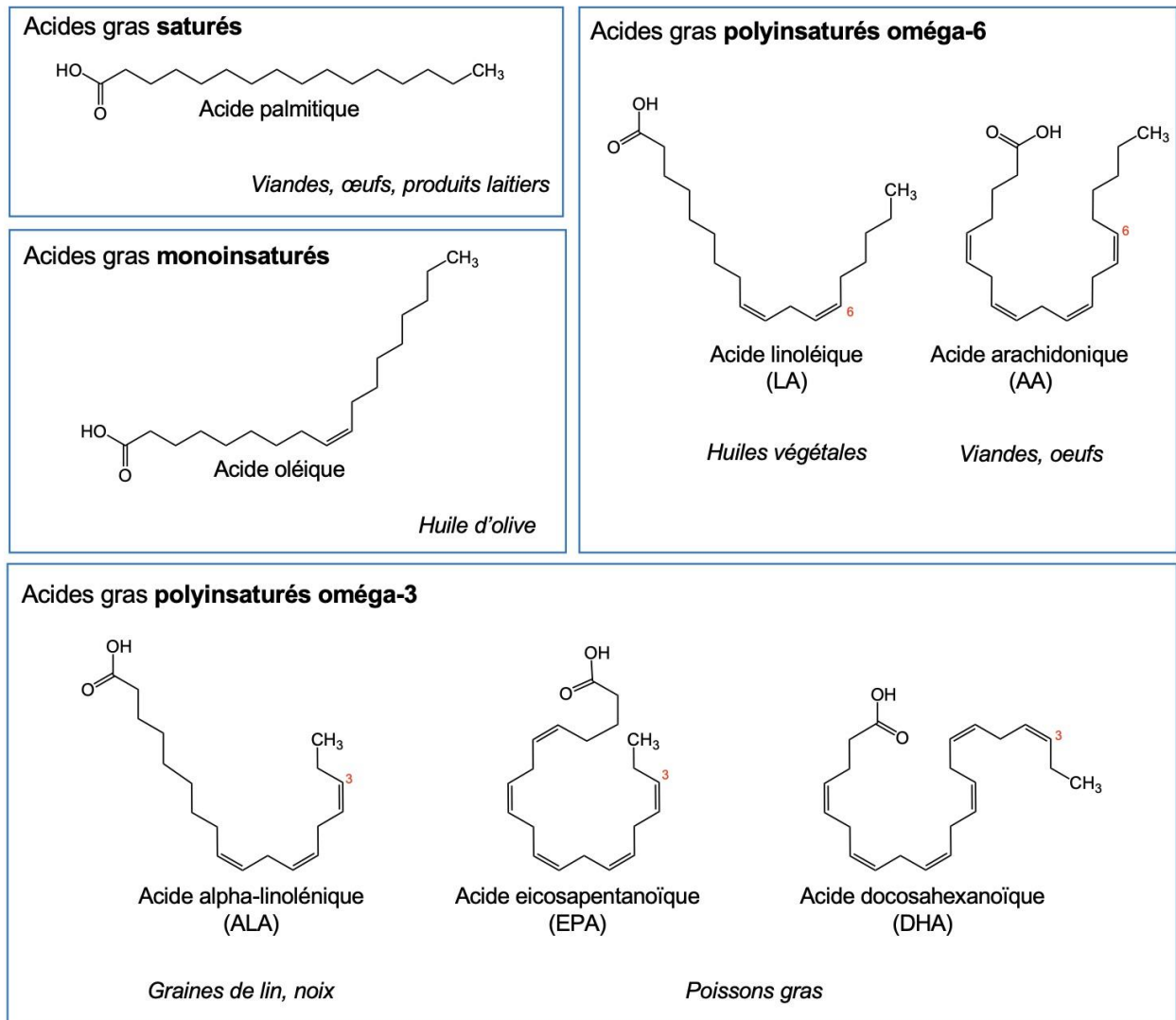


Figure 23 Structures chimiques des acides gras dérivés de l'huile de poisson (Juneau, 2020).

Lors de l'ingestion, les triglycérides contenus dans l'huile de poisson sont libérés dans l'estomac sous forme de gouttelettes lipidiques. Sous l'action des lipases gastriques, ces dernières subissent une hydrolyse partielle, libérant ainsi un acide gras libre (AGL) et un diglycéride (DG). Au niveau de l'intestin, les sels biliaires émulsifient les graisses, facilitant ainsi l'action des lipases pancréatiques sur les di- et triglycérides restants. Ces enzymes hydrolysent principalement les triglycérides, libérant ainsi deux AGL et un monoglycéride (MG). Une hydrolyse complète peut également avoir lieu, conduisant à la libération de trois AGL et d'un glycérol (Schuchardt & Hahn, 2013; D'Aquila et al., 2016). Au niveau de l'intestin grêle, les AGL et les MG peuvent être absorbés par diffusion passive dans les entérocytes ou traverser la membrane apicale via des transporteurs spécifiques, tels que la

protéine CD36 et la protéine de transport des acides gras FATP4. L'absorption de ces lipides se fait tout au long de l'intestin grêle (D'Aquila et al., 2016).

Une fois à l'intérieur des entérocytes, les AGL peuvent être incorporés dans différentes classes de lipides, tels que les phospholipides et les esters de cholestérol. Cependant, la majorité d'entre eux est convertie en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (Mansbach & Siddiqi, 2010) (figure 23). Les acyl-CoA, en association avec les MG et les DG, participent à la reformation des TG dans les entérocytes sous l'action de la monoglycérade acyltransférase. Les TG suivent ensuite deux voies distinctes : ils peuvent soit être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (GLC) au sein des entérocytes, soit être intégrés dans des chylomicrons (figure 24). Ces derniers assurent le transport des TG vers le pôle basolatéral des entérocytes via l'appareil de Golgi. Une fois sécrétés, les chylomicrons rejoignent les vaisseaux lymphatiques (D'Aquila et al., 2016), qui les acheminent jusqu'à la veine sous-clavière gauche. Cela leur permet d'intégrer directement la circulation sanguine, contournant ainsi le premier passage hépatique (Tanaka & Iwakiri., 2016). Les chylomicrons atteignent finalement la veine cave, où ils sont transportés vers l'artère pulmonaire, puis vers la veine pulmonaire, avant de rejoindre le côté gauche du cœur et de pénétrer dans la circulation systémique. Les TG transportés par les chylomicrons se lient aux cellules des tissus périphériques via des protéoglycans. L'apoprotéine C-II, présente sur les chylomicrons, active les lipoprotéines lipases (LPL) localisées sur la surface luminale des cellules endothéliales, facilitant ainsi l'hydrolyse des TG et la libération d'acides gras libres (AGL), tels que l'EPA et le DHA, dans la circulation sanguine. Ces AGL peuvent ensuite être captés par les cellules environnantes (Mansbach & Siddiqi, 2010; Chevalier, 2020;).

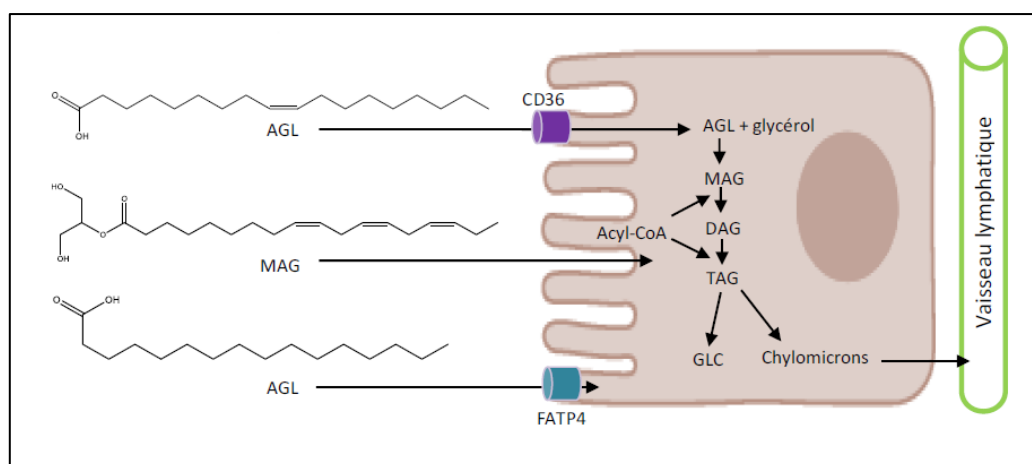


Figure 24 Absorption des acides gras polyinsaturés par les chylomicrons (Chevalier, 2020).

Suite à une réponse à un stimulus physiologique, tel que l'inflammation, les acides gras EPA et DHA sont libérés des phospholipides membranaires et agissent comme précurseurs permettant la biosynthèse des eicosanoïdes. Le métabolisme des eicosanoïdes est assuré par les enzymes de la cyclooxygénase (COX) et de la lipoxygénase (LOX) convertissant les EPA et DHA en produits métaboliques tels que les prostaglandines de type 3 (PGE3), les leucotriènes, les lipoxines et les thromboxanes. Ces médiateurs lipidiques jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'inflammation, de la pression artérielle, de la coagulation sanguine et divers de mécanismes physiologiques (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015; Harwood, 2023).

5. Activités biologiques des AGPI

5.1. Fluidité de la membrane cellulaire

Les membranes cellulaires et cytoplasmiques, ainsi que d'autres structures cellulaires, sont principalement composées de protéines et de lipides contenant des acides gras saturés ou insaturés. Les acides gras saturés, caractérisés par des chaînes hydrocarbonées linéaires dépourvues de doubles liaisons, s'agencent de manière dense, conférant ainsi à la membrane une rigidité accrue. En revanche, la présence d'acides gras insaturés, tels que le DHA, introduit des courbures dans les chaînes hydrocarbonées en raison de leurs multiples doubles liaisons. Ces déformations créent des espaces au sein de la membrane, modifiant ses propriétés physiques.

Cette organisation assure une fluidité membranaire optimale, essentielle au bon fonctionnement des récepteurs, des canaux ioniques et des protéines de transport. Ces éléments jouent un rôle clé dans la communication cellulaire, la réactivité aux stimuli et l'adaptabilité de la cellule à son environnement (Feller & Gawrisch, 2005; Massey & Nicolaou, 2011).

Le DHA, un acide gras polyinsaturé, est un composant majeur des membranes cellulaires et plasmiques de l'organisme. Il est particulièrement abondant dans le tissu cérébral et la rétine, où il constitue respectivement jusqu'à 50 % et 60 à 80 % des phospholipides membranaires (figure 25). (Jt & Gy, 2007; Lee et al., 2016). Le DHA peut exister sous forme libre ou être associé à la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylsérine (PS) (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015).

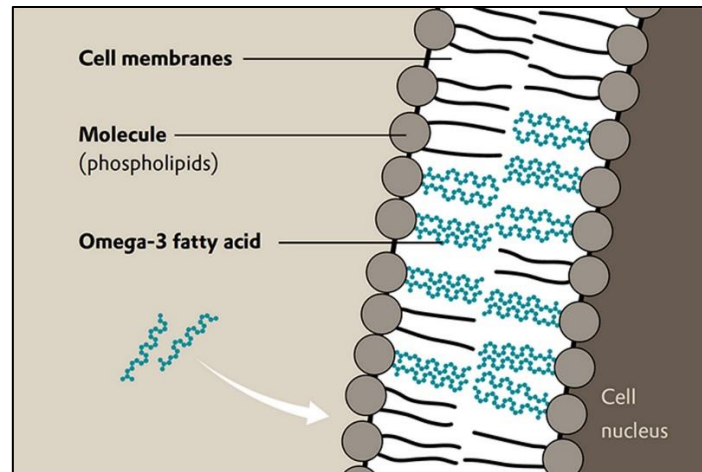


Figure 25 Incorporation des acides gras omégas trois à la membrane cellulaire (Stange, 2019).

5.2. Activités anti inflammatoire

Les eicosanoïdes, tels que les prostaglandines, les prostacyclines, les thromboxanes et les leucotriènes, constituent un lien clé entre les acides gras AGPI et l'inflammation. Ces molécules, impliquées dans la régulation et la médiation de la réponse inflammatoire, sont synthétisées à partir d'AGPI à 20 atomes de carbone (Calder, 2006). Étant donné que les cellules inflammatoires contiennent généralement une proportion élevée d'acide arachidonique ; ce dernier est généralement le substrat principal de la synthèse des eicosanoïdes qui sont principalement impliqués dans la modulation de l'intensité et de la durée des réponses inflammatoires (Tilley et al., 2001; B. Wang et al., 2021). La consommation des AGPI-n-3 (EPA et DHA) entraîne une augmentation des proportions de ces acides gras dans les phospholipides des cellules inflammatoires en remplaçant l'acide arachidonique. L'incorporation des EPA/DHA dans les cellules inflammatoires mène à la génération d'eicosanoïdes alternatifs (indicateurs inflammatoires plus faibles) modulant ainsi la génération des PGE2 et d'autres médiateurs inflammatoires dérivés d'acide arachidonique.

Les PGE3 formés à partir des EPA présentent un effet moins puissant que les PGE2 sur l'expression du gène COX-2 dans les fibroblastes et sur la production d'IL-6 par les macrophages (Rogerio et al., 2020). Les AGPI de type ω -3 peuvent exercer une activité anti-inflammatoire en diminuant l'expression du NF- κ B via une diminution de la phosphorylation de I κ B ce qui conduit à une diminution de la production de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8) (figure 26). En outre, ils peuvent également affecter le mécanisme

inflammatoire en réduisant la chimiotaxie des leucocytes par l'inactivation de certains récepteurs chimioattractants (Calder, 2006; J. L. Harwood, 2023).

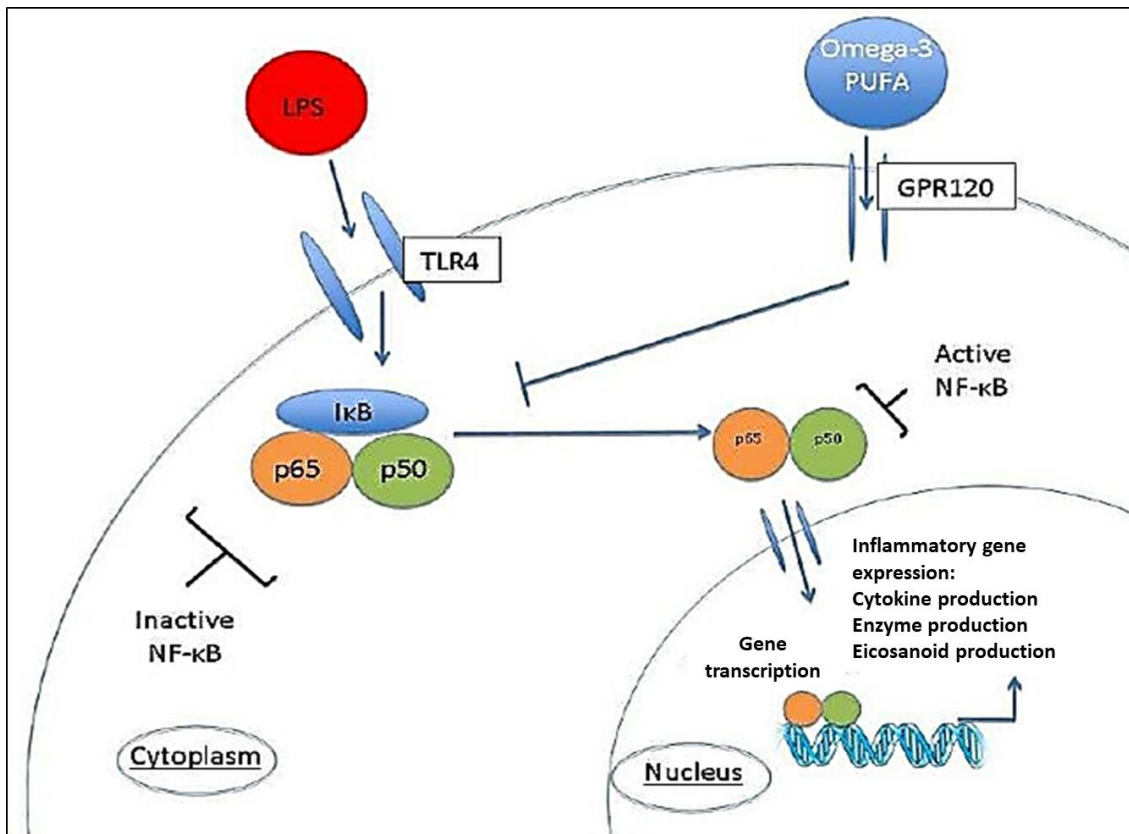


Figure 26 Régulation de la réponse inflammatoire par inactivation de la voie NF-KB par les omégas trois (Robertson et al., 2013).

5.3. Maintien du système nerveux

Le DHA joue un rôle crucial non seulement dans le développement du système nerveux pendant la vie fœtale et l'enfance, mais aussi dans le maintien de son bon fonctionnement à l'âge adulte. En outre, il est considéré comme l'un des principaux constituants des neurones, en particulier au niveau des synapses (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015).

Les AGPI de type ω -3 exercent une fonction protectrice contre les troubles de l'humeur en intervenant indirectement dans la synthèse de la sérotonine et de la dopamine (figure 27) (Salem et al., 2001). De plus, ces molécules pourraient avoir un effet bénéfique sur la concentration, les troubles de comportement, tels que l'hyperréactivité chez les enfants atteints de troubles du développement de la coordination, et les troubles psychiques. Elles pourraient également

atténuer les effets métaboliques indésirables des médicaments psychotropes ainsi que l'obésité, fréquemment rencontrée dans ce type de pathologies (Freeman et al., 2006; Ross et al., 2007).

Le DHA apparaît également en grande quantité dans la rétine. Il joue un rôle primordial dans l'œil en tant que précurseur de certains composés, tels que la neuroprotectine D1 qui présente des activités cytoprotectrices et anti-inflammatoires. Par ailleurs, cet AGPI est impliqué également dans la structure des membranes plasmiques des photorécepteurs, et en particulier de leurs segments externes (POS). La présence de DHA dans les POS est essentielle afin d'assurer un bon fonctionnement des pigments visuels (par exemple, la rhodopsine) (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015).

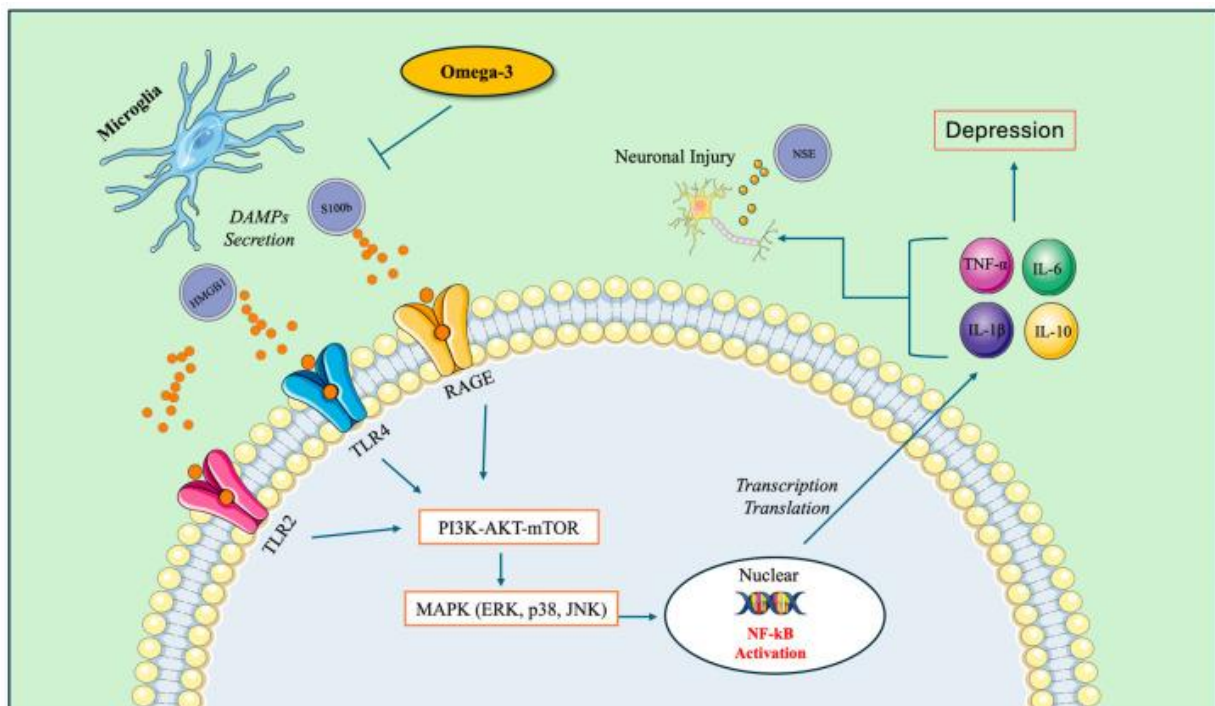


Figure 27 Voies de signalisation influencée par AGPI ω -3 dans le système nerveux (Malau et al., 2024).

5.4. Maintien du système cardiovasculaire

Les AGPI sont considérés comme des nutriments essentiels pour prévenir certaines maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires (Abdelhamid et al., 2018). Les AGPI de type EPA et DHA affectent positivement le métabolisme lipidique par la diminution du taux de triglycérides dans le plasma dans le cas d'hyperglycémie. Ils réduisent également le niveau

de cholestérol total et de la fraction LDL, tout en augmentant le niveau de la fraction HDL (Jump et al., 2012).

Le DHA et l'EPA contribuent à la régulation de la pression artérielle en augmentant les niveaux de prostacyclines et du facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF), deux puissants vasodilatateurs. Parallèlement, ils réduisent la concentration de thromboxane A2 (TXA2), un vasoconstricteur puissant, ainsi que celle de la prostaglandine E2 (PGE2), impliquée dans la stimulation de la production de rénine et la réabsorption du sodium (figure 28). De plus, en modifiant la composition lipidique des membranes cellulaires, notamment au niveau des sites des récepteurs des hormones vasoactives, les AGPI peuvent induire un effet hypotenseur (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015; Sokoła-Wysoczańska et al., 2018).

Les AGPI de type ω -3 possèdent également une activité antithrombotique. Ils prolongent le temps de saignement en réduisant l'adhésion et l'agrégation plaquettaires. Cet effet résulte de l'inhibition de la synthèse de composés prothrombotiques, tels que le facteur activateur des plaquettes, de la diminution de la concentration de fibrinogène, ainsi que de l'augmentation des niveaux de prostacycline, de l'activateur tissulaire du plasminogène et de l'angiotensine III (Golanski et al., 2021).

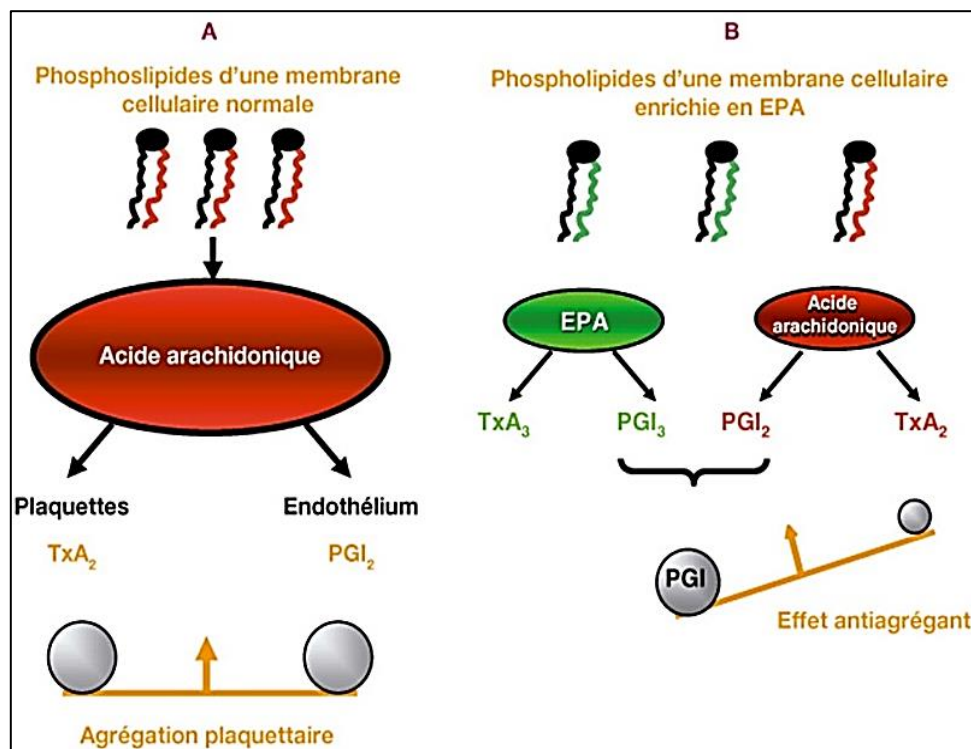


Figure 28 Effet antiagrégant des EPA dans le traitement de pathologies cardiovasculaires (Monnier & Colette, 2011).

5.5. Activités anti-cancéreuse

De nombreuses études suggèrent que les acides gras polyinsaturés (AGPI) de type ω -3 jouent un rôle clé dans l'inhibition du processus de carcinogenèse (figure 29). En particulier, le DHA exerce des effets anti-tumoraux marqués en supprimant la transformation néoplasique, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire, tout en favorisant l'apoptose (Yao et al., 2014; Yin et al., 2017). Son effet pro-apoptotique repose sur la modulation de plusieurs mécanismes moléculaires, notamment des modifications de l'environnement membranaire. En altérant la composition, la fluidité et l'organisation des radeaux lipidiques, le DHA influence la localisation et l'activité de récepteurs membranaires essentiels, tels que les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), les récepteurs de type Toll (TLR) et le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). Ces changements impactent directement les voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire et l'apoptose (Serini et al., 2009 ; Im, 2012 ; Abdolahi et al., 2016).

Selon le type de cancer, l'effet pro-apoptotique du DHA implique la modulation de plusieurs voies de survie moléculaire. Dans les cellules cancéreuses du sein, le DHA inhibe la voie Akt-mTOR en augmentant l'expression du récepteur nucléaire PPAR γ qui joue un rôle clé dans la différenciation cellulaire et l'inhibition de la prolifération tumorale. L'activation de PPAR γ bloque la signalisation pro-survie Akt/mTOR, réduisant ainsi la croissance tumorale (Rovito et al., 2013)

Le DHA active également l'AMPK (AMP-activated protein kinase), une enzyme qui régule le métabolisme énergétique cellulaire en agissant comme un "capteur énergétique" inhibant les voies pro-survie comme mTOR, favorisant ainsi l'apoptose des cellules cancéreuses (Abdolahi et al., 2016).

Un autre mécanisme clé est la modulation de p53, un suppresseur de tumeur central dans la réponse apoptotique. Dans certaines cellules cancéreuses du sein, le DHA favorise l'expression de p53 mutant, ce qui peut rétablir certaines fonctions apoptotiques de la protéine (Shin et al., 2013)

Le DHA régule à la baisse l'axe Akt/NF- κ B, une voie de signalisation pro-survie et anti-apoptotique régulant des gènes impliqués dans l'inflammation, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (Schley et al., 2005).

Un autre effet notable du DHA est l'augmentation du rapport AMPc/GMPc, favorisant l'activation du récepteur de type Toll 4 (TLR4) via PPAR α . Les TLR sont des récepteurs impliqués dans l'immunité innée, et leur activation par le DHA peut conduire à l'apoptose des cellules tumorales en déclenchant des cascades de signalisation inflammatoires et immunitaires (Geng et al., 2018a).

Dans les cellules cancéreuses du pancréas (PANC-1), la supplémentation en DHA entraîne une régulation négative des voies NF- κ B/I κ B α (Park et al., 2018). NF- κ B est normalement séquestré dans le cytoplasme par I κ B α . Lorsqu'il est activé, il migre vers le noyau et favorise l'expression de gènes anti-apoptotiques. L'inhibition de cette voie par le DHA facilite donc l'induction de l'apoptose. Enfin, dans les cellules cancéreuses de la prostate humaine DU145, le DHA induit l'apoptose par l'activation des voies p53, MAPK, impliquée dans la réponse au stress et l'induction de l'apoptose, TNF, PI3K/Akt et NF- κ B. TNF (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine pro-inflammatoire qui active la signalisation apoptotique via les récepteurs TNFR. De plus, bien que la voie PI3K/Akt soit souvent associée à la survie cellulaire, son inhibition par le DHA contribue à l'induction de l'apoptose (Sun et al., 2017).

Le potentiel anti-tumoral de l'EPA repose sur la modulation des voies apoptotiques classiques et alternatives, ainsi que sur l'altération des mécanismes de survie et des voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire. Les activités d'EPA varient en fonction du type cellulaire et du mécanisme impliqué, par exemple, dans la lignée cellulaire du cancer du sein BT20, il induit un arrêt du cycle cellulaire en bloquant la transition de la phase S à la phase G2-M (Nappo et al., 2012). De plus, en combinaison avec le DHA et la vitamine D3, il favorise la régulation positive de la voie Raf/MAPK (Yang et al., 2017), la modification des radeaux lipidiques, et induit l'activation soutenue de la voie EGFR/p38/MAPK sur les cellules MDA-MB-231 (Schley et al., 2007; Montecillo-Aguado et al., 2023).

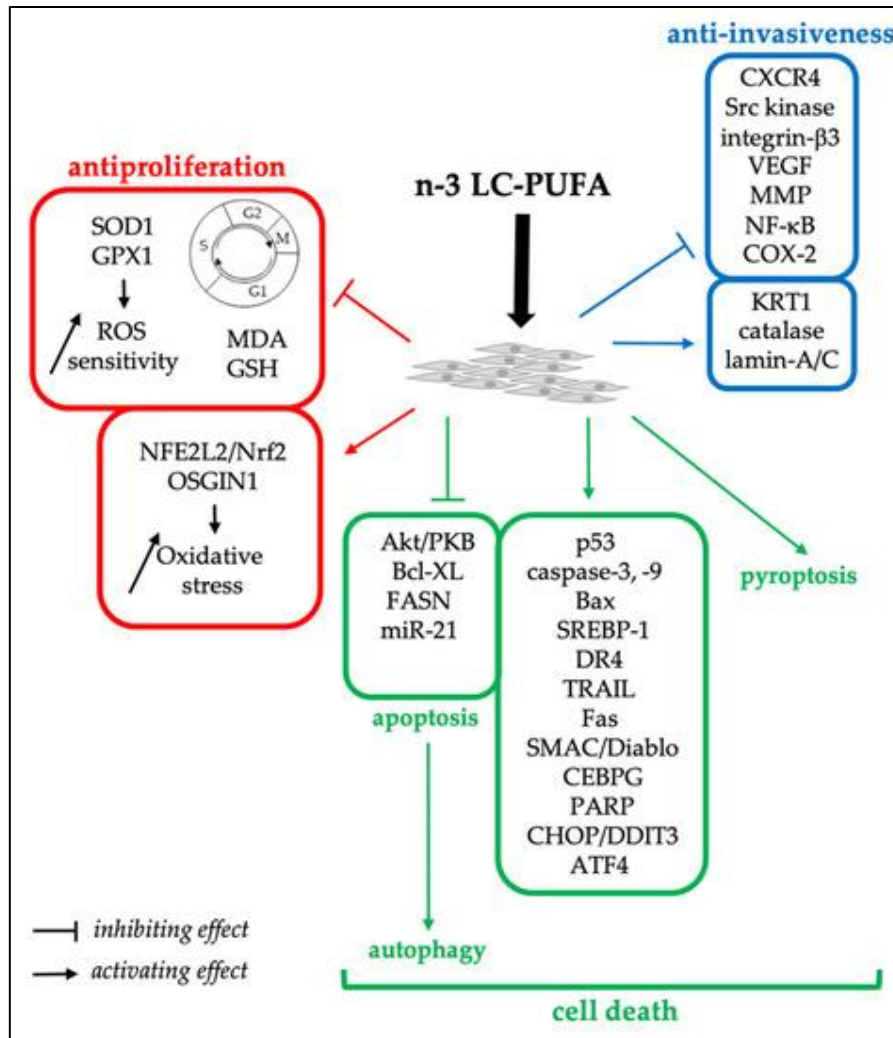


Figure 29 Activités anticancéreuses des AGPI omégas trois (Fodil et al., 2022)

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Cette étude vise à évaluer le potentiel préventif des acides gras polyinsaturés de type AGPI ω -3 présents dans l'huile de poisson sur l'induction d'un CSCc dans un modèle animal. Pour cela, il a été nécessaire de développer un modèle expérimental adapté à nos conditions de recherche.

Dans un premier volet, nous avons optimisé le protocole expérimental permettant d'induire un carcinome spinocellulaire cutané invasif, chez les souris de la souche swiss albinos, en faisant varier la dose et la fréquence d'administration de l'agent initiateur, le DMBA. Pour évaluer l'efficacité du modèle, nous avons utilisé les méthodes d'investigation suivantes :

- L'examen macroscopique des papillomes.
- L'examen histologique des prélèvements cutanés.
- La numération de la formule sanguine (FNS).
- Le dosage sérique de la lactate déshydrogénase (LDH).

Dans un second volet, nous avons évalué le potentiel préventif des AG ω -3 (EPA/DHA) contenus dans l'huile de poisson sur le modèle de carcinogenèse établi dans la première partie. L'effet des ω -3 a été analysé en fonction de la dose et de la voie d'administration (figure 29). Dans cette perspective, nous avons exploré l'activité biopréventive des ω -3 en étudiant :

- Les paramètres morphologiques des papillomes,
- L'examen anatomopathologique des prélèvements cutanés,
- Les taux d'expression génique des facteurs nucléaires NF-kB1 et NF-kB2 dans la peau.
- La numération de la formule sanguine (FNS).
- Le taux d'expression sérique du facteur de nécrose tumoral (TNF- α).
- Le dosage sérique de la lactate déshydrogénase (LDH).
- Les paramètres du stress oxydatif, incluant :
 - La peroxydation lipidique via le dosage du malondialdéhyde (MDA).
 - L'oxydation des protéines à travers la mesure des protéines carbonylées (PCO) et de l'oxydation avancée des protéines (AOPP).
 - Les paramètres du système antioxydant, enzymatiques (CAT, SOD, GPX) et non enzymatique (GSH), au niveau de la peau, organe cible.

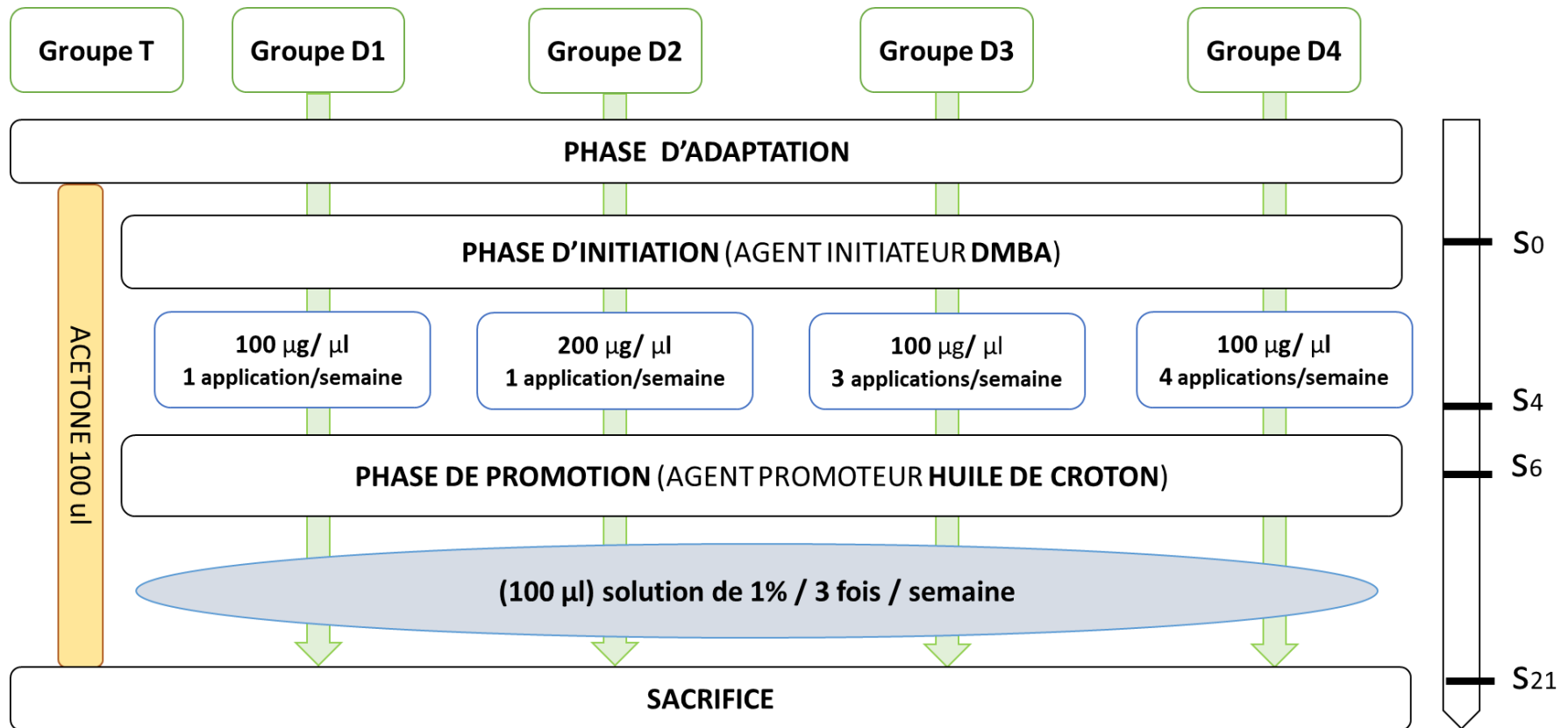


Figure 30 Schéma récapitulatif du protocole expérimental de la mise au point d'un modèle animal de carcinome spinocellulaire chez la souris swiss albinos.

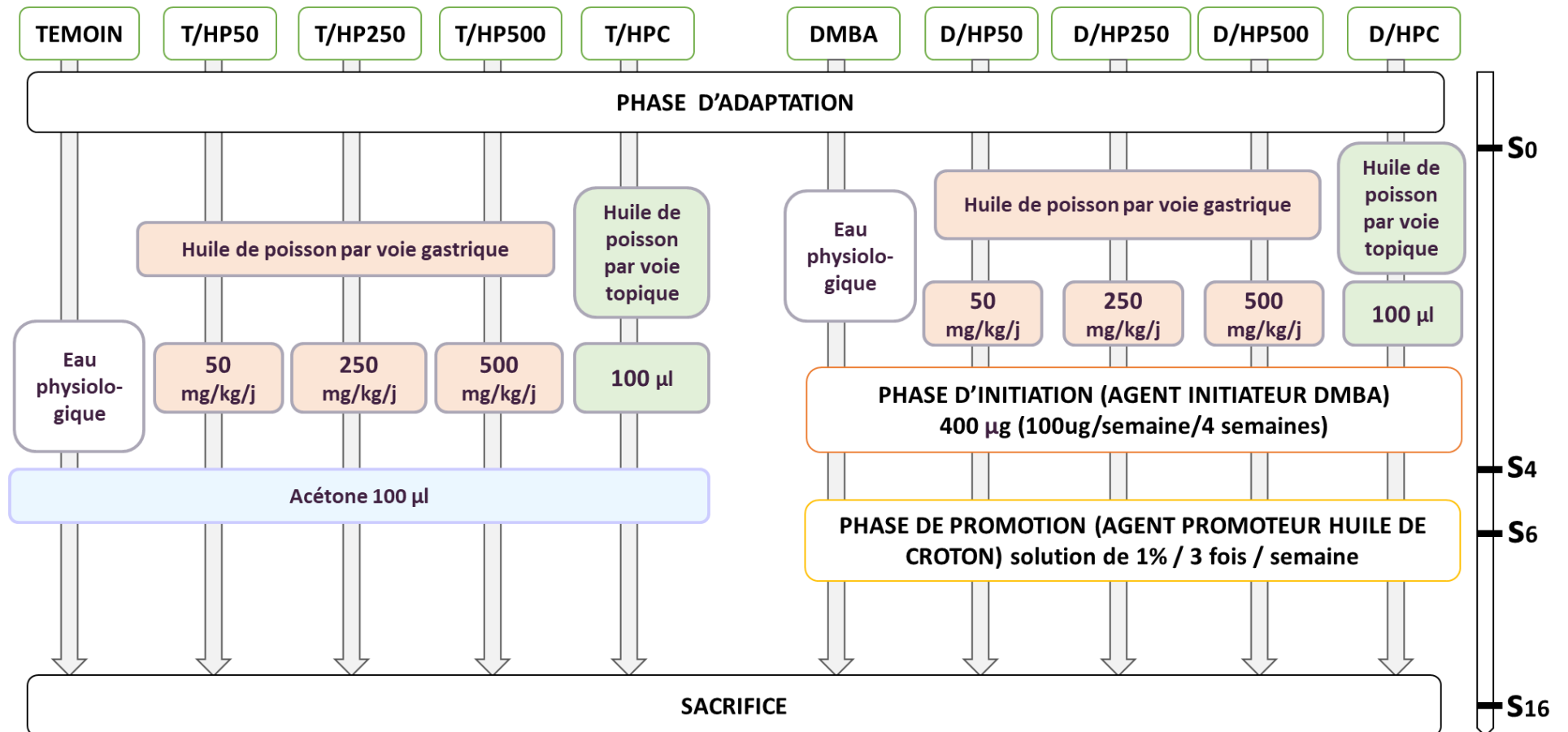


Figure 31 Schéma récapitulatif du protocole expérimental de l'effet préventif de l'huile de poisson chez un modèle animal de carcinome spinocellulaire.

CHAPITRE IV

***MISE AU POINT DU MODELE
EXPERIMENTAL DE CARCINOME
SPINOCELLULAIRE***

Chapitre IV Mise au point du modèle expérimental de carcinome spinocellulaire.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux et conditions d'élevage

Dans le cadre de notre protocole expérimental, nous avons utilisé 35 souris mâles de souche Swiss albinos, âgées de 4 à 6 semaines et pesant entre 25 et 30 grammes. Ces animaux ont été fournis par le département d'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Avant le début des expérimentations, une phase d'acclimatation de deux semaines a été instaurée. Durant cette période, les souris ont été hébergées individuellement dans des cages en polypropylène, garnies de litière en copeaux de bois, remplacée et désinfectée toutes les 72 heures. Les conditions environnementales ont été maintenues aussi constantes que possible, avec une température ambiante de 25 ± 5 °C, une humidité relative de 40 ± 5 %, et une exposition à une photopériode naturelle.

Les animaux ont reçu un aliment standard équilibré sur le plan énergétique, fourni par l'ONAB (Oued Fragha, Guelma, Algérie), ainsi qu'un accès libre à de l'eau du robinet.

1.2. Protocole expérimental de carcinogénèse chimique

Le protocole de la mise au point a été réalisé en collaboration avec Abdellaoui (2024).

Compte tenu du fort pouvoir cancérogène du 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) (Sigma Chemicals, USA, Cat. No. D3254), toutes les manipulations ont été réalisées sous une hotte chimique aspirante, afin de limiter au maximum l'exposition. Des gants de protection spécifiques, ainsi qu'un masque de sécurité adapté, ont été systématiquement portés afin de prévenir tout contact cutané ou risque d'inhalation.

1.2.1. Phase d'initiation

Les souris ont été réparties équitablement en 5 groupes composé 7 souris chacun. Avant chaque application de DMBA, une zone dorsale d'environ 3 cm² a été soigneusement rasée chez chaque souris afin de favoriser l'absorption cutanée du composé. Après l'application, les animaux ont été exposés à une lumière jaune pendant au moins 24 heures, cette précaution ayant pour but de prévenir la photodégradation du DMBA et d'assurer son efficacité maximale :

- **Groupe 1 (témoin) T** : les souris ont reçu une application topique de 100 µl d'acétone tout au long de l'expérimentation.
- **Groupe 2 (dose 1) D1** : les souris ont reçu une dose unique d'une solution de 100µg de DMBA /100µl d'acétone.
- **Groupe 2 (dose 2) D2** : les souris, ont reçu une dose unique de 200µg de DMBA /100µl d'acétone.
- **Groupe 3 (dose 3) D3** : les souris ont reçu une application hebdomadaire d'une solution de 100µg de DMBA /100µl d'acétone pendant trois semaines successives.
- **Groupe 4 (dose 4) D4** : les souris ont reçu une application hebdomadaire d'une solution de 100µg DMBA/100µl d'acétone pendant quatre semaines successives.

1.2.2. Phase de promotion

Deux semaines après la dernière application du DMBA pour chacun des groupes traités, une solution de l'huile de croton (Sigma chemicals, USA. Cat. No. 8001) a été appliquée, par voie topique, à une dose de 100µl d'une manière rythmique (1% resuspendu dans de l'acétone) à savoir, 3 fois par semaine, jusqu'à la fin du protocole expérimental.

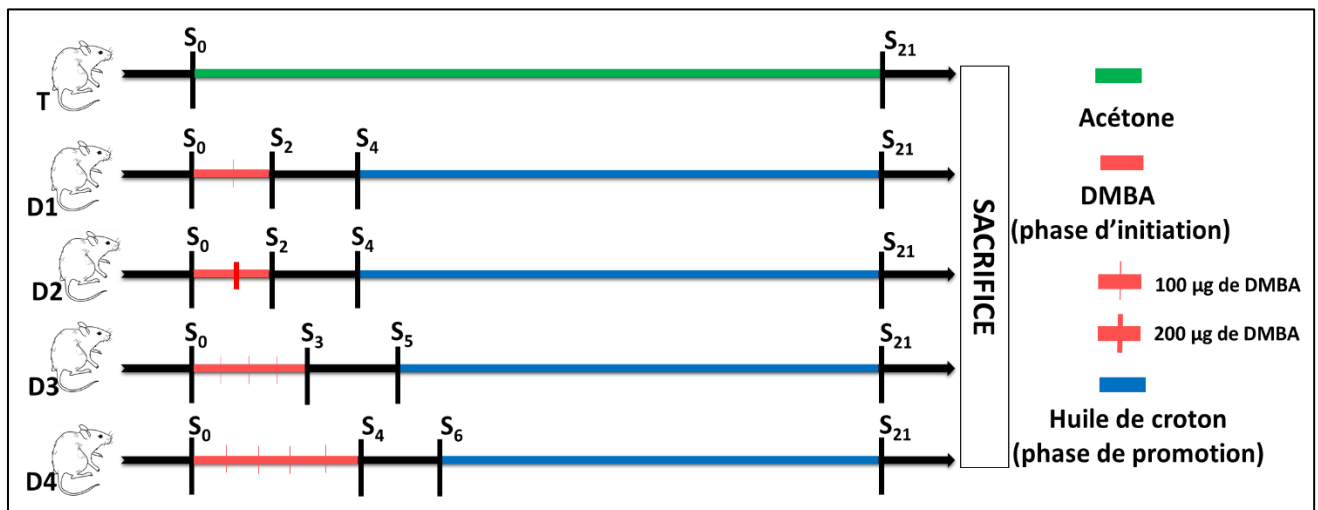


Figure 32 Schéma simplifié des groupes expérimentaux du protocole de mise au point de la carcinogénèse chimique par le couple DMBA/huile de croton.

1.2. Etude morphologique

À la fin du protocole expérimental, une analyse des paramètres morphologiques des papillomes a été réalisée afin de mesurer les éléments suivants : le cumul et l'incidence des papillomes, le

nombre de papillomes par souris, le volume moyen des papillomes, la charge tumorale ainsi que le ratio volume sur nombre (tableau 02).

Tableau 02 Indicateurs morphométriques de la formation de papillomes

| | |
|---|---|
| Le nombre cumulatif de papillomes | Nombre total de papillomes par groupe. |
| La moyenne de papillomes par souris | Nombre total de papillomes par groupe / nombre de souris possédant de papillomes au sein du même groupe. |
| L'incidence de papillomes | Nombre de souris présentant des papillomes / nombre total des souris dans le groupe x 100 |
| La moyenne de volumes de papillomes par souris | Calculée par la formule : $\frac{4}{3} \pi r^3$; où r est le rayon de la sphère en (mm) (Sati et al., 2016). |
| La charge tumorale de papillomes par groupe | Somme des volumes de l'ensemble des papillomes du groupe. |
| Le ratio V/N | Volume total des papillomes par groupe / nombre cumulatif de papillomes. |

1.3. Sacrifice et prélèvement des organes

1.3.1. Prélèvement sanguin

Après 21 semaines de la première application du DMBA, les souris ont été sacrifiées par décapitation et le sang a été immédiatement recueilli dans deux tubes ; un tube sec qui a été centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 min. le sérum collecté a été stocké à -20°C jusqu'à analyse, et un deuxième tube contenant un anticoagulant (EDTA) a servi pour mesurer les paramètres hématologiques partielles.

1.3.2. Prélèvement de fragments cutanés

Immédiatement après le sacrifice, des biopsies cutanées ont été prélevés à l'aide d'une pince, d'un bistouri et de ciseaux chirurgicaux. Une partie des échantillons a été conservée dans le formaldéhyde à 10% afin d'effectuer l'étude anatomopathologique. La deuxième partie a été conservée pour l'étude de paramètres du stress oxydatif.

1.4. Numération cellulaire

La mesure de numération cellulaire (FNS) a été effectuée en utilisant un automate d'hématologie (Marque : Blood Cell Center, ERMA INC, PCE-210N, Japan).

1.5. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)

Le dosage du taux sérique de la lactate déshydrogénase a été effectué au niveau du laboratoire de biochimie du centre anti-cancer CHU Ibn Rochd-Annaba, à l'aide d'un automate de type (*COBAS INTEGRA 400*). La méthode spectrophotométrique consiste à mesurer l'absorbance (à 340 nm) du NADH formé, ce qui permet de suivre en temps réel la cinétique de la réaction. L'activité enzymatique du LDH est exprimée en unité internationale (UI) par L de sérum. La réaction enzymatique catalysée est la suivante :



1.6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du service d'anatomie pathologique du centre hospitalisé Abd Allah Nouaouria-El-Bouni-Annaba-. La technique utilisée est celle décrite par Hould (1984), résumé dans le tableau 03 et illustrée dans la figure (33).

Tableau 03 Etapes de réalisation des coupes histologique par la coloration standard
(Hématoxyline - Eosine).

| Technique | | Étapes |
|------------------------------------|---------------------------------|--|
| Fixation | | La mise en cassette et fixation au le formol à 10 %. |
| Enrobage et mise en bloc | Déshydratation (Automatisée) | Passage progressif dans des bains d'alcools : 1 bain d'éthanol 70% (24h). 2 bains d'éthanol à 95% (4 à 5h chacun). 2 bains d'éthanol absolu (4 à 5h chacun). |
| | Eclaircissement | 2 bains de xylène (45 minutes chacun). |
| | Inclusion | 1 bain rapide de paraffine liquide (56/58°C). Enrobage de tissus par inclusion dans un bloc de paraffine fondue. |
| Confection des coupes | | Réalisation (par microtome) de coupes minces ($\approx 5 \mu\text{m}$). Fixation (par de l'eau gélatineuse chauffée) des coupes sur des lames porte – objet. |
| Coloration (Hématéine - Eosine) | | 1 Bain de xylène pour le déparaffinage 3 Bains successifs d'alcool 100%, 95%, 70% pour la réhydratation 1 Bain d'hématoxyline de Harris (15 minutes). 1 Bain d'eau du robinet. 1 Bain d'eau ammoniacale (1 à 2 plongées). 1 Bain d'eau du robinet. 1 Bain d'éosine (15 minutes). 1 Bain d'eau du robinet. |
| Observation | | Observation des lames au microscope optique. |

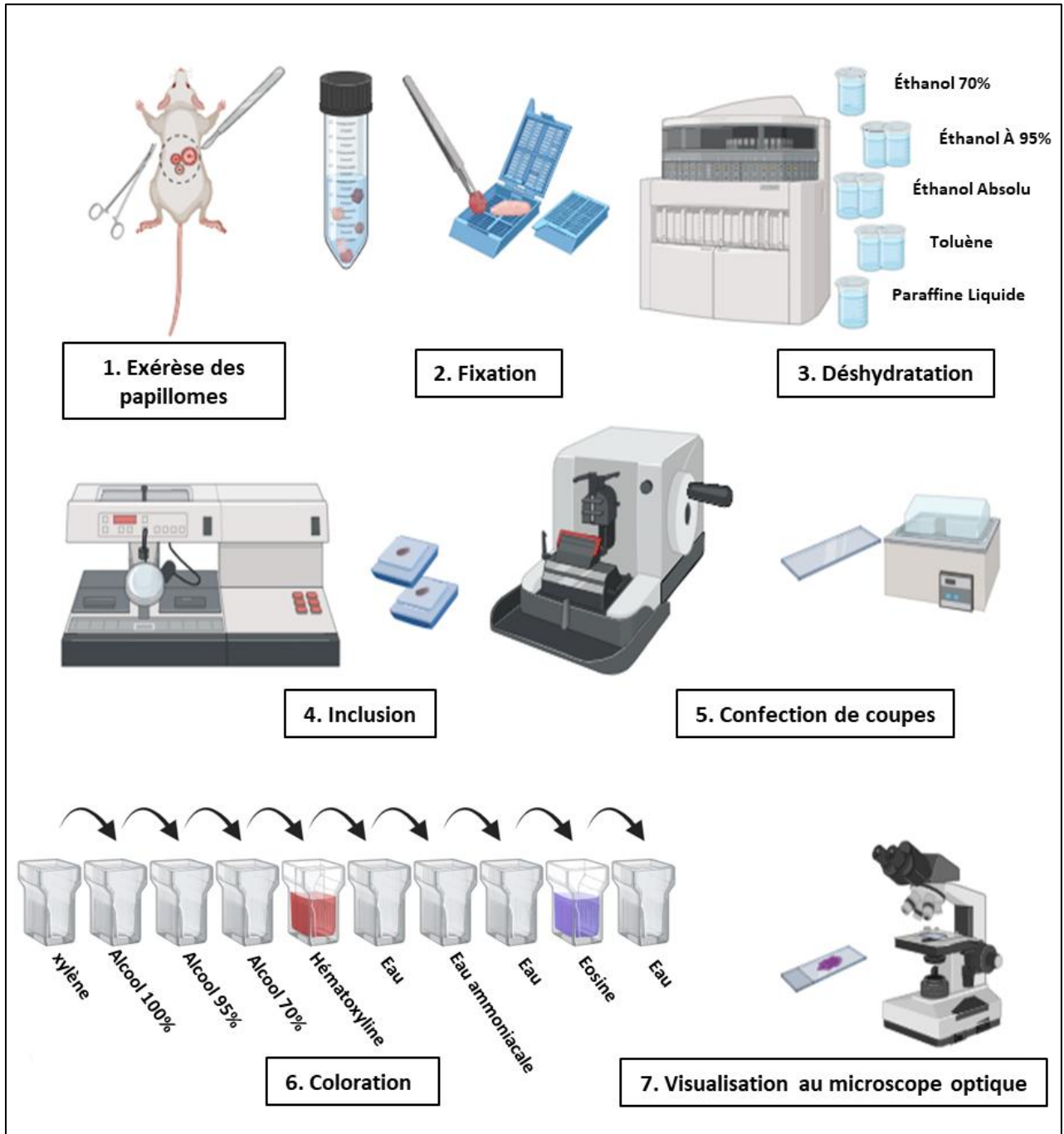


Figure 33 Schéma simplifié des étapes de réalisation de la technique histologique et coloration standard (Hématoxyline - Eosine).

2. Résultats

2.1. Etude macroscopique

La figure (34) illustre des photographies de la face dorsale des souris appartenant aux cinq groupes expérimentaux. Le groupe témoin (T) présente une peau saine, d'aspect et de couleur normaux. En revanche, les groupes (D1), (D2), (D3) et (D4) affichent des lésions bourgeonnantes (papillomes) sur le dos des souris, dont le nombre et les caractéristiques morphologiques varient en fonction de la dose et de la fréquence d'application du DMBA.

Les souris du groupe (D1) développent quelques lésions bourgeonnantes de petite taille, de forme circulaire et de couleur rosâtre. Celles du groupe (D2) présentent un plus grand nombre de papillomes, avec un volume accru mais un aspect similaire à celui du groupe (D1). Enfin, les souris des groupes (D3) et (D4) exhibent des papillomes de volumes importants, de formes irrégulières, avec une tendance au noircissement.

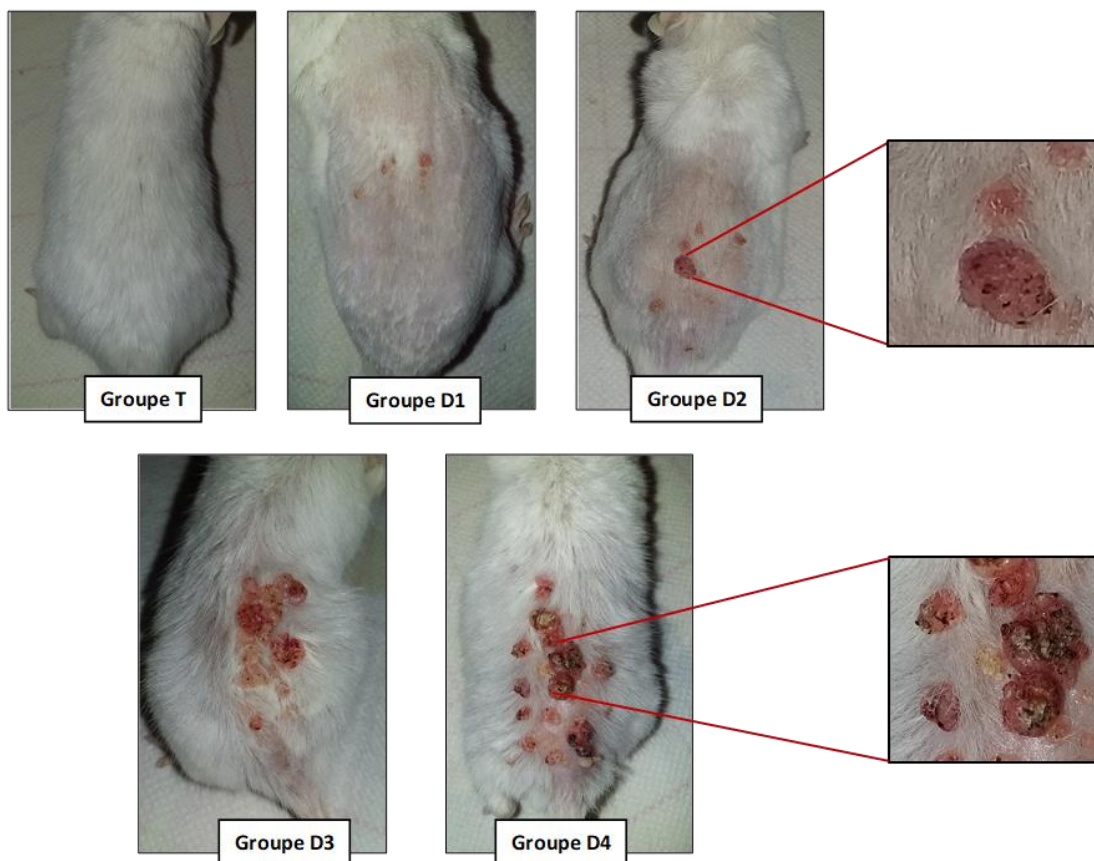


Figure 34 Aspect macroscopique du développement de papillomes après 21 semaines d'expérimentation.

Le tableau (04) montre une incidence de papillomes de 100% chez les souris des groupes (D2) et (D4), contrairement aux groupes D1 et D3 qui ont présenté une incidence de 60% et 83% respectivement. Les groupes D2, D3 et D4 ont enregistré une augmentation aux nombres cumulatifs de papillomes par rapport au groupe (D1). Le groupe D2 a présenté une augmentation significative de la moyenne des volumes par souris ($p \leq 0,05$), tandis que les groupes D3 et D4 ont montré une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) par rapport au groupe D1. Une tendance similaire a été observée pour les volumes totaux des papillomes par groupe. De plus, une augmentation significative de la moyenne des volumes a été notée dans le groupe D4 par rapport au groupe D2 ($p \leq 0,05$). Ces résultats sont corroborés par les valeurs du ratio V/N, qui augmentent progressivement en fonction de la dose et de la fréquence d'application du DMBA ($D1 < D2 < D3 < D4$).

Tableau 04 Effet de la variation de la dose et de la fréquence d'application de DMBA dans l'induction de papillomes cutanés chez des souris swiss albinos.

| | <i>Groupe D1</i> | <i>Groupe D2</i> | <i>Groupe D3</i> | <i>Groupe D4</i> |
|---|------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| Nombre cumulatif de papillomes | 5 | 39 | 34 | 40 |
| Moyenne de papillome/souris | 1,66 ± 0.31 | 7,8 ± 1.26** | 8,5 ± 2.03** | 8 ± 2.54** |
| Incidence (%) | 60 (3/5) | 100 (5/5) | 83 (4/5) | 100 (5/5) |
| Moyenne de V de papillomes/souris (mm³) | 5.43 ± 3.49 | 32,14 ± 19,83* | 84,76 ± 23,77** | 110,41 ± 49,51***# |
| Charge de papillome / groupe (mm³) | 12,46 ± 6,73 | 97.57 ± 28.42** | 489.41 ± 30.97*** | 527.52 ± 39.15*** |
| V/N ratio | 2.49 | 2.50 | 14.39 | 13.18 |

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM (n=5). * $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ vs **groupe D1** ; # $p \leq 0.05$ vs **groupe D2**.

2.2. Variation histologiques

L'étude microscopique des coupes histologiques de fragments cutanés du groupe témoin a révélé une architecture tissulaire normale, distinguant clairement les trois couches constitutives de la peau : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. En revanche, les coupes histologiques du groupe D1 ont montré une hyperplasie de bas grade, accompagnée d'une anisokaryose. Les résultats histologiques des souris des groupes D2 et D3 ont révélé une hyperplasie associée à

une dysplasie de haut grade (carcinome *in situ*), ainsi que le début d'un processus d'angiogenèse, attesté par la présence d'hématies dans les vaisseaux sanguins néoformés.

Concernant le groupe D4, l'examen microscopique a mis en évidence un carcinome spinocellulaire mature, caractérisé par une nécrose tumorale, une désorganisation architecturale des tissus, la présence de cellules atypiques et un stroma fibroblastique inflammatoire. De plus, une embolisation tumorale a été observée (figure 35).

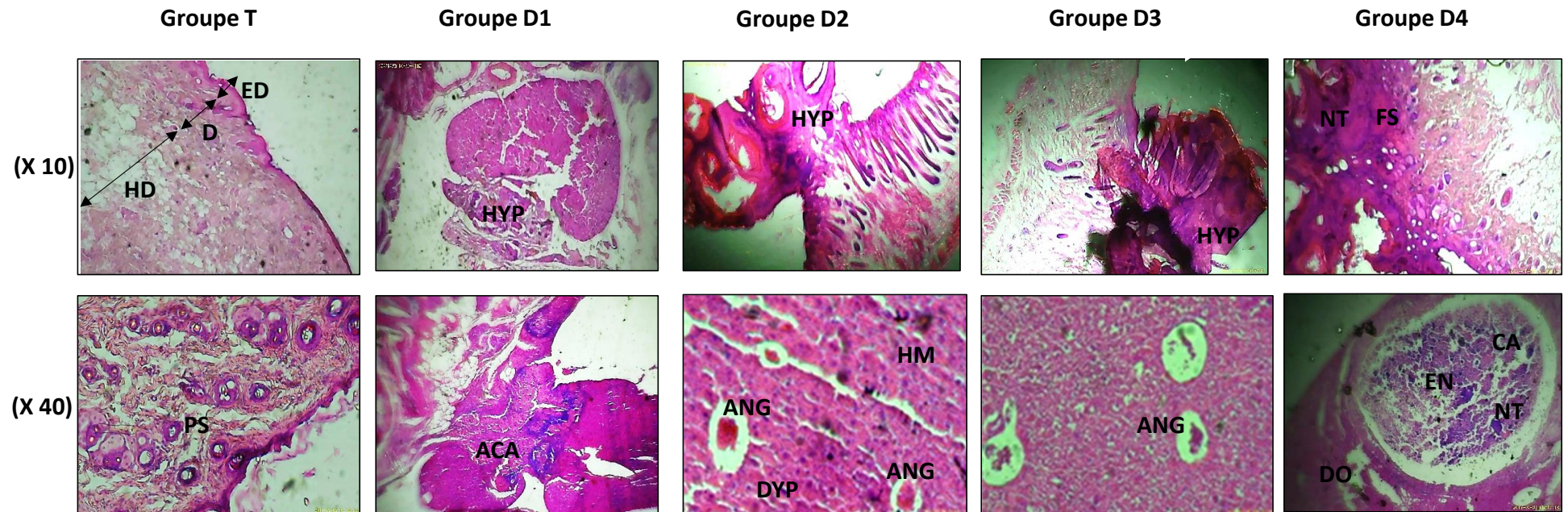


Figure 35 Coupes histologiques cutanées des différents groupes expérimentaux. Légendes (**ED** : épiderme ; **D** : derme ; **HD** : hypoderme ; **HYP** : hyperplasie ; **DYP** : dysplasie ; **ACA** : anisocaryose ; **HM** : hématies ; **ANG** : angiogenèse ; **DO** : désorganisation architecturale ; **FS** : stroma fibroinflammatoire ; **CA** : cellules atypiques ; **NT** : nécrose tumorale) (Digital microscope optique OX-2000X, 1200X pixels-china. grossissement : x10 / x40).

2.3. Variations hématologiques

Le tableau (05) met en évidence une augmentation significative du nombre de globules blancs dans le groupe D4 par rapport au groupe témoin ($p \leq 0,05$). Une hausse significative du nombre de monocytes et de granulocytes a également été observée chez les souris des groupes D3 et D4 par rapport aux groupes T et D1 ($p \leq 0,05$).

En ce qui concerne les globules rouges, une réduction significative a été notée dans les groupes D2, D3 et D4 ($p \leq 0,05$), tandis qu'une diminution hautement significative a été enregistrée dans le groupe D1 ($p \leq 0,01$) par rapport au groupe témoin.

Enfin, nos résultats n'ont révélé aucune différence significative dans le nombre de lymphocytes entre les différents groupes expérimentaux.

Tableau 05 Evolution partielle des paramètres hématologiques (numération des GB et GR) dans les différents groupes expérimentaux

| | <i>Groupe T</i> | <i>Groupe D1</i> | <i>Groupe D2</i> | <i>Groupe D3</i> | <i>Groupe D4</i> |
|-------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
| WBC X 10³ /μL | 9,77 ± 3,2 | 12,85 ± 5,9 | 11,5 ± 0,48 | 15,18 ± 2,73 | 19,8 ± 0,62* |
| LYM X 10³ /μL | 7,32 ± 2,59 | 6,7 ± 5,05 | 4,25 ± 0,75 | 6,88 ± 1,01 | 7,58 ± 1,21 |
| MONO X 10³ /μL | 1,42 ± 0,42 | 1,37 ± 0,18 | 1,7 ± 0,45 | 3,24 ± 0,85** [#] | 4,32 ± 0,32** [#] |
| GRANULO X 10³ /μL | 1,05 ± 0,27 | 1,57 ± 0,68 | 1,97 ± 0,47 | 4,9 ± 1,3* | 5,2 ± 0,57** [#] |
| RBC X 10⁶ /μL | 18,3 ± 1,08 | 12,12 ± 2,35** | 16,42 ± 1,59* | 15,3 ± 0,98* | 15,5 ± 1,06* |

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM (n=5). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ vs **groupe T** ; [#] $p \leq 0,05$ vs **groupe D1**.

2.4. Variations de la lactate déshydrogénase sérique

La figure (36) illustre les résultats du dosage du taux sérique de la LDH. Une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) a été observée dans le groupe D3, tandis qu'une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) a été notée dans le groupe D4 par rapport au groupe témoin (T). De plus, la concentration sérique de la LDH dans le groupe D4 est significativement plus élevée ($p \leq 0,01$) que dans le groupe D1.

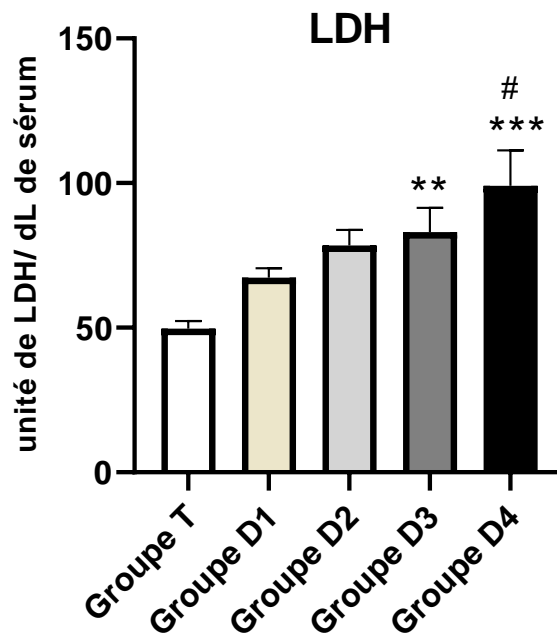


Figure 36 Variations de concentration de la LDH sérique chez les souris des groupes expérimentaux. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 5 souris). ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs **groupe T** ; # $p \leq 0.05$ vs **groupe D1**.

3. Discussion

La carcinogénèse cutanée induite par le DMBA, en association avec l'huile de croton, suit classiquement trois étapes : initiation, promotion et progression. Ce modèle reproduit fidèlement les mécanismes du développement naturel des tumeurs humaines (Yang et al., 2014). L'enchaînement de ces étapes implique des altérations des voies moléculaires et cellulaires associées à de multiples modifications génétiques. Le gène *Hras1* constitue la principale cible génétique de la phase d'initiation. Le DMBA provoque principalement une mutation caractérisée par une transversion de l'adénine (A) en thymine (T) au niveau du codon 61 de ce gène (Brown et al., 1990). Lors de la phase de promotion, les cellules mutées se multiplient sous forme de clones, qui bénéficient d'un avantage prolifératif sur les cellules voisines, favorisant ainsi leur expansion sélective. L'émergence de ces excroissances clonales de cellules nucléées entraîne une hyperplasie épidermique, conduisant à la formation de papillomes. Ces derniers se caractérisent par la présence d'un noyau stromal entouré d'un épiderme hyperplasique. (Abel et al., 2009). L'un des principaux défis rencontrés lors du développement du protocole d'induction chimique avec le DMBA réside dans la durée prolongée requise pour obtenir une tumeur mature. Pour surmonter cette contrainte, il est

impératif d'explorer continuellement de nouveaux protocoles, qui impliquent des ajustements tant dans la dose administrée que dans la fréquence d'application du DMBA.

Dans cette étude, l'induction tumorale par le DMBA a entraîné une incidence élevée et un cumulatif important de papillomes chez les souris des groupes D2, D3 et D4, comparativement au groupe D1. De plus, une différence hautement significative a été observée dans le volume des papillomes des groupes D3 et D4 par rapport au groupe D1. Une augmentation significative du volume moyen a également été relevée en comparant les résultats du groupe D4 à ceux du groupe D2. Par ailleurs, l'examen histologique des papillomes a révélé une hyperplasie de bas grade chez le groupe D1, une hyperplasie associée à une dysplasie de haut grade chez les groupes D2 et D3 et un carcinome spinocellulaire mature chez le groupe D4.

La littérature rapporte que l'accumulation de dommages génétiques induite par des applications répétées de DMBA entraîne une fréquence accrue de mutations, augmentant ainsi la probabilité de progression du cancer (Manjanatha et al., 2000; Nassar et al., 2015). Il est essentiel de souligner qu'au-delà de son rôle initiateur dans la tumorigénèse, le DMBA peut également agir comme un puissant agent promoteur, en activant plusieurs voies favorisant la prolifération cellulaire, l'invasion tumorale et l'inflammation (Ahn et al., 2014; Kwon et al., 2018). Cela pourrait expliquer le taux élevé d'incidence tumorale ainsi que l'évolution avancée des lésions cutanées observées chez les souris des groupes D3 et D4, qui ont subi une phase d'initiation prolongée par rapport aux groupes D1 et D2. En accord avec ces observations, Rifai et al. (2024) ont démontré, dans une étude menée sur des souris, que des applications répétées de 100 µg de DMBA induisent le développement d'un carcinome spinocellulaire mature et invasif.

Le DMBA, un puissant carcinogène, induit une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, jouant un rôle clé dans le déclenchement et le maintien des réponses inflammatoires (Aggarwal et al., 2006). Cet environnement inflammatoire favorise non seulement la prolifération des cellules tumorales, mais entraîne également le recrutement de diverses cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral, contribuant ainsi au processus de cancérogénèse (Wu & Chen, 2013).

Dans notre protocole expérimental utilisant plusieurs doses de DMBA (100 µg, 200 µg, 300 µg et 400 µg), nous avons observé une augmentation significative du nombre de globules blancs uniquement chez le groupe D4, comparé au groupe témoin (T) et aux autres groupes ayant reçu des doses de DMBA inférieures à 400 µg. En revanche, les monocytes et granulocytes ont

montré une élévation significative chez les souris des groupes D3 et D4, par rapport aux groupes T et D1. Le recrutement des leucocytes inflammatoires (monocytes, macrophages, neutrophiles et éosinophiles) favorise la libération de multiples facteurs solubles, connus pour jouer un rôle de médiateur dans le développement tumoral associé à l'inflammation. Les cellules tumorales sécrètent des facteurs de croissance tels que TGF- β , PDGF et FGF, qui recrutent et activent les fibroblastes résidant dans le tissu environnant. Ces fibroblastes activés, appelés fibroblastes associés au cancer, prolifèrent et déposent une matrice extracellulaire dense, favorisant ainsi la fibrose tumorale (Shacter & Weitzman, 2002). Les fibroblastes et cellules immunitaires du stroma fibro-inflammatoire libèrent des facteurs angiogéniques (VEGF, FGF), stimulant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cette vascularisation est souvent anormale et favorise un apport irrégulier en oxygène et nutriments, créant des zones hypoxiques qui encouragent l'agressivité tumorale. Il a été démontré que de nombreux cancers émergent de sites d'infection, d'irritation chronique ou d'inflammation, cette dernière constitue donc un élément clé de la progression tumorale (Pęczek et al., 2023). Ces résultats mettent en évidence une corrélation entre l'élévation des leucocytes inflammatoires sanguins et l'intensité des dommages tissulaires observés chez les souris des groupes D3 et D4, notamment le stroma fibro-inflammatoire et le début de l'angiogénèse, renforçant ainsi l'hypothèse du rôle crucial de l'inflammation dans la progression du cancer.

Concernant les globules rouges, les résultats de la présente étude ont révélé une diminution significative chez tous les groupes traités au DMBA. Des études antérieures ont rapporté que le DMBA exerce des effets hématotoxiques altérant l'intégrité et la fonction des globules rouges, conduisant ainsi à leur hémolyse (Hidayati et al., 2015). Par ailleurs, les cellules cancéreuses induisent un stress oxydatif entraînant une accumulation de céramides, ce qui provoque un rétrécissement des membranes érythrocytaires et aboutit à leur lyse, un phénomène connu sous le nom d'éryptose (Lang et al., 2017).

Le processus métabolique énergétique cellulaire est assuré par la lactate déshydrogénase (LDH) dans des conditions d'oxygène variables (aérobies et anaérobies) en catalysant la conversion réversible du pyruvate en lactate (Klein et al., 2020). Dans le métabolisme aérobie, la LDH soutient la respiration cellulaire et la production d'énergie par phosphorylation oxydative par la conversion du lactate en pyruvate. Lorsque les niveaux d'oxygène, en glycolyse anaérobie, sont faibles, la LDH catalyse la conversion du pyruvate en lactate en régénérant le NAD⁺, permettant la production de l'ATP (Rajala et al., 2023).

Au cours de la tumorigénèse, lorsque la masse tumorale dépasse la distance de diffusion de l'oxygène à partir des vaisseaux sanguins adjacents, les cellules tumorales évoluent dans un environnement hypoxique. Pour compenser ce manque d'oxygène, elles adaptent leur métabolisme en privilégiant la glycolyse comme principale source de production d'énergie, favorisant ainsi l'entrée de la tumeur dans une phase de croissance exponentielle (Sonveaux et al., 2009). Dans notre étude, le dosage des taux sériques de la LDH chez les cinq groupes expérimentaux a révélé une augmentation des concentrations de cette enzyme après la cancérisation induite par le DMBA. Cette élévation était proportionnelle à la dose administrée, avec des augmentations hautement significative et très hautement significative observées respectivement chez les groupes D3 et D4 par rapport au groupe témoin (T). De plus, la comparaison entre les groupes expérimentaux a montré une augmentation significative du taux de LDH chez le groupe D4 en comparaison avec le groupe D1.

L'origine de cette élévation du taux de la LDH est attribué au métabolisme particulier de cellules cancéreuses dans leur microenvironnement tumoral, phénomène bien connu sous le nom « effet de Warburg ». Contrairement aux cellules normales, qui utilisent principalement la phosphorylation oxydative en présence d'oxygène, les cellules tumorales privilégient la glycolyse anaérobie suivie d'une fermentation, même en conditions normoxiques. Ce métabolisme altéré permet aux cellules cancéreuses de produire rapidement l'énergie nécessaire à leur prolifération et à leur survie. Dans ce processus, la glycolyse génère de grandes quantités de pyruvate, qui est ensuite converti en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) régénérant ainsi le NAD^+ , un cofacteur essentiel au maintien du flux glycolytique (Sonveaux et al., 2009).

L'accumulation de l'acide lactique produit contribue à l'acidification du microenvironnement tumoral inhibant ainsi l'activité des cellules immunitaires et favorisant la survie et la croissance tumorale (Icard & Lincet, 2013). Il a également été démontré que la LDH constitue un indicateur pronostique clé, son élévation étant étroitement corrélée à la progression tumorale (Tini et al., 2024). Toutefois, bien que son augmentation reflète l'agressivité et l'expansion de la tumeur, la LDH ne peut être considérée comme un biomarqueur spécifique de la progression tumorale. En effet, son taux sérique peut également s'élever en réponse à des lésions tissulaires, des maladies cardiovasculaires ou d'autres pathologies non cancéreuses, limitant ainsi son utilisation en tant que marqueur exclusif du développement tumoral (Jaleel et al., 2024).

4. Conclusion

Les modèles animaux expérimentaux restent un outil fondamental pour étudier, *in vivo*, les mécanismes de la cancérogenèse. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact de la dose et de la fréquence d'administration du DMBA sur le développement du carcinome spinocellulaire cutané chez la souris, en combinant une analyse morphologique, histologique, hématologique et biochimique. Nous avons démontré que l'augmentation de la dose et de la fréquence d'administration du DMBA influence directement la tumorigénèse cutanée chez la souris. En effet, des doses et des fréquences élevées ont favorisé une progression tumorale plus rapide et plus agressive, avec une transition de lésions bénignes (papillomes) vers un carcinome spinocellulaire invasif et une réponse inflammatoire marquée (élévation des globules blancs, notamment des monocytes et granulocytes) accompagné d'une augmentation significative du taux sérique de LDH, un marqueur du métabolisme tumoral.

Ces résultats valident le protocole utilisé dans le groupe D4 (100 µg de DMBA/semaine, pendant quatre semaines consécutives) comme modèle murin de référence du carcinome spinocellulaire. Ce modèle expérimental a été exploité dans la deuxième partie de notre recherche qui a visé d'évaluer le potentiel préventif de l'huile de poisson contre le carcinome spinocellulaire cutané (CSCc).

CHAPITRE V

*ÉVALUATION DU POTENTIEL PREVENTIF DE
L'HUILE DE POISSON DANS UN MODELE
EXPERIMENTAL DE CARCINOME
SPINOCELLULAIRE*

Chapitre V Evaluation du potentiel préventif de l'huile de poisson dans un modèle expérimental de carcinome spinocellulaire.

1. Matériel et méthodes

1.1. Protocole expérimental

1.1.1. Animaux et conditions d'élevage

Au cours du protocole expérimental, nous avons utilisé 70 souris mâles de la souche *swiss albinos*, âgés de 4 semaines avec un poids corporel ≈ 30 g, obtenues auprès du département animalerie de l'institut pasteur d'Algérie.

Ces animaux ont été soumis à une phase d'adaptation de deux semaines où ils ont été hébergés dans des cages individuelles en polypropylène, tapissées d'une litière de copeaux de bois qui a été désinfectée tous les 72h. Les rongeurs ont été exposés à une photopériode naturelle, à une température ambiante quasiment stable de 25 ± 5 °C et une humidité relative de 40 ± 5 %. Ils ont été nourris avec un régime alimentaire énergétiquement équilibré (aliment standard fournit par l'ONAB d'Oued Fragha, Guelma, Algérie) et avec de l'eau de robinet.

1.1.2. Choix de la marque et de la dose de l'huile de poisson

L'huile de poisson (HP) utilisée au cours du protocole expérimental est une huile commercialisée de la marque *natural Factors* (Canada) de grade pharmaceutique. Elle est raffinée, purifiée et concentrée en EPA et DHA (1ml d'HP contient 526 mg des AGPI ω).



Figure 37 Huile de poisson utilisée dans le protocole expérimental.

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un essai dose-réponse visant à évaluer l'effet de différentes doses d'huile de poisson sur la croissance tumorale et l'inflammation. Trois doses ont été sélectionnées d'après la littérature préclinique tenant compte à la fois de la toxicité et des effets anti-inflammatoires : une dose de départ (50 mg/kg/jour), une dose minimale efficace (250 mg/kg/jour) et une dose maximale bien tolérée (500 mg/kg/jour).

Les études antérieures rapportent que si des doses élevées à court terme peuvent provoquer des effets indésirables (nausées, ballonnements, diarrhée), les doses recommandées à long terme ne sont généralement pas toxiques. Toutefois, une exposition prolongée à des doses excessives peut altérer certaines fonctions biologiques, notamment hépatiques, gastro-intestinales, lipidiques et plaquettaires.

Dans notre protocole, la durée de traitement de 16 semaines représente environ 20 % de la durée de vie moyenne des rongeurs, ce qui classe cette expérimentation parmi les études à long terme. Compte tenu de l'âge juvénile des animaux, un facteur déterminant en cancérogenèse, nous avons opté pour des doses largement inférieures aux seuils de toxicité établis chez le rat adulte. Cette précaution visait à garantir la sécurité des animaux, leur métabolisme étant potentiellement plus vulnérable, et à limiter les biais liés aux effets toxiques pour préserver la fiabilité des résultats (Godea et al., 2020; Khadke et al., 2020).

En ce qui concerne l'application topique, contrairement à l'administration orale, où les substances ingérées sont progressivement absorbées par le tractus gastro-intestinal, l'absorption cutanée de substances appliquées localement est limitée par la surface de la peau. Dans notre expérience, cette surface était restreinte à 3 cm² sur le dos de la souris. Ainsi, l'application topique a été optimisée afin d'administrer une dose standardisée, adaptée aux conditions expérimentales.

1.1.3. Carcinogénèse chimique

Les souris ont été équitablement réparties en 10 groupes (figure 38). Durant les 16 semaines d'expérimentation, les souris ont reçu l'HP par gavage ou par application topique.

- **Groupe 1 (Témoin) T** : les souris ont reçu une application topique de 100 µl d'acétone à la place du DMBA et de l'eau physiologique à la place d'HP tout au long de l'expérimentation.

- **Groupe 2 (HP/G1)** : les souris ont reçu 150 mg/kg d'AG ω 3 par gavage à intervalle de trois jours. Cette dose correspond à une dose moyenne quotidienne de 50 mg/kg/j.
- **Groupe 3 (HP/G2)** : les souris ont reçu 750 mg/kg d'AG ω 3 par gavage à intervalle de trois jours. Cette dose correspond à une dose moyenne quotidienne de 250 mg/kg/j.
- **Groupe 4 (HP/G3)** : les souris ont reçu 1500 mg/kg d'AG ω 3 par gavage à intervalle de trois jours. Cette dose correspond à une dose moyenne quotidienne de 500 mg/kg/j.
- **Groupe 5 (HP/C)** : les souris ont reçu une 100 μ l de l'huile de poisson par application topique à intervalle de trois jours. Cette dose correspond à une dose moyenne quotidienne de 584 mg/kg/j.
- **Groupe 6 (DMBA)** : les souris ont reçu une application hebdomadaire de 100 μ g de DMBA/100 μ l d'acétone pendant 4 semaines consécutives et 100 μ l HC à 1% pendant la durée de la promotion.
- **Groupe 7 (DHP/G1)** : les souris ont reçu le DMBA /HC/ HP (50 mg/kg/J) par gavage.
- **Groupe 8 (DHP/G2)** : les souris ont reçu le DMBA /HC/ HP (250 mg/kg/J) par gavage.
- **Groupe 9 (DHP/G3)** : les souris ont reçu le DMBA /HC/ HP (500 mg/kg/J) par gavage.
- **Groupe 10 (DHP/C)** : les souris ont reçu le DMBA /HC/ HP (100 μ l) par application topique.

1.2.2. Prélèvement de la peau :

Après le sacrifice des souris, des fragments de peau ont été prélevés à l'aide d'une pince, d'un bistouri et de ciseaux chirurgicaux. Les échantillons ont ensuite été conservés soit dans du formaldéhyde à 10 % pour l'analyse anatomopathologique, soit à -20 °C en vue de la préparation d'un homogénat destiné au dosage des marqueurs du stress oxydatif et à l'étude de l'expression génique.

1.2.3. Préparation des homogénats de tissus cutanés :

Deux grammes de fragments cutanés ont été broyés à l'aide d'un broyeur mécanique dans 4 mL de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4). La suspension obtenue a ensuite subi une seconde homogénéisation par sonication avant d'être centrifugée à 9000 g à 4 °C pendant 15 minutes. Le surnageant ainsi obtenu a été aliquoté dans des tubes Eppendorf et conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

1.3. Numération cellulaire

Protocole précédemment décrit (page 61).

1.4. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)

Protocole précédemment décrit (page 61).

1.5. Dosage des protéines totales

La concentration des protéines au sein de chaque échantillon a été quantifiée selon la méthode de Bradford (1976) une technique spectrophotométrique basée sur une réaction colorimétrique entre le bleu de Coomassie (G-250) et les groupements cationiques des protéines. Cette interaction forme un complexe bleu dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en protéines, permettant ainsi une quantification précise.

La procédure expérimentale s'est déroulée comme suit :

- Un volume de 50 µL de solution standard d'albumine sérique bovine (BSA) ou d'échantillon a été prélevé.
- Ce volume a été mélangé avec 2,5 mL de réactif au bleu de Coomassie.
- Après agitation et incubation pendant 5 minutes, la densité optique a été mesurée à 595 nm contre un blanc.
- La concentration en protéines a été déterminée par comparaison avec une courbe d'étalonnage établie à partir de (BSA) (figure 39).

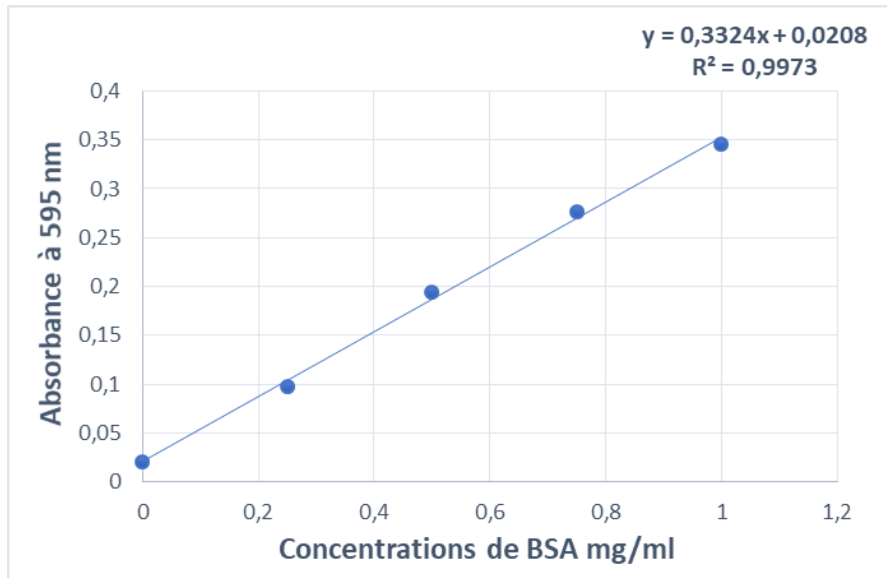


Figure 39 Courbe d'étalonnage de la BSA.

1.6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au service d'anatomie pathologique et cytologie du centre de recherche en biotechnologie (C.R.B.T) Ali Mendjli - Constantine-. Les étapes de la technique utilisée sont décrites dans le tableau (03) et figure (33).

1.7. Etude des paramètres du stress oxydants

1.7.1. Evaluation du taux de la peroxydation lipidique

Le taux de peroxydation lipidique a été déterminé en mesurant le malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de Buege & Aust (1978). Les résultats sont exprimés en nmol/mg de protéines.

1.7.2. Evaluation du taux des produits protéiques d'oxydation avancée

Le taux tissulaire en AOPP a été déterminé selon la méthode de Kayali et al. (2006). Les résultats sont exprimés en nmol AOPP/mg de protéines.

1.7.3. Evaluation du taux des protéines carbonylées

Le taux des PCO a été mesuré selon la méthode de Levine (1990). Les résultats sont exprimés en nmol of PCO/mg de protéines.

1.8. Etude des paramètres antioxydants

1.8.1. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)

Le taux du GSH réduit a été mesuré selon la méthode d'Ellman et al. (1961). Les résultats sont exprimés en nmole de GSH/mg protéines.

1.8.2. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase

La mesure de l'activité enzymatique de la GPx a été effectuée par la méthode de Flohé et Günzler (1984). Les résultats sont exprimés en μM de glutathion réduit consommé par minute par mg of protéines (μM GSH/min/mg protéines).

1.8.3. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité enzymatique de la CAT a été mesuré selon la méthode d' Aebi (1984). Les résultats sont exprimés en μM d' H_2O_2 consommé par minute par mg of protéines (μM H_2O_2 /min/mg protéines).

1.8.4. Détermination de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase

L'activité de la SOD a été déterminée par la méthode de Beyer et Fridovich (1987). Les results sont exprimés en unité internationale par mg de protéines (IU/mg protéines).

1.9. Etude de l'expression sérique du TNF α

Un test ELISA sandwich visant à quantifier le TNF- α murin a été réalisé à l'aide d'un kit (Cat number : 88-7324-Invitrogen) (figure 40). La préparation des réactifs inclut la dilution des tampons, des anticorps de capture et de détection, ainsi que la reconstitution du standard TNF α conformément aux indications du kit. La plaque ELISA 96 puits Costar TM 9018 (corning) a tout d'abord été revêtue avec l'anticorps de capture et incubée à 4°C sous agitation pendant toute la nuit. Après une série de lavages avec un tampon PBS-Tween 20 (0,05%), les puits ont été bloqués avec un diluant spécifique pendant 1h avant l'ajout des standards et des échantillons. Une incubation toute la nuit à 4°C sous agitation a été réalisée pour une sensibilité optimale. Ensuite, l'anticorps de détection a été ajouté et incubé pendant 1 heure, suivi du streptavidine-HRP marqué, avec de nouveaux lavages entre chaque étape. La révélation a été effectuée avec un substrat TMB, et la réaction a été stoppée après 10 minutes avec 100 μl de H_2SO_4 2N. Enfin, la densité optique a été mesurée à 450 nm. Les concentrations de TNF- α ont été calculées à partir de l'équation de régression linéaire obtenue par la courbe d'étalonnage (figure 41).

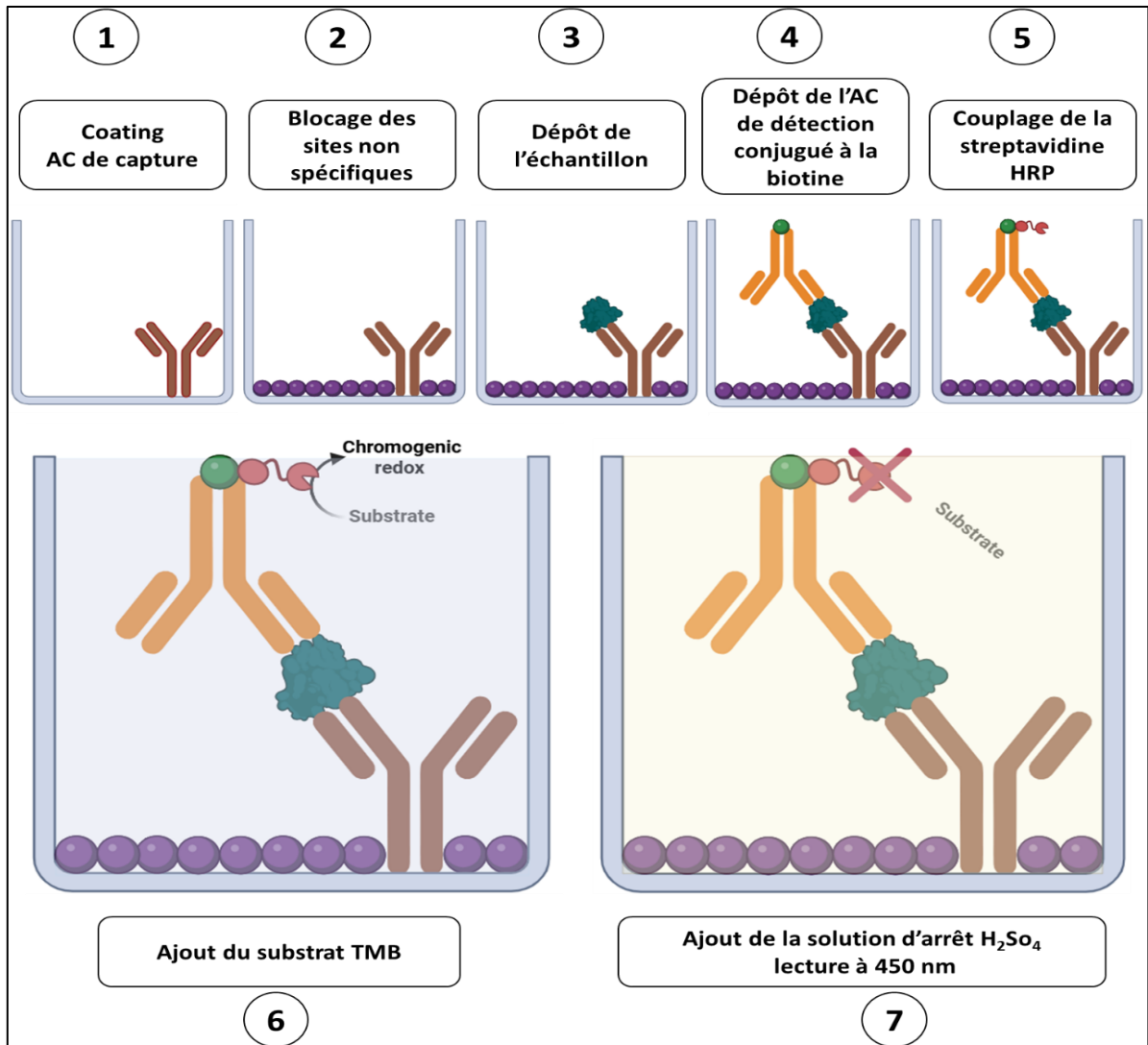


Figure 40 Etapes de réalisation du dosage du TNF- α par la technique ELISA sandwich

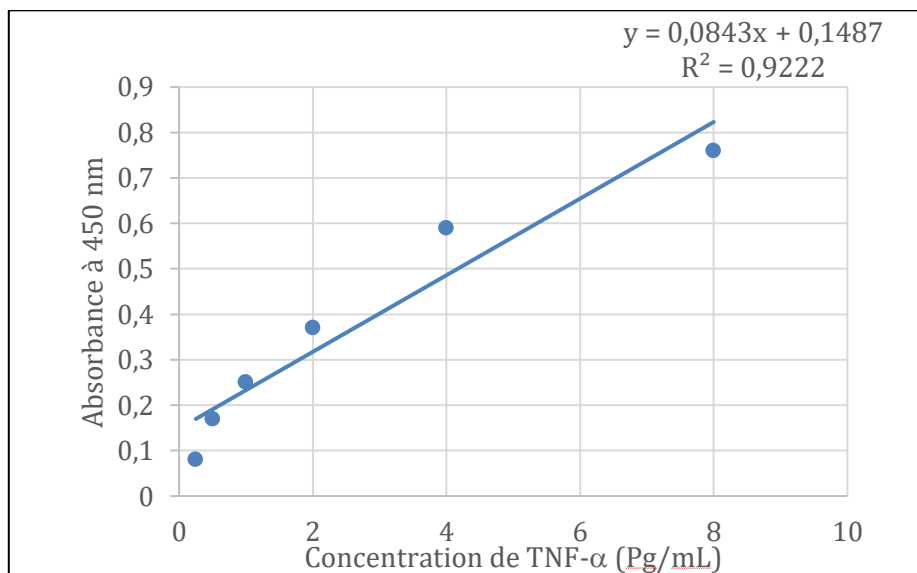


Figure 41 Courbe d'étalonnage du TNF- α

1.10. Etude de l'expression génique des gènes NF- κ B1 et NF- κ B2

La technique de RT-PCR a été effectuée au niveau de l'unité des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.B.T) Ali Mendjli - Constantine.

1.10.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée selon la méthode monophasique classique, avec quelques modifications du protocole (figure 41).

Tout d'abord, 100 mg d'échantillon tissulaire cutané, préalablement conservé à -20 °C, ont été broyés finement dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. La poudre obtenue a été immédiatement transférée dans un tube de microcentrifugeuse contenant 1 mL de NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL). Après agitation, 200 μ L de chloroforme ont été ajoutés, et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Enfin, une centrifugation à 12 000 g à 4 °C pendant 15 minutes a permis la séparation des phases. Un volume de 500 μ L de surnageant a été transféré dans un nouveau tube contenant 499 μ L d'isopropanol à 100 % et 1 μ L de glyco-bleu. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 minutes, puis centrifugé à 12 000 g à 4 °C pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant, 500 μ L d'éthanol à 75 % ont été ajoutés au culot, suivi d'une centrifugation à 8 000 g à 4 °C pendant 3 minutes. Cette étape de lavage a été répétée après une nouvelle élimination du surnageant. Pour éliminer l'ADN génomique, un volume de 25 μ L de DNase I a été ajouté au culot, suivi d'un vortexage. Après une incubation de 10 minutes à 37 °C, 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 2,5 volumes d'éthanol absolu ont été ajoutés. Le mélange a été homogénéisé délicatement, puis incubé pendant 20 minutes à -20 °C. Après une centrifugation à vitesse maximale (16 000 g) à 4 °C pendant 10 minutes, le surnageant a été éliminé, suivi d'un rinçage à l'éthanol 70 %, puis d'une nouvelle centrifugation à 8 000 g à 4 °C pendant 3 minutes. Après élimination du surnageant et séchage, le culot a été resuspendu dans 30 μ L de nuclease-free water.

La concentration, l'intégrité et la pureté des ARN totaux ont été évaluées à l'aide du NanoDrop, où les ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230 devaient être supérieurs ou égaux à 2. L'intégrité des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % en conditions dénaturantes.

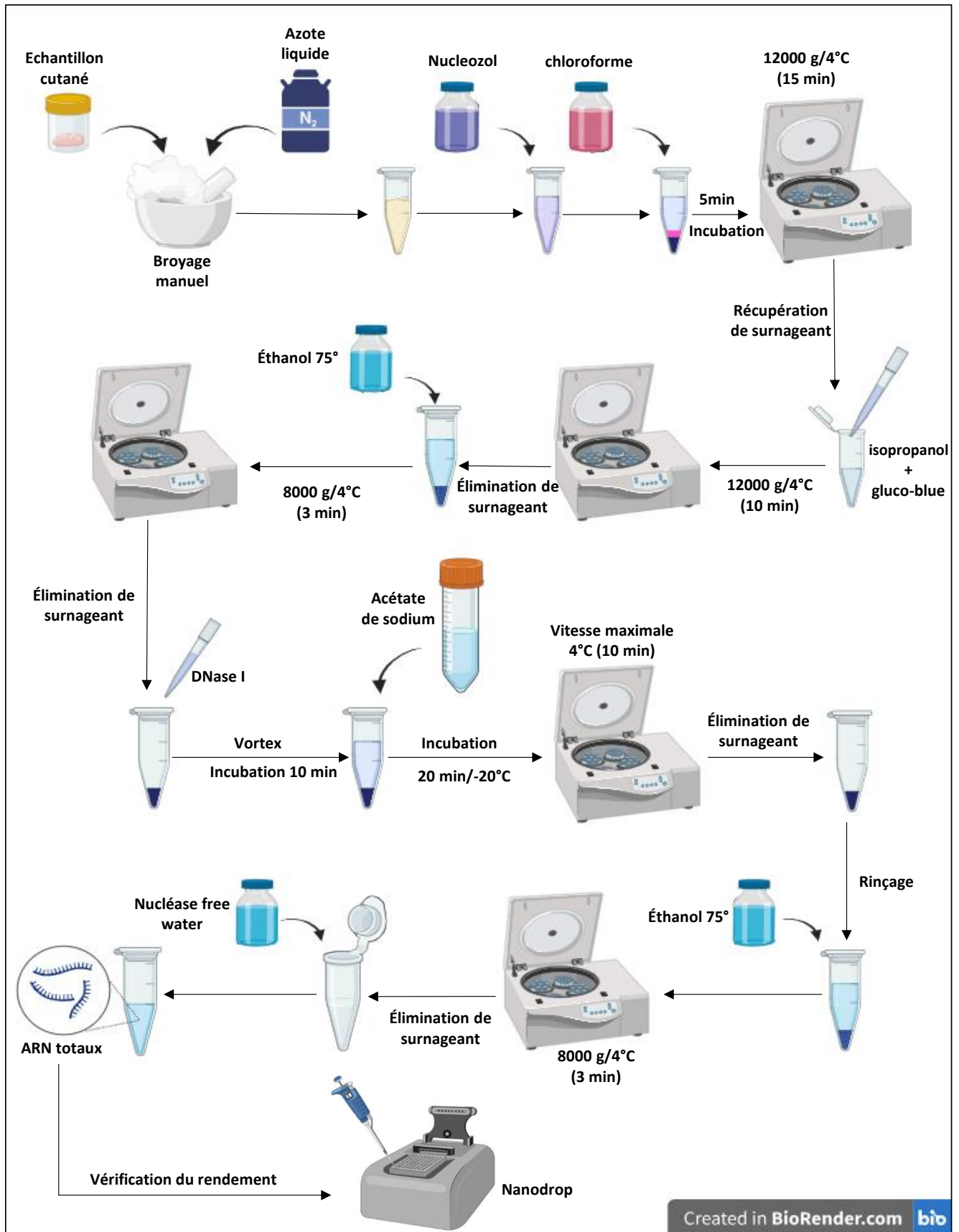


Figure 42 Etapes d'extraction des ARN totaux, par le NucleoZOL, à partir de fragments cutanés.

1.10.2. Synthèse de l'ADN complémentaire par transcription inverse

La transcription inverse est une réaction enzymatique permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN totaux (ARNt). Cette étape est essentielle pour les analyses basées sur l'expression génique, telles que la RT-qPCR (figure 42).

Dans cette étude, la synthèse d'ADNc a été réalisée à l'aide du kit de transcription inverse (Invitrogen). Une quantité de 1 µg d'ARNt a été utilisée après une étape de dénaturation à 65 °C pendant 5 minutes dans un thermocycleur, afin d'éliminer d'éventuelles structures secondaires. La réaction a ensuite été préparée conformément aux recommandations du fabricant, selon la composition détaillée dans le tableau (06) :

Tableau 06 Composants du mix réactionnel pour la synthèse du premier brin d'ADNc à partir de 1000 ng d'ARNt (volume final de 20 µl).

| Composant | Volume |
|--|--------|
| Eau sans nucléases | 7 µl |
| 50 µM random d'hexamère | 1 µl |
| 10 mM de dNTP | 1 µl |
| Tampon réactionnel 5x | 4 µl |
| 100 mM DTT | 1 µl |
| Inhibiteur de RNase RNaseOUT™ (40 U/µL) | 1 µl |
| Transcriptase inverse SuperScript® IV (200 U/µL) | 1 µl |
| Echantillon d'ARNt | 4 µl |

Le mélange réactionnel préparé est soumis à un programme d'incubation en thermocycleur selon les étapes suivantes :

1. **Stabilisation thermique et hybridation des amorces** : incubation à 23 °C pendant 10 minutes pour permettre l'hybridation des amorces random hexamers.
2. **Transcription inverse et synthèse de l'ADNc** : augmentation de la température à 50-55 °C pendant 10 minutes afin d'activer l'enzyme de transcription inverse et permettre la conversion de l'ARN en ADNc.

3. **Inactivation de l'enzyme et destruction de l'ARN résiduel** : la réaction est arrêtée par une dénaturation thermique à 80 °C pendant 10 minutes.
4. **Stockage** : l'ADNc est ensuite incubé à 0 °C pendant 5 minutes, puis conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

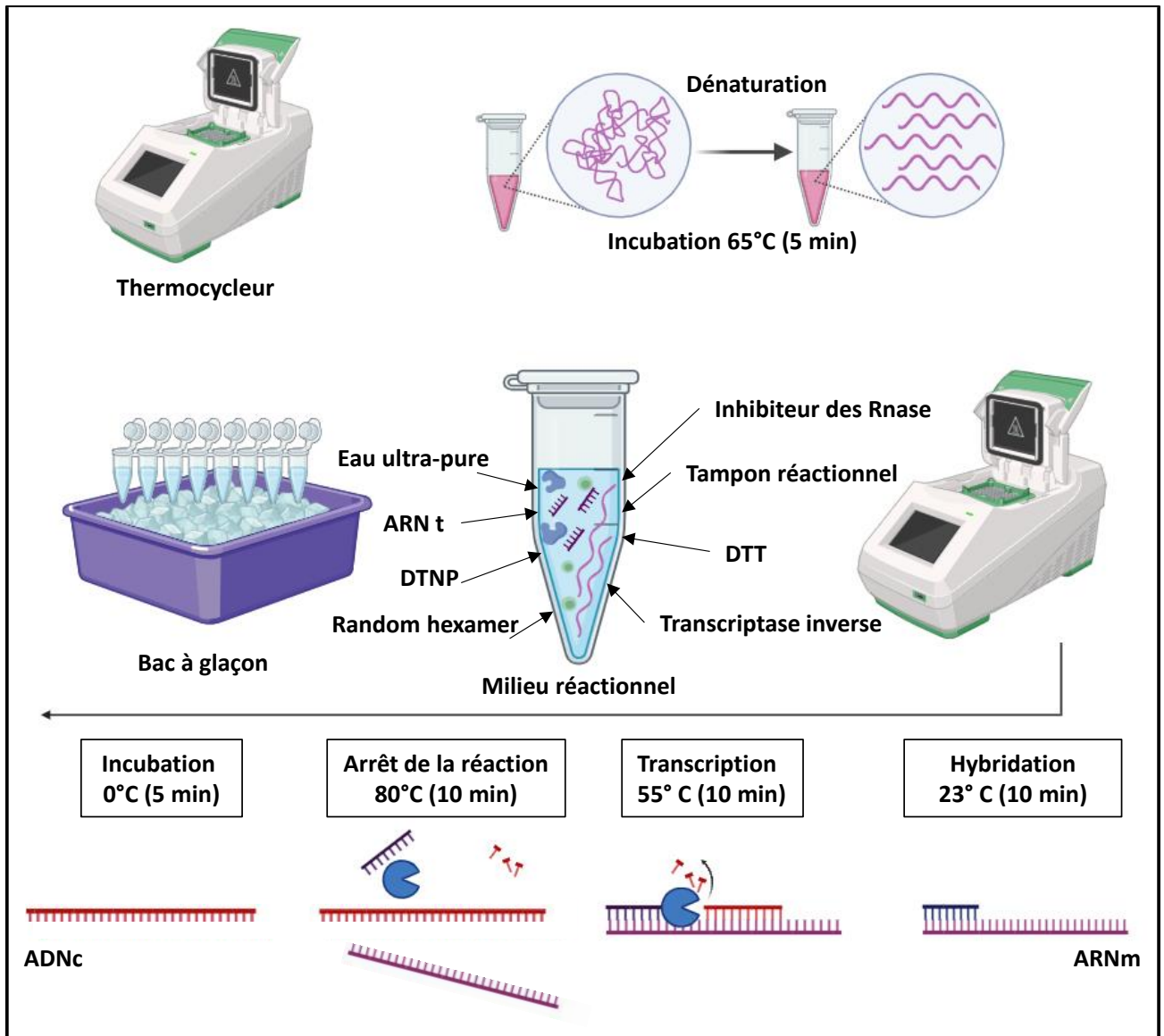


Figure 43 Synthèse de l'ADNc à partir des ARN totaux extraits à partir de fragments cutanés.

1.10.3. Amplification par q-PCR en temps réel

Lors de la réaction de PCR quantitative en temps réel, le thermocycleur (Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR) mesure en continu le signal de fluorescence émis par le SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Ce colorant fluorescent possède une affinité spécifique pour l'ADN double brin (ADNdb) et s'y lie immédiatement. Le tableau (07) récapitule les composants du SYBR Green master mix.

Tableau 07 Composants du SYBR Green Master Mix pour qRT-PCR.

| | |
|--|-------------------------------------|
| Composants du SYBR Green master mix | Colorant SYBR Green |
| | ADN polymérase (Taq polymérase) |
| | Uracile ADN glycosylase (UDG) |
| | Référence passive du colorant ROX |
| | Mélange dNTP contenant du dUTP/dTTP |
| | Composants tampons optimisés |

Afin d'assurer une amplification efficace et spécifique, les paires d'amorces doivent être conçues de manière optimale. Elles doivent cibler exclusivement les gènes d'intérêt, avec un pourcentage de GC compris entre 30 et 70 % et une longueur variant de 20 à 25 bases. Le tableau (08) présente les séquences des paires d'amorces utilisées pour l'amplification des gènes cibles.

Tableau 08 Séquences et températures de fusion (T_m) de paires d'amorces codant pour les gènes de β -actin, NF-kB1 et NF-kB2.

| Amorces | Sens/Anti-sens | Séquences | T_m |
|----------------|----------------|---------------------------|---------|
| β -actin | Sens | GTAAAGACCTCTATGCCAACA | 56.1 °C |
| | Anti-sens | GGACTCATCGTACTCCTGCT | 61° C |
| NF-kB1 | Sens | GAAATTCCTGATCCAGACAAAAC | 56.8° C |
| | Anti-sens | ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG | 60.8° C |
| NF-kB2 | Sens | CTGGTGGACACATACAGGAAGAC, | 62.5° C |
| | Anti-sens | ATAGGCACTGTCTTCTTTCACCTC. | 60.7° C |

Tableau 09 Composition du mix réactionnel pour une amplification Q-rt PCR d'un échantillon d'ADNc en système SybrGreen, volume final de 10 µL.

| Composant | Volume |
|----------------------------|--------|
| Nuclease free water | 3,4 µl |
| Amorce sens (0,3 µM) | 0,3 µl |
| Amorce anti-sens (0,3 µM) | 0,3 µl |
| SYBR Green master mix (2x) | 5 µl |
| ADNc (10 ng) | 1 µl |

L'amplification de l'ADNc est réalisée selon un programme thermique spécifique aux paires d'amorces ayant une température de fusion (T_m) inférieure à 60°C selon le tableau (10) :

Tableau 10 Programme thermique spécifique aux paires d'amorces.

| Etape | Température | Durée | Cycles |
|------------------------------|-------------|-------------|--------|
| Activation de l'enzyme UDG | 50°C | 2 Minutes | 1 |
| Fixation de l'ADN polymérase | 95°C | 2 Minutes | 1 |
| Dénaturation | 95°C | 15 secondes | 40 |
| Hybridation | 56°C | 15 secondes | |
| polymérisation | 72°C | 1 Minute | |

- **Analyse de la courbe de fusion**

À la fin de l'amplification, une analyse des courbes de fusion (multi-curve) est réalisée en un cycle afin d'évaluer la spécificité de la réaction PCR et détecter d'éventuelles amplifications non spécifiques ou la formation de dimères d'amorces selon le tableau (11) :

Tableau 11 Cycle réalisé pour l'analyse des courbes de fusion.

| Etape | Vitesse de changement de T° | Température | Durée |
|--------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| Dénaturation | 1,6° C/seconde | 95°C | 15 secondes |
| Hybridation | 1,6° C/seconde | 60°C | 1 Minute |
| Fusion | 0,15° C/seconde | 95°C | 15 secondes |

Au fil des cycles d'amplification, la quantité de produits PCR d'ADNdb augmente, entraînant une intensification proportionnelle du signal fluorescent. Cette augmentation est enregistrée en temps réel, permettant ainsi la quantification précise des produits amplifiés et l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt (figure 43).

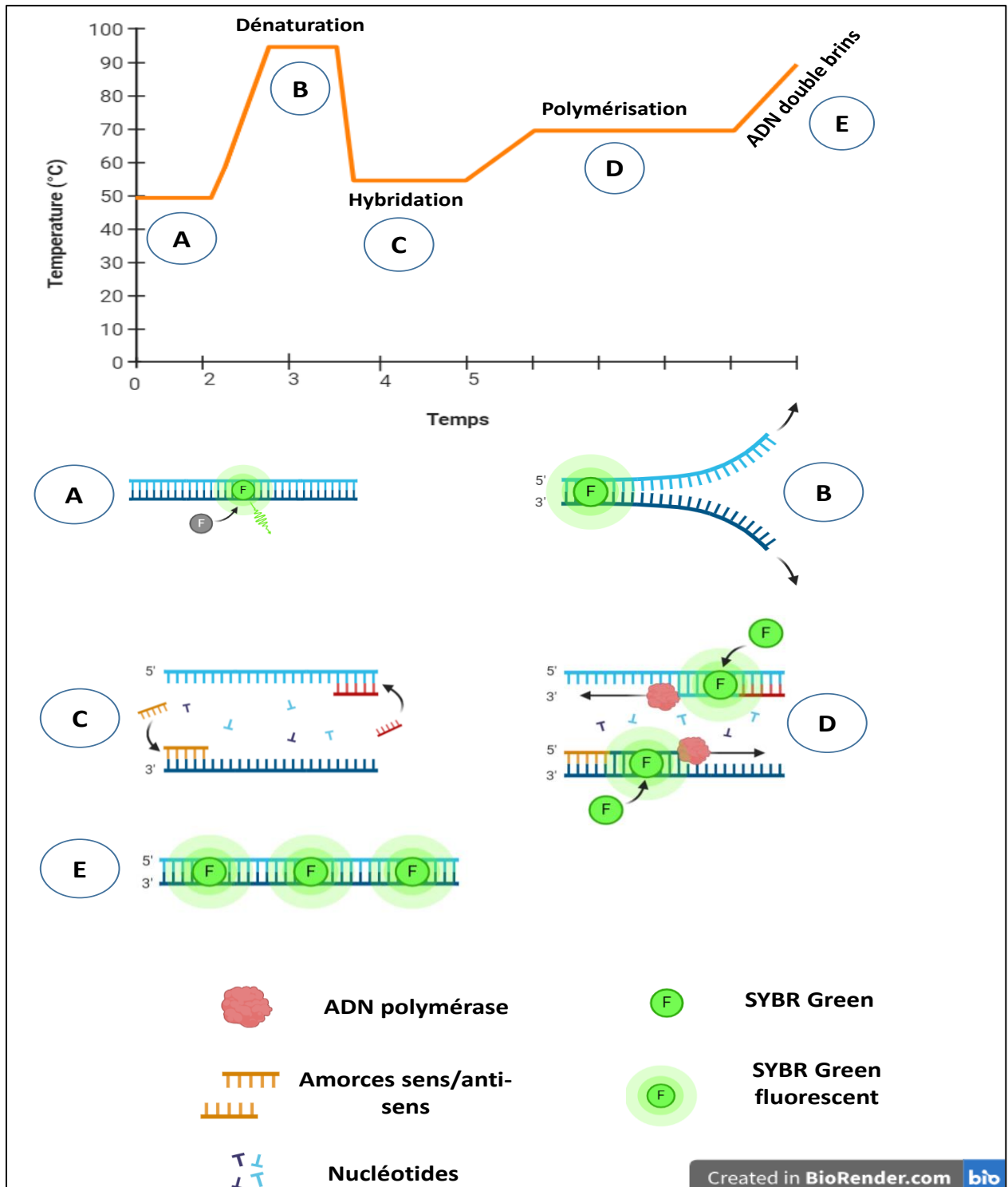


Figure 44 Etapes de la qRT-PCR en temps réel quantitative utilisant de SYBR Green.

- **Méthode de quantification relative de l'expression génique**

La quantification relative de l'expression génique a été calculée à partir des valeurs Ct (cycle seuil), qui correspondent au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse un seuil prédéfini. L'analyse a été réalisée automatiquement selon la méthode comparative $\Delta\Delta Ct$.

Pour chaque échantillon, le ΔCt est obtenu en soustrayant le Ct du gène de référence (β -actine) de celui du gène cible (NF-kB1 ou NF-kB2). Le ΔCt du groupe traité est ensuite comparé à celui du groupe témoin, ce qui permet de calculer le $\Delta\Delta Ct$.

L'expression relative du gène d'intérêt est alors exprimée sous la forme $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ce qui permet d'évaluer les variations d'expression entre les différentes conditions expérimentales. Le niveau d'expression du groupe témoin est fixé arbitrairement à 1 et sert de calibrateur.

1.11. Analyses statistiques

Les résultats des expérimentations effectuées sont exprimés sous forme de moyenne plus ou moins l'erreur standard de la moyenne (Moy \pm SEM). Les valeurs de volumes de papillomes ont été analysées par le test *t*-student non apparié (Excel 2013). Tandis qu'une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie par le post-test Sidak pour les comparaisons multiples a été effectuée pour le reste des résultats présentés en utilisant le GraphPad PRISM version 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). La signification statistique a été déterminée à $p \leq 0,05$ pour tous les tests.

2. Résultats

2.1. Etude morphologique

2.1.1. Aspect qualitatif

Les souris du groupe DMBA ont développé de nombreux papillomes aux contours irréguliers et bien définis (Figure 44). La majorité de ces lésions présentaient une teinte rosée, avec certaines zones de pigmentation noire. Les papillomes observés chez les souris du groupe DHP/G1 avaient une apparence similaire à ceux du groupe DMBA. En revanche, les souris des groupes DHP/G2, DHP/G3 et DHP/C ont présenté un nombre réduit de papillomes, caractérisés par des contours plus réguliers et une coloration principalement rosée. À l'inverse, les souris des groupes témoins ainsi que celles des groupes HP/G1, HP/G2, HP/G3 et HP/C présentaient une peau saine, avec une couleur et une texture normale.

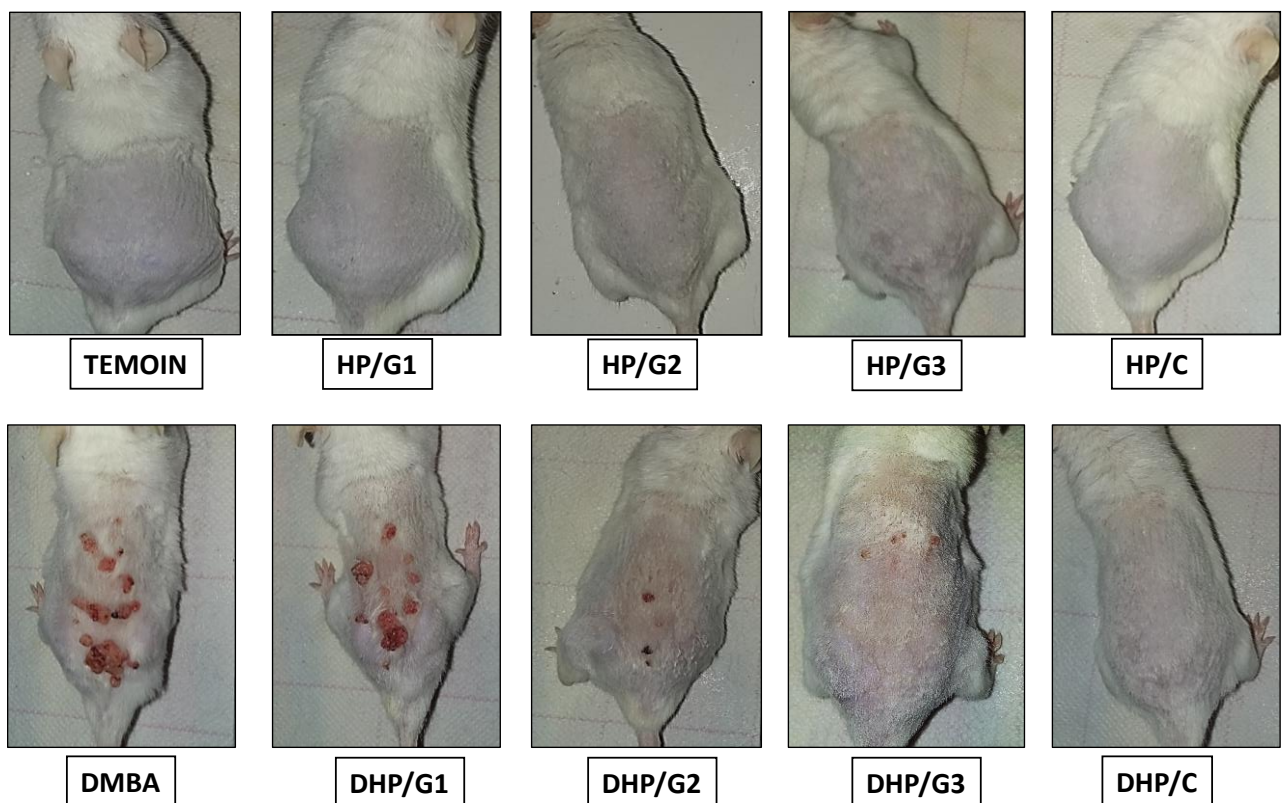


Figure 45 Description macroscopique des papillomes et de l'aspect cutané après 16 semaines d'expérimentation.

2.1.2. Aspect quantitatif

Les résultats de l'application topique de DMBA/HC ont montré une incidence tumorale de 100 %, accompagnée d'un nombre cumulé important de papillomes et d'une charge tumorale conséquente (Tableau 12). L'administration, aussi bien topique qu'orale, d'huile de poisson (HP) aux doses de 250 et 500 mg/kg/j a significativement réduit le nombre moyen (*p≤0,05) et le volume (**p≤0,001) des papillomes, ainsi que la charge tumorale globale (**p≤0,001) par rapport au groupe DMBA, tout en diminuant également l'incidence tumorale. En revanche, l'administration orale de HP à la dose de 50 mg/kg/jour a montré un impact moindre.

Par ailleurs, une diminution du ratio V/N a été observée dans tous les groupes traités avec FO par rapport au groupe DMBA seul (12,02). Cette réduction était plus marquée avec l'application topique de HP qu'avec son administration orale, selon la tendance suivante : V/N (DMBA) > V/N (DHP/G1) > V/N (DHP/G2) > V/N (DHP/G3) > V/N (DHP/C).

Tableau 12 Effet de l'administration orale et cutanée de l'huile de poisson sur le développement de papillomes induits par le couple DMBA/HC chez des souris *swiss albinos*.

| Colonne1 | DMBA | DHP/G1 | DHP/G2 | DHP/G3 | DHP/C |
|--|---------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Nombre cumulatif de papillomes (N) dans chaque groupe | 62 | 42 | 21 | 20 | 24 |
| Moyenne de papillomes/souris | 8,8 ± 2.29 | 7 ± 1.49 | 4.8 ± 0.87* | 2,8 ± 0.55* | 4.2 ± 1.28* |
| Incidence (%) | 100 (7/7) | 100 (7/7) | 85,7 (6/7) | 100 (7/7) | 71,4 (5/7) |
| Moyenne. des volumes de papillomes/souris (mm ³) | 92,60 ± 10,25 | 66,05 ± 66,05 | 34,87 ± 5,92*** | 28.65 ± 4.83*** | 15,87 ± 5.22*** |
| Charge totale des Volumes (V) des papillomes/groupe (mm ³) | 745,8 ± 25,40 | 355,4 ± 47,69 | 109 ± 5,48*** | 68.18 ± 7.94*** | 50,85 ± 5,47*** |
| V/N ratio | 12.02 | 8.46 | 5.19 | 3.4 | 2.11 |

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM (n=7). *p≤0.05, *** p≤0.01 vs DMBA.

2.2. Etude hématologique et biochimique

2.2.1. Variation des paramètres hématologiques

Le groupe DMBA a présenté, par rapport au groupe témoin, une augmentation significative du taux de globules blancs (GB) et de lymphocytes (LYM) ($*p \leq 0,05$), ainsi qu'une élévation très hautement significative des monocytes (MONO) ($***p \leq 0,001$). En revanche, une diminution hautement significative des globules rouges (GR) ($**p \leq 0,01$) a été observée.

De plus, une augmentation persistante des taux de GB, de LYM ($*p \leq 0,05$) et de MONO ($**p \leq 0,01$) a été notée chez les souris du groupe DHP/G1 par rapport au témoin. Toutefois, cette différence n'était plus observable dans les groupes DHP/G2, DHP/G3 et DHP/C. Fait intéressant, une diminution significative des populations leucocytaires a été observée dans ces groupes (DHP/G2, DHP/G3 et DHP/C) par rapport au groupe DMBA, selon la tendance suivante :

- Réduction des MONO dans le groupe DHP/G2 ($\#p \leq 0,05$),
- Réduction des GB et des MONO dans le groupe DHP/G3 ($\#\#p \leq 0,01$),
- Réduction des GB ($**p \leq 0,01$), des LYM ($*p \leq 0,05$) et des MONO ($\#\#\#p \leq 0,001$) dans le groupe DHP/C.

Par ailleurs, une augmentation significative du taux de GR a été observée dans ces mêmes groupes par rapport au groupe DMBA ($\#p \leq 0,05$).

Enfin, aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs des groupes témoins et celles des groupes traités uniquement avec l'HP.

Tableau 13 Variation des paramètres hématologiques des groupes témoins et traités.

| | | <i>TEMOIN</i> | <i>HP/G1</i> | <i>HP/G2</i> | <i>HP/G3</i> | <i>HP/C</i> |
|------------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Groupes témoins | G.B. X 10³ /µl | 10.7±1.12 | 11±0.65 | 10.4±1.15 | 8±0.66 | 10.4±1.89 |
| | LYM. X 10³ /µl | 10.4±0.89 | 9.4±0.62 | 9.5±0.95 | 7.08±0.64 | 8.5±1.49 |
| | MONO. X 10³ /µl | 0.65±0.08 | 0.716±0.1 | 0.65±0.06 | 0.66±0.08 | 0.65±0.04 |
| | GRANULO. X 10³ /µl | 1.03±0.12 | 0.8±0.05 | 0.83±0.12 | 0.76±0.09 | 0.85±0.04 |
| | G.R. X 10⁶/µl | 10.2±0.39 | 9.1±0.29 | 8.5±0.35 | 10.8±0.42 | 8.8±0.34 |
| | | <i>DMBA</i> | <i>DHP/G1</i> | <i>DHP/G2</i> | <i>DHP/G3</i> | <i>DHP/C</i> |
| Groupes traités | G.B. X 10³ /µl | 15.1±0.49 * | 15.25±0.59 * | 13.86±0.47 | 9.71±0.57 ^{##} | 9.55±0.98 ^{##} |
| | LYM. X 10³ /µl | 14.9±1,0 * | 14.74±0.94 * | 11.25±0,83 | 11.8±0.61 | 10.95±0.56 [#] |
| | MONO. X 10³ /µl | 1.41±0.12 *** | 1.33±0.08 ** | 0.96±0.13 [#] | 0.91±0.08 ^{##} | 0.72±0.07 ^{###} |
| | GRANULO. X 10³ /µl | 0.9±0.08 | 0.98±0.1 | 1.11±0.1 | 1.05±0.1 | 0.69±0.1 |
| | G.R. X 10⁶/µl | 5.8±0.55 ** | 8.7±0.77 | 8.3±0.99 [#] | 8.2±0.5 [#] | 8.4±0.34 [#] |

Les valeurs sont représentées en moyenne ± SEM (n=6). *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 vs **Témoin** ; #p≤0.05, ##p≤0.01, ###p≤0.001 vs **DMBA**.

2.2.2. Variation du taux de la LDH sérique :

Les résultats du dosage de la concentration sérique de la LDH (Figure 45) ont révélé une élévation très hautement significative (**p≤0.0001) dans le groupe DMBA par rapport au groupe témoin.

L'administration de l'HP à une dose de 50 mg/kg/j (DHP/G1) n'a montré aucune différence significative par rapport au groupe DMBA. En revanche, l'administration de l'HP à des doses de 250 mg/kg/j (DHP/G2), 500 mg/kg/j (DHP/G3) et en application topique (DHP/C) a entraîné une réduction hautement significative (##p≤0.01) à très hautement significative (###p≤0.0001) du taux sérique de LDH par rapport au groupe DMBA.

De plus, les groupes DHP/G2, DHP/G3 et DHP/T ont présenté une diminution hautement (§§ P≤0.01) à très hautement significative (§§§§ P≤0.0001) du taux sérique de LDH comparativement au groupe D/HP G1.

Enfin, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes témoins et ceux traités uniquement par l'HP.

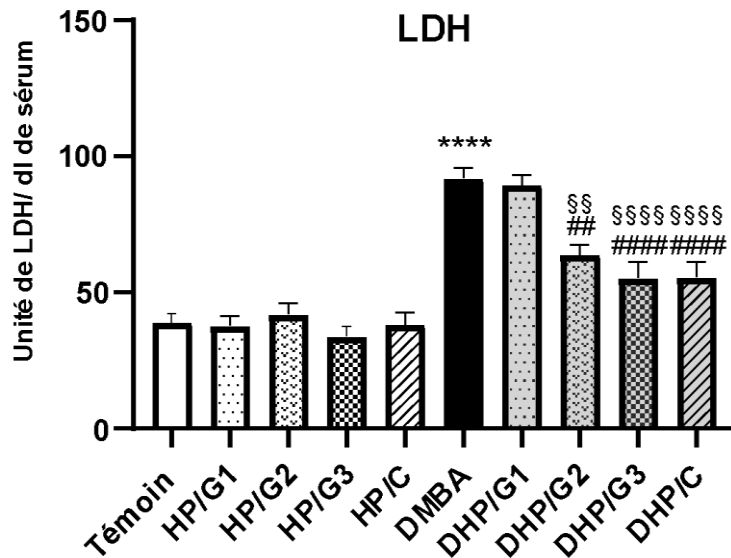


Figure 46 Variations des concentrations de la LDH sérique chez les souris des groupes témoins et traitées. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n = 5 souris). ****p≤ 0.0001 vs **Témoin** ; ##p≤ 0.01, #####p≤ 0.0001 vs **DMBA** ; § p≤ 0.05, §§§§ p≤ 0.0001 vs **DHP/G1**.

2.3. Etude anatomopathologique

L'examen microscopique des sections histologiques de la peau du groupe DMBA a révélé un carcinome spinocellulaire cutané (CSCc) mature et invasif, kératinisé et bien différencié, présentant des zones de nécrose (figure 47). De plus, nous avons observé une anisocariose, une anisocytose et une basophilie en raison de la présence de noyaux hyperchromatiques. En outre, la tumeur présentait un boyau tumoral kératinisé et un stroma fibro-inflammatoire, accompagnée d'une désorganisation de l'architecture tissulaire et d'une apparence nécrotico-hémorragique.

L'administration de 50 mg/kg/j de HP (groupe DHP/G1) n'a eu aucun impact discernable par rapport au groupe DMBA. Un CSCc in situ a été observé, caractérisé par la présence d'un boyau

tumorale intra-épidermique. Les coupes histologiques ont montré un polymorphisme nucléaire, ainsi qu'une anisocariose, une anisocytose, une basophilie et une désorganisation de l'architecture tissulaire.

Les coupes histologiques des souris traitées avec 250 mg/kg/j de HP en concomitance avec la carcinogénèse (DHP/G2) ont montré des signes de malignité de bas grade. Les caractéristiques comprenaient une anisocytose, une anisocaryose, des noyaux pycnotiques et caryorrhétiques, indicatifs de l'apoptose cellulaire. Les sections histologiques du groupe traité avec 500 mg/kg de HP (DHP/G3) ont révélé une apparence presque normale, avec quelques signes d'anisocaryose et aucune indication de malignité. Les sections des souris ayant reçu simultanément l'HP en application cutanée avec la carcinogénèse (DHP/C) ont montré des tissus avec une apparence normale et une absence totale des signes de malignité. Toutes les souris des groupes témoin, HP/G1, HP/G2, HP/G3 et HP/C ont présenté une architecture tissulaire normale (figure 46).

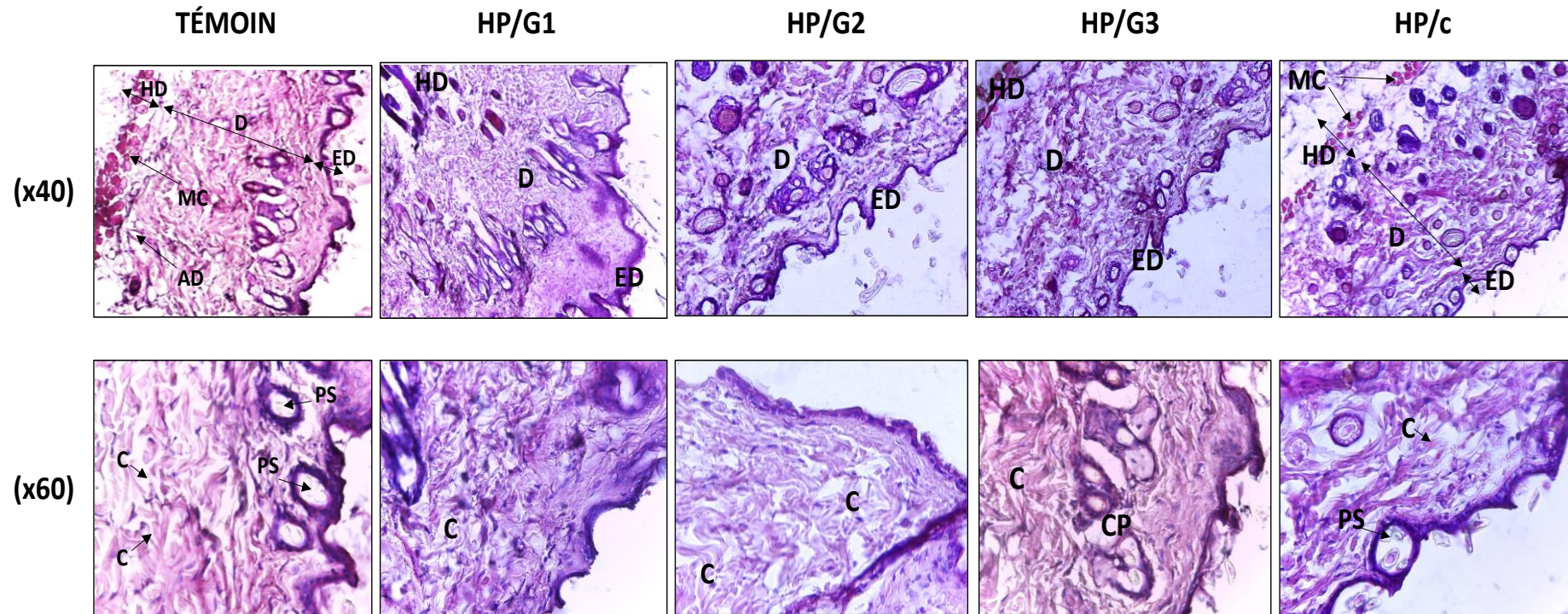


Figure 47 Images microscopiques d'échantillons cutanés des cinq lots témoins. Légendes (**HD** : hypoderme ; **D** : derme ; **ED** : épiderme ; **MC** : cellules musculaires ; **AD** : adipocytes ; **C** : collagène ; **PS** : complexes pilosébacés). (Microscope Optique Leica ICC50 HD x40/x60)

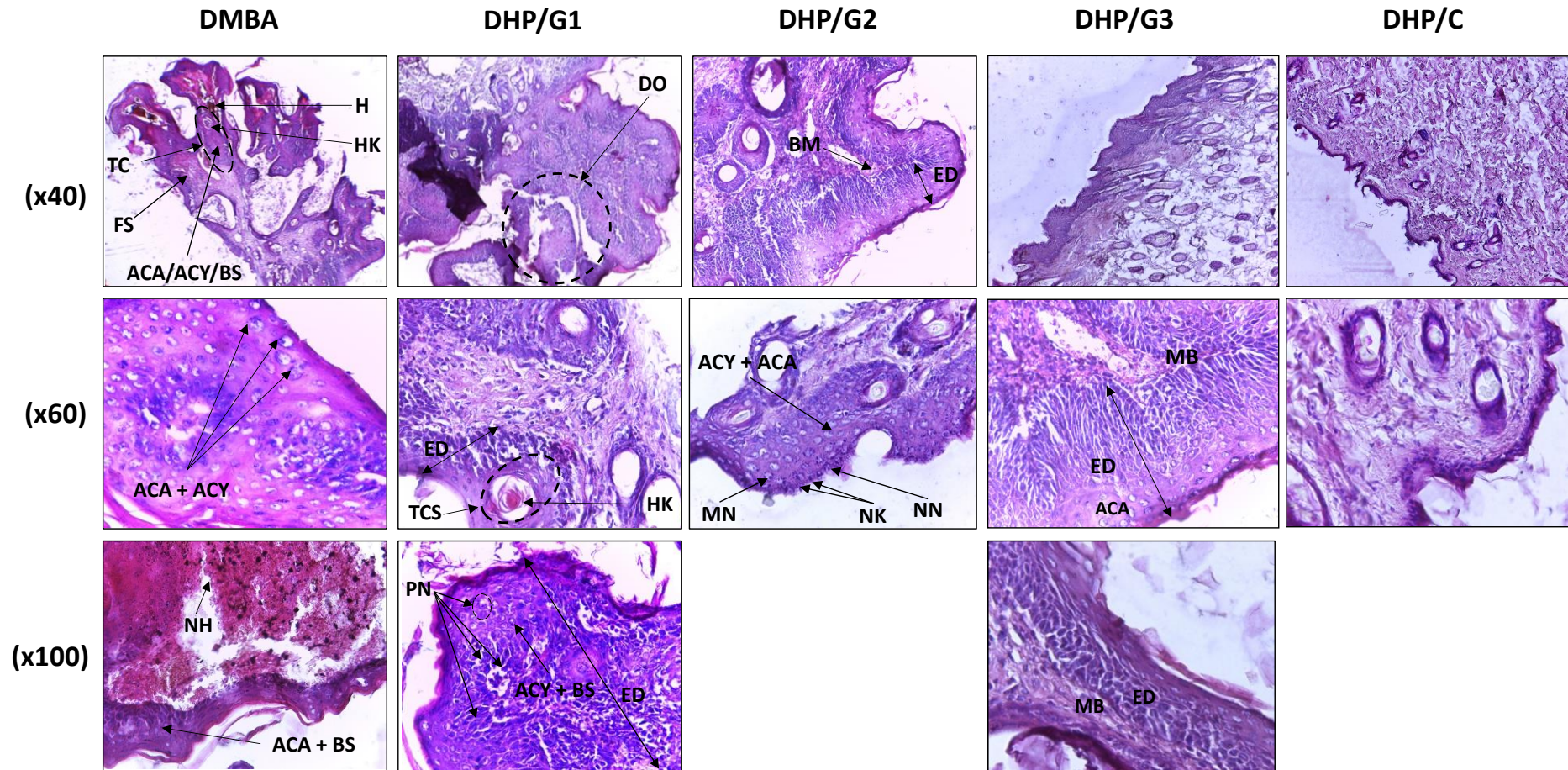


Figure 48 Images microscopiques de coupes d'échantillons cutanés des cinq lots DMBA et traités à l'huile de poisson. Légendes (**H** : hémorragie ; **HK** : hyperkératose ; **TC** : capsule tumorale ; **FS** : stroma fibro-inflammatoire ; **ACA** : anisocaryose ; **ACY** : anisocytose ; **BS** : basophilie ; **DO** : désorganisation architecturale ; **BM** : membrane basale ; **TCS** : capsule tumorale in situ ; **MN** : noyau mitotique ; **NK** : noyau apoptotique ; **NN** : noyau pycnotique ; **NH** : aspect nécrotico-hémorragique ; **PN** : nucléole proéminent). (Microscope Optique Leica ICC50HD ; grossissement : x40/x60/x100).

2.4. Etude de variations des paramètres du stress oxydant

Pour évaluer l'étendue des dommages oxydatifs et cytotoxiques carcinogènes, cette étude a utilisé des marqueurs de peroxydation lipidique, à savoir le MDA, et des indicateurs d'oxydation des protéines, y compris le PCO et l'AOPP. Les résultats ont démontré une augmentation significative des niveaux de MDA (** $p \leq 0.001$), AOPP (**** $p \leq 0.0001$) et PCO (* $p \leq 0.05$) chez les souris appartenant au groupe DMBA par rapport au contrôle (figure 48). Dans tous les groupes soumis au protocole de carcinogenèse, le traitement par HP a significativement réduit les niveaux tissulaires d'AOPP lorsqu'il était administré soit par voie orale (## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$), soit par voie topique (#### $p \leq 0.0001$) par rapport au groupe DMBA. Cependant, les niveaux de PCO ont diminué de manière significative uniquement avec l'application topique de HP (## $p \leq 0.01$) et le gavage oral avec 500 mg/kg (D/FO G3) (# $p \leq 0,05$). Les niveaux de MDA n'ont pas montré de différences significatives, que le HP soit administré par voie orale ou topique. Aucune différence significative n'a été observée entre les souris traitées uniquement avec HP et le groupe témoin.

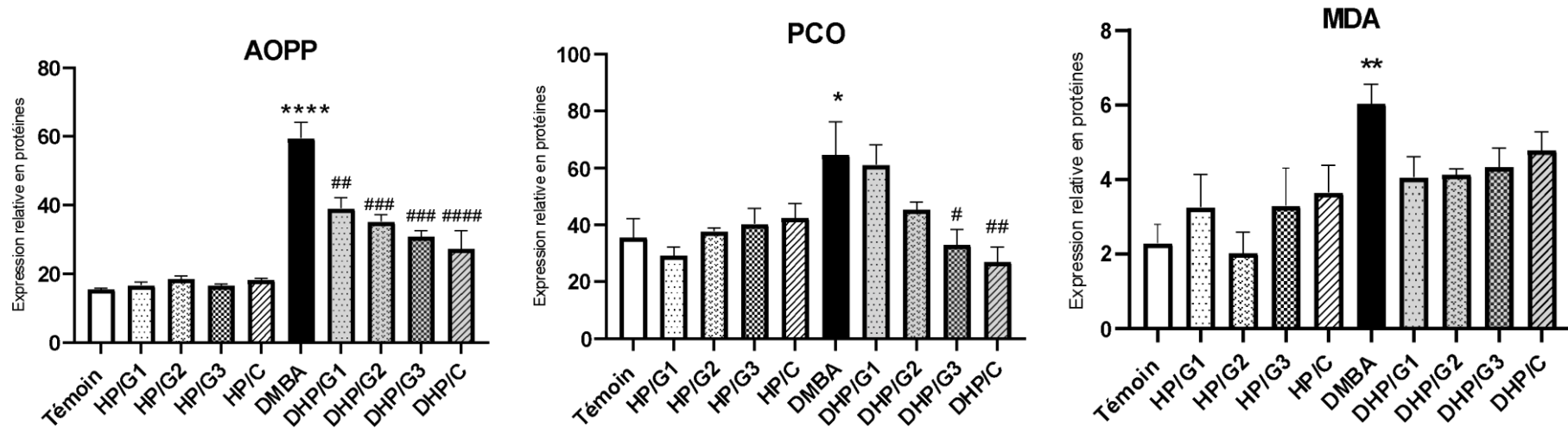


Figure 49 Variations de concentration des biomarqueurs de stress oxydatif (oxydation avancée des protéines (**AOPP**), protéines carbonylées (**PCO**) et malondialdéhyde (**MDA**) dans l'homogénat des échantillons cutanés chez les souris des groupes témoins et traitées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 5 souris). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$ vs **Témoin** ; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$, #### $p \leq 0.0001$ vs **DMBA**.

2.5. Etude de variations des paramètres antioxydants

Les résultats ont mis en évidence une diminution significative de l'activité de la CAT (** $p \leq 0,001$) et de la GPx (* $p \leq 0,05$) chez les souris du groupe DMBA par rapport au groupe témoin (figure 49).

L'administration concomitante de l'HP avec le protocole de cancérogenèse a significativement augmenté l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx comparativement au groupe DMBA. Cette augmentation était d'autant plus marquée avec l'augmentation de la dose d'HP ou son application topique. En effet, l'administration de 500 mg/kg/j de HP (DHP/G3) ainsi que son application topique (DHP/C) ont entraîné une augmentation significative de l'activité de la GPx et de la CAT, respectivement, par rapport à l'administration orale de HP à faible dose (DHP/G1) ($P \leq 0,05$).

Par ailleurs, les souris du groupe DMBA ont présenté des niveaux élevés de GSH par rapport au groupe témoin (** $p \leq 0,001$), avec une diminution significative après la supplémentation orale en HP.

Enfin, aucune différence significative n'a été observée entre les souris traitées uniquement avec de l'HP et celles du groupe témoin.

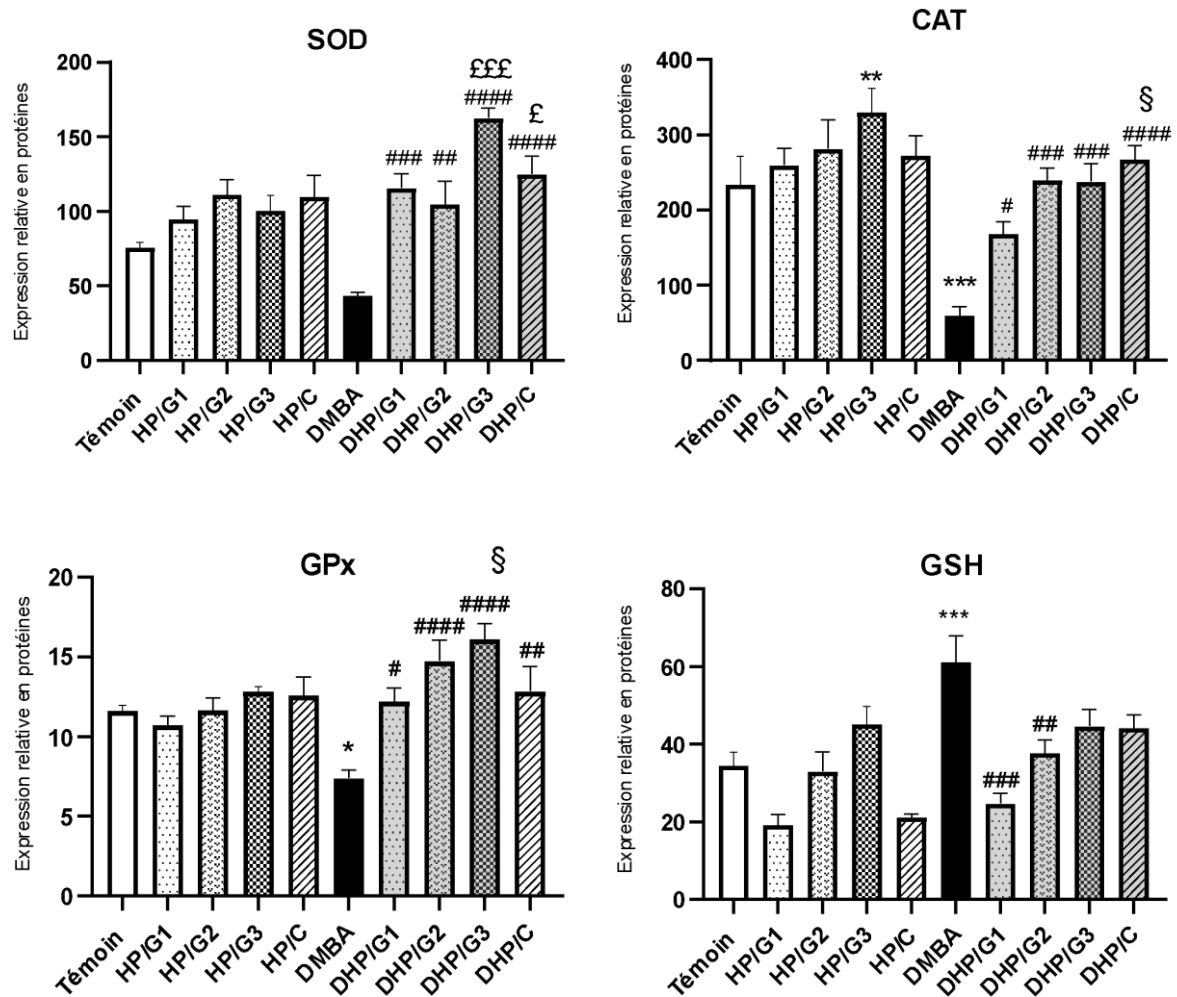


Figure 50 Variations de concentration des antioxydants enzymatiques (SOD, CAT et GPx) et non enzymatiques (GSH) dans l'homogénat des échantillons cutanés chez les souris des groupes témoins et traitées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 5 souris). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs **Témoin** ; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.0001$, #### $p \leq 0.0001$ vs **DMBA** ; § $P \leq 0.05$; £ $P \leq 0.05$, £££ $P \leq 0.01$ vs **DHP/G2**.

2.6. Etude de variations de l'expression sérique TNF α

Les résultats du dosage de la concentration sérique de TNF α (Figure 50) ont révélé une élévation très hautement significative (**** $p \leq 0.001$) chez le groupe DMBA par rapport au groupe témoin.

L'administration de l'HP à une dose de 50 mg/kg/j (DHP/G1) a montré diminution très hautement significative (##### $p \leq 0.001$) par rapport au groupe DMBA. Quant à l'administration de l'HP à des doses de 250 mg/kg/j (DHP/G2), 500 mg/kg/j (DHP/G3) et en application topique (DHP/C) a entraîné une élévation hautement significative (## $p \leq 0.01$) à très hautement significative (##### $p \leq 0.0001$) du taux sérique du TNF α par rapport au groupe DMBA. De plus, le groupe DHP/C a présenté une augmentation très hautement significative (\$\$\$ $p \leq 0.001$) du taux sérique de TNF α comparativement au groupe D/HP G3.

La supplémentation à l'HP en l'absence de cancérogénèse n'a montré aucune influence sur la concentration sérique en TNF α .

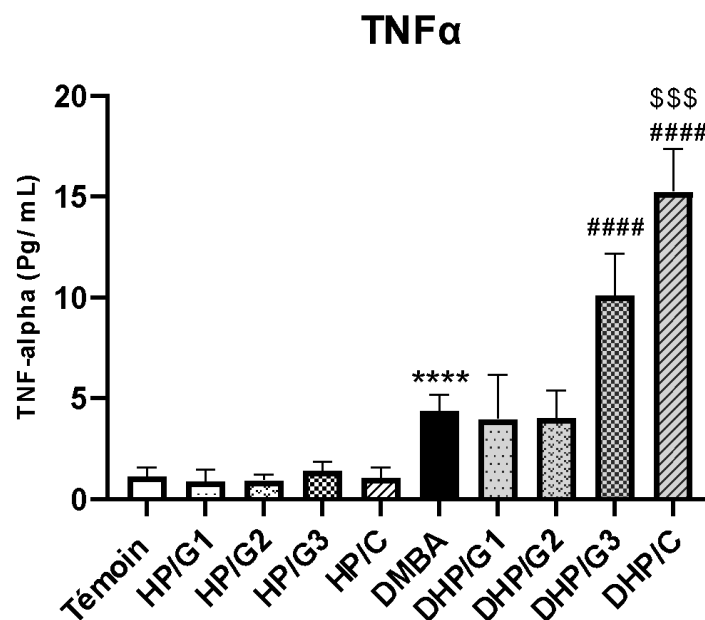


Figure 51 Variations des concentrations du TNF α sérique chez les souris des groupes témoins et traitées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 4 souris) en duplicat. **** $p \leq 0.0001$ vs **Témoin** ; ##### $p \leq 0.0001$ vs **DMBA** ; \$\$\$ $p \leq 0.0001$ vs **DHP/G3**.

2.7. Etude de variations de l'expression génique des NF-kB1 et NF-kB2

Les résultats ont révélé une régulation positive hautement significative de la sous-unité du gène NF-kB1 dans les échantillons de peau des souris du groupe DMBA par rapport au groupe témoin (**** $p \leq 0.0001$) (figure 51). Cette expression a diminué de manière significative dans les groupes DHP/G2 (### $p \leq 0.001$), DHP/G3 et DHP/C (#### $p \leq 0.0001$) par rapport au groupe DMBA. De plus, l'expression du gène NF-kB1 était significativement plus faible dans les groupes DHP/G2, DHP/G3 et DHP/C par rapport au groupe DHP/G1 (££ $p \leq 0,01$). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée dans l'expression du gène NF-kB1 entre les souris des groupes HP/G1, HP/G2, HP/G3 et HP/C par rapport au groupe témoin. Ni l'administration de DMBA ni celle de HP n'ont eu d'impact sur l'expression des gènes NF-kB2 dans aucun des groupes traités.

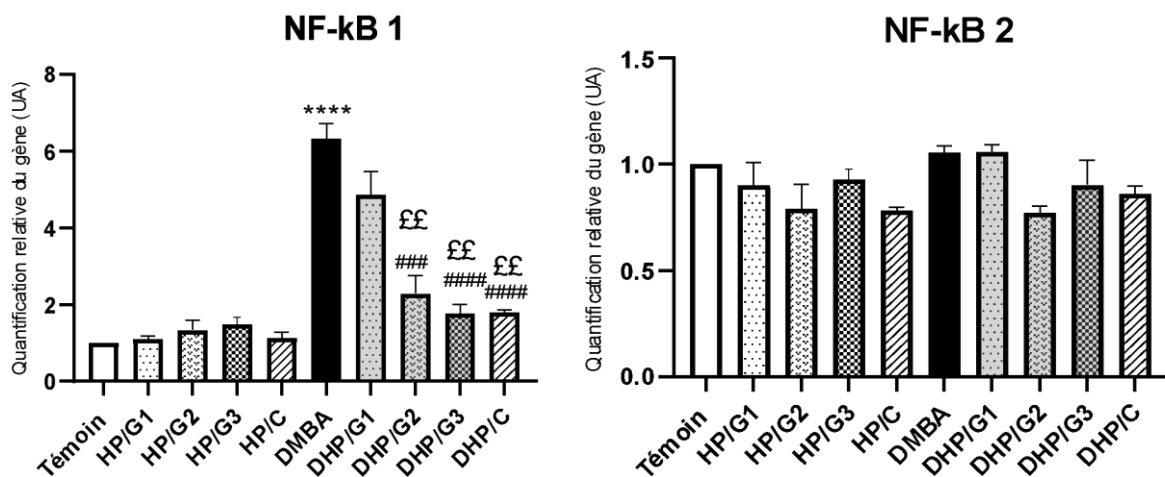


Figure 52 Variations des taux d'expression génique des sous unités NF-KB1 et NF-KB2 par qRT-PCR sont calculés par la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dans des échantillons cutanés chez les souris des groupes témoin (valeur fixée à 1 UA) et traitées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 3 souris) en triplicata. **** $p \leq 0.0001$ vs **Témoin** ; #### $p \leq 0.0001$, ##### $p \leq 0.0001$ vs **DMBA**, ££ $P \leq 0.01$ vs **DHP/G1**

3. Discussion

Le cancer cutané non mélanocytaire constitue une cause croissante de morbidité à l'échelle mondiale (Khadge et al., 2020 ; OMS, 2024). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse cutanée et d'identifier des stratégies de prévention efficaces, le modèle murin induit par le DMBA associé à l'huile de croton (DMBA/HC) est largement utilisé dans la recherche expérimentale (Subramanian et al., 2014). C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude, dont l'objectif est d'évaluer l'impact de l'huile de poisson, riche en acides gras oméga-3, administrée selon différentes voies et à diverses doses, sur les étapes clés du processus carcinogène cutané.

Dans un premier temps, nous avons analysé les effets macroscopiques et histopathologiques de la cancérogenèse induite, en portant une attention particulière aux altérations morphologiques des lésions tumorales et aux modifications tissulaires associées. Dans un second temps, nous avons évalué des paramètres biochimiques représentatifs du stress oxydatif et de l'inflammation, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets observés.

Nos résultats montrent que l'application topique de DMBA/HC induit une incidence tumorale de 100 %, avec un nombre élevé de papillomes et une charge tumorale importante. L'efficacité de l'HP dépend à la fois de la dose et de la voie d'administration. Une supplémentation orale à 50 mg/kg/j a peu d'effet, tandis que des doses de 250 et 500 mg/kg/j, ainsi qu'une application topique, réduisent significativement le nombre et le volume des papillomes. Ces observations sont corroborées par l'analyse histologique : le groupe DMBA présente des signes caractéristiques d'un CSCc invasif, tandis que l'HP à 250 mg/kg/j atténue les lésions et limite la malignité. À 500 mg/kg/j ou par application topique, le processus de cancérogenèse est complètement inhibé, aucune transformation maligne n'étant observée.

Il a été démontré dans la littérature que le DMBA, en tant que xénobiotique mutagène, favorise la croissance tumorale *in situ*. L'inflammation et le stress oxydatif induits par la tumorigenèse accélèrent la promotion et la progression de ces tumeurs (Kong & Xu, 2018). Des études antérieures ont déjà rapporté qu'une période de traitement de 16 semaines peut favoriser la croissance du CSCc (Subramanian et al., 2014; Sharma et al., 2016)

Lorsque l'huile de poisson est administrée, la proportion de DHA et d'EPA augmente dans la membrane phospholipidique, remplaçant partiellement l'acide arachidonique et ses métabolites,

tels que les prostaglandines. Ces métabolites jouent des rôles cruciaux dans les voies de signalisation intracellulaires associées à la prolifération cellulaire et à la surveillance immunitaire (Reddy, 2004). L'efficacité préventive des AG ω -3 contenus dans l'HP a été déjà validée par leur capacité à réduire à la fois la multiplicité et le volume des tumeurs mammaires chez les souris (Liu et al., 2018). De plus, en ce qui concerne l'efficacité de la voie d'administration, il est important de noter que les médicaments topiques sont souvent recommandés pour les maladies de la peau, car ils peuvent cibler directement la zone affectée, minimisant ainsi les effets systémiques (Cullen et al., 2020).

Le devenir métabolique des acides gras de l'HP après application topique reste moins documenté que leur ingestion orale. Les études rapportent que, lorsqu'ils sont appliqués localement, les AG ω -3 diffusent passivement à travers les membranes lipidiques de la couche cornée (Puglia et al., 2005). Ils peuvent alors atteindre les couches les plus profondes de l'épiderme et du derme, interagissant avec les fibroblastes et les vaisseaux sanguins impliqués dans les processus inflammatoires et de réparation de la peau, ce qui pourrait expliquer l'efficacité de l'application topique dans le traitement des troubles cutanés. En effet, l'HP appliqué localement a déjà montré des propriétés anti-inflammatoires. Dans une étude utilisant un modèle d'inflammation cutanée avec l'HC, l'HP a réduit l'œdème et l'activité des myéloperoxydases, qui sont des marqueurs de l'inflammation (Ames et al., 2017). Localement, les AG ω -3 peuvent subir des transformations enzymatiques aboutissant à la formation de médiateurs lipidiques bioactifs, tels que les résolvines et les protectines. Ces composés jouent un rôle clé dans la résolution de l'inflammation en inhibant la migration des cellules inflammatoires, en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires et en favorisant la régénération tissulaire (Escobar et al., 1992). Dans le contexte de la carcinogenèse cutanée, cette action est particulièrement pertinente. En effet, l'inflammation chronique est un facteur majeur favorisant la transformation maligne des cellules cutanées exposées à des agents cancérigènes comme le DMBA. En limitant cette inflammation, les médiateurs dérivés des AG ω -3 contribuent à un environnement cutané moins propice à l'initiation et à la progression tumorale (Khadge et al., 2020). Un autre mécanisme clé repose sur l'interaction compétitive entre les AG ω -3 et l'acide arachidonique au niveau des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est le précurseur de nombreux eicosanoïdes pro-inflammatoires qui favorisent la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la suppression des réponses immunitaires anti-tumorales. En remplaçant l'acide arachidonique dans les membranes lipidiques et en servant de substrat préférentiel pour les enzymes lipoxygénases (LOX) et cyclooxygénases (COX), les AG

ω -3 réduisent la production de ces eicosanoïdes pro-inflammatoires tout en favorisant la synthèse de médiateurs pro-résolutifs. Ainsi, en agissant à la fois sur la résolution de l'inflammation et sur la modulation des voies métaboliques des eicosanoïdes, les AG ω -3 appliqués localement pourraient jouer un rôle préventif essentiel contre la carcinogenèse cutanée induite par le DMBA (Black, 2012; Brücher & Jamall, 2019).

Bien que de nombreuses études aient exploré les effets de l'administration orale et topique de l'HP, les comparaisons directes entre ces deux modes d'application restent limitées. L'application topique présente toutefois l'avantage d'un ciblage plus précis. Contrairement à l'administration orale, où les AG ω -3 doivent être absorbés au niveau intestinal, transportés par la circulation sanguine et métabolisés avant d'atteindre les tissus cutanés, l'application locale permet une diffusion directe à travers l'épiderme. Cette approche optimise la biodisponibilité des AG ω -3 dans les cellules de la peau, influençant potentiellement les voies inflammatoires et anti-tumorales de manière plus immédiate et efficace dans la zone traitée.

Au cours de la cancérogénèse, les cellules transformées en cellules malignes sont considérées comme étrangères induisant ainsi une réponse à la fois immunitaire et inflammatoire (Grivennikov et al., 2010). Les cellules tumorales ont la capacité de sécréter une panoplie de cytokines, tels que le TNF- α , et les interleukines. Ces derniers font appel au recrutement de monocytes et de lymphocytes dans le microenvironnement tumoral via la circulation sanguine (Li et al., 2020).

Les résultats de la présente étude ont montré une élévation significative du taux de globules blancs et de lymphocytes ainsi qu'une augmentation très hautement significative de nombre de monocytes chez le groupe DMBA. Ces résultats confirment les observations rapportées dans la littérature, où il a été expliqué que la leucocytose, ou bien l'augmentation de taux de globules blancs, est une réponse systémique aux signaux inflammatoires lors d'une réponse immunitaire au cours du développement de carcinome spinocellulaire (Nishimura, 1990).

Les monocytes jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces cellules ont la capacité de se différencier en macrophages et en cellules dendritiques qui sont spécialisées, non seulement dans la phagocytose et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T, mais aussi dans la sécrétion des cytokines modulant ainsi la réponse immunitaire de l'organisme (Klauber et al., 2017 ; Boyette et al., 2017).

La prolifération des lymphocytes T est une réponse directe à la présence d'antigènes tumoraux. Les CD4⁺ auxiliaires et les CD8⁺ cytotoxiques sont capables d'identifier et de neutraliser les

cellules cancéreuses (Durgeau et al., 2018). Dans ce contexte, Sakai et ses collaborateurs ont noté une élévation du taux de lymphocytes du sang périphérique dans un modèle animal de carcinome spinocellulaire induit par le DMBA au stade de promotion (Sakai et al., 2004).

Par ailleurs, nos résultats ont signalé une diminution très hautement significative de taux de globules rouges. Cela pourrait être élucidé par le fait que l'inflammation chronique peut entraîner une anémie inflammatoire où les cytokines libérées peuvent interférer avec le métabolisme du fer et l'érythropoïèse réduisant forcément la production des globules rouges (Anees Ahmed et al., 2014). De plus, les cellules cancéreuses peuvent libérer des substances qui affectent l'intégrité de globules rouges et stimulent leur destruction immunitaire (Manoharan et al., 2008). La stabilité du nombre de granulocytes observée dans le groupe DMBA suggère que le microenvironnement tumoral maintient un certain équilibre homéostatique. Cette régulation pourrait refléter une réponse immunitaire compensatoire, dans laquelle les granulocytes sont continuellement recrutés et utilisés au niveau tumoral, empêchant ainsi une augmentation significative de leur concentration dans le sang périphérique. (Nirschl et al., 2017).

Les ω -3 contenus dans l'HP, notamment l'EPA et le DHA, possèdent des propriétés anti-inflammatoires et améliorent la réponse immunitaire anti-tumorale par plusieurs mécanismes. L'équilibre de la balance entre la réponse pro/anti inflammatoire est l'un des mécanismes clés ciblés par les ω 3 dans la prévention contre la progression tumorale (Rehman et al., 2016). La réduction de production des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-alpha et IL-6 entraîne une diminution des cellules immunitaires circulantes, notamment les monocytes (Minokawa et al., 2021 ; Poggioli et al., 2023). L'immuno-modulation par la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 améliore la réponse anti-inflammatoire exercée par les omégas trois (Rehman et al., 2016). Par ailleurs, plusieurs études concordent sur l'effet des ω -3 dans la régulation de la prolifération cellulaire des macrophages et des lymphocytes (Gutiérrez et al., 2019)

Nos résultats indiquent que le traitement à l'HP induit une modulation des populations de cellules immunitaires sanguines. Cette modulation se traduit par une réduction significative à très hautement significative du nombre de lymphocytes, de globules blancs et de monocytes, selon la voie et la dose administrées. Par ailleurs, une augmentation significative du nombre de globules rouges a été observée chez les groupes traités par l'HP par rapport au groupe DMBA. Dans ce contexte, une étude menée sur des patientes atteintes d'un cancer du sein a montré que la supplémentation en DHA exerce un effet systémique sur les populations de cellules

immunitaires sanguines (Molfino et al., 2017). Cette même étude a également révélé que les ω_3 peuvent s'incorporer dans les membranes des globules rouges, améliorant leur fluidité ainsi que leur capacité de transport de l'oxygène.

La LDH est une enzyme ubiquitaire qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire énergétique (Lin et al., 2022). Il a été démontré dans plusieurs études une augmentation des taux sériques de LDH chez les patients atteints de formes orales et œsophagien de carcinome spinocellulaire (Gholizadeh et al., 2020; Vardhan, 2018). Dans la présente étude, les résultats ont montré une élévation très hautement significative de la concentration du LDH sérique chez les souris du groupe soumis à la cancérogénèse (DMBA). Cela est en accord avec l'étude menée par Subramanian et ses collaborateurs sur une carcinogénèse cutanée induite par le DMBA, où les résultats ont montré une augmentation du taux de LDH sérique chez les souris qui ont reçu le DMBA (Subramanian et al., 2014).

Il est important de souligner que les ω_3 n'exercent pas un effet direct sur la LDH elle-même ; en revanche, ils peuvent influencer les mécanismes énergétiques cellulaires. D'après des études récentes s'intéressant au métabolisme des cellules cancéreuses, il a été prouvé que leur développement est accompagné par une acidose qui est due à l'accumulation du lactate résultant de la glycolyse anaérobie entraînant ainsi un déséquilibre acido-basique (Bogdanov et al., 2022). Dans ce cas, l'hypoxie inhibe la phosphorylation oxydative et l'acidose inhibe le métabolisme glycolytique. De ce fait, les cellules cancéreuses développent un degré élevé de plasticité métabolique pour répondre à leurs besoins énergétiques et biosynthétiques en augmentant l'absorption, le stockage et l'utilisation des lipides (Rolver et al., 2024). Dans les mitochondries, la production d'énergie à partir de lipides se fait via la bêta-oxydation qui est un processus par lequel les acides gras sont dégradés en unités d'acétyl-CoA, qui entrent ensuite dans le cycle de Krebs pour la production d'ATP (Pougovkina et al., 2014).

Nos résultats ont montré une diminution significative du taux de LDH chez les groupes ayant reçu 250 mg/kg/j d'HP et 500 mg/kg/j par voie orale, ainsi que chez le groupe traité par voie topique. La littérature rapporte que l'absorption d'acides gras exogènes favorise l'accumulation de triglycérides dans des gouttelettes lipidiques. Ces dernières servent ensuite de réservoirs d'acides gras pouvant être mobilisés et oxydés par la bêta-oxydation, contournant ainsi l'implication de la LDH dans le métabolisme énergétique (Corbet et al., 2020). Par ailleurs, les ω_3 peuvent freiner la progression tumorale en régulant la survie cellulaire. Il a été démontré que le DHA, lorsqu'il est présent en grande quantité, induit un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses en activant sélectivement la ferroptose. Ce processus repose sur une peroxydation

excessive des lipides membranaires due à un stress oxydatif incontrôlé des phospholipides polyinsaturés, entraînant la destruction des membranes cellulaires et la mort des cellules tumorales (Dierge et al., 2021).

Il est important de souligner que les cellules tumorales génèrent en permanence des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) tout au long de leur progression. Ces molécules comprennent des espèces non radicalaires, comme l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxydinitrite (ONOO^-) et l'acide hypochloreux (HOCl), ainsi que des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^\bullet), le monoxyde d'azote (NO^\bullet) et le dioxyde d'azote (NO_2^\bullet) (Di Meo et al., 2016).

Dans le cancer de la peau, notamment le carcinome spinocellulaire (CSCc), les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS) jouent un rôle ambivalent. D'une part, une production excessive dépassant les capacités de défense antioxydante de l'organisme favorise l'initiation et la progression des tumeurs cutanées via des mécanismes génotoxiques et non génotoxiques. D'autre part, une accumulation excessive de ces espèces peut induire l'apoptose des cellules tumorales, faisant ainsi des ROS/RNS une cible potentielle pour des approches thérapeutiques (Xian et al., 2019; Emanuelli et al., 2022). Dans cette étude, les produits de la peroxydation lipidique (MDA), de l'oxydation protéique (protéines carbonylées) et les produits avancés de l'oxydation protéique (AOPP) ont été utilisés comme biomarqueurs pour évaluer l'ampleur des dommages oxydatifs et de la cytotoxicité induits par la carcinogenèse.

L'interaction des ROS avec les protéines peut entraîner la rupture des liaisons peptidiques et induire des réactions d'oxydation au niveau des chaînes latérales des acides aminés soufrés et aromatiques. Cette oxydation peut conduire à la formation de groupements hydroxyles, favorisant ainsi la création de réticulations intra- ou intermoléculaires. L'ensemble des composés résultant de ces altérations oxydatives des protéines est regroupé sous le terme de « produits avancés de l'oxydation des protéines » (AOPP) (Höhn et al., 2013).

Le malondialdéhyde (MDA), un composé mutagène et cancérigène, est un produit naturel de la peroxydation des lipides ainsi que de la biosynthèse des prostaglandines. Il résulte de l'oxydation des phospholipides membranaires, notamment des acides gras polyinsaturés, par les ROS et RNS (Marnett, 1999; Grimsrud et al., 2008). La formation de composés carbonylés réactifs lors de la peroxydation des lipides et de la glycoxydation des glucides induit un phénomène appelé « stress carbonyle ». Ce dernier se caractérise par la formation d'adduits et de liaisons croisées entre les composés carbonylés réactifs (RCC) et certains acides aminés des

protéines tissulaires, en particulier la lysine, la cystéine et l'histidine, entraînant ainsi la formation de protéines carbonylées (PCO). Cette accumulation conduit progressivement à une altération des fonctions protéiques, un dysfonctionnement cellulaire, une réponse inflammatoire et à l'apoptose (Grimsrud et al., 2008; Negre-Salvayre et al., 2008).

Nos résultats ont montré une élévation significative du taux de PCO, ainsi qu'une augmentation très hautement significative des concentrations de MDA et d'AOPP chez les souris du groupe DMBA. Ces observations sont en accord avec les travaux de Kundaktepe et al. (2021), qui ont rapporté une augmentation similaire de ces biomarqueurs de stress oxydatif lors de l'induction du cancer mammaire par le DMBA. Le traitement à HP a entraîné une réduction des niveaux tissulaires de PCO et d'AOPP dans tous les groupes traités, ce qui corrobore les résultats de Méndez et ses collaborateurs, ayant démontré que la consommation combinée d'HP et de D-fagomine prévient la carbonylation des protéines et la lipotoxicité chez les rats (Méndez et al., 2023).

Les niveaux de MDA ont diminué après l'administration d'HP, mais sans atteindre un seuil de significativité, indépendamment de la voie ou de la dose administrée. Il a été précédemment démontré que la supplémentation en DHA pouvait augmenter la production de MDA dans des lignées cellulaires cancéreuses dans un milieu acide (Dierge et al., 2021). Nous suggérons que cette modulation des taux de MDA après supplémentation en HP est liée à la présence d'acides gras polyinsaturés (AGPI) de type ω -3, qui peuvent agir comme cibles préférentielles des ROS, détournant ainsi l'attaque oxydative des lipides membranaires et protégeant la structure cellulaire contre la peroxydation lipidique.

Les antioxydants enzymatiques (CAT, SOD et GPx) jouent un rôle clé dans la neutralisation des $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 , contribuant ainsi à la prévention de la cancérogenèse (Valavanidis et al., 2013; Xiao et al., 2021). Nos résultats ont révélé une diminution significative des taux de GPx et une réduction très hautement significative de la CAT dans le groupe DMBA. Il est bien établi que l'induction chimique du CSCc par le DMBA entraîne une diminution des concentrations des enzymes antioxydantes (Sagar et al., 2014; Subramanian et al., 2014). Les AGPI ω -3 présents dans l'HP jouent un double rôle : d'une part, ils activent les enzymes antioxydantes cytoprotectrices, et d'autre part, ils protègent l'intégrité cellulaire en servant de cibles aux attaques radicalaires (Rhodes et al., 1994; Meital et al., 2019). Dans notre étude, les groupes traités par l'HP ont présenté des niveaux accrus des enzymes SOD, CAT et GPx. Ces résultats sont en accord avec ceux de Pedroza et son équipe qui ont montré que la supplémentation en HP améliore les capacités antioxydantes des enzymes SOD, GPx et CAT chez les rats (da Silva

Pedroza et al., 2015) ; De plus, il a été démontré que le DHA entraîne une augmentation des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx) dans les tissus du cancer du sein (Geng et al., 2018).

En tant qu'antioxydant biologique endogène non enzymatique, le GSH joue un rôle essentiel dans la protection contre les dommages oxydatifs et la détoxification des composés réactifs induits par le DMBA (Suhail et al., 2015; Dasari et al., 2018). Nos résultats ont montré une augmentation hautement significative des niveaux de GSH dans le groupe traité par DMBA. Sharma et ses collaborateurs ont démontré qu'au cours de l'induction tumorale par le DMBA, la concentration des métabolites du DMBA augmente dans les cellules tumorales, entraînant une élévation des niveaux de ROS, ce qui conduit à une consommation accrue de GSH (Sharma et al., 2016). En réponse à cette accumulation de ROS, les cellules tumorales peuvent activer des voies de signalisation redox, stimulant ainsi la synthèse de GSH pour maintenir des niveaux élevés et favoriser la survie et la progression tumorale (Kennedy et al., 2020).

La supplémentation en HP a modifié les niveaux de GSH dans tous les groupes traités, avec des différences de signification légères selon la dose et la voie d'administration. Ces résultats sont cohérents avec des études menées sur des cellules tumorales de myélome, où il a été observé que les ω -3 régulent l'expression des enzymes clés de la synthèse du GSH, telles que GCLM et GSR (Chen et al., 2021). De plus, l'EPA et le DHA possèdent un potentiel antioxydant, grâce à leur capacité à réduire les niveaux de ROS endogènes, à améliorer le statut redox cellulaire et à moduler la signalisation des cytokines pro-inflammatoires tout en régulant les enzymes antioxydantes cytoprotectrices (Meital et al., 2019).

Le NF- κ B est un facteur de transcription central impliqué dans l'initiation et la progression des tumeurs. Il joue également un rôle clé dans la promotion de l'angiogenèse et de la métastase tumorale, tout en protégeant les cellules des signaux apoptotiques et nécrotiques (Tago et al., 2019). Dans des conditions cytoplasmiques normales, les complexes NF- κ B1 (RelA/p50, cRel/p50) et NF- κ B2 (RelB/p100, RelB/p52) sont maintenus inactifs grâce à leur association avec des protéines inhibitrices, telles que I κ B α pour RelA et p100 pour RelB. Lors de la stimulation de la voie classique (canonique) ou alternative (non canonique), ces inhibiteurs subissent une phosphorylation et une dégradation, ce qui libère les sous-unités NF- κ B actives. Ces sous-unités se transloquent alors dans le noyau, où elles activent la transcription de gènes anti-apoptotiques (figure 51) (Baud & Jacque, 2008). La voie canonique de NF- κ B cible des gènes impliqués dans des processus essentiels tels que la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la survie cellulaire. En revanche, la voie alternative induit la

transcription de gènes associés à la lymphogenèse et à la maturation des cellules B (Ben-Neriah & Karin, 2011; Yu et al., 2020). Lorsqu'une réponse immunitaire innée est déclenchée par le stress oxydatif, la voie de signalisation canonique de NF- κ B est souvent activée (Ben-Neriah & Karin, 2011). Cette activation peut avoir un effet ambivalent sur le développement tumoral : d'une part, lors d'une inflammation aiguë, elle stimule l'activité des cellules immunitaires cytotoxiques, facilitant l'élimination des cellules altérées ; d'autre part, une inflammation chronique, souvent causée par l'activité tumorale, entraîne l'activation continue de NF- κ B, ce qui peut soutenir divers processus pro-tumoraux (Dunn et al., 2004; Smyth et al., 2006).

L'expression élevée des gènes NF- κ B1 est souvent associée à la progression des tumeurs solides, où la signalisation dépend principalement de la voie canonique via RelA/p50 (Kaltschmidt et al., 2018). En revanche, les tumeurs hématopoïétiques sont généralement liées à la signalisation NF- κ B2, qui repose sur la voie non canonique impliquant RelB (Dos Santos et al., 2008). En effet, Kong et al. ont démontré que l'induction du cancer de la peau (CSCc) par le couple DMBA/TPA active la voie I κ B/NF- κ B1 (Kong & Xu, 2018). Le DMBA est un puissant agent génotoxique capable d'induire des mutations dans l'oncogène H-ras-1, un événement initiateur fréquent dans la tumorigenèse (Mao et al., 2004). La GTPase-Ras mutante augmente l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de NF- κ B en phosphorylant la sous-unité RelA, ce qui entraîne une hyperactivation de la voie canonique de NF- κ B (Tago et al., 2019). Une étude menée sur la lignée cellulaire murine CSC PAM 212 a révélé que l'augmentation de l'expression des gènes NF- κ B1 est essentielle à la formation tumorale, agissant comme un commutateur moléculaire central qui induit des changements génotypiques et phénotypiques au cours de la progression maligne de ce type de cancer (Loercher et al., 2004). De plus, dans un modèle murin de mélanome, il a été démontré que l'activation de la voie canonique NF- κ B par IKK2 est essentielle pour initier la tumorigenèse médiée par H-ras (Yang et al., 2010).

Des études antérieures ont mis en évidence une accumulation nucléaire des dimères RelB/p52 dans les tumeurs mammaires murines expérimentales (Romieu-Mourez et al., 2003; Demicco et al., 2005). Il a également été démontré que l'inhibition de RelB entraînait une réduction de la prolifération des cellules tumorales, suggérant ainsi son implication dans la carcinogenèse mammaire (Demicco et al., 2005). De manière similaire, Wang et son équipe ont détecté une accumulation de RelB dans les cellules de cancer du sein invasif, indépendamment de la signalisation des œstrogènes. Dans ces cellules, RelB favorise l'expression du gène anti-apoptotique Bcl2 (Wang et al., 2007). Par ailleurs, une forte expression de RelB a été observée

dans les noyaux des tissus atteints de cancer de la prostate, suggérant une implication de la voie alternative NF- κ B dans les cancers solides (Baud & Jacque, 2008). De même, des mutations somatiques dans le gène IKK1 ont été identifiées dans le CSC, indiquant une corrélation inverse potentielle entre l'expression d'IKK1 et l'agressivité de ce cancer (Hu et al., 1999). En complément, l'équipe de Liu a souligné le rôle central d'IKK1 dans le développement du CSC humain. En analysant 114 échantillons de CSC humains par immunohistochimie, ils ont mis en évidence une corrélation inverse entre les niveaux d'expression d'IKK1 et l'agressivité du CSC (Liu et al., 2006). Ces observations corroborent les résultats de notre étude, qui montrent, chez les souris du groupe DMBA, une élévation très hautement significative de l'expression du gène NF- κ B1, tandis que la sous-unité NF- κ B2 conserve un niveau d'expression stable. Ces résultats suggèrent que le SCC invasif induit dans le groupe DMBA repose principalement sur la voie canonique NF- κ B. En tenant compte de l'ensemble de ces données, nous proposons que l'activation de la voie NF- κ B dans la carcinogenèse ne varie pas uniquement entre les tumeurs solides et hématopoïétiques, mais qu'elle dépend également du degré d'agressivité tumorale.

Selon des recherches déjà publiées, les AG ω -3, en particulier l'EPA et le DHA, réduisent l'activation de NF- κ B par plusieurs mécanismes. Ils activent les récepteurs PPAR, qui interfèrent avec la signalisation NF- κ B. Ils réduisent également l'expression nucléaire de RalA et inhibent la dégradation de I κ B α , retenant ainsi le NF- κ B dans le cytoplasme (Mullen et al., 2010; Bazan et al., 2011; Serhan, 2014). En raison de sa structure chimique hautement insaturée, le DHA s'intègre dans la membrane phospholipidique, où il augmente la fluidité, perturbe les microdomaines lipidiques. Cette intégration permet la modification des voies de transduction du signal intracellulaire impliquées dans la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression des molécules d'adhésion (De Caterina et al., 2000). En modifiant l'environnement membranaire, le DHA réduit l'activation du récepteur de type Toll (TLR4), un récepteur pour les lipopolysaccharides (LPS), qui est l'un des signaux déclencheurs de NF- κ B (Lee et al., 2001). De plus, des recherches antérieures ont démontré que, plus de ses propriétés inhibitrices de la voie NF- κ B, l'EPA et le DHA induisent l'apoptose dans les cellules de myélome humain en activant la caspase-3. Cela se produit à la suite de modifications de la membrane mitochondriale, entraînant la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération de facteurs pro-apoptotiques (Abdi et al., 2014). Ces résultats sont cohérents avec nos résultats histologiques après traitement avec 250 et 500 mg/kg/j d'HP. Nos résultats ont montré un effet inhibiteur de l'HP sur l'expression du gène NF- κ B1, qui a augmenté significativement en fonction de doses. De plus, l'administration topique s'est révélée plus

efficace que le gavage. Dans deux expériences consécutives, Allam-Ndoul et ses collègues ont évalué les effets anti-inflammatoires de l'EPA et du DHA sur la lignée cellulaire de macrophages THP-1. Les résultats ont indiqué que la supplémentation en EPA et DHA, soit séparément, soit en combinaison, présentait un effet anti-inflammatoire dose-dépendant en inhibant l'expression génique et les niveaux de cytokines inflammatoires telles que TNF α , IL-1B et IL-6, conduisant ainsi à la baisse la signalisation NF- κ B (Allam-Ndoul et al., 2016, 2017).

Nos résultats ont montré des taux très faibles de TNF- α chez tous les groupes témoins, ce qui est attendu chez une souris en bonne santé, en l'absence de réponse inflammatoire systémique ou de stress biologique. Une augmentation significative du TNF- α a été observée chez les souris soumises à la cancérogenèse chimique, indiquant que ce processus a bien induit une réponse inflammatoire. Cela est cohérent avec la littérature, qui rapporte que le TNF- α joue un rôle pro-cancérogène en favorisant l'inflammation chronique, l'angiogenèse, et l'expression de marqueurs métastatiques, contribuant ainsi à la progression tumorale (Nenu et al., 2015). Il a également été démontré que l'exposition prolongée à de faibles niveaux de TNF- α favorise un phénotype pro-malignant, en stimulant la prolifération, l'invasion et la métastase des cellules tumorales (Szlosarek et al., 2006). Cette exposition est également associée à une augmentation du stress oxydatif, pouvant induire des dommages à l'ADN et favoriser la transformation maligne (Wheelhouse et al., 2003). Ces observations corroborent nos résultats histologiques et biochimiques qui montrent un aspect invasif de la tumeur et une augmentation des marqueurs de stress oxydatif chez les souris soumises à la cancérogenèse.

Une approche intuitive serait de bloquer le TNF- α afin d'améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses. Cependant, ce blocage pourrait également inhiber les réponses immunitaires anti-tumorales (Mercogliano et al., 2021). En effet, plusieurs études ont démontré que le TNF- α peut induire l'apoptose des cellules tumorales. Il a notamment été observé que le TNF- α renforce l'apoptose des cellules de CSCc humain (SCC-13) et des kératinocytes immortalisés (HaCaT), tout en protégeant les kératinocytes humains normaux primaires (PNHK) de cette même apoptose, ce qui pourrait avoir des implications cliniques importantes (Kokolakis et al., 2021). Ces résultats suggèrent que le TNF- α peut avoir un double effet, apoptotique dans les cellules tumorales et protecteur pour les cellules normales.

Dans ce contexte, nos résultats sont particulièrement intéressants : nous avons observé une augmentation marquée du TNF- α chez les souris recevant les ω -3 en parallèle de la cancérogenèse, ce qui indique une modulation significative de la réponse inflammatoire. Ce résultat est d'autant plus intrigant que nous nous attendions initialement à une diminution du

TNF- α chez les souris traitées aux ω -3. Cependant, en nous appuyant sur la littérature, nous suggérons que cette augmentation pourrait en réalité jouer un rôle clé dans la régression tumorale, en favorisant l'apoptose des cellules cancéreuses, ce qui est confirmé par nos observations morphologiques et histologiques.

Il est généralement admis que le TNF- α active la voie NF- κ B, favorisant ainsi la prolifération tumorale. Cela correspond aux observations faites chez les souris soumises à la cancérogenèse chimique. Toutefois, chez les souris traitées aux ω -3, l'augmentation du TNF- α s'est accompagnée d'une diminution de l'expression génique du NF- κ B. Ce paradoxe peut être expliqué par un mécanisme de rétroaction négative bien documenté entre le TNF- α et NF- κ B. En effet, le TNF- α active la kinase IKK, qui phosphoryle l'inhibiteur I κ B α , entraînant sa dégradation et la libération de NF- κ B vers le noyau. Cependant, NF- κ B induit également la transcription de I κ B α , qui, une fois synthétisé, inhibe à nouveau NF- κ B, aboutissant ainsi à une diminution progressive de son activité (Moss et al., 2012). Une étude a également montré que chez des souris déficientes en I κ B α , la signalisation NF- κ B est prolongée en réponse au TNF- α , mettant en évidence le rôle essentiel de cette boucle de rétroaction (Shih et al., 2009).

Le rôle des ω -3 dans la sécrétion de TNF- α reste controversé, car il varie selon le contexte expérimental, le type cellulaire étudié et les conditions de stimulation. Certains travaux rapportent une diminution du TNF- α , attribuée aux effets anti-inflammatoires des ω -3, notamment via la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, connu pour ses propriétés immunosuppressives (Gutiérrez et al., 2019). À l'inverse, d'autres études montrent une augmentation du TNF- α dans des contextes spécifiques, en particulier en présence de stimuli immunitaires ou tumoraux. En effet, il a été rapporté que l'huile de poisson alimentaire augmente le nombre de macrophages spléniques sécrétant TNF- α et IL-10 (Petursdottir & Hardardottir, 2007). De plus, une autre étude a observé que les oméga-3 stimulent la sécrétion de TNF- α par les macrophages péritonéaux résidents murins en réponse à une stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) (Skuladottir et al., 2007). Ces observations suggèrent que l'augmentation du TNF- α observée dans notre étude pourrait traduire une activation immunitaire bénéfique, jouant un rôle dans la réponse anti-tumorale. Or, nos résultats de la formulation sanguine ont indiqué que le traitement à l'HP induit une réduction significative du nombre de monocytes circulant. Ainsi, l'augmentation marquée du TNF- α observée chez les souris traitées suggère l'intervention d'autres sources, telles que les kératinocytes tumoraux (Köck et al., 1990). Dans ce contexte, la production de TNF- α pourrait refléter une réponse inflammatoire anti-tumorale, contribuant à la régression observée des lésions cutanées.

Pour récapituler, nos résultats suggèrent que le TNF- α joue un rôle ambivalent, à la fois pro-inflammatoire et pro-apoptotique dans les cellules tumorales. L'administration d' ω -3 aux souris soumises à la cancérogenèse a entraîné une augmentation très marquée du TNF- α , ce qui, loin d'être délétère, semble stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale. L'exposition prolongée à des niveaux élevés de TNF- α pourrait avoir déclenché une boucle de rétro-régulation de NF- κ B, réduisant ainsi son activité transcriptionnelle et favorisant l'apoptose des cellules tumorales. Ces observations suggèrent que, dans ce contexte précis, le TNF- α a activé la voie apoptotique plutôt que la voie pro-survie, ce qui pourrait avoir des implications thérapeutiques intéressantes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Sur la base de l'ensemble de nos résultats, nous concluons que l'huile de poisson possède des propriétés chimiopréventives significatives, inhibant le développement du carcinome spinocellulaire cutané (CSCc) chimiquement induit par le couple DMBA/HC chez les souris Swiss albinos. Bien que les acides gras ω -3 subissent des transformations métaboliques au niveau du tractus gastro-intestinal, l'administration orale de l'HP exerce néanmoins un effet inhibiteur sur la carcinogenèse chimique cutanée.

Nos résultats suggèrent que l'effet anticancérogène des ω -3 passe par une régulation négative du signal NF- κ B1, probablement en lien avec une augmentation du taux de TNF- α . La diminution du nombre de leucocytes inflammatoires circulants suggère que d'autres populations cellulaires pourraient être impliquées dans la production de TNF- α détecté, notamment les kératinocytes ou les cellules tumorales elles-mêmes.

Par ailleurs, les ω -3 participent à la restauration de l'équilibre du système antioxydant en renforçant les défenses enzymatiques (SOD, CAT, GPx) et non enzymatiques (GSH), tout en réduisant les marqueurs du stress oxydatif, notamment la carbonylation des protéines (PCO) et l'oxydation avancée des protéines (AOPP). Enfin, la diminution du taux sérique de LDH indique une inhibition du métabolisme anaérobie, caractéristique des cellules cancéreuses, renforçant ainsi l'hypothèse d'un effet métabolique des ω -3 dans la suppression de la progression tumorale.

Ces effets protecteurs sont plus marqués avec l'application topique qu'avec l'administration orale. Toutefois, l'efficacité de la voie orale dépend de la dose administrée. À cet égard, la dose maximale de 500 mg/kg/j d' ω -3 a entraîné une inhibition significative du processus de carcinogenèse, confirmée tant morphologiquement qu'histologiquement. Cela suggère que, sous un dosage approprié, la voie orale peut être aussi efficace que la voie topique.

En perspective... Cette étude présente certaines limitations. Premièrement, une évaluation plus approfondie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des cytokines pro-inflammatoires telles que TGF- β , IL-1 et IL-6 aurait permis de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans l'effet préventif observé. Deuxièmement, une analyse des formes phosphorylées des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), impliquées dans la signalisation de NF- κ B, aurait pu révéler d'éventuelles anomalies associées à la surexpression de NF- κ B1.

Dans cette perspective, nous envisageons d'approfondir nos recherches en explorant, sur des lignées cellulaires en culture, l'effet distinct des deux principaux oméga-3, la DHA et l'EPA. Nous évaluerons notamment l'activation des formes phosphorylées des MAPK (ERK1/2, JNK1/2, p38) par Western blot, ainsi que l'implication des récepteurs associés à la transduction des signaux apoptotiques et prolifératifs. Compte tenu de la complexité du cancer, la durée de l'étude reste un facteur limitant, ne permettant pas d'évaluer pleinement l'effet préventif de l'huile de poisson (HP) à long terme. Des investigations prolongées seront donc nécessaires pour confirmer la durabilité et l'ampleur de son impact.

Au vu des résultats, nous avons également formulé l'hypothèse que le mode d'action des ω -3 contre la cancérogenèse repose sur une expression importante et chronique de TNF α . ceci induirait une diminution du signal NF κ B, levant ainsi l'inhibition des mécanismes apoptotiques. Cependant, ces suppositions nécessitent d'être consolidées par des analyses complémentaires.

Dans cette perspective, une approche in vitro permettrait de confirmer le rôle clé du TNF α en le neutralisant à l'aide d'un inhibiteur spécifique tel que l'Etanercept. Si l'effet anticancéreux des ω -3 était atténué ou supprimé, cela renforcerait l'idée que le TNF α est un médiateur essentiel de leur action. Dans le cas contraire, d'autres voies moléculaires pourraient être impliquées.

De même, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de NF κ B, tel que le Bay 11-7082 (inhibiteur de IKK), permettrait d'évaluer si son inhibition potentialise l'effet des ω -3, apportant ainsi des preuves supplémentaires du lien entre ces deux acteurs.

Par ailleurs, une analyse de la translocation des sous-unités de NF κ B par immunofluorescence serait essentielle pour démontrer que la diminution du signal NF κ B induite par le TNF α se produit à l'échelle cellulaire et non uniquement au niveau de l'expression génique.

Afin d'établir plus fermement le lien entre TNF α et NF κ B, une analyse des gènes régulés par NF κ B en présence de TNF α , tels que Cyclin D1, Bcl-2 et COX-2, permettrait de préciser les mécanismes sous-jacents.

Enfin, il serait souhaitable de confirmer le rôle pro-apoptotique du TNF α par des analyses complémentaires, telles qu'un Western blot ciblant la caspase-3 clivée et le rapport Bax/Bcl-2, ainsi qu'un test TUNEL pour détecter l'apoptose in situ.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Abdelhamid, A. S., Brown, T. J., Brainard, J. S., Biswas, P., Thorpe, G. C., Moore, H. J., Deane, K. H., AlAbdulghafoor, F. K., Summerbell, C. D., Worthington, H. V., Song, F., & Hooper, L. (2018). Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11(11), CD003177. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003177.pub4>
- Abdellaoui, M. (2024). *Effets préventifs de différentes substances 'Graviola, Dichloroacétate et immunostimulants'' en application seules ou combinées sur une cancérogénèse chimique expérimentale de la peau*. Thèse de doctorat. Badji Mokhtar Annaba University.
- Abdi, J., Garssen, J., Faber, J., & Redegeld, F. A. (2014). Omega-3 fatty acids, EPA and DHA induce apoptosis and enhance drug sensitivity in multiple myeloma cells but not in normal peripheral mononuclear cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(12), 1254-1262. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.013>
- Abdollahi, M., Shokri, F., Hosseini, M., Shadani, M., & Saboor-Yaraghi, A.-A. (2016). The combined effects of all-trans-retinoic acid and docosahexaenoic acid on the induction of apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(1), 204. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.154071>
- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ahn, J., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Ruiz, P., & Barber, G. N. (2014). Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nature Communications*, 5(1), 5166. <https://doi.org/10.1038/ncomms6166>
- Allam-Ndoul, B., Guénard, F., Barbier, O., & Vohl, M.-C. (2016). Effect of n-3 fatty acids on the expression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0241-4>
- Allam-Ndoul, B., Guénard, F., Barbier, O., & Vohl, M.-C. (2017). Effect of different concentrations of omega-3 fatty acids on stimulated THP-1 macrophages. *Genes & Nutrition*, 12(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0554-6>
- Ames, F. Q., Sato, F., de Castro, L. V., de Arruda, L. L. M., da Rocha, B. A., Cuman, R. K. N., Baesso, M. L., & Bersani-Amado, C. A. (2017). Evidence of anti-inflammatory effect and percutaneous penetration of a topically applied fish oil preparation: A photoacoustic spectroscopy study. *Journal of Biomedical Optics*, 22(5), 55003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.5.055003>

Anees Ahmed, R. A., Ganvir, S. M., & Hazarey, V. K. (2014). Relation of erythrocyte indices and serum iron level with clinical and histological progression of oral squamous cell carcinoma in Central India. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 5(1), 65-71. <https://doi.org/10.1111/jicd.12021>

B

Baud, V., & Jacque, E. (2008). Voie alternative d'activation de NF- κ B et cancer : Amis ou ennemis ? *médecine/sciences*, 24(12), 1083-1088. <https://doi.org/10.1051/medsci/200824121083>

Bazan, N. G., Molina, M. F., & Gordon, W. C. (2011). Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition : Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases. *Annual review of nutrition*, 31, 321-351. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104635>

Béliveau, R., & Gingras, D. (2007). Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien*, 53(11), 1905-1911.

Benjamin, C. L., & Ananthaswamy, H. N. (2007). P53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.006>

Ben-Neriah, Y., & Karin, M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunology*, 12(8), 715-723. <https://doi.org/10.1038/ni.2060>

Bessaguet, F., Seuve, É., & Desmoulière, A. (2022). La peau. *Actualités Pharmaceutiques*, 61(615), 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2022.02.014>

Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity : Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559-566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)

Bogdanov, A., Bogdanov, A., Chubenko, V., Volkov, N., Moiseenko, F., & Moiseyenko, V. (2022). Tumor acidity : From hallmark of cancer to target of treatment. *Frontiers in Oncology*, 12, 979154. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.979154>

Bonilla-Méndez, J. R., Hoyos-Concha, J. L., Bonilla-Méndez, J. R., & Hoyos-Concha, J. L. (2018). Methods of extraction refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(3), 645-668. https://doi.org/10.21930/rcta.vol19_num2_art:684

Bouharissa, B. (2017). *Carcinome épidermoïde*. dermatologie chirurgicale. <https://www.dermatologie-chirurgicale-antibes.fr/lesions-malignes/carcinome-epidermoïde/>

Bowen, K. J., Harris, W. S., & Kris-Etherton, P. M. (2016). Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease : Are There Benefits? *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 18(11), 69. <https://doi.org/10.1007/s11936-016-0487-1>

Boyette, L. B., Macedo, C., Hadi, K., Elinoff, B. D., Walters, J. T., Ramaswami, B., Chalasani, G., Taboas, J. M., Lakkis, F. G., & Metes, D. M. (2017). Phenotype, function, and differentiation

- potential of human monocyte subsets. *PLOS ONE*, 12(4), e0176460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176460>
- Bradford, M. M. (s. d.). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*.
- Brancati, A. (2024, février 14). *Carcinome et Mélanome : Comment les différencier ?* <https://dr-brancati-esthetique.fr/quelles-sont-les-differences-entre-carcinome-et-melanome/>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
- Burns, E. M., Tober, K. L., Riggenschach, J. A., Kusewitt, D. F., Young, G. S., & Oberyszyn, T. M. (2013). Extended UVB Exposures Alter Tumorigenesis and Treatment Efficacy in a Murine Model of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Skin Cancer*, 2013(1), 246848. <https://doi.org/10.1155/2013/246848>
- Butt, C. M., & Salem, N. (2016). Chapter 12—Fish and Fish Oil for the Aging Brain. In S. K. Ratz & D. M. Bibus (Éds.), *Fish and Fish Oil in Health and Disease Prevention* (p. 143-158). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802844-5.00012-9>
- ## C
- Calder, P. C. (2006). N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases 2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1505S-1519S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1505S>
- Chen, J., Zaal, E. A., Berkers, C. R., Ruijtenbeek, R., Garssen, J., & Redegeld, F. A. (2021). Omega-3 Fatty Acids DHA and EPA Reduce Bortezomib Resistance in Multiple Myeloma Cells by Promoting Glutathione Degradation. *Cells*, 10(9), 2287. <https://doi.org/10.3390/cells10092287>
- Chengizkhan, G., Sukumar, K., Kunnumakkara, A. B., Queimado, L., Munirajan, A. K., Bhaskaran, R. S., Kumaran, R. I., & Ramachandran, I. (2021). Reactive Oxygen Species and Cancer Stem Cells: Molecular Interactions and Their Implications in Cancer. In S. Chakraborti (Éd.), *Handbook of Oxidative Stress in Cancer : Therapeutic Aspects* (p. 1-42). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1247-3_109-3
- Cheniti, H., Kadi, A., Agred, R., Kadi, Y., Djeradi, M. K., Melliti, H., Chiheb, N., Kherfi, H., & Messarah, M. (2025). Fish Oil's Preventive Effect on Two-Stage Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice : Involvement of NF-κB Pathways and Oxidative Stress in a Dose- and Route Dependent Manner. *Molecular Nutrition & Food Research*, 69(4), e202400630. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202400630>
- Chevalier, L. (2020). *Pharmacocinétique de l'EPA et du DHA estérifié sous les formes monoacylglycérols, triglycérides et ester éthyliques : Deux études cliniques contrôlées randomisées*. <https://savoirs.usherbrooke.ca/handle/11143/18302>

- Chuang, T. Y., Su, W. P., & Muller, S. A. (1990). Incidence of cutaneous T cell lymphoma and other rare skin cancers in a defined population. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 23(2 Pt 1), 254-256. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70208-y](https://doi.org/10.1016/0190-9622(90)70208-y)
- Corbet, C., Bastien, E., Santiago de Jesus, J. P., Dierge, E., Martherus, R., Vander Linden, C., Doix, B., Degavre, C., Guilbaud, C., Petit, L., Michiels, C., Dessy, C., Larondelle, Y., & Feron, O. (2020). TGFβ2-induced formation of lipid droplets supports acidosis-driven EMT and the metastatic spreading of cancer cells. *Nature Communications*, 11(1), 454. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14262-3>
- Crexi, V. T., Monte, M. L., Soares, L. A. de S., & Pinto, L. A. A. (2010). Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Food Chemistry*, 119(3), 945-950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.050>
- Cullen, J. K., Simmons, J. L., Parsons, P. G., & Boyle, G. M. (2020). Topical treatments for skin cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 153, 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.11.002>
- D**
- D, H., & Ra, W. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Dalle, S., Martin-Denavit, T., & Thomas, L. (2006). [Genotypic hypervariability of melanoma: A therapeutic challenge]. *Medecine Sciences: M/S*, 22(2), 178-182. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006222178>
- D'Aquila, T., Hung, Y.-H., Carreiro, A., & Buhman, K. K. (2016). Recent discoveries on absorption of dietary fat: Presence, synthesis, and metabolism of cytoplasmic lipid droplets within enterocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1861(8 Pt A), 730-747. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.04.012>
- Dasari, S., Ganjavi, M. S., Yellanurkonda, P., Basha, S., & Meriga, B. (2018). Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene. *Chemico-Biological Interactions*, 294, 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.023>
- Da Silva Pedroza, A. A., Lopes, A., Mendes da Silva, R. F., Braz, G. R., Nascimento, L. P., Ferreira, D. S., dos Santos, Â. A., Batista-de-Oliveira-Hornsby, M., & Lagranha, C. J. (2015). Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts? *Life Sciences*, 137, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.021>
- De Caterina, R., Liao, J. K., & Libby, P. (2000). Fatty acid modulation of endothelial activation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1 Suppl), 213S-233S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.213S>
- Deka, K., & Li, Y. (2023). Transcriptional Regulation during Aberrant Activation of NF-κB Signalling in Cancer. *Cells*, 12(5), 788. <https://doi.org/10.3390/cells12050788>

- Delehedde, M. (2006). *Que sait-on du cancer ? - - Maryse Delehedde (EAN13 : 9782759808700) | La boutique EDP Sciences : e-librairie, vente en ligne de livres et ebooks scientifiques*. EDP Sciences. <https://laboutique.edpsciences.fr/produit/137/9782759808700/que-sait-on-du-cancer>
- De Magalhães, J. P., Müller, M., Rainger, G. Ed., & Steegenga, W. (2016). Fish oil supplements, longevity and aging. *Aging (Albany NY)*, 8(8), 1578-1582. <https://doi.org/10.18632/aging.101021>
- Demico, E. G., Kavanagh, K. T., Romieu-Mourez, R., Wang, X., Shin, S. R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D. C., & Sonenshein, G. E. (2005). RelB/p52 NF-kappaB complexes rescue an early delay in mammary gland development in transgenic mice with targeted superrepressor IkappaB-alpha expression and promote carcinogenesis of the mammary gland. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), 10136-10147. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.10136-10147.2005>
- Derancourt, C. (2019). Aspects épidémiologiques et clinique des cancers cutanés sur peau noire. Particularités de prise en charge. *Dermato Mag*, . 7(1), 34-40. <https://doi.org/10.1684/dm.2019.140>.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-44. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Dierge, E., Debock, E., Guilbaud, C., Corbet, C., Mignolet, E., Mignard, L., Bastien, E., Dessy, C., Larondelle, Y., & Feron, O. (2021). Peroxidation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the acidic tumor environment leads to ferroptosis-mediated anticancer effects. *Cell Metabolism*, 33(8), 1701-1715.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.05.016>
- DiGiovanni, J. (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacology & Therapeutics*, 54(1), 63-128. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(92\)90051-z](https://doi.org/10.1016/0163-7258(92)90051-z)
- Dos Santos, N. R., Williame, M., Gachet, S., Cormier, F., Janin, A., Weih, D., Weih, F., & Ghysdael, J. (2008). RelB-Dependent Stromal Cells Promote T-Cell Leukemogenesis. *PLoS ONE*, 3(7), e2555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002555>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22, 329-360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Durgeau, A., Virk, Y., Corgnac, S., & Mami-Chouaib, F. (2018). Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 9, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00014>

E

- Elaine N. Marieb, K. H. (2019). *Anatomie et Physiologie Humaine—Marieb—Anatomie et Physiologie Humaine Dernière Édition de Marieb (ERPI-Renouveau pédagogique)*. <https://www.livres-medicaux.com/etudiants/18044-anatomie-et-physiologie-humaines-10e-edition-monlab.html>

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Em, G., & Mg, K. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4). <https://doi.org/10.1038/nrc2110>
- Emanuelli, M., Sartini, D., Molinelli, E., Campagna, R., Pozzi, V., Salvolini, E., Simonetti, O., Campanati, A., & Offidani, A. (2022). The Double-Edged Sword of Oxidative Stress in Skin Damage and Melanoma : From Physiopathology to Therapeutical Approaches. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(4), 612. <https://doi.org/10.3390/antiox11040612>
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation : P53-p21-RB signaling. *Cell Death & Differentiation*, 29(5), 946-960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- Escobar, S. O., Achenbach, R., Iannantuono, R., & Torem, V. (1992). Topical fish oil in psoriasis—A controlled and blind study. *Clinical and Experimental Dermatology*, 17(3), 159-162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1992.tb00194.x>
- F**
- Fania, L., Didona, D., Di Pietro, F. R., Verkhovskaia, S., Morese, R., Paolino, G., Donati, M., Ricci, F., Coco, V., Ricci, F., Candi, E., Abeni, D., & Dellambra, E. (2021). Cutaneous Squamous Cell Carcinoma : From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020171>
- Feller, S. E., & Gawrisch, K. (2005). Properties of docosahexaenoic-acid-containing lipids and their influence on the function of rhodopsin. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(4), 416-422. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.07.002>
- Figel, S., & Fenstermaker, R. A. (2018). Chapter 18—Cell-Cycle Regulation. In H. B. Newton (Éd.), *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy (Second Edition)* (p. 257-269). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812100-9.00018-8>
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, p. 114-120). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- Fodil, M., Blanckaert, V., Ulmann, L., Mimouni, V., & Chénais, B. (2022). Contribution of n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids to the Prevention of Breast Cancer Risk Factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph19137936>
- Freeman, M. P., Hibbeln, J. R., Wisner, K. L., Davis, J. M., Mischoulon, D., Peet, M., Keck, P. E., Marangell, L. B., Richardson, A. J., Lake, J., & Stoll, A. L. (2006). Omega-3 fatty acids : Evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 67(12), 1954-1967. <https://doi.org/10.4088/jcp.v67n1217>

Freitas, R. D. S., & Campos, M. M. (2019). Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. *Nutrients*, *11*(5), 945. <https://doi.org/10.3390/nu11050945>

G

Ganier, C. (2018). *Potentiel thérapeutique des cellules stromales mésenchymateuses dans l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive*.

Garcia, A., Nelson, K., & Patel, V. (2021). Emerging therapies for rare cutaneous cancers : A systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, *100*, 102266. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102266>

Geng, L., Zhou, W., Liu, B., Wang, X., & Chen, B. (2018a). DHA induces apoptosis of human malignant breast cancer tissues by the TLR-4/PPAR- α pathways. *Oncology Letters*, *15*(3), 2967-2977. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7702>

Geng, L., Zhou, W., Liu, B., Wang, X., & Chen, B. (2018b). DHA induces apoptosis of human malignant breast cancer tissues by the TLR-4/PPAR- α pathways. *Oncology Letters*, *15*(3), 2967-2977. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7702>

Gholizadeh, N., Alipanahi Ramandi, M., Motiee-Langroudi, M., Jafari, M., Sharouny, H., & Sheykhbahaei, N. (2020). Serum and salivary levels of lactate dehydrogenase in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus and oral lichenoid reaction. *BMC Oral Health*, *20*, 314. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01306-0>

Global cancer observatory. (2022). Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2022. <https://gco.iarc.fr/today/en>

Golanski, J., Szymanska, P., & Rozalski, M. (2021). Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Metabolites on Haemostasis—Current Perspectives in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 2394. <https://doi.org/10.3390/ijms22052394>

Grimsrud, P. A., Xie, H., Griffin, T. J., & Bernlohr, D. A. (2008). Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(32), 21837-21841. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700019200>

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, *140*(6), 883-899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>

Gupta, I., Hussein, O., Sastry, K. S., Bougarn, S., Gopinath, N., Chin-Smith, E., Sinha, Y., Korashy, H. M., & Maccalli, C. (2023). Deciphering the complexities of cancer cell immune evasion : Mechanisms and therapeutic implications. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, *8*, 100107. <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2023.100107>

Gutiérrez, S., Svahn, S. L., & Johansson, M. E. (2019). Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20), 5028. <https://doi.org/10.3390/ijms20205028>

H

- Hait, D. S. M. (2012). An Ontological Design : Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis Induced By DMBA and Promoted By Croton Oil. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 01-03.
- Hands, J. M., & Moy, L. (2020). A Review of Exogenous Factors Implicated in the Induction of Cutaneous Melanoma. *SKIN The Journal of Cutaneous Medicine*, 4(3), 200-220. <https://doi.org/10.25251/skin.4.3.2>
- Harwood, C. A., Proby, C. M., & Arron, S. T. (2016). Genomics of SCC : Tumor Formation, Progression, and Future Therapeutic Implications for High-Risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. In C. D. Schmults (Éd.), *High-Risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma : A Practical Guide for Patient Management* (p. 67-102). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47081-7_3
- Harwood, J. L. (2023). Polyunsaturated Fatty Acids : Conversion to Lipid Mediators, Roles in Inflammatory Diseases and Dietary Sources. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8838. <https://doi.org/10.3390/ijms24108838>
- Hashim, N. A., Abdul Mudalip, S. K., Sulaiman, S. Z., & Md Shaarani, S. (2021). Nutritional values and microencapsulation techniques of fish oil from different sources : A mini review. *Materials Today: Proceedings*, 42, 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.849>
- Hedberg, M. L., Berry, C. T., Moshiri, A. S., Xiang, Y., Yeh, C. J., Attilasoy, C., Capell, B. C., & Seykora, J. T. (2022). Molecular Mechanisms of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3478. <https://doi.org/10.3390/ijms23073478>
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(7), 1287-1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>
- Höhn, A., König, J., & Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of Proteomics*, 92, 132-159. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.004>
- Hould, R. (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Centre collégial de développement de matériel didactique (CCDMD). <https://educ.info/xmlui/handle/11515/24954>
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., & Karin, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5412), 316-320. <https://doi.org/10.1126/science.284.5412.316>
- Huang, T.-H., Wang, P.-W., Yang, S.-C., Chou, W.-L., & Fang, J.-Y. (2018). Cosmetic and Therapeutic Applications of Fish Oil's Fatty Acids on the Skin. *Marine Drugs*, 16(8), 256. <https://doi.org/10.3390/md16080256>

I

- Icard, P., & Lincet, H. (2013). [The cancer tumor : A metabolic parasite?]. *Bulletin Du Cancer*, 100(5), 427-433. <https://doi.org/10.1684/bdc.2013.1742>

Im, D.-S. (2012). Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs. *Progress in Lipid Research*, 51(3), 232-237. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.02.003>

Iqbal, M. J., Kabeer, A., Abbas, Z., Siddiqui, H. A., Calina, D., Sharifi-Rad, J., & Cho, W. C. (2024). Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01398-5>

J

Jaleel, S., Gata, A. M., & Zarzoor, A. M. (2024). Assessment of Brain Natriuretic Peptide (BNP) and Lactate Dehydrogenase (LDH) levels in type 2 Diabetic Patients with Cardiovascular Disease. *Journal of Kufa for Chemical Sciences*. [https://www.semanticscholar.org/paper/Assessment-of-Brain-Natriuretic-Peptide-\(BNP\)-and-2-Jaleel-Gata/b75917ad00e678dceac8056c790308a27b3e3ece](https://www.semanticscholar.org/paper/Assessment-of-Brain-Natriuretic-Peptide-(BNP)-and-2-Jaleel-Gata/b75917ad00e678dceac8056c790308a27b3e3ece)

Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., & Srdjenovic, B. U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 17(1), 22-28. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_862_16

Jimenez-Champi, D., Romero-Orejon, F. L., Muñoz, A. M., & Ramos-Escudero, F. (2024). The Revalorization of Fishery By-Products : Types, Bioactive Compounds, and Food Applications. *International Journal of Food Science*, 2024(1), 6624083. <https://doi.org/10.1155/2024/6624083>

Jouanneau, J., Moens, G., Bourgeois, Y., Poupon, M. F., & Thiery, J. P. (1994). A minority of carcinoma cells producing acidic fibroblast growth factor induces a community effect for tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 286-290. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.286>

Jt, B., & Gy, D. (2007). The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 77(5-6). <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.016>

Jump, D. B., Depner, C. M., & Tripathy, S. (2012). Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease : Thematic Review Series: New Lipid and Lipoprotein Targets for the Treatment of Cardiometabolic Diseases. *Journal of Lipid Research*, 53(12), 2525-2545. <https://doi.org/10.1194/jlr.R027904>

K

Kaltschmidt, B., Greiner, J. F. W., Kadhim, H. M., & Kaltschmidt, C. (2018). Subunit-Specific Role of NF-κB in Cancer. *Biomedicines*, 6(2), 44. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020044>

Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M. D. M., Miller, C. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J., & Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), 333-339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>

- Kayali, R., Cakatay, U., Akçay, T., & Altuğ, T. (2006). Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-mitotic tissues of ageing rat. *Cell Biochemistry and Function*, 24(1), 79-85. <https://doi.org/10.1002/cbf.1190>
- Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M.-E., & Cuperlovic-Culf, M. (2020). Role of Glutathione in Cancer : From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*, 10(10), 1429. <https://doi.org/10.3390/biom10101429>
- Khan, A. Q., Khan, R., Qamar, W., Lateef, A., Rehman, M. U., Tahir, M., Ali, F., Hamiza, O. O., Hasan, S. K., & Sultana, S. (2013). Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced oxidative stress and inflammation in mouse skin : Possible role of p38 MAP Kinase and NF-κB. *Experimental and Molecular Pathology*, 94(3), 419-429. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.01.006>
- Klauber, T. C. B., Laursen, J. M., Zucker, D., Brix, S., Jensen, S. S., & Andresen, T. L. (2017). Delivery of TLR7 agonist to monocytes and dendritic cells by DCIR targeted liposomes induces robust production of anti-cancer cytokines. *Acta Biomaterialia*, 53, 367-377. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.072>
- Klaunig, J. E., & Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.014>
- Klein, R., Nagy, O., Tóthová, C., & Chovanová, F. (2020). Clinical and Diagnostic Significance of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes in Animals. *Veterinary Medicine International*, 2020, 5346483. <https://doi.org/10.1155/2020/5346483>
- Km, C., Jx, G., Dm, R., M, M., L, A., J, J., En, S., & Ej, S. (1990). Fatty acid content of marine oil capsules. *Lipids*, 25(9). <https://doi.org/10.1007/BF02537158>
- Köck, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C., & Luger, T. A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha : Evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(6), 1609-1614. <https://doi.org/10.1084/jem.172.6.1609>
- Kokolakis, G., Sabat, R., Krüger-Krasagakis, S., & Eberle, J. (2021). Ambivalent Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Apoptosis of Malignant and Normal Human Keratinocytes. *Skin Pharmacology and Physiology*, 34(2), 94-102. <https://doi.org/10.1159/000513725>
- Kolb, T. M., & Davis, M. A. (2004). The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) provokes a prolonged morphologic response and ERK activation in Tsc2-null renal tumor cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 81(1), 233-242. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh183>
- Kong, Y.-H., & Xu, S.-P. (2018). Salidroside prevents skin carcinogenesis induced by DMBA/TPA in a mouse model through suppression of inflammation and promotion of apoptosis. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6381>

- Kovalchuk, O. (2016). Chapter 32—Chemical Carcinogens and Their Effect on Genome and Epigenome Stability. In I. Kovalchuk & O. Kovalchuk (Éds.), *Genome Stability* (p. 555-567). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803309-8.00032-X>
- Kumah, E., & Bibee, K. (2023). Modelling cutaneous squamous cell carcinoma for laboratory research. *Experimental Dermatology*, 32(2), 117-125. <https://doi.org/10.1111/exd.14706>
- Kundaktepe, B. P., Sozer, V., Durmus, S., Kocael, P. C., Kundaktepe, F. O., Papila, C., Gelisgen, R., & Uzun, H. (2021). The evaluation of oxidative stress parameters in breast and colon cancer. *Medicine*, 100(11), e25104. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025104>
- Kuo, C.-L., Ponneri Babuharisankar, A., Lin, Y.-C., Lien, H.-W., Lo, Y. K., Chou, H.-Y., Tangeda, V., Cheng, L.-C., Cheng, A. N., & Lee, A. Y.-L. (2022). Mitochondrial oxidative stress in the tumor microenvironment and cancer immunoescape : Foe or friend? *Journal of Biomedical Science*, 29(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00859-2>
- Kwon, Y.-J., Ye, D.-J., Baek, H.-S., & Chun, Y.-J. (2018). 7,12-Dimethylbenz[α]anthracene increases cell proliferation and invasion through induction of Wnt/ β -catenin signaling and EMT process. *Environmental Toxicology*, 33(7), 729-742. <https://doi.org/10.1002/tox.22560>
- L**
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., & Hermoso, M. A. (2014). Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research*, 2014(1), 149185. <https://doi.org/10.1155/2014/149185>
- Lee, J., Lee, H., Kang, S., & Park, W. (2016). Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/nu8010023>
- Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H., & Hwang, D. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 16683-16689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011695200>
- Levine, D. I. (1990). Participation, Productivity, and the Firm's Environment. *California Management Review*. <https://doi.org/10.2307/41166630>
- Li, K., Deng, Z., Lei, C., Ding, X., Li, J., & Wang, C. (2024). The Role of Oxidative Stress in Tumorigenesis and Progression. *Cells*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/cells13050441>
- Li, L., Yu, R., Cai, T., Chen, Z., Lan, M., Zou, T., Wang, B., Wang, Q., Zhao, Y., & Cai, Y. (2020). Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. *International Immunopharmacology*, 88, 106939. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106939>
- Li, S., Townes, T., & Na'ara, S. (2024). Current Advances and Challenges in the Management of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Immunosuppressed Patients. *Cancers*, 16(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/cancers16183118>

- Lin, Y., Wang, Y., & Li, P. (2022). Mutual regulation of lactate dehydrogenase and redox robustness. *Frontiers in Physiology, 13*, 1038421. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1038421>
- Lister, R. E. (2008). Overview of Health Benefits of Essential Fatty Acids from Fish Oils. *Nutrition and Health, 19*(3), 165-174. <https://doi.org/10.1177/026010600801900302>
- Liu, B., Park, E., Zhu, F., Bustos, T., Liu, J., Shen, J., Fischer, S. M., & Hu, Y. (2006). A critical role for I κ B kinase α in the development of human and mouse squamous cell carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103*(46), 17202-17207. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604481103>
- Liu, J., Abdelmagid, S. A., Pinelli, C. J., Monk, J. M., Liddle, D. M., Hillyer, L. M., Hucik, B., Silva, A., Subedi, S., Wood, G. A., Robinson, L. E., Muller, W. J., & Ma, D. W. L. (2018). Marine fish oil is more potent than plant-based n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumors. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 55*, 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.12.011>
- Loercher, A., Lee, T. L., Ricker, J. L., Howard, A., Geoghegan, J., Chen, Z., Sunwoo, J. B., Sitcheran, R., Chuang, E. Y., Mitchell, J. B., Baldwin, A. S., Jr., & Van Waes, C. (2004). Nuclear Factor- κ B is an Important Modulator of the Altered Gene Expression Profile and Malignant Phenotype in Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research, 64*(18), 6511-6523. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0852>
- Loftsson, T., Gudmundsdóttir, T. K., Fridriksdóttir, H., Sigurdardóttir, A. M., Thorkelsson, J., Gudmundsson, G., & Hjaltason, B. (1995). Fatty acids from cod-liver oil as skin penetration enhancers. *Die Pharmazie, 50*(3), 188-190.
- Lui, V. W. Y., & Grandis, J. R. (2002). EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Research, 22*(1A), 1-11.

M

- Malau, I. A., Chang, J. P.-C., Lin, Y.-W., Chang, C.-C., Chiu, W.-C., & Su, K.-P. (2024). Omega-3 Fatty Acids and Neuroinflammation in Depression : Targeting Damage-Associated Molecular Patterns and Neural Biomarkers. *Cells, 13*(21), 1791. <https://doi.org/10.3390/cells13211791>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes : The first 30 years. *Nature Reviews Cancer, 3*(6), 459-465. <https://doi.org/10.1038/nrc1097>
- Manjanatha, M. G., Shelton, S. D., Culp, S. J., Blankenship, L. R., & Casciano, D. A. (2000). DNA adduct formation and molecular analysis of in vivo lacI mutations in the mammary tissue of Big Blue rats treated with 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis, 21*(2), 265-273. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.2.265>
- Manoharan, S., Panjamurthy, K., Pugalendi, P., Balakrishnan, S., Rajalingam, K., Vellaichamy, L., & Alias, L. M. (2008). Protective Role of Withaferin-A on Red Blood Cell Integrity During 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Induced Oral Carcinogenesis. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines, 6*(1), 94-102.

- Mansbach, C. M., & Siddiqi, S. A. (2010). The biogenesis of chylomicrons. *Annual Review of Physiology*, 72, 315-333. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135801>
- Mao, J.-H., To, M. D., Perez-Losada, J., Wu, D., Del Rosario, R., & Balmain, A. (2004). Mutually exclusive mutations of the Pten and ras pathways in skin tumor progression. *Genes & Development*, 18(15), 1800-1805. <https://doi.org/10.1101/gad.1213804>
- Marak, N. R., Baruah, U., & Bhattacharya, R. (2020). Fish Oils in Health and Disease. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(11), 1337-1343. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2020.911.157>
- Mardaryev, A. N. (2020). Method to Study Skin CancerSkin cancer : Two-Stage Chemically Induced CarcinogenesisCarcinogenesis in MouseMiceSkin. In N. V. Botchkareva & G. E. Westgate (Éds.), *Molecular Dermatology: Methods and Protocols* (p. 231-238). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0648-3_19
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1), 83-95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00010-X)
- Martillo, A. B. V., García, A. G. V., & García, B. E. C. (2024). SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE SKIN. *EPRA International Journal of Multidisciplinary Research (IJMR)*, 10(10), Article 10.
- Martínez-Cruz, A. B., Santos, M., Lara, M. F., Segrelles, C., Ruiz, S., Moral, M., Lorz, C., García-Escudero, R., & Paramio, J. M. (2008). Spontaneous Squamous Cell Carcinoma Induced by the Somatic Inactivation of Retinoblastoma and Trp53 Tumor Suppressors. *Cancer Research*, 68(3), 683-692. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3049>
- Massey, K. A., & Nicolaou, A. (2011). Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1240-1246. <https://doi.org/10.1042/BST0391240>
- Meital, L. T., Windsor, M. T., Perissiou, M., Schulze, K., Magee, R., Kuballa, A., Golledge, J., Bailey, T. G., Askew, C. D., & Russell, F. D. (2019). Omega-3 fatty acids decrease oxidative stress and inflammation in macrophages from patients with small abdominal aortic aneurysm. *Scientific Reports*, 9, 12978. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49362-z>
- Méndez, L., Muñoz, S., Barros, L., Miralles-Pérez, B., Romeu, M., Ramos-Romero, S., Torres, J. L., & Medina, I. (2023). Combined Intake of Fish Oil and D-Fagomine Prevents High-Fat High-Sucrose Diet-Induced Prediabetes by Modulating Lipotoxicity and Protein Carbonylation in the Kidney. *Antioxidants*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/antiox12030751>
- Mercogliano, M. F., Bruni, S., Mauro, F., Elizalde, P. V., & Schillaci, R. (2021). Harnessing Tumor Necrosis Factor Alpha to Achieve Effective Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 13(3), 564. <https://doi.org/10.3390/cancers13030564>

- Meyer, O. L., Andersen, J. D., Børsting, C., Morling, N., Andersen, M. M., Wulf, H. C., Philipsen, P. A., & Lerche, C. M. (2024). Changes in mouse epidermal DNA methylation during development of squamous cell carcinoma in response to UVR. *Experimental Dermatology*, 33(6), e15123. <https://doi.org/10.1111/exd.15123>
- Michael stange, julia born. (2019). *Small algae, big effect*. <https://elements.evonik.com/en/articles/3-2019/kleine-algen--grosse-wirkung.html>
- Minokawa, Y., Sawada, Y., & Nakamura, M. (2021). The Influences of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Development of Skin Cancers. *Diagnostics*, 11(11), 2149. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11112149>
- Mirunalini, S., & Susmitha, R. (2023). 7, 12- Dimethylbenz[a]anthracene : A potent and multivariant Chemical carcinogen. *Research Journal of Biotechnology*, 18(9), 247-258. <https://doi.org/10.25303/1809rjbt2470258>
- Mohamed, S. A., & Hargest, R. (2022). Surgical anatomy of the skin. *Surgery - Oxford International Edition*, 40(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.021>
- Molfino, A., Amabile, M. I., Mazzucco, S., Biolo, G., Farcomeni, A., Ramaccini, C., Antonaroli, S., Monti, M., & Muscaritoli, M. (2017). Effect of Oral Docosahexaenoic Acid (DHA) Supplementation on DHA Levels and Omega-3 Index in Red Blood Cell Membranes of Breast Cancer Patients. *Frontiers in Physiology*, 8, 549. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00549>
- Monnier, L., & Colette, C. (2011). Acides gras oméga 3 et pathologie cardiovasculaire : La part du vrai: Omega-3 fatty acids and cardiovascular diseases: The part of consistency. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 5(3), 269-277. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(11\)70239-5](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(11)70239-5)
- Montecillo-Aguado, M., Tirado-Rodriguez, B., & Huerta-Yepez, S. (2023). The Involvement of Polyunsaturated Fatty Acids in Apoptosis Mechanisms and Their Implications in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/ijms241411691>
- Moss, B. L., Elhammali, A., Fowlkes, T., Gross, S., Vinjamoori, A., Contag, C. H., & Pivnicka-Worms, D. (2012). Interrogation of Inhibitor of Nuclear Factor κ B α /Nuclear Factor κ B (I κ B α /NF- κ B) Negative Feedback Loop Dynamics. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31359-31370. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364018>
- Mullen, A., Loscher, C. E., & Roche, H. M. (2010). Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(5), 444-450. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.02.008>

N

- Nappo, M., Berkov, S., Massucco, C., Di Maria, V., Bastida, J., Codina, C., Avila, C., Messina, P., Zupo, V., & Zupo, S. (2012). Apoptotic activity of the marine diatom *Cocconeis scutellum* and

- eicosapentaenoic acid in BT20 cells. *Pharmaceutical Biology*, 50(4), 529-535.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2011.611811>
- Nassar, D., Latil, M., Boeckx, B., Lambrechts, D., & Blanpain, C. (2015). Genomic landscape of carcinogen-induced and genetically induced mouse skin squamous cell carcinoma. *Nature Medicine*, 21, 946-954. <https://doi.org/10.1038/nm.3878>
- Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., & Salvayre, R. (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, 153(1), 6-20. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707395>
- Nenu, I., Tudor, D., Filip, A. G., & Baldea, I. (2015). Current position of TNF- α in melanomagenesis. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(9), 6589-6602. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3639-0>
- Nirschl, C. J., Suárez-Fariñas, M., Izar, B., Prakadan, S., Dannenfels, R., Tirosh, I., Liu, Y., Zhu, Q., Devi, K. S. P., Carroll, S. L., Chau, D., Rezaee, M., Kim, T.-G., Huang, R., Fuentes-Duculan, J., Song-Zhao, G. X., Gulati, N., Lowes, M. A., King, S. L., ... Anandasabapathy, N. (2017). IFN γ -Dependent Tissue-Immune Homeostasis Is Co-opted in the Tumor Microenvironment. *Cell*, 170(1), 127-141.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.016>
- Nishimura, R. (1990). [Studies on the pathophysiology of paraneoplastic syndromes : Both cancer cells and host immune cells are responsible for the pathophysiology of leukocytosis associated with oral cancer]. [*Osaka Daigaku Shigaku Zasshi*] *The Journal of Osaka University Dental Society*, 35(1), 147-179.
- O**
- Oliveira, P. A. (2016). Chemical carcinogens. In D. J. Kerr, D. G. Haller, C. J. H. van de Velde, & M. Baumann (Éds.), *Oxford Textbook of Oncology* (p. 0). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/med/9780199656103.003.0016_update_001
- Ono, M. (2008). Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation : Inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Science*, 99(8), 1501-1506. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00853.x>
- Organisation mondiale de la santé. (2024). Cancer : une charge toujours plus lourde dans le monde et des besoins en services croissants. <https://www.who.int/fr/news-room-fact-sheets-detail-cancer>.
- Osman, H., Suriah, A. R., & Law, E. C. (2001). Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. *Food Chemistry*, 73(1), 55-60. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00277-6)
- P**
- Pak, F., Barati, M., Shokrolahi, M., & Kokhaei, P. (2014). Tumor immunology and tumor escape mechanisms from immune response. *Koomesh*, 15(4), Article 4.

- Paramio, J. M. (2023). *Data from Spontaneous Squamous Cell Carcinoma Induced by the Somatic Inactivation of Retinoblastoma and Trp53 Tumor Suppressors*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.c.6497094.v1>
- Park, M., Lim, J. W., & Kim, H. (2018). Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis of Pancreatic Cancer Cells by Suppressing Activation of STAT3 and NF- κ B. *Nutrients*, *10*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/nu10111621>
- Petursdottir, D. H., & Hardardottir, I. (2007). Dietary fish oil increases the number of splenic macrophages secreting TNF-alpha and IL-10 but decreases the secretion of these cytokines by splenic T cells from mice. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 665-670. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.665>
- Pierre Kamina, K. (2009). *Anatomie Tome 1 : Anatomie Clinique* (MALOINE). <https://www.livres-medicaux.com/etudiants-medecine/1679-kamina-anatomie-clinique-4-edition-tome-1-anatomie-generale-membres.html>
- Poggioli, R., Hirani, K., Jogani, V. G., & Ricordi, C. (2023). Modulation of inflammation and immunity by omega-3 fatty acids: A possible role for prevention and to halt disease progression in autoimmune, viral, and age-related disorders. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *27*(15), 7380-7400. https://doi.org/10.26355/eurrev_202308_33310
- Porojnicu, A. C., Bruland, O. S., Aksnes, L., Grant, W. B., & Moan, J. (2008). Sun beds and cod liver oil as vitamin D sources. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, *91*(2-3), 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.02.007>
- Pougovkina, O., te Brinke, H., Ofman, R., van Cruchten, A. G., Kulik, W., Wanders, R. J. A., Houten, S. M., & de Boer, V. C. J. (2014). Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation. *Human Molecular Genetics*, *23*(13), 3513-3522. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu059>
- Puglia, C., Tropea, S., Rizza, L., Santagati, N. A., & Bonina, F. (2005). In vitro percutaneous absorption studies and in vivo evaluation of anti-inflammatory activity of essential fatty acids (EFA) from fish oil extracts. *International Journal of Pharmaceutics*, *299*(1-2), 41-48. <https://doi.org/ames>

R

- Rajala, A., Bhat, M. A., Teel, K., Gopinadhan Nair, G. K., Purcell, L., & Rajala, R. V. S. (2023). The function of lactate dehydrogenase A in retinal neurons: Implications to retinal degenerative diseases. *PNAS Nexus*, *2*(3), pgad038. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad038>
- Reddy, B. S. (2004). Omega-3 fatty acids in colorectal cancer prevention. *International Journal of Cancer*, *112*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1002/ijc.20320>
- Reed, L., Arlt, V. M., & Phillips, D. H. (2018). The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: An in vivo–in vitro paradox. *Carcinogenesis*, *39*(7), 851-859. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy058>

- Reeves, M. Q., Kandyba, E., Harris, S., Del Rosario, R., & Balmain, A. (2018). Multicolour lineage tracing reveals clonal dynamics of squamous carcinoma evolution from initiation to metastasis. *Nature Cell Biology*, 20(6), 699-709. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0109-0>
- Rehman, K., Mohd Amin, M. C. I., Yuen, N. P., & Zulfakar, M. H. (2016). Immunomodulatory Effectiveness of Fish Oil and omega-3 Fatty Acids in Human Non-melanoma Skin Carcinoma Cells. *Journal of Oleo Science*, 65(3), 217-224. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15256>
- Rhodes, L. E., O'Farrell, S., Jackson, M. J., & Friedmann, P. S. (1994). Dietary fish-oil supplementation in humans reduces UVB-erythema sensitivity but increases epidermal lipid peroxidation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 103(2), 151-154. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12392604>
- Rifai, C., Hatta, M., Tabri, F., Sari, D. K., & Dwiyantri, R. (2024). Differentiation of the DMBA Signaling Pathway on the Development of Skin Tumor Based on Histopathological Changing. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences (PJLSS)*, 22(2). <https://doi.org/10.57239/PJLSS-2024-22.2.0056>
- Robertson, R., Guihéneuf, F., Schmid, M., Stengel, D., Fitzgerald, G., Ross, P., & Stanton, C. (2013). *Algae-Derived Polyunsaturated Fatty Acids : Implications for Human Health*. (p. 7x10-(NBC).
- Rogero, M. M., Leão, M. de C., Santana, T. M., Pimentel, M. V. de M. B., Carlini, G. C. G., da Silveira, T. F. F., Gonçalves, R. C., & Castro, I. A. (2020). Potential benefits and risks of omega-3 fatty acids supplementation to patients with COVID-19. *Free Radical Biology and Medicine*, 156, 190-199. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.005>
- Rolver, M. G., Severin, M., & Pedersen, S. F. (2024). Regulation of cancer cell lipid metabolism and oxidative phosphorylation by microenvironmental acidosis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 327(4), C869-C883. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00429.2024>
- Romieu-Mourez, R., Kim, D. W., Shin, S. M., Demicco, E. G., Landesman-Bollag, E., Seldin, D. C., Cardiff, R. D., & Sonenshein, G. E. (2003). Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5738-5754. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5738-5754.2003>
- Ross, B. M., Seguin, J., & Sieswerda, L. E. (2007). Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness : Which disorder and which fatty acid? *Lipids in Health and Disease*, 6, 21. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-21>
- Rovito, D., Giordano, C., Vizza, D., Plastina, P., Barone, I., Casaburi, I., Lanzino, M., De Amicis, F., Sisci, D., Mauro, L., Aquila, S., Catalano, S., Bonofiglio, D., & Andò, S. (2013). Omega-3 PUFA ethanolamides DHEA and EPEA induce autophagy through PPAR γ activation in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 228(6), 1314-1322. <https://doi.org/10.1002/jcp.24288>

S

- Sagar, R., Sahoo, H., & Santani, D. (2014). Chemopreventive potential of *Apium leptophyllum* (Pers.) against DMBA induced skin carcinogenesis model by modulatory influence on. *Indian Journal of Pharmacology*, *46*(5), 531. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.140587>
- Saify, Z. S., Akhtar, S., Hassan, S., Arif, M., Ahmed, F., & Siddiqui, S. (2000). A study on fatty acid composition of fish oil from two marine fish, *Eusphyra blochii* and *Carcharhinus bleekeri*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*(2), 5-12.
- Sakai, Y., Tanaka, M., & Shirakawa, M. (2004). Lymphocyte changes in peripheral blood, spleen, and liver in DMBA-induced squamous cell carcinoma of mouse cheek skin. *Odontology*, *92*(1), 36-42. <https://doi.org/10.1007/s10266-004-0041-6>
- Salem, N., Litman, B., Kim, H. Y., & Gawrisch, K. (2001). Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*, *36*(9), 945-959. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0805-6>
- Santiago-Cardona, P. G. (2012). The Retinoblastoma Protein in Osteogenesis and Osteosarcoma Formation. In *Osteogenesis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/36712>
- Sati, J., Mohanty, B. P., Garg, M. L., & Koul, A. (2016). Pro-Oxidant Role of Silibinin in DMBA/TPA Induced Skin Cancer: 1H NMR Metabolomic and Biochemical Study. *PLOS ONE*, *11*(7), e0158955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158955>
- Schley, P. D., Brindley, D. N., & Field, C. J. (2007). (N-3) PUFA Alter Raft Lipid Composition and Decrease Epidermal Growth Factor Receptor Levels in Lipid Rafts of Human Breast Cancer Cells^{1,2}. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 548-553. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.548>
- Schley, P. D., Jijon, H. B., Robinson, L. E., & Field, C. J. (2005). Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, *92*(2), 187-195. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-2415-z>
- Schuchardt, J. P., & Hahn, A. (2013). Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, *89*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.03.010>
- Ségala, G. (2012). *Principes de l'oncogénèse: Gène et épigénétique*. Futura sciences. <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/5/>
- Serhan, C. N. (2014). Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for Resolution Physiology. *Nature*, *510*(7503), 92-101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>
- Serini, S., Piccioni, E., Merendino, N., & Calviello, G. (2009). Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: Implications for cancer. *Apoptosis*, *14*(2), 135-152. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0298-2>
- Shahidi, F. (2007). 12—Marine oils from seafood waste. In F. Shahidi (Éd.), *Maximising the Value of Marine By-Products* (p. 258-278). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845692087.2.258>

- Sharma, J., Singh, R., & Goyal, P. K. (2016). Chemomodulatory Potential of Flaxseed Oil Against DMBA/Croton Oil–Induced Skin Carcinogenesis in Mice. *Integrative Cancer Therapies*, *15*(3), 358-367. <https://doi.org/10.1177/1534735415608944>
- Shih, V. F.-S., Kearns, J. D., Basak, S., Savinova, O. V., Ghosh, G., & Hoffmann, A. (2009). Kinetic control of negative feedback regulators of NF-kappaB/RelA determines their pathogen- and cytokine-receptor signaling specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(24), 9619-9624. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812367106>
- Šimat, V., Vlahović, J., Soldo, B., Skroza, D., Ljubenković, I., & Generalić Mekinić, I. (2019). Production and Refinement of Omega-3 Rich Oils from Processing By-Products of Farmed Fish Species. *Foods*, *8*(4), 125. <https://doi.org/10.3390/foods8040125>
- Singh, H., Chopra, H., Singh, I., Mohanto, S., Ahmed, M. G., Ghumra, S., Seelan, A., Survase, M., Kumar, A., Mishra, A., Mishra, A. K., & Kamal, M. A. (2024). Molecular targeted therapies for cutaneous squamous cell carcinoma : Recent developments and clinical implications. *EXCLI Journal*, *23*, 300-334. <https://doi.org/10.17179/excli2023-6489>
- Skuladottir, I. H., Petursdottir, D. H., & Hardardottir, I. (2007). The effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on TNF-alpha and IL-10 secretion by murine peritoneal cells in vitro. *Lipids*, *42*(8), 699-706. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3081-1>
- Smyth, M. J., Dunn, G. P., & Schreiber, R. D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting : The roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in Immunology*, *90*, 1-50. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90001-7)
- Sokoła-Wysoczańska, E., Wysoczański, T., Wagner, J., Czyż, K., Bodkowski, R., Lochyński, S., & Patkowska-Sokoła, B. (2018). Polyunsaturated Fatty Acids and Their Potential Therapeutic Role in Cardiovascular System Disorders—A Review. *Nutrients*, *10*(10), 1561. <https://doi.org/10.3390/nu10101561>
- Song, Z.-Q., Li, X., Wang, Y.-K., Du, Z.-Q., & Yang, C.-X. (2017). DMBA acts on cumulus cells to desynchronize nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Scientific Reports*, *7*(1), 1687. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01870-6>
- Sonveaux, P., Végran, F., Verrax, J., De Saedeleer, C. J., Diepart, C., Jordan, B. F., Gallez, B., & Feron, O. (2009). Cancer : Lorsque recycler devient une faiblesse. *médecine/sciences*, *25*(4), 327-329. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009254327>
- Spranger, S., Spaapen, R. M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T. T., & Gajewski, T. F. (2013). Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Science Translational Medicine*, *5*(200), 200ra116-200ra116. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006504>
- Subramanian, V., Venkatesan, B., Tumala, A., & Vellaichamy, E. (2014). Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating

- anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. *Food and Chemical Toxicology*, 66, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.017>
- Suhail, N., Bilal, N., Hasan, S., Ahmad, A., Ashraf, G. Md., & Banu, N. (2015). Chronic unpredictable stress (CUS) enhances the carcinogenic potential of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and accelerates the onset of tumor development in Swiss albino mice. *Cell Stress and Chaperones*, 20(6), 1023-1036. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0632-x>
- Sun, H., Chen, L., Cao, S., Liang, Y., & Xu, Y. (2019). Warburg Effects in Cancer and Normal Proliferating Cells : Two Tales of the Same Name. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 17(3), 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.12.006>
- Sun, Y., Jia, X., Hou, L., Liu, X., & Gao, Q. (2017). Involvement of apoptotic pathways in docosahexaenoic acid-induced benefit in prostate cancer : Pathway-focused gene expression analysis using RT2 Profile PCR Array System. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0442-5>
- Syu, L., Mishra, S., Wu, R., Wilbert, D., Ryan, R., Cho, K., & Dlugosz, A. (2023). LB1665 CRISPR/Cas9-mediated genome editing in postnatal epidermis drives squamous tumor development. *Journal of Investigative Dermatology*, 143(9), B8. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2023.06.036>
- Szlosarek, P., Charles, K. A., & Balkwill, F. R. (2006). Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 42(6), 745-750. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.012>
- T**
- Tago, K., Funakoshi-Tago, M., Ohta, S., Kawata, H., Saitoh, H., Horie, H., Aoki-Ohmura, C., Yamauchi, J., Tanaka, A., Matsugi, J., & Yanagisawa, K. (2019). Oncogenic Ras mutant causes the hyperactivation of NF-κB via acceleration of its transcriptional activation. *Molecular Oncology*, 13(11), 2493-2510. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12580>
- Taher, Dr. A. A., Hossain, Dr. M. I., Ahmed, Dr. A., Habib, Dr. A., Akhi, Dr. M. Z., & Alam, D. M. Z. (2024). Squamous Cell Carcinoma : From Diagnosis to Effective Treatment-A Comprehensive Guide. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 12(10), 1405-1409. <https://doi.org/10.36347/sjams.2024.v12i10.023>
- Talmadge, J. E. (2007). Clonal Selection of Metastasis within the Life History of a Tumor. *Cancer Research*, 67(24), 11471-11475. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2496>
- Tanaka, M., & Iwakiri, Y. (2016). The Hepatic Lymphatic Vascular System : Structure, Function, Markers, and Lymphangiogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(6), 733-749. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.09.002>
- Tandukar, B., Deivendran, D., Chen, L., Cruz-Pacheco, N., Sharma, H., Xu, A., Bandari, A. K., Chen, D. B., George, C., Marty, A., Cho, R. J., Cheng, J., Saylor, D., Gerami, P., Arron, S. T., Bastian,

- B. C., & Shain, A. H. (2024). *Genetic evolution of keratinocytes to cutaneous squamous cell carcinoma* (p. 2024.07.23.604673). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.07.23.604673>
- Tetterton-Kellner, J., Jensen, B. C., & Nguyen, J. (2024). Navigating cancer therapy induced cardiotoxicity : From pathophysiology to treatment innovations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 211, 115361. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115361>
- Thilsted, S. H. (2010). *The potential of nutrient-rich small fish species in aquaculture to improve human nutrition and health*.
- Tilley, S. L., Coffman, T. M., & Koller, B. H. (2001). Mixed messages : Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(1), 15-23. <https://doi.org/10.1172/JCI13416>
- Tini, P., Cinelli, E., Yavorska, M., Donnini, F., Marampon, F., Pastina, P., Rubino, G., Chibbaro, S., Cerase, A., Mazzei, M. A., Di Giacomo, A. M., & Minniti, G. (2024). Serum lactate dehydrogenase as a prognostic marker for treatment response in IDH wild-type glioblastoma patients undergoing stupp protocol. *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11060-024-04862-5>

V

- Vaisali, C., Charanyaa, S., Belur, P. D., & Regupathi, I. (2015). Refining of edible oils : A critical appraisal of current and potential technologies. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1), 13-23. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12657>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., & Loridas, S. (2013). Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer : Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 3886-3907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>
- van der Ploeg, P., Uittenboogaard, A., Thijs, A. M. J., Westgeest, H. M., Boere, I. A., Lambrechts, S., van de Stolpe, A., Bekkers, R. L. M., & Piek, J. M. J. (2021). The effectiveness of monotherapy with PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in ovarian cancer : A meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, 163(2), 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.07.008>
- Vardhan, A. (2018). *Serum LDH levels in oral squamous cell carcinoma patients*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Serum-LDH-levels-in-oral-squamous-cell-carcinoma-Vardhan/ba33c2f81a9c422cfdb56800cf2eb6cf1b2ecb6c>
- Varshney, K., Mazumder, R., Rani, A., Mishra, R., & Khurana, N. (s. d.). Recent Research Trends against Skin Carcinoma—An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 30(34), 2685-2700. <https://doi.org/10.2174/0113816128307653240710044902>
- Vaska, S., Muralakar, P., Chimmalagi, U., & Tv, V. (2023). *Current Trends In Production And Processing Of Fish Oils & Its Chemical Analytical Techniques : An Overview*. 12, 1705-1725.

W

- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., Hu, J., Fleming, I., & Wang, D. W. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1-30. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>
- Wang, X., Belguise, K., Kersual, N., Kirsch, K. H., Mineva, N. D., Galtier, F., Chalbos, D., & Sonenshein, G. E. (2007). Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nature Cell Biology*, 9(4), 470-478. <https://doi.org/10.1038/ncb1559>
- Welzel, J. (2019). From actinic keratosis to squamous cell carcinoma – answers to some open questions. *British Journal of Dermatology*, 180(4), 699-700. <https://doi.org/10.1111/bjd.17637>
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(5), 843-846. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>
- Wheelhouse, N. M., Chan, Y.-S., Gillies, S. E., Caldwell, H., Ross, J. A., Harrison, D. J., & Prost, S. (2003). TNF-alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 12(6), 889-894.
- Wiktorowska-Owczarek, A., Berezińska, M., & Nowak, J. Z. (2015). PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, 24(6), 931-941. <https://doi.org/10.17219/acem/31243>
- Wunderlich, K., Suppa, M., Gandini, S., Lipski, J., White, J. M., & Del Marmol, V. (2024). Risk Factors and Innovations in Risk Assessment for Melanoma, Basal Cell Carcinoma, and Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 16(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/cancers16051016>

X

- Xian, D., Lai, R., Song, J., Xiong, X., & Zhong, J. (2019). Emerging Perspective: Role of Increased ROS and Redox Imbalance in Skin Carcinogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 8127362. <https://doi.org/10.1155/2019/8127362>
- Xiao, W., Liu, H., Lei, Y., Gao, H., Alahmadi, T. A., Peng, H., & Chen, W. (2021). Chemopreventive effect of dieckol against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced skin carcinogenesis model by modulatory influence on biochemical and antioxidant biomarkers. *Environmental Toxicology*, 36(5), 800-810. <https://doi.org/10.1002/tox.23082>
- Xu, Y., & Ye, H. (2022). Progress in understanding the mechanisms of resistance to BCL-2 inhibitors. *Experimental Hematology & Oncology*, 11(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00283-0>

Y

- Yang, A. Y., Lee, J. H., Shu, L., Zhang, C., Su, Z.-Y., Lu, Y., Huang, M.-T., Ramirez, C., Pung, D., Huang, Y., Verzi, M., Hart, R. P., & Kong, A.-N. T. (2014). Genome-wide analysis of DNA methylation in UVB- and DMBA/TPA-induced mouse skin cancer models. *Life sciences*, 113(1-2), 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.031>

- Yang, J., Splittgerber, R., Yull, F. E., Kantrow, S., Ayers, G. D., Karin, M., & Richmond, A. (2010). Conditional ablation of *Ikkb* inhibits melanoma tumor development in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(7), 2563-2574. <https://doi.org/10.1172/JCI42358>
- Yang, J., Zhu, S., Lin, G., Song, C., & He, Z. (2017). Vitamin D enhances omega-3 polyunsaturated fatty acids-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cell Biology International*, *41*(8), 890-897. <https://doi.org/10.1002/cbin.10806>
- Yao, Q.-H., Zhang, X.-C., Fu, T., Gu, J.-Z., Wang, L., Wang, Y., Lai, Y.-B., Wang, Y.-Q., & Guo, Y. (2014). ω -3 polyunsaturated fatty acids inhibit the proliferation of the lung adenocarcinoma cell line A549 in vitro. *Molecular Medicine Reports*, *9*(2), 401-406. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1829>
- Yin, Y., Sui, C., Meng, F., Ma, P., & Jiang, Y. (2017). The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid inhibits proliferation and progression of non-small cell lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K /Akt pathway. *Lipids in Health and Disease*, *16*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0474-x>
- Yousef, H., Alhajj, M., Fakoya, A. O., & Sharma, S. (2025). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., & Hu, H. (2020). Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases : Mechanism and clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>
- Z**
- Zahra, K. F., Lefter, R., Ali, A., Abdellah, E.-C., Trus, C., Ciobica, A., & Timofte, D. (2021). The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology : A Double View on the Role of the Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*(1), 9965916. <https://doi.org/10.1155/2021/9965916>
- Zhang, Z., Miar, Y., Huyben, D., & Colombo, S. M. (2024). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in Atlantic salmon : Functions, requirements, sources, de novo biosynthesis and selective breeding strategies. *Reviews in Aquaculture*, *16*(3), 1030-1041. <https://doi.org/10.1111/raq.12882>

ACTIVITES ET PRODUCTION SCIENTIFIQUE

RESEARCH ARTICLE

Fish Oil's Preventive Effect on Two-Stage Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice: Involvement of NF- κ B Pathways and Oxidative Stress in a Dose- and Route Dependent Manner

Hayeme Cheniti¹ | Assia Kadi¹ | Rym Agred² | Yacine Kadi³ | Meriem Khadidja Djeradi¹ | Hanane Melliti¹ | Nadia Chiheb¹ | Hind Kherfi³ | Mahfoud Messarah¹

¹Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Badji Mokhtar-Annaba University, Annaba, Algeria | ²Biotechnology Research Center (B.T.R.C), Constantine, Algeria | ³Anatomical Pathology Unit, Public Hospital Establishment Azzaba, Skikda, Algeria

Correspondence: Assia Kadi (assia.kadi@univ-annaba.dz) | Hayeme Cheniti (cheniti.hayeme@univ-annaba.org)

Received: 8 August 2024 | **Revised:** 15 December 2024 | **Accepted:** 8 January 2025

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Keywords: croton oil | DMBA | fish oil | NF- κ B | squamous cell carcinoma

ABSTRACT

This study investigated the chemopreventive mechanisms of fish oil (FO) at different doses and administration routes in skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and croton oil (CO) in Swiss albino mice. Seventy mice were divided into 10 groups, including controls and those receiving FO either orally or topically, with or without the carcinogenesis protocol. Warts were morphologically analyzed. Anatomopathological analysis, qRT-PCR of nuclear factor kappa B (NF- κ B) subunits' gene expression, and evaluation of oxidative parameters were conducted. Anatomopathological analysis revealed a presence of invasive squamous cell carcinoma (SCC) in DMBA group. Both oral (500 mg/kg/day) and topical FO treatment showed no signs of cancer, while oral administration at 50 mg/kg/day had no therapeutic effect, and 250 mg/kg/day resulted in low-grade malignancy. Both oral (250 and 500 mg/kg/day) and topical FO significantly reduced NF- κ B1 gene expression, alleviated oxidative stress markers, and restored antioxidant enzyme activities compared to the DMBA group. FO shows dose-dependent chemopreventive effects, with oral administration potentially as effective as topical application when using an appropriate dosage. The development of SCC is linked to the stress status and the upregulation of the canonical NF- κ B pathway, while FO's chemoprotective effects likely result from its downregulation.

1 | Introduction

The skin is a part of the tissue system and is the biggest organ in the human body [1]. Several factors contribute to the development

of skin cancers, including atopy, exposure to ultraviolet radiation, aging, stress, pollution, and in some cases chemical substances. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), a polycyclic aromatic hydrocarbon classified as an organ-specific carcinogen, is notably

Abbreviations: AOPP, advanced oxidation protein products; CAT, catalase; CO, croton oil; DHA, docosahexaenoic acid; DMBA, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene; EPA, eicosapentaenoic acid; FO, fish oil; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; H₂O₂, hydrogen peroxide; IKK1/IKK2, inhibitor NF- κ B kinase; I κ B, NF- κ B inhibitor; LC-PUFAs, long-chain polyunsaturated fatty acids; LPO, lipid peroxidation; MDA, malondialdehyde; NF- κ B, nuclear factor kappa B; NIK, NF- κ B-inducing kinase; PCO, protein carbonyl; RNS, reactive nitrogenated species; ROS, reactive oxygenated species; SCC, squamous cell carcinoma; SOD, superoxide dismutase; TNF, tumor necrosis factor; TRAF3, TNF receptor-associated factor 3; ω -3 FAs, omega-3 fatty acids.

prevalent in skin tumor induction protocols [2]. Skin carcinogenesis induced by DMBA and croton oil (CO) is often characterized by stages of initiation, promotion, and progression, closely resembling the natural development of human tumors [3]. Progression through these phases involves numerous genetic mutations as well as alterations in molecular and cellular mechanisms. The Hras1 gene is identified as a pivotal target during the initiation phase, with DMBA primarily inducing a mutation by converting the purine base (A) to the pyrimidine base (T) at codon 61 of the Hras1 gene [4]. During the promotion phase, mutant cells form clones that possess a proliferative advantage over neighboring cells, enabling selective expansion. This clonal growth of nucleated cells leads to epidermal hyperplasia, culminating in the formation of papillomas characterized by a stromal core surrounded by hyperplastic epidermis [5].

This specific type of cancer arises from a culmination of various cellular and molecular changes. Oxidative stress, particularly during initiation, plays a pivotal role in the onset and progression of the disease [6]. The overproduction of oxygenated (ROS) and nitrogenated (RNS) reactive species creates an imbalance due to antioxidants' inability to neutralize these destabilizing molecules. Structural and functional damage induced by increased oxidative stress triggers various apoptotic signals that eliminate the damaged cells. During tumorigenesis, cancerous cells emit multiple anti-apoptotic and proliferative signals, including nuclear factor kappa B (NF- κ B), which promote survival, angiogenesis, and tumor development [7, 8].

The NF- κ B family consists of five subunits: RelA (p65), c-Rel, RelB, p50, and p52 (Figure 1). There are two pathways of NF- κ B signaling: the canonical and noncanonical (alternative) pathways. In the canonical pathway, NF- κ B dimers (RelA/p50 and c-Rel/p50) are bound to I κ B α in the cytoplasm. Stimulation by cytokines, growth factors, and cellular stresses such as oxidative stress, radiation, or genotoxic agents induces phosphorylation of IKK2, which subsequently phosphorylates I κ B α . Upon degradation of I κ B α via polyubiquitination, NF- κ B dimers translocate to the nucleus, where they bind to specific DNA target sites, inducing the transcription of antiapoptotic genes and promoting tumor growth. In the noncanonical pathway, NF- κ B-inducing kinase (NIK) interacts with TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3) in the cytoplasm. Stimulation by members of the tumor necrosis factor (TNF) family, such as lymphotoxin β , induces membrane translocation of this dimer, leading to degradation of TRAF3, phosphorylation of NIK, and subsequently, phosphorylation of IKK1 via NIK. In the cytoplasm, RelB is associated with P100 (the precursor of p52) as an inhibitor, or with both P100 and p50. IKK1 phosphorylates p100, triggering proteasomal processing that either fully degrades p100 and releases the RelB/p50 dimer, or partially degrades p100 to release the RelB/p52 dimer. Finally, the nuclear translocation of these released NF- κ B dimers (RelB/p50, RelB/p52) leads to transcription of target genes [9]. Fish oil (FO) is rich in long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs), particularly omega-3 fatty acids (ω -3 FAs), which have at least one double bond between the third and fourth carbons from the omega end. The primary ω -3 FAs in FO are eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) [10, 11]. The dietary precursor α -linolenic acid is essential in mammals for synthesizing ω -3 FAs. However, direct absorption from food sources offers a more

efficient assimilation pathway compared to the synthesis process, which involves multiple elongation and desaturation phases [11]. ω -3 FAs are predominantly found in chloroplasts of green plants, plankton, and algae. Their concentration significantly increases up the food chain, leading to comparatively high levels in seafood and marine fish, particularly in their flesh [12]. Studies have demonstrated the beneficial health effects of ω -3 FAs, specifically EPA and DHA, which act as modulators of membrane protein function, precursors to lipid mediators, and regulators of transcription [12]. After intestinal absorption, EPA and DHA are transported via chylomicrons to the liver. There, ω -3 FAs are incorporated into the phospholipid and triglyceride components of very low-density lipoproteins (VLDL) and secreted into the bloodstream, where they are delivered to peripheral tissues for various metabolic functions. These include the synthesis of cellular membranes by integrating into glycerophospholipids, thereby modulating membrane fluidity, flexibility, and structural integrity. Additionally, ω -3 FAs serve as precursors for pro-resolving lipid mediators (such as resolvins, protectins, and maresins), which facilitate the resolution of inflammation and mitigate oxidative stress. Furthermore, they influence key signaling pathways involved in cell growth, differentiation, and the maintenance of tissue homeostasis [10, 13–15]. ω -3 FAs reduce circulating triglycerides and VLDL levels primarily by acting as ligands for nuclear receptors such as peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α). Activation of PPAR- α stimulates β -oxidation of FAs in the mitochondria and peroxisomes, thereby decreasing the availability of FAs for triglyceride synthesis and reducing hepatic VLDL secretion, which helps prevent cardiovascular diseases [16]. Moreover, by acting as ligands for the nuclear receptors PPAR- γ and modulating signaling pathways downstream of cytokine receptors like Interleukin 1 and 6 (IL-1, IL-6) and TNF, EPA, and DHA influence the expression of NF- κ B genes, which are closely associated with inflammation [17, 18]. In recent decades, researchers have extensively studied the effects of EPA and DHA on a range of syndromes and diseases, including inflammation, cardiovascular disease, and cancers like colon, breast, and brain cancer [19–22].

The objective of this study was to assess the preventive effect of FO on DMBA/CO-induced two-stage squamous cell carcinoma (SCC) in Swiss albino mice. We compared, for the first time, the impact of FO dose and delivery method, and examined the expression of NF- κ B 1 and NF- κ B 2 genes to understand the molecular mechanisms involved in EPA and DHA's preventive actions in skin carcinogenesis. The morphological assessment included determining the incidence, number, and volume of papillomas per mouse and per group, as well as calculating the V/N ratio. The potential chemopreventive effect of FO was evaluated through histopathological analysis. Additionally, oxidative stress parameters were measured.

2 | Experimental Section

2.1 | Animals

Male Swiss albino mice, aged 4 weeks and weighing approximately 30 g, were procured from the animal care department of the Pasteur Institute of Algiers, Algeria. The mice were

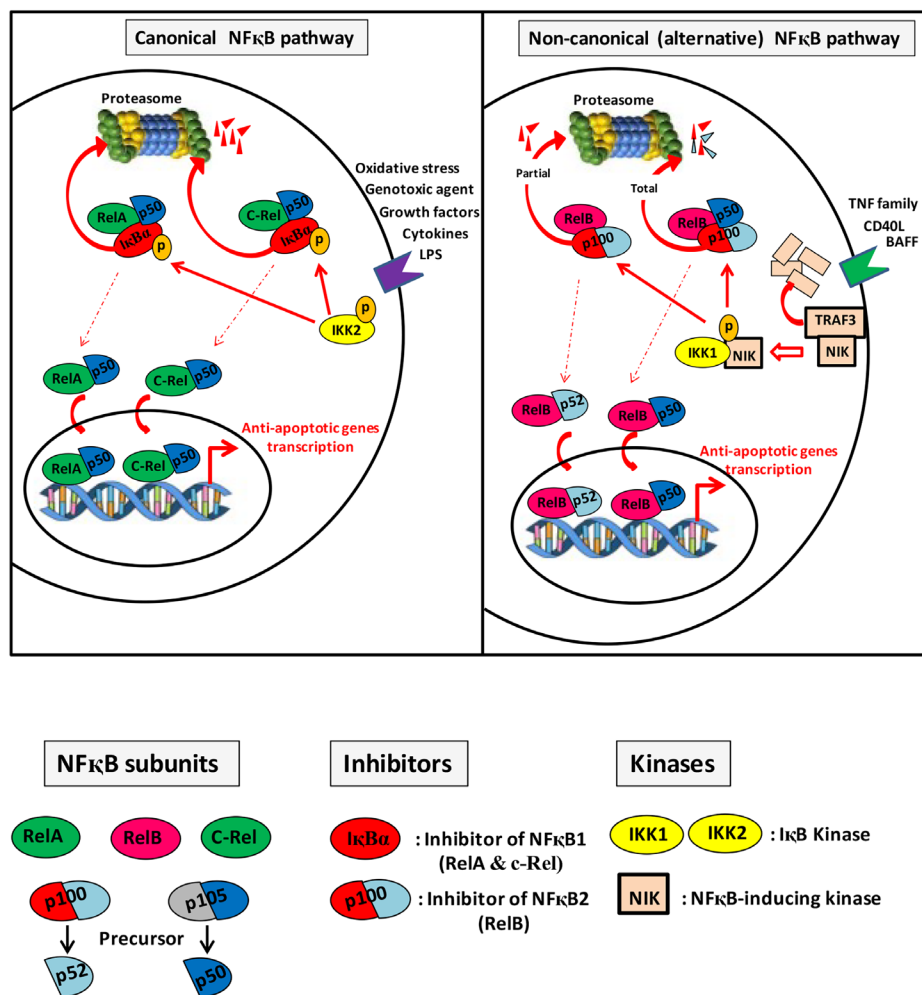


FIGURE 1 | Diagram of canonical and noncanonical signaling pathways of NF- κ B. (This figure was designed based on data available in the existing literature on the canonical and non-canonical signaling pathways of NF- κ B. It is intended to illustrate the molecular mechanisms discussed in the work and does not represent the experimental results obtained in this study).

individually housed in polypropylene cages, which were disinfected every 72 h. They were maintained under a natural photoperiod, with ambient temperature kept stable at $25 \pm 5^\circ\text{C}$ and relative humidity at $40 \pm 5\%$. The mice were fed a standard diet (supplied by the National Livestock Feed Office of Oued Fragha, Guelma, Algeria) and provided with tap water ad libitum. A 1-week acclimatization period was allowed prior to the commencement of the experiment.

2.2 | Chemicals

The FO ω -3 FAs were obtained from Natural Factors (Canada). Each 5 mL of this FO provides 2630 mg of total ω -3 FAs, including 1500 mg of EPA and 750 mg of DHA. DMBA, CO, and all other chemicals used for histopathological and oxidative stress analyses were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), and were of analytical grade.

2.3 | Experimental Protocol

Seventy mice were allocated into 10 groups ($n = 7$) (Figure 2):

Given that 1 mL of FO contains 526 mg of ω -3 FAs, the 30 g mouse was administered ω -3 FAs either by gavage or topically for 16 weeks as follows:

- Group (C): control, Mice were treated with acetone instead of DMBA and CO, and with physiological water instead of FO.
- Group (FO G1): Mice received 150 mg/kg of ω -3 FAs by oral gavage every 3 days, which corresponds to an average daily dose of 50 mg/kg/day (human equivalent dose « HED » : 4.05 mg/kg/day).
- Group (FO G2): Mice received 750 mg/kg of ω -3 FAs by oral gavage every 3 days, which corresponds to an average daily dose of 250 mg/kg/day (human equivalent dose « HED » : 20.27 mg/kg/day).
- Group (FO G3): Mice received 1500 mg/kg of ω -3 FAs by oral gavage every 3 days, which corresponds to an average daily dose of 500 mg/kg/day (human equivalent dose « HED » : 40.54 mg/kg/day).
- Group (FO T): mice received 100 μL of FO by topical application every 3 days, which corresponds to an average daily dose of 584 mg/kg/day.

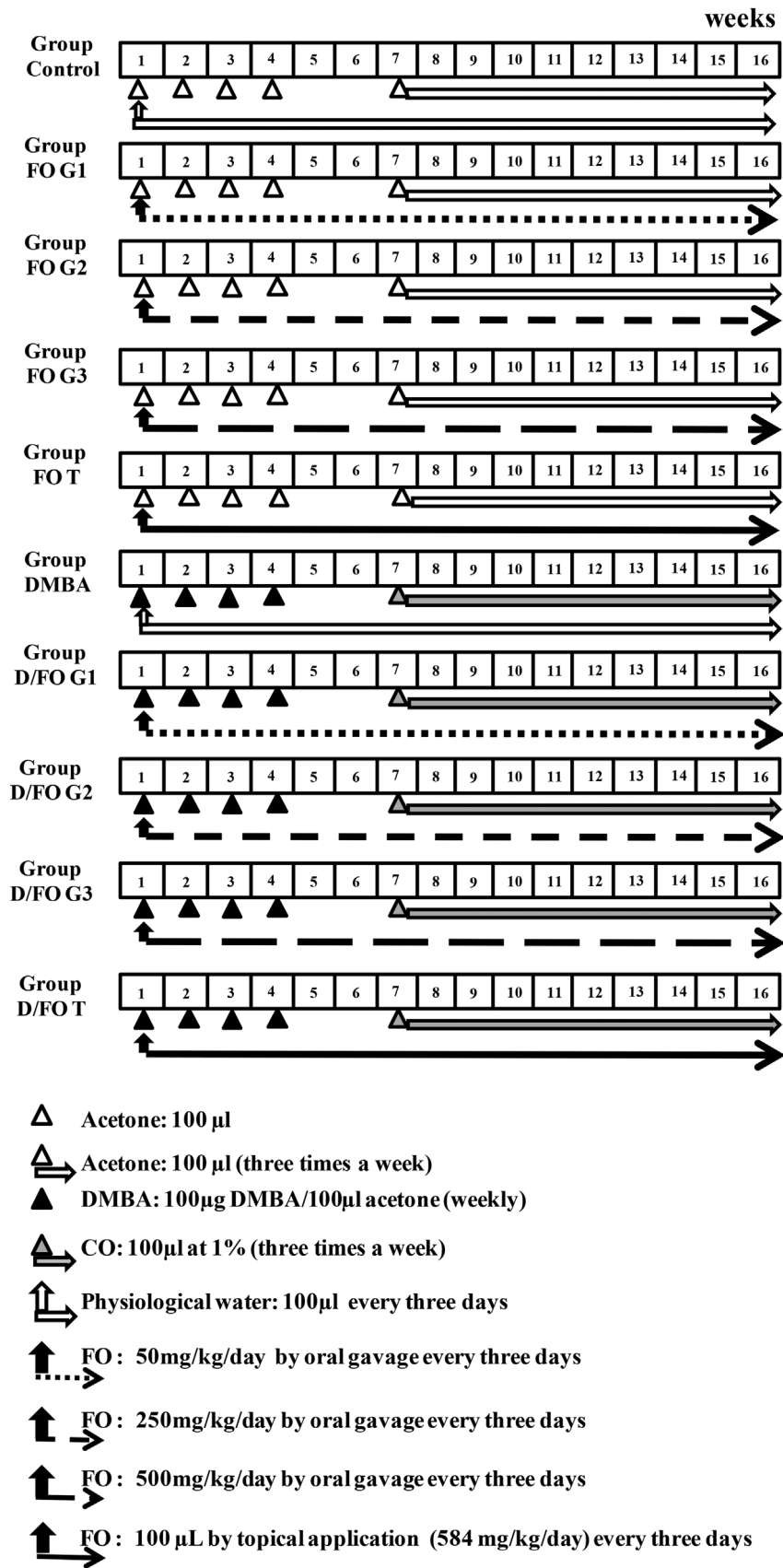


FIGURE 2 | The experimental design procedure.

- Group (DMBA): mice received 100 µg DMBA/100 µL acetone and 100 µL CO at 1%.
- Group (D/FO G1): mice received DMBA/CO/FO (50 mg/kg/day) by oral gavage.
- Group (D/FO G2): mice received DMBA/CO/FO (250 mg/kg/day) by oral gavage.
- Group (D/FO G3): mice received DMBA/CO/FO (500 mg/kg/day) by oral gavage.
- Group (D/FO T): mice received DMBA/CO/FO, 100 µL (584 mg/kg/day) by topical application.

The highest human equivalent dose of 40.54 mg/kg/day, calculated using standard conversion factor, could be achieved through a regular diet, by consuming adequate amounts of fatty fish daily. However, it is more easily attained through dietary supplements, depending on the context of potential therapeutic application.

The oral doses were selected based on preclinical studies reported in the literature [23, 24]. Considering that the mice used in this study were 4 weeks old and weighed only 30 g, placing them in the juvenile development stage, a critical factor for carcinogenesis, we selected a maximum dose well below the known toxicity threshold, as determined in an acute toxicity study conducted on adult rats (2820 mg/kg/day) [25]. In a subchronic study, the same team reported that adult rats can tolerate doses of up to 976 mg/kg/day [26]. Since our study is chronic, this precaution was taken to ensure safety, as the metabolic capacity of young mice may differ from that of adults, making them more susceptible to higher doses.

A single dose was used for topical application due to methodological and biological constraints. Indeed, topical application is limited by the available surface area, which restricts the amount of product that can be applied in a uniform and reproducible manner. Therefore, the topical application was optimized to deliver a standardized dose that was practical within the experimental conditions.

The chemical carcinogenesis protocol for mice involved weekly application of a DMBA solution (100 mg/100 µL acetone) for 4 consecutive weeks. Two weeks after the final DMBA application, a CO solution (1% in acetone) was applied three times weekly to approximately 3 cm² of the shaved dorsal surface. After 16 weeks, papilloma volumes were measured. All animals were euthanized, and skin tissues were harvested for analysis.

2.4 | Morphological Assessment

After completing the protocol period, skin tumors were measured using a caliper, and the following analyses were conducted:

- Tumor incidence: [(number of mice with papillomas/total number of mice in the group) × 100].
- Mean number of papillomas per mouse (*N*).
- Cumulative number of papillomas in the group.
- Mean tumor volume per mouse (*V*) (mm³).

- Tumor burden per group (mm³).

The volumes of papillomas were calculated using the formula: V (mm³) = $4/3 \pi r^3$, where, *r* is the mean tumor radius in millimeters [27].

The ratio of the total volume of papillomas (*V*) to the number of papillomas per group (*N*), known as the *V/N* ratio, was calculated.

2.5 | Preparation of Homogenates

The minced skin tissue samples were homogenized in Tris-buffered saline (TBS, 50 mM, pH 7.4) and centrifuged at 10 000 rpm for 15 min at 4°C. The resulting supernatant was used for oxidative stress assays. Protein content in the homogenates was determined using the Bradford method [28], with bovine serum albumin as the standard.

2.6 | Histopathological Analysis

The collected skin tissues were fixed in 10% formaldehyde for hematoxylin and eosin staining. After fixation, samples were dehydrated through a series of increasing alcohol concentrations and embedded in low-melting-point paraffin wax. Sections of 2–5 µm thickness were prepared and stained with hematoxylin and eosin. Finally, these sections were examined under a digital microscope for evaluation (OX-2000X, 1200 W pixels—China).

2.7 | Determination of Lipid Peroxidation (LPO)

The quantitative measurement of LPO was conducted using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, which determines the condensation rate of malondialdehyde (MDA). A volume of tissue homogenate was added to a reaction mixture containing 150 µL of TBS buffer and 375 µL of Trichloroacetic Acid-Butylated Hydroxytoluene (TCA-BHT). After centrifugation at 1000 × g for 10 min at 4°C, 400 µL of the supernatant was mixed with 80 µL of 0.6 M HCl and 320 µL of TBS buffer. The mixture was then incubated at 80°C for 10 min. The absorbance of the resulting complex was measured spectrophotometrically at 530 nm, and the concentration of TBARS was calculated using an extinction coefficient of 1.56×10^5 /(M cm).

2.8 | Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)

The sample volume was mixed with four volumes of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5). Subsequently, 60 µL of potassium iodide (KI) and 120 µL of acetic acid were added to the mixture. The absorbance of the resulting reaction was measured immediately. The concentration of AOPP for each sample was calculated using an extinction coefficient of 261/(cm mM), and the results were expressed as nmol AOPP/mg of protein.

2.9 | Determination of Protein Carbonyl (PCO) Content

Tissue levels of PCO were determined spectrophotometrically. Samples were incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). After protein precipitation with trichloroacetic acid (TCA) and washing with ethyl acetate (v/v), the pellets were dissolved in guanidine and measured at 370 nm. PCO content was calculated using the molar extinction coefficient of DNPH ($\epsilon = 2.2 \times 10^4/(\text{cm M})$) and expressed as nmol of PCO/mg of protein.

2.10 | Determination of Superoxide Dismutase (SOD) Activity

SOD activity in the skin homogenate was assessed based on its ability to inhibit the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT), resulting in a blue color formation. A mixture containing 50 μL of homogenate, 1830 μL of PBS (pH 7.8), 1 mL of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)/methionine (0.3 mM), 85 μL of NBT (2.6 mM), and 22 μL of riboflavin (0.26 mM) was prepared. The results were expressed as International Units per mg of protein (IU/mg protein), representing the amount of enzyme required to inhibit the NBT reduction rate by 50%.

2.11 | Determination of Catalase (CAT) Activity

CAT activity was determined by measuring the decomposition rate of hydrogen peroxide (H_2O_2) through changes in absorbance at 240 nm over a period of 1 min. For the assay, 780 μL of PBS (pH 7.5), 200 μL of H_2O_2 (500 mM), and 20 μL of the tissue supernatant were mixed to a final volume of 1 mL. Enzyme activity was calculated using an extinction coefficient of 0.043/(mM cm). Results were expressed as μmol of H_2O_2 decomposed per minute per mg of protein ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protein}$).

2.12 | Determination of Glutathione Peroxidase (GPx) Activity

The measurement of GPx enzyme activity involved the reduction of H_2O_2 using reduced glutathione (GSH), which is converted to glutathione disulfide (GSSG). Initially, 0.2 mL of homogenate was combined with 0.4 mL of GSH (0.1 mM) and 0.2 mL of TBS buffer. After incubation in 25°C water bath for 5 min, 0.2 mL of H_2O_2 (1.3 mM) was added. The reaction was halted after 10 min by adding 1 mL TCA (1%). Following centrifugation at 3000 rpm for 10 min, 0.48 mL of supernatant was mixed with 2.2 mL of Na_2HPO_4 (0.32 M) and 0.32 mL of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (1 M). The absorbance was measured at 412 nm. Results were expressed as μmol of reduced glutathione consumed per minute per milligrams of protein ($\mu\text{mol GSH}/\text{min}/\text{mg protein}$).

2.13 | Determination of Reduced Glutathione (GSH) Content

GSH levels were determined by measuring the formation of a yellow color upon reaction with DTNB, which reacts with

sulfhydryl groups. Briefly, tubes containing 800 μL of homogenate supernatant and 200 μL of 0.25% sulfosalicylic acid were centrifuged at 1000 rpm for 15 min. Next, 500 μL of the resulting supernatant was mixed with 10 mM DTNB, 25 μL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), and 500 μL of phosphate. The absorbance was then measured at 412 nm.

Total glutathione (GSH) content was expressed as nmol of GSH per mg of protein (nmol GSH/mg protein).

2.14 | Extraction and Quantification of RNA for NF- κ B Gene Expression

2.14.1 | Extraction of Total RNA

The tissue fragments were pulverized with liquid nitrogen, and total RNA was extracted using NucleoZOL (Macherey-Nagel, CA, USA). RNA purity and concentration were assessed using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific 8000) with an A260/280 ratio approximately equal to 2, confirming high purity and efficiency of the extracted RNA.

2.14.2 | Reverse Transcription and PCR

Total RNA was incubated at 65°C for 5 min using random hexamers in a thermocycler (Applied Biosystems SimpliAmp). Subsequently, cDNA was synthesized using reverse transcriptase (Invitrogen, SuperScript™ IV Reverse Transcriptase, catalog number 18090050) following the manufacturer's protocol.

2.14.3 | Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

The qRT-PCR reaction was conducted using the Applied Biosystems QuantStudio 5 system, with triplicate reactions performed for each sample. Each reaction had a total volume of 10 μL , containing 5 μL of SYBR Green PCR Master Mix (Power SYBR), 0.3 μM of each forward and reverse primer, and 10 ng of cDNA. Amplification was detected over 40 cycles at 95°C for 15 s, 56°C for 15 s, and 72°C for 1 min. Relative quantification was determined using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ analysis method, using β -actin as the reference gene. Primer sequences were synthesized by Macrogen Singapore and validated using Primer-BLAST. β -actin: Forward: GTAAAGACCTCTATGCCAACA Reverse: GGACTCATCGTACTCCTGCT, NF-kB1: Forward: GAAATTCCTGATCCAGACAAAAAC Reverse: ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG, NF-kB2 Forward: CTGGTGGACACATACAGGAAGAC, Reverse: ATAGGCACTGTCTTCTTTACCTC.

3 | Statistical Analysis

All data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Tumor volumes were analyzed using Student's *t*-test, while other experiments were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Sidak test multiple comparisons using GraphPad PRISM version 7 (GraphPad software, Inc., La

TABLE 1 | Effect of oral and topical administration of FO on DMBA/CO induced papillomas in Swiss albino mice.

| | DMBA | D FO/G1 | D FO/G2 | D FO/G3 | D FO/T |
|---|---------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Incidence (%) | 100 (7/7) | 100 (7/7) | 85.7 (6/7) | 100 (6/7) | 71.4 (5/7) |
| Mean number (<i>N</i>) of papillomas per mouse | 8.8 ± 2.29 | 7 ± 1.49 | 4.8 ± 0.87* | 2.8 ± 0.55* | 4.2 ± 1.28* |
| Cumulative number (<i>N</i>) of papillomas | 62 | 42 | 21 | 20 | 24 |
| Mean tumor volume (<i>V</i>) per mouse (mm ³) | 92.60 ± 10.25 | 66.05 ± 25.77 | 34.87 ± 5.92*** | 28.65 ± 4.83*** | 15.87 ± 5.22*** |
| Tumor burden per group (mm ³) | 745.8 ± 25.40 | 355.4 ± 47.69 | 109 ± 5.48*** | 68.18 ± 7.94*** | 50.85 ± 5.74*** |
| V/ <i>N</i> ratio | 12.02 | 8.46 | 5.19 | 3.4 | 2.11 |

Note: Data are presented as mean ± SEM (*n* = 7).

**p* ≤ 0.05.

****p* ≤ 0.001 compared to the DMBA group, as analyzed using Student's *t*-test unpaired.

Jolla, CA, USA). Statistical significance was determined at *p* ≤ 0.05 for all tests.

4 | Results and Discussion

4.1 | Morphological Analysis

The results from topical application of DMBA/CO demonstrated a 100% tumor incidence with a substantial cumulative number of papillomas and tumor burden (Table 1). Both topical and oral administration of FO at a doses of 250 and 500 mg/kg/day significantly reduced the mean number (**p* ≤ 0.05) and volumes (***p* ≤ 0.001) of papillomas as well as overall tumor burden (***p* ≤ 0.001) compared with DMBA group, and also decreased tumor incidence. Oral administration of FO at a dose of 50 mg/kg/day showed less impact. Furthermore, we observed a decrease in the V/*N* ratio in all FO-treated groups compared to the DMBA-only group (12.02). This reduction was more pronounced with topical application of FO compared to oral administration $V/N_{(DMBA)} > V/N_{(D\ FO/G1)} > V/N_{(D\ FO/G2)} > V/N_{(D\ FO/G3)} > V/N_{(D\ FO/T)}$.

Mice in the DMBA group exhibited numerous papillomas with clearly defined irregular outlines (Figure 3). Most papillomas appeared pink, with some areas showing black pigmentation. Papillomas in mice from the D/FO G1 group exhibited a similar appearance to those in the DMBA group. However, mice in the D/FO G2, D/FO G3, and D/FO T groups showed fewer papillomas with regular outlines and a predominantly pink coloration. In contrast, mice in the control groups, FO G1, FO G2, FO G3, and FO T displayed healthy skin with normal color and texture.

4.2 | Histopathological Analysis

Microscopic examination of histological skin sections from the DMBA group revealed mature and invasive SCC that was keratinized and well-differentiated, exhibiting areas of necrosis (Figure 4). Additionally, we observed anisocariosis, anisocytosis, and basophilia due to the presence of hyperchromatic nuclei. Furthermore, the tumor exhibited a capsule with keratinized

pearls and a fibro-inflammatory stroma, accompanied by disorganization of tissue architecture and a necrotic-hemorrhagic appearance.

The administration of 50 mg/kg/day of ω-3 FAs (D/FO G1 group) had no discernible impact compared to the DMBA group. A noninvasive SCC was observed, characterized by the presence of an intraepidermal tumor capsule. Histological sections exhibited nuclear polymorphism, along with anisocariosis, anisocytosis, basophilia, and disorganization of tissue architecture.

Histological sections from mice treated with 250 mg/kg/day of ω-3 FAs concurrent with carcinogenesis (D/FO G2) exhibited signs of low-grade malignancy. Features included anisocytosis, anisokaryosis, pyknotic, and karyorrhectic nuclei, indicative of cell apoptosis. The histological sections from the group treated with 500 mg/kg of ω-3 FAs (D/FO G3) revealed a near-normal appearance, with some evidence of anisokaryosis and no signs of malignancy. Sections from mice treated topically with FO concurrent with carcinogenesis (D/FO T) showed tissues with a normal appearance and absence of malignancy signs. All mice in the control, FO G1, FO G2, FO G3, and FO T groups exhibited normal tissue architecture.

These results underscore the dose- and route-dependent anticarcinogenic effects of FO. DMBA has been shown to promote in-situ tumor growth. The inflammation and oxidative stress induced by tumorigenesis accelerate the initiation and progression of these tumors [2]. The anomalies resulting from the DMBA-induced cancer protocol vary depending on the time interval between the noninvasive lesion stage and the metastatic stage [29, 30]. Studies have reported that a 16-week treatment period can enhance the growth of SCC [6, 31]. When FO is administered, the levels of DHA and EPA increase in the phospholipid membrane, partially replacing arachidonic acid and its metabolites, such as prostaglandins, which play key roles in intracellular signaling pathways involved in cell proliferation and immune surveillance [32]. The preventive efficacy of ω-3 FAs in FO has been demonstrated by their ability to reduce both the multiplicity and volume of breast tumors in mice [33]. Furthermore, concerning the route of administration, it is worth noting that topical treatments are often preferred for skin diseases, as they

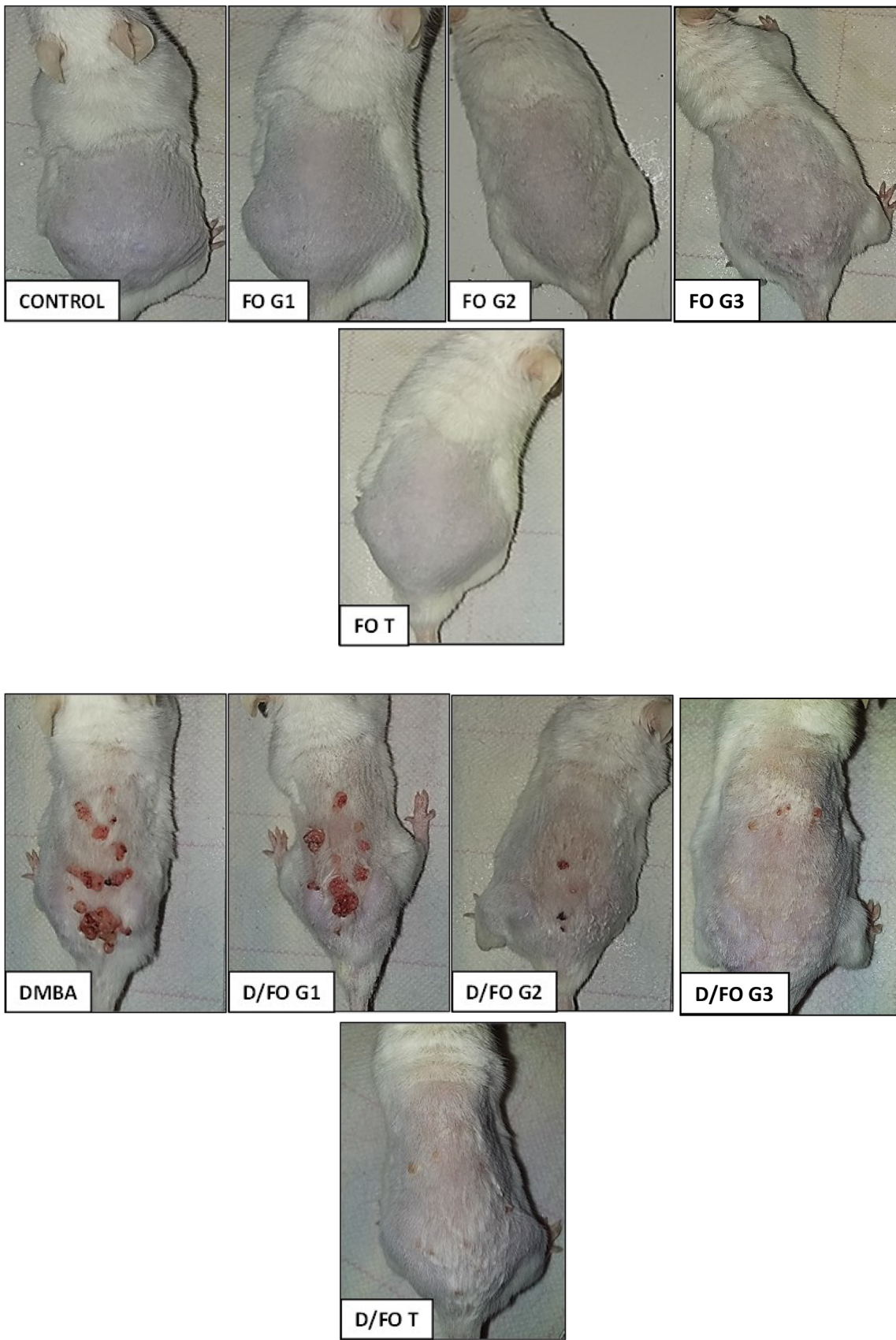


FIGURE 3 | Photographs of mice displaying papillomas in all experimental groups after 16 weeks.

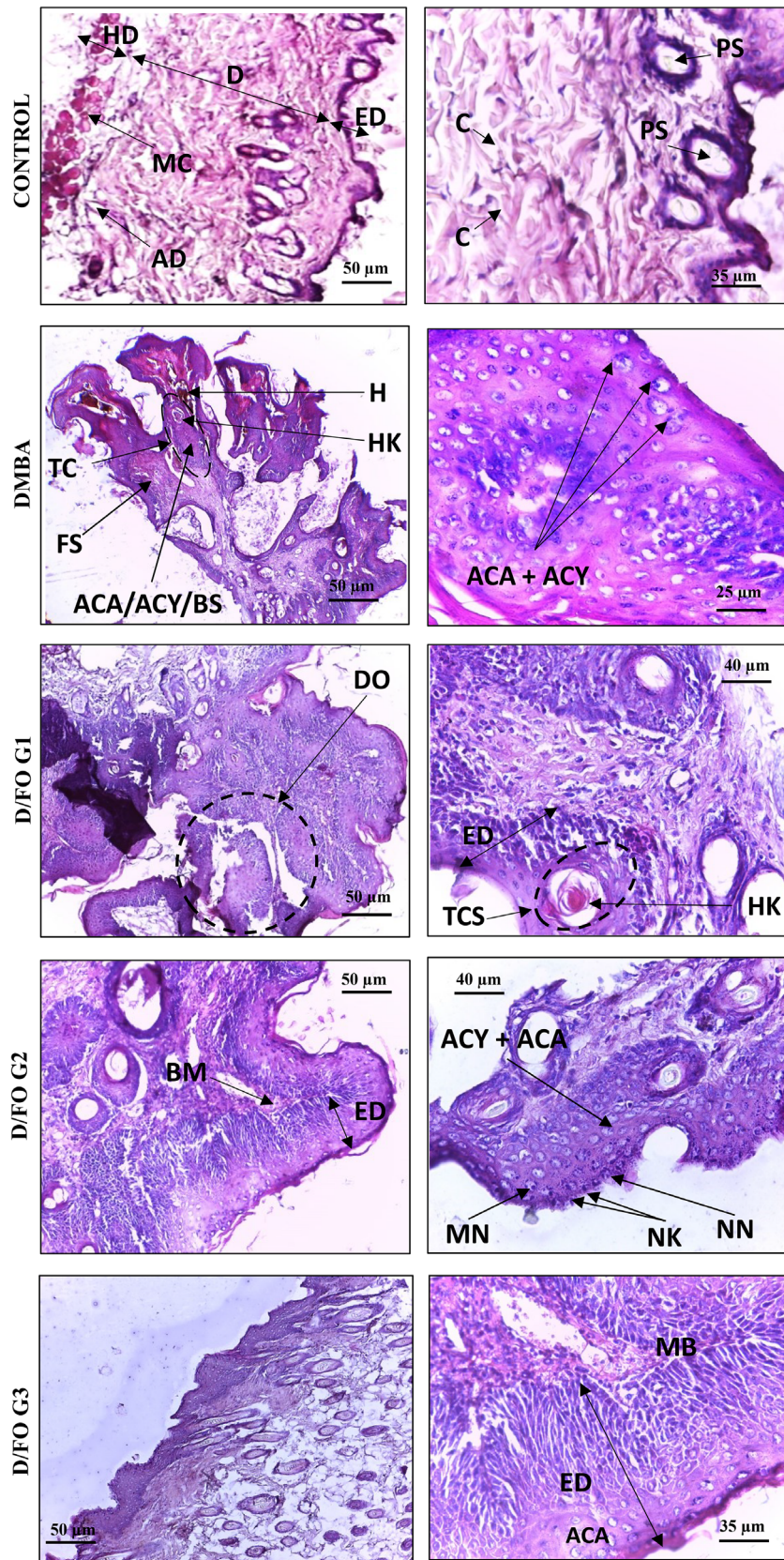


FIGURE 4 | Histopathological analysis of skin sections of control and experimental groups of animals. **HD**: Hypodermis; **D**: Dermis; **ED**: Epidermis; **PS**: pilosebaceous unit; **C**: collagen; **AD**: adipocytes; **MC**: muscle cells; **BM**: basal membrane; **NK**: nuclei in karyorrhexis; **ACA**: anisocaryosis; **ACY**: anisocytosis; **BS**: basophilia; **TC**: tumor capsule; **H**: hemorrhage; **HK**: hyperkeratosis; **MN**: mitotic nuclei; **DO**: architectural disorganization; **TCS**: tumor capsule in situ; **NN**: Pyknotic nuclei; **FS**: fibro-inflammatory stromal cell. (Optical Microscope Leica ICC50 HD x40/x60; scale bar = 25, 35, 40, and 50 μm).

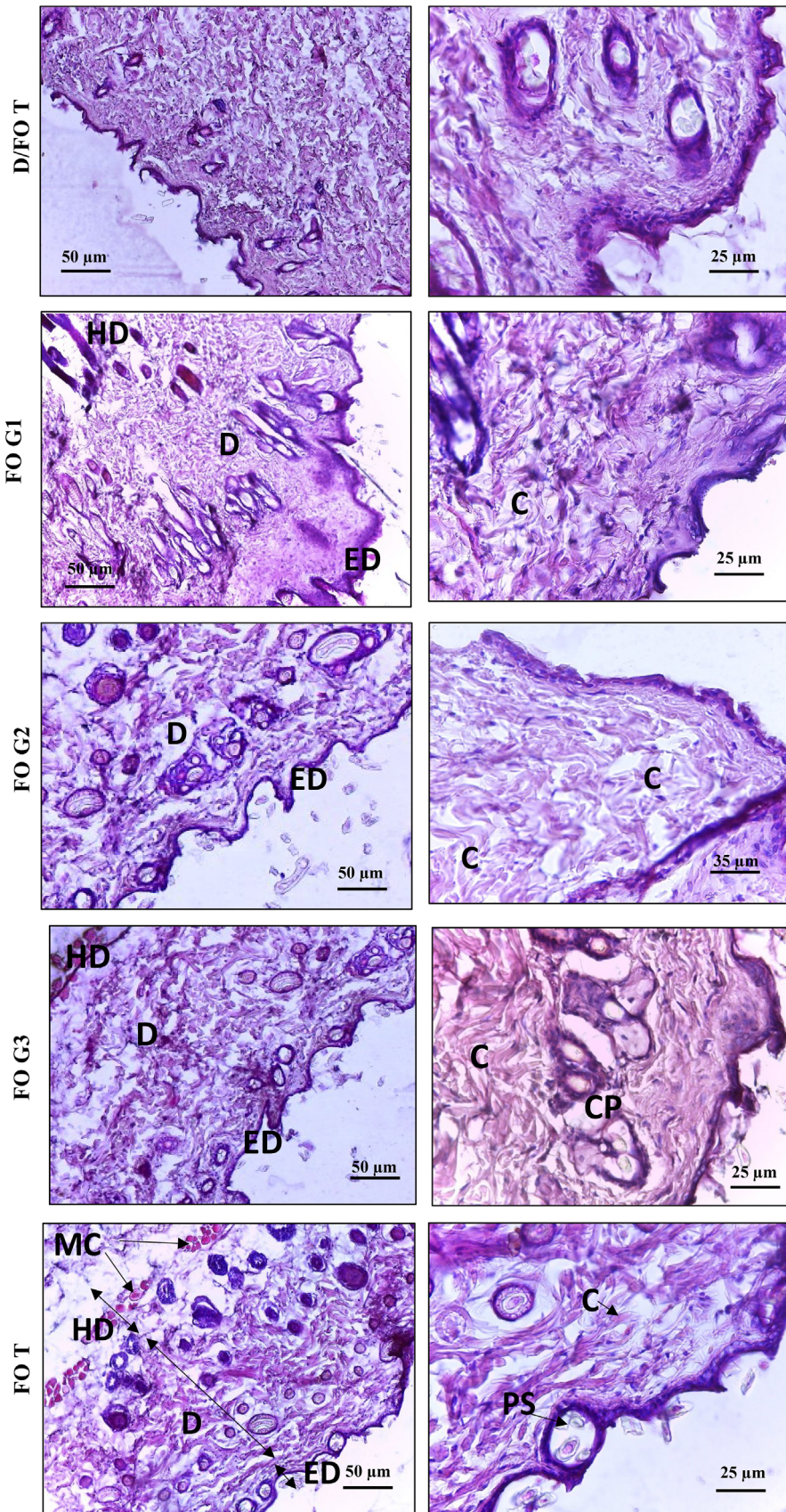


FIGURE 4 | (Continued)

directly target the affected area while minimizing systemic effects [34]. The metabolic fate of FO's FAs when applied topically is less documented compared to oral ingestion. Data reported that when applied topically, ω -3 FAs dissolve and passively diffuse through the lipid membranes of the stratum corneum [35]. They can then reach the deeper layers of the epidermis and dermis, interacting with fibroblasts and blood vessels involved in the skin's inflammatory and repair processes, which may explain the effectiveness of topical application in treating skin disorders. Indeed, topically applied FO have been shown to exhibit anti-inflammatory properties. In a study using a CO model of skin inflammation, FO reduced edema and myeloperoxidase activity, which are markers of inflammation [36]. Locally, ω -3 FAs can also be converted into bioactive lipid mediators that exert anti-inflammatory effects, which are crucial in preventing skin carcinogenesis and compete with arachidonic acid, reducing the production of pro-inflammatory eicosanoids [37]. Although the metabolic transformation of these FAs post-absorption is not fully understood, their ability to reduce inflammation and promote skin health is well-supported by current research. While studies exist on both oral and topical administration of FO, there is a lack of direct comparative studies between these two methods. We suggest that topical application, however, offers a more targeted effect. Unlike oral absorption, where ω -3 FAs must be transported throughout the body and undergo multiple metabolic steps before reaching the skin, local application maximizes the direct delivery of ω -3 FAs to skin cells, potentially altering cellular responses in the treated area.

4.3 | NF- κ B Gene Expression

The results revealed a highly significant upregulation of the NF- κ B1 gene subunit in skin samples from mice in the DMBA group compared to the control group (##### $p \leq 0.0001$) (Figure 5). This expression significantly decreased in the D/FO G2 (** $p \leq 0.001$), D/FO G3 (**** $p \leq 0.0001$) groups compared to the DMBA group. Additionally, NF- κ B1 gene expression was significantly lower in the D/FO G2, D/FO G3, and D/FO T groups compared to the D/FO G1 group (££ $p \leq 0.01$). No significant difference was observed in NF- κ B1 gene expression between mice in the FO G1, FO G2, D/FO G3, and FO T groups compared to the control group. Neither DMBA nor FO administration had any impact on the expression of NF- κ B2 genes in any of the treated groups.

One of the key transcription factors involved in the initiation and progression of tumors is NF- κ B. It also plays a critical role in promoting angiogenesis and tumor metastasis, and it protects cells from apoptotic and necrotic signals [38]. As previously described, under normal cytoplasmic conditions, NF- κ B1 (RelA/p50, cRel/p50) and NF- κ B2 (RelB/p100, RelB/p52) are sequestered by inhibitory proteins: I κ B α for RelA and p100 for RelB. Upon stimulation of the classical (canonical) or alternative pathways, these inhibitors (I κ B and p100) undergo phosphorylation and degradation, releasing active NF- κ B subunits that translocate into the nucleus. This translocation led to the transcription of antiapoptotic genes [9]. The canonical pathway targets genes involved in various processes such as immune response, cell proliferation, apoptosis, and cell survival. In contrast, the alternative pathway induces the transcription

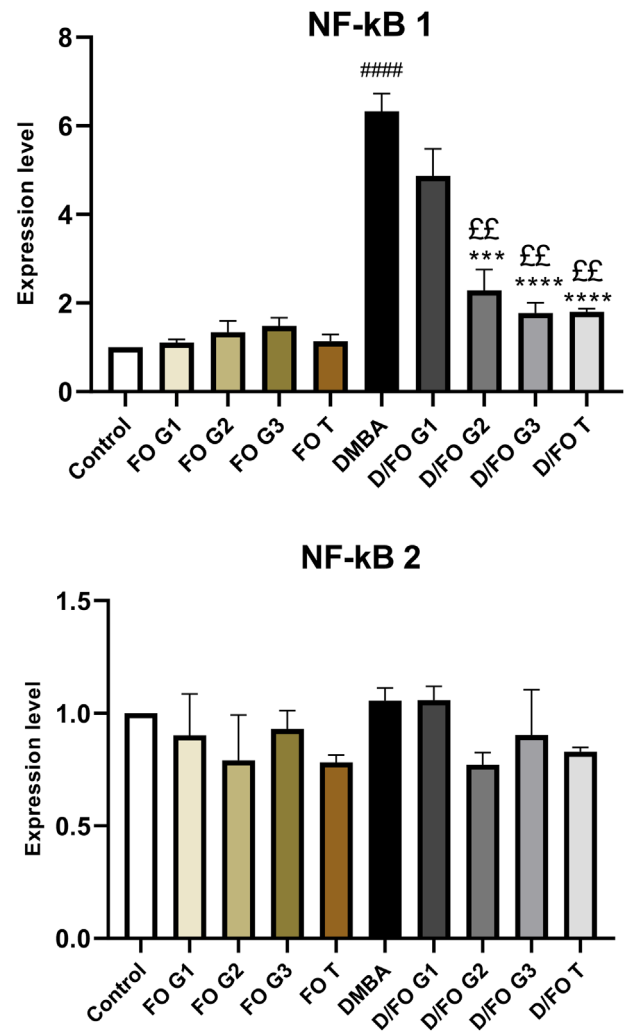


FIGURE 5 | Effect of oral and topical administration of FO on the expression of NF- κ B1 and NF- κ B2 genes in skin tissue of control and experimental groups of mice. RT-qPCR analysis was employed to assess NF- κ B1 and NF- κ B2 mRNA levels. Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 3$ samples as a biological replicate with 3 technical replicate for each sample. ##### $p \leq 0.0001$ versus control; *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ versus DMBA; ££ $p \leq 0.01$ versus D/FO G1, as analyzed with one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.

of genes associated with lymphogenesis and B-cell maturation [39]. When innate immunity triggers inflammation in response to oxidative stress, the canonical NF- κ B signaling pathway is frequently activated [40]. This activation has a dual effect on tumor development. On one hand, during acute inflammation, full activation of NF- κ B stimulates cytotoxic immune cells, aiding in the elimination of altered cells. On the other hand, chronic inflammation, often induced by tumor activity, leads to NF- κ B activation that can support various pro-tumor functions [41, 42].

The elevated expression of NF- κ B1 genes may be associated with the solid tumor process, which primarily depends on canonical signaling via RelA/p50 [43]. While hematopoietic tumors are predominantly associated with NF- κ B2 signaling, which relies on non-canonical signaling through RelB [44]. Indeed, Kong and his research team found that SCC induction by the DMBA/TPA pair activates the I κ B/NF- κ B1 signaling pathway [2]. DMBA is

recognized as a genotoxic agent capable of inducing activating mutations in the H-ras-1 oncogene, which is the most common initiating event in tumorigenesis [45]. Mutant Ras GTPase enhances the transcriptional activation of NF- κ B target genes by phosphorylating the RelA subunit, thereby hyperactivating the canonical NF- κ B pathway [38]. A study using the murine SCC cell line (PAM 212) confirmed that increased expression of NF- κ B1 gene is crucial for tumor formation, serving as a pivotal molecular switch driving both genotypic and phenotypic changes during the malignant progression of this cancer type [46]. Additionally, in a murine model of melanoma, it was demonstrated that activation of the canonical NF- κ B pathway through IKK2 is essential for initiating H-ras-mediated tumorigenesis [47].

Interestingly, other studies have noted nuclear accumulation of RelB/p52 dimers in experimental murine mammary tumors [48, 49]. They also demonstrated that inhibiting RelB led to decreased tumor cell proliferation, implicating RelB in the process of mammary carcinogenesis [48]. Similarly, Wang et al. reported RelB accumulation in invasive breast cancer cells that was independent of estrogen signaling. In these cells, RelB promotes the expression of the anti-apoptotic gene Bcl2 [50]. Furthermore, high RelB expression has been observed in the nuclei of prostate cancer tissues, suggesting the involvement of the alternative NF- κ B pathway in solid cancers [9]. Likewise, studies have demonstrated that IKK1, which is involved in the alternative pathway, plays a significant role in keratinocyte proliferation. Somatic mutations in the IKK1 gene have been identified in SCC, indicating a potential inverse correlation between IKK1 expression and the aggressiveness of this cancer [51]. Finally, Liu's team underscored the pivotal role of IKK1 in human SCC development. They assessed IKK1 expression levels in 114 human SCC samples using immunohistochemical staining. Their findings revealed an inverse correlation between IKK1 expression levels and the aggressiveness of SCC [52]. All these reports corroborate our findings, demonstrating that the invasive SCC induced in the DMBA group predominantly relies on the canonical NF- κ B pathway. Considering this collective evidence, we propose that the NF- κ B pathway implicated in carcinogenesis not only varies between solid and hematopoietic tumors but also exhibits significant dependence on tumor aggressiveness.

According to published research, ω -3 FAs particularly EPA and DHA, reduce NF- κ B activation through multiple mechanisms. They activate PPAR receptors, which interfere with NF- κ B signaling. They also reduce the nuclear expression of RelA and inhibit the degradation of I κ B α , thereby sequestering NF- κ B in the cytoplasm [17, 18, 53]. Due to its highly unsaturated chemical structure, DHA integrates into the phospholipid membrane, where it increases fluidity, disrupts lipid rafts, and thereby alter intracellular signal transduction pathways involved in pro-inflammatory cytokines production and adhesion molecules expression [54]. By altering the membrane environment, DHA reduces the activation of the Toll like receptor (TLR4), a receptor for lipopolysaccharides (LPS), which is one of the signals triggering NF- κ B [55]. Moreover, previous research has demonstrated that, in addition to inhibiting the NF- κ B pathway, EPA and DHA induce apoptosis in human multiple myeloma cells by activating caspase-3. This occurs as a result of changes in the mitochondrial membrane potential, leading to

mitochondrial outer membrane permeabilization and the release of proapoptotic factors [56]. These findings are consistent with our histological results, which revealed karyorrhectic nuclei following treatment with 250 and 500 mg/kg of ω -3 FAs, a clear indicator of cell apoptosis. Our findings demonstrated that the inhibitory effect of FO on NF- κ B1 gene expression increased significantly according to the doses. Furthermore, topical administration proved more effective than gavage. In two consecutive experiments, Allam-Ndoul and colleagues assessed the anti-inflammatory effects of EPA and DHA on the THP-1 macrophage cell line. The results indicated that supplementation with EPA and DHA, either individually or in combination, exhibited a dose-dependent anti-inflammatory effect by inhibiting gene expression and levels of inflammatory cytokines such as TNF α , IL-1B, and IL-6, consequently downregulating NF- κ B signaling [20, 57].

4.4 | Expression of Oxidative Stress Biomarkers AOPP, MDA, and PCO

In assessing the extent of carcinogenic oxidative and cytotoxic damage, this study employed lipid peroxidation markers, namely MDA, and protein oxidation indicators including PCO and AOPP. The results demonstrated a significant increase in MDA (### $p \leq 0.001$), AOPP (#### $p \leq 0.0001$), and PCO (# $p \leq 0.05$) levels in mice of the DMBA group compared to the control (Figure 6). In all groups subjected to the carcinogenesis protocol, FO treatment significantly reduced tissue levels of AOPP when administered either orally (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) or topically (**** $p \leq 0.0001$) compared to the DMBA group. However, PCO levels decreased significantly only with topical application of FO and oral gavage with 500 mg/kg/day (D/FO G3) (* $p \leq 0.05$). MDA levels did not show significant differences, whether FO administered orally or topically. There were no significant differences observed between mice treated only with FO and the control group.

It should be noted that tumor cells continuously produce reactive ROS and RNS throughout their progression. These include nonradicals, such as singlet oxygen (O), peroxides like hydrogen peroxide (H₂O₂), peroxyxynitrite (ONOO⁻), hypochlorous acid (HOCl), and free radical species such as superoxide anion radicals (O₂⁻), hydroxyl radicals (OH[•]), as well as nitrogen monoxide (NO[•]) and nitrogen dioxide (NO₂[•]) [58]. In skin cancer, especially in SCC, these byproducts serve a dual role: first, they overwhelm antioxidant defenses, fostering the initiation and promotion of skin tumors via both genotoxic and non-genotoxic pathways. Second, their accumulation can induce apoptosis, potentially serving as an effective therapeutic approach [59, 60]. When ROS interact with proteins, they can disrupt peptide bonds or initiate oxidation of aromatic and sulfur-containing amino acid side chains. This process can generate OH[•] that lead to intra- or intermolecular crosslinking. Collectively, compounds resulting from ROS-protein interactions are categorized as AOPP [61]. MDA is a naturally occurring product of lipid peroxidation and prostaglandin biosynthesis. It is a mutagenic and potentially carcinogenic molecule formed when phospholipids in cell membranes, especially PUFAs, undergo oxidation in the presence of ROS and RNS [62, 63]. We suggest that ω -3 FAs can act as alternative targets to membrane lipids, safeguarding cellular structures against lipid peroxidation and ROS. Therefore, the

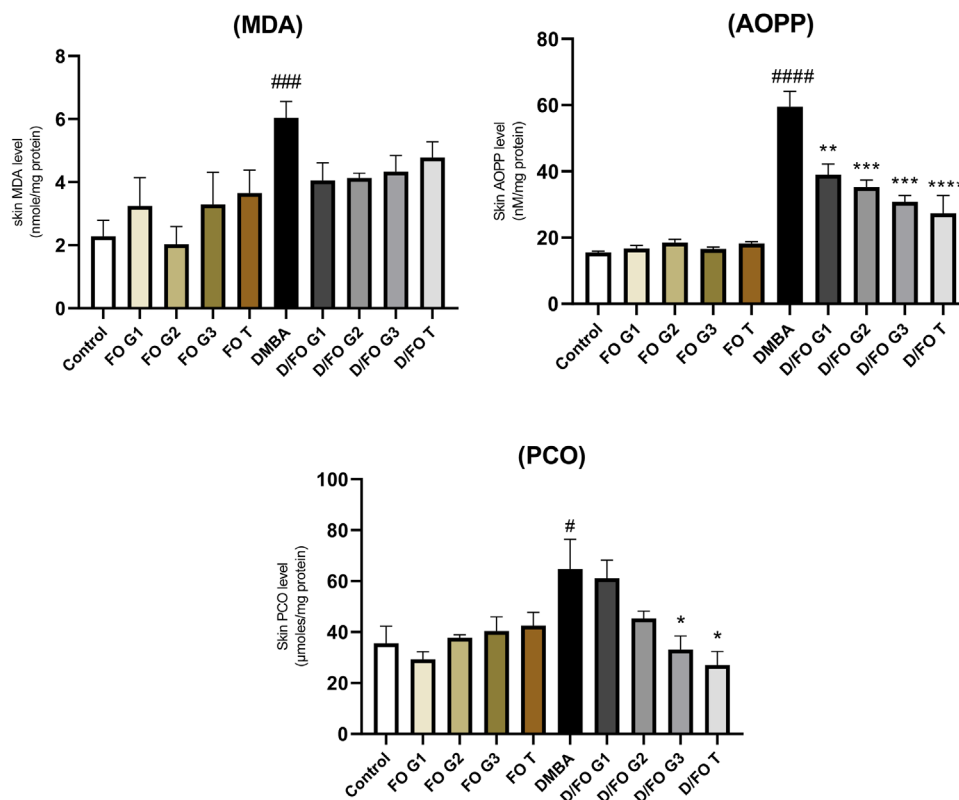


FIGURE 6 | Effect of oral and topical administration of FO on various oxidative stress biomarkers in mouse skin tissue of control and experimental groups. Values are expressed as mean \pm SEM, $n = 5$ samples as a biological replicate. # $p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.001$, #### $p \leq 0.0001$ versus control; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ versus DMBA, as analyzed with one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.

stability in MDA levels with FO supplementation underscores its protective role. Carbonyl stress results from the interaction of reactive carbonylated compounds (RCCs) with amino acids in tissue proteins, notably lysine, cysteine, and histidine residues. RCCs are generated during lipid peroxidation and carbohydrate oxidation processes. This stress progressively impairs protein function, leading to cellular dysfunction, triggering inflammatory responses, and potentially culminating in apoptosis [63, 64]. The notable elevation observed in AOPP, MDA, and PCO levels in the DMBA group are consistent with observations made by Kundaktepe and colleagues during DMBA-induced breast cancer [65]. Finally, the decreased tissue levels of PCO and AOPP, aligning with the results reported by Méndez, who found that combining FO with D-fagomine reduced protein carbonylation and lipotoxicity in rats [66].

4.5 | Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants Activities

The results revealed a significant decrease in both CAT ### ($p \leq 0.001$) and GPx (# $p \leq 0.05$) activities in mice from the DMBA group compared to the control (Figure 7). Simultaneous administration of FO with DMBA significantly restored the activities of SOD, CAT, and GPx enzymes. Interestingly, the administration of 500 mg/kg of FO (D/FO G3) and topical application of FO (D/FO T) resulted in a significant increase in GPx and CAT activity, respectively, compared to oral administration (D/FO G1) ($p \leq 0.05$).

Mice in the DMBA group exhibited elevated GSH levels compared to the control group (## $p \leq 0.01$), which significantly decreased upon orally FO supplementation in the D/FO G1 and D/FO G2) groups (**** $p \leq 0.0001$ and ** $p \leq 0.01$, respectively). No significant differences were observed between mice treated only with FO and the control group.

Enzymatic antioxidants like SOD, CAT, and GPx play a crucial role in neutralizing $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , offering potential preventive effects against carcinogenesis [8, 67]. According to our results, previous studies have shown that DMBA-induced chemical induction of SCC leads to reduced antioxidant enzyme activities [6, 68]. The ω -3 FAs in FO serve a dual role: they act as targets for radical assaults and activate cytoprotective antioxidant enzymes, thereby safeguarding the essential structural integrity of cells [69, 70]. Pedroza and colleagues have reported that administering FO supplements to rats enhances the antioxidant capacity of SOD, GPx, and CAT enzymes [71]. Additionally, research has demonstrated that DHA elevates the levels of these antioxidant enzymes in breast cancer tissues [21].

GSH is a natural, nonenzymatic biological antioxidant that plays a crucial role in cellular redox balance, protecting cells from damage caused by lipid peroxides, ROS, RNS, and xenobiotics such as DMBA [72, 73]. Sharma et al. demonstrated that DMBA-induced tumorigenesis increases metabolite concentrations within tumor cells, leading to elevated ROS levels and subsequent depletion of GSH [31]. Disruption in GSH homeostasis has been implicated in both the onset and treatment of tumorigenesis, highlighting

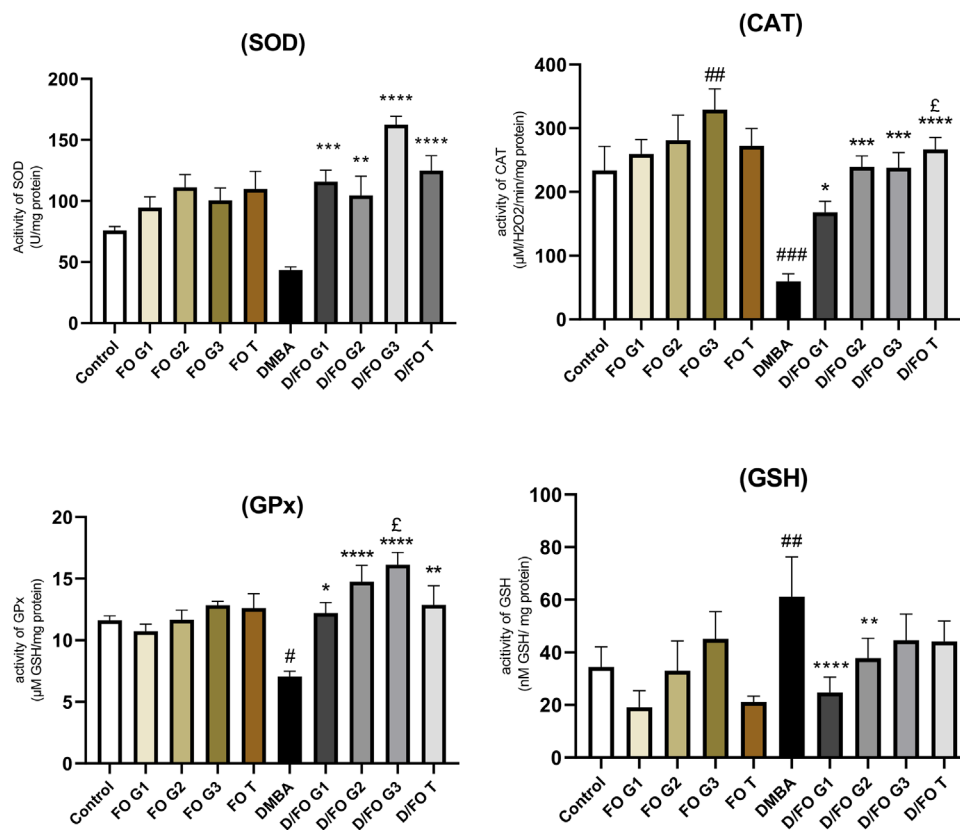


FIGURE 7 | Effect of oral and topical administration of FO on enzymatic and nonenzymatic antioxidant activity in skin tissue of control and experimental groups. Values are expressed as mean \pm SEM, $n = 5$ samples as a biological replicate. # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ versus control; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ versus DMBA; £ $p \leq 0.05$ versus D/FO G1, as analyzed with one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.

its dual protective and pathogenic roles. Indeed, elevated GSH levels in tumor cells are associated with tumor progression [74]. Supplementation with FO in mice undergoing carcinogenesis resulted in decreased GSH levels across all groups, with slight variations in significance depending on dosage and mode of administration. This reduction can be attributed to the increased activity of GPx observed in these groups. These findings align with studies conducted on multiple myeloma cells, which have demonstrated that pretreatment with DHA/EPA significantly reduces cellular GSH levels and alters the expression of related metabolites and key enzymes in GSH metabolism [75]. EPA and DHA exhibit antioxidant potential by lowering endogenous ROS levels and improving cellular redox balance through the inhibition of pro-inflammatory cytokine signaling, and modulation of cytoprotective antioxidant enzymes [69].

5 | Concluding Remarks

Our findings highlight that FO possesses chemopreventive properties capable of reducing and inhibiting the development of induced SCC. Although ω -3 FAs undergo biochemical modifications as they pass through the gastrointestinal tract, oral administration of FO still exerts an inhibitory effect on skin chemical carcinogenesis, with this effect becoming more pronounced as the dose increases. FO's protective effects include the downregulation of NF- κ B1 gene expression and the enhancement

of the antioxidant system. These benefits are more pronounced with topical application than with oral administration. However, given the dose-dependent effects of FO via oral administration, the maximum dose of 500 mg/kg/day of ω -3 FAs led to significant inhibition of carcinogenesis, both morphologically and histologically. This suggests that the oral route could be as effective as the topical route, provided an appropriate dosage is used. However, further research is needed to fully elucidate the mechanisms by which ω -3 FAs influence the NF- κ B signaling pathway. In this context, studying the phosphorylated forms of MAPK pathways is crucial for understanding the regulation of NF- κ B and related processes such as inflammation and carcinogenesis, which could inform the development of more effective preventive strategies against skin cancer.

Acknowledgments

We would like to give special thanks to Dr. Yacine KADI for his assistance and tips. We also thank Dr Rym AGRED for her help with the molecular biology platform.

Ethics Statement

We strictly adhered to the rules of ethics in animal experimentation in accordance with the directive 2010/63/EU for animal experiments and with that of AASAE: Algerian Association of Sciences of Animal Experimentation (Agreement Number 45/DGLPAG/DVA.SDA.14).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

The authors have nothing to report.

References

1. S. Agarwal and K. Krishnamurthy, "Histology, Skin," in: *StatPearls Treasure Island (FL)*: (StatPearls Publishing, 2024), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537325/>.
2. Y. H. Kong and S. P. Xu, "Salidroside Prevents Skin Carcinogenesis Induced by DMBA/TPA in a Mouse Model Through Suppression of Inflammation and Promotion of Apoptosis," *Oncology Reports* 39 (2018): 2513, <https://doi.org/10.3892/or.2018.6381>.
3. A. Y. Yang, J. H. Lee, and L. Shu, "Genome-Wide Analysis of DNA Methylation in UVB- and DMBA/TPA-Induced Mouse Skin Cancer Models," *Life Sciences* 113 (2014): 45, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.031>.
4. K. Brown, A. Buchmann, and A. Balmain, "Carcinogen-Induced Mutations in the Mouse c-Ha-ras Gene Provide Evidence of Multiple Pathways for Tumor Progression," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1990): 538, <https://doi.org/10.1073/pnas.87.2538>.
5. E. L. Abel, J. M. Angel, K. Kiguchi, and J. DiGiovanni, "Multi-Stage Chemical Carcinogenesis in Mouse Skin: Fundamentals and Applications," *Nature Protocols* 4 (2009): 1350, <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.120>.
6. V. Subramanian, B. Venkatesan, A. Tumala, and E. Vellaichamy, "Topical Application of Gallic Acid Suppresses the 7,12-DMBA/Croton Oil Induced Two-Step Skin Carcinogenesis by Modulating Anti-Oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss Albino Mice," *Food and Chemical Toxicology* 66 (2014): 44, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.017>.
7. J. Monga, V. Aggarwal, S. K. Suthar, N. Monika, K. Nongalleima, and M. Sharma, "Topical (+)-Catechin Emulsified Gel Prevents DMBA/TPA-Induced Squamous Cell Carcinoma of the Skin by Modulating Antioxidants and Inflammatory Biomarkers in BALB/c Mice," *Food & Function* 5 (2014): 3197, <https://doi.org/10.1039/c4fo00531g>.
8. W. Xiao, H. Liu, Y. Lei, et al., "Chemopreventive Effect of Dieckol Against 7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene Induced Skin Carcinogenesis Model by Modulatory Influence on Biochemical and Antioxidant Biomarkers," *Environmental Toxicology* 36 (2021): 800, <https://doi.org/10.1002/tox.23082>.
9. V. Baud and E. Jacque, "Voie Alternative D'activation de NF- κ B et Cancer: Amis Ou Ennemis?," *Médecine/Sciences* 24 (2008): 1083, <https://doi.org/10.1051/medsci/200824121083>.
10. A. Goel, N. V. Pothineni, M. Singhal, H. Paydak, T. Saldeen, and J. L. Mehta, "Fish, Fish Oils and Cardioprotection: Promise or Fish Tale?," *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2018): 3703, <https://doi.org/10.3390/ijms19123703>.
11. J. P. de Magalhães, M. Müller, G. E. d Rainger, and W. Steegenga, "Fish Oil Supplements, Longevity and Aging," *Aging* 8 (2016): 1578, <https://doi.org/10.18632/aging.101021>.
12. D. Hishikawa, W. J. Valentine, Y. Iizuka-Hishikawa, H. Shindou, and T. Shimizu, "Metabolism and Functions of Docosahexaenoic Acid-Containing Membrane Glycerophospholipids," *FEBS Letters* 591 (2017): 2730, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12825>.
13. M. Ibarguren, D. J. López, and P. V. Escribá, "The Effect of Natural and Synthetic Fatty Acids on Membrane Structure, Microdomain Organization, Cellular Functions and Human Health," *Biochimica et Biophysica Acta* 1838 (2014): 1518, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.021>.
14. A. Simopoulos, "The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases," *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.) 233 (2008): 674, <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>.
15. R. De Caterina, "n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease," *New England Journal of Medicine* 364 (2011): 2439, <https://doi.org/10.1056/NEJMr1008153>.
16. B. Grygiel-Górniak, "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Ligands: Nutritional and Clinical Implications—A Review," *Nutrition Journal* 13 (2014): 17, <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>.
17. N. G. Bazan, M. F. Molina, and W. C. Gordon, "Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases," *Annual Review of Nutrition* 31 (2011): 321, <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104635>.
18. C. N. Serhan, "Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for Resolution Physiology," *Nature* 510 (2014): 92, <https://doi.org/10.1038/nature13479>.
19. L. Kenar, T. Karayilanoglu, A. Aydin, M. Serdar, S. Kose, and M. K. Erbil, "Protective Effects of Diets Supplemented With Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Calcium Against Colorectal Tumor Formation," *Digestive Diseases and Sciences* 53 (2008): 2177, <https://doi.org/10.1007/s10620-007-0107-8>.
20. B. Allam-Ndoul, F. Guénard, O. Barbier, and M. C. Vohl, "Effect of Different Concentrations of Omega-3 Fatty Acids on Stimulated THP-1 Macrophages," *Genes and Nutrition* 12 (2017): 7, <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0554-6>.
21. L. Geng, W. Zhou, B. Liu, X. Wang, and B. Chen, "DHA Induces Apoptosis of human Malignant Breast Cancer Tissues by the TLR-4/PPAR- α Pathways," *Oncology letters* 15 (2018): 2967, <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7702>.
22. L. Liu, R. Jin, J. Hao, et al., "Consumption of the Fish Oil High-Fat Diet Uncouples Obesity and Mammary Tumor Growth Through Induction of Reactive Oxygen Species in Protumor Macrophages," *Cancer Research* 80 (2020): 2564, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3184>.
23. S. Godea Lupei, D. Ciubotariu, M. Danciu, et al., "Improvement in Serum Lipids and Liver Morphology After Supplementation of the Diet With Fish Oil Is More Evident Under Regular Feeding Conditions Than Under High-Fat or Mixed Diets in Rats," *Lipids in Health and Disease* 19, no. 1 (2020): 162.
24. S. Khadke, P. Mandave, A. Kuvalekar, V. Pandit, M. Karandikar, and N. Mantri, "Synergistic Effect of Omega-3 Fatty Acids and Oral-Hypoglycemic Drug on Lipid Normalization Through Modulation of Hepatic Gene Expression in High Fat Diet With Low Streptozotocin-Induced Diabetic Rats," *Nutrients* 12, no. 12 (2020): 3652, <https://doi.org/10.3390/nu12123652>.
25. L. A. Belcher, S. A. MacKenzie, M. Donner, G. P. Sykes, S. R. Frame, and P. J. Gillies, "Safety Assessment of EPA-Rich Triglyceride Oil Produced From Yeast: Genotoxicity and 28-Day Oral Toxicity in Rats," *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2011, 59(1), 53–63, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.09.007>.
26. S. A. MacKenzie, L. A. Belcher, G. P. Sykes, S. R. Frame, P. Mukerji, and P. J. Gillies, "Safety Assessment of EPA-Rich Oil Produced From Yeast: Results of a 90-Day Subchronic Toxicity Study," *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 58 (2010): 490–500, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.08.021>.
27. J. Sati, B. P. Mohanty, M. L. Garg, and A. Koul, "Pro-Oxidant Role of Silibinin in DMBA/TPA Induced Skin Cancer: 1H NMR Metabolomic and Biochemical Study," *PLOS ONE* 11 (2016): e0158955, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158955>.
28. M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," *Analytical Biochemistry* 72 (1976): 248, <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
29. N. K. Gupta and K. P. Gupta, "Development of Mouse Skin Tumors by 7, 12- dimethylbenz (a) Anthracene and Its Prevention by C-Phycocyanin

- Involve the Regulators of Cell Cycle and Apoptosis,” *Integrative Pharmacology, Toxicology and Genotoxicology* 1 (2015): 61, <https://doi.org/10.15761/IPTG.1000112>.
30. I. Plante, M. K. G. Stewart, K. Barr, A. L. Allan, and D. W. Laird, “Cx43 Suppresses Mammary Tumor Metastasis to the Lung in a Cx43 Mutant Mouse Model of Human Disease,” *Oncogene* 30 (2011): 1681, <https://doi.org/10.1038/onc.2010.551>.
31. J. Sharma, R. Singh, and P. K. Goyal, “Chemomodulatory Potential of Flaxseed Oil against DMBA/Croton Oil-Induced Skin Carcinogenesis in Mice,” *Integrative Cancer Therapies* 15 (2016): 358, <https://doi.org/10.1177/1534735415608944>.
32. B. S. Reddy, “Omega-3 Fatty Acids in Colorectal Cancer Prevention,” *International Journal of Cancer* 112 (2004): 1, <https://doi.org/10.1002/ijc.20320>.
33. J. Liu, S. A. Abdelmagid, C. J. Pinelli, et al., “Marine Fish Oil Is More Potent Than Plant-Based n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention of Mammary Tumors,” *Journal of Nutritional Biochemistry* 55 (2018): 41, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.12.011>.
34. J. K. Cullen, J. L. Simmons, P. G. Parsons, and G. M. Boyle, “Topical Treatments for Skin Cancer,” *Advanced Drug Delivery Reviews* 153 (2020): 54, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.11.002>.
35. C. Puglia, S. Tropea, L. Rizza, N. A. Santagati, and F. Bonina, “In Vitro Percutaneous Absorption Studies and in Vivo Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Essential Fatty Acids (EFA) From Fish Oil Extracts,” *International Journal of Pharmaceutics* 299 (2005): 1–182, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.031>.
36. F. Q. Ames, F. Sato, L. V. de Castro, et al., “Evidence of Anti-Inflammatory Effect and Percutaneous Penetration of a Topically Applied Fish Oil Preparation: A Photoacoustic Spectroscopy Study,” *Journal of Biomedical Optics* 22 (2017): 5, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.5.055003>.
37. S. O. Escobar, R. Achenbach, R. Iannantuono, and V. Toremt, “Opical Fish Oil in Psoriasis—A Controlled and Blind Study,” *Clinical and Experimental Dermatology* 17 (1992): 159–162, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1992.tb00194>.
38. K. Tago, M. Funakoshi-Tago, S. Ohta, et al., “Oncogenic Ras Mutant Causes the Hyperactivation of NF- κ B via Acceleration of Its Transcriptional Activation,” *Molecular Oncology* 13 (2019): 2493, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12580>.
39. H. Yu, L. Lin, Z. Zhang, H. Zhang, and H. Hu, “Targeting NF- κ B Pathway for the Therapy of Diseases: Mechanism and Clinical Study,” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (2020): 1, <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>.
40. Y. Ben-Neriah and M. Karin, “Inflammation Meets Cancer, With NF- κ B as the Matchmaker,” *Nature Immunology* 12 (2011): 715, <https://doi.org/10.1038/ni.2060>.
41. G. P. Dunn, L. J. Old, and R. D. Schreiber, “The Three Es of Cancer Immunoediting,” *Annual Review of Immunology* 22 (2004): 329, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>.
42. M. J. Smyth, G. P. Dunn, and R. D. Schreiber, “Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity,” *Advances in Immunology* 90 (2006): 1, [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90001-7).
43. B. Kaltschmidt, J. F. W. Greiner, H. M. Kadhim, and C. Kaltschmidt, “Subunit-Specific Role of NF- κ B in Cancer,” *Biomedicines* 6 (2018): 44, <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020044>.
44. N. R. Dos Santos, M. Williams, S. Gachet, et al., “RelB-Dependent Stromal Cells Promote T-Cell Leukemogenesis,” *PLOS ONE* 3 (2008): 2555, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002555>.
45. J. H. Mao, M. D. To, J. Perez-Losada, D. Wu, R. Del Rosario, and A. Balmain, “Mutually Exclusive Mutations of the Pten and Ras Pathways in Skin Tumor Progression,” *Genes & Development* 18 (2004): 1800, <https://doi.org/10.1101/gad.1213804>.
46. A. Loercher, T. L. Lee, J. L. Ricker, et al., “Nuclear Factor- κ B Is an Important Modulator of the Altered Gene Expression Profile and Malignant Phenotype in Squamous Cell Carcinoma,” *Cancer Research* 64 (2004): 6511, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0852>.
47. J. Yang, R. Splittgerber, F. E. Yull, et al., “Conditional Ablation of Ikkb Inhibits Melanoma Tumor Development in Mice,” *Journal of Clinical Investigation* 120 (2010): 2563, <https://doi.org/10.1172/JCI42358>.
48. E. G. Demicco, K. T. Kavanagh, R. Romieu-Mourez, et al., “RelB/p52 NF- κ B Complexes Rescue an Early Delay in Mammary Gland Development in Transgenic Mice With Targeted Superrepressor IkkappaB-alpha Expression and Promote Carcinogenesis of the Mammary Gland,” *Molecular and Cellular Biology* 25 (2005): 10136, <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.10136-10147.2005>.
49. R. Romieu-Mourez, D. W. Kim, S. M. Shin, et al., “Mouse Mammary Tumor Virus c-rel Transgenic Mice Develop Mammary Tumors,” *Molecular and Cellular Biology* 23 (2003): 5738, <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5738-5754.2003>.
50. X. Wang, K. Belguise, N. Kersual, et al., “Oestrogen Signalling Inhibits Invasive Phenotype by Repressing RelB and Its Target BCL2,” *Nature Cell Biology* 9 (2007): 470, <https://doi.org/10.1038/ncb1559>.
51. Y. Hu, V. Baud, M. Delhase, et al., “Abnormal Morphogenesis But Intact IKK Activation in Mice Lacking the IKKalpha Subunit of IkkappaB Kinase,” *Science* 284 (1999): 316, <https://doi.org/10.1126/science.284.5412.316>.
52. B. Liu, E. Park, F. Zhu, et al., “A Critical Role for I κ B Kinase α in the Development of Human and Mouse Squamous Cell Carcinomas,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006): 17202, <https://doi.org/10.1073/pnas.0604481103>.
53. A. Mullen, C. E. Loscher, and H. M. Roche, “Anti-Inflammatory Effects of EPA and DHA Are Dependent Upon Time and Dose-Response Elements Associated With LPS Stimulation in THP-1-Derived Macrophages,” *Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (2010): 444, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.02.008>.
54. R. De Caterina, J. K. Liao, and P. Libby, “Fatty Acid Modulation of Endothelial Activation,” *American Journal of Clinical Nutrition* 71 (2000): 213S, <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.213S>.
55. J. Y. Lee, K. H. Sohn, S. H. Rhee, and D. Hwang, “Saturated Fatty Acids, But Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated Through Toll-Like Receptor 4,” *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001): 16683, <https://doi.org/10.1074/jbc.M011695200>.
56. J. Abdi, J. Garssen, J. Faber, and F. A. Redegeld, “Omega-3 Fatty Acids, EPA and DHA Induce Apoptosis and Enhance Drug Sensitivity in Multiple Myeloma Cells But Not in Normal Peripheral Mononuclear Cells,” *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (2014): 1254, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.013>.
57. B. Allam-Ndoul, F. Guénard, O. Barbier, and M. C. Vohl, “Effect of n-3 Fatty Acids on the Expression of Inflammatory Genes in THP-1 Macrophages,” *Lipids in Health and Disease* 15 (2016): 69, <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0241-4>.
58. S. Di Meo, T. T. Reed, P. Venditti, and V. M. Victor, “Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 (2016): 1245049, <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>.
59. D. Xian, R. Lai, J. Song, X. Xiong, and J. Zhong, “Emerging Perspective: Role of Increased ROS and Redox Imbalance in Skin Carcinogenesis,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (2019): 8127362, <https://doi.org/10.1155/2019/8127362>.
60. M. Emanuelli, D. Sartini, E. Molinelli, et al., “The Double-Edged Sword of Oxidative Stress in Skin Damage and Melanoma: From Physiopathology to Therapeutical Approaches,” *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (2022): 612, <https://doi.org/10.3390/antiox11040612>.

61. A. Höhn, J. König, and T. Grune, "Protein Oxidation in Aging and the Removal of Oxidized Proteins," *Journal of Proteomics* 92 (2013): 132, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.004>.
62. L. J. Marnett, "Lipid Peroxidation—DNA Damage by Malondialdehyde," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424 (1999): 83, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00010-X).
63. P. A. Grimsrud, H. Xie, T. J. Griffin, and D. A. Bernlohr, "Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein With Bioactive Aldehydes," *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008): 21837, <https://doi.org/10.1074/jbc.R700019200>.
64. A. Negre-Salvayre, C. Coatrieux, C. Ingueneau, and R. Salvayre, "Advanced Lipid Peroxidation End Products in Oxidative Damage to Proteins. Potential Role in Diseases and Therapeutic Prospects for the Inhibitors," *British Journal of Pharmacology* 153 (2008): 6, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707395>.
65. B. P. Kundaktepe, V. Sozer, S. Durmus, et al., "The Evaluation of Oxidative Stress Parameters in Breast and Colon Cancer," *Medicine* 100 (2021): 25104, <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025104>.
66. L. Méndez, S. Muñoz, L. Barros, et al., "Combined Intake of Fish Oil and D-Fagomine Prevents High-Fat High-Sucrose Diet-Induced Prediabetes by Modulating Lipotoxicity and Protein Carbonylation in the Kidney," *Antioxidants* 12 (2023): 751, <https://doi.org/10.3390/antiox12030751>.
67. A. Valavanidis, T. Vlachogianni, K. Fiotakis, and S. Loidas, "Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis Through Reactive Oxygen Species Mechanisms," *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (2013): 3886, <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>.
68. R. Sagar, H. Sahoo, and D. Santani, "Chemopreventive Potential of *Apium leptophyllum* (Pers.) Against DMBA Induced Skin Carcinogenesis Model by Modulatory Influence on Biochemical and Antioxidant Biomarkers in Swiss Mice," *Indian Journal of Pharmacology* 46 (2014): 531, <https://doi.org/10.4103/0253-7613.140587>.
69. L. T. Meital, M. T. Windsor, M. Perissiou, et al., "Omega-3 Fatty Acids Decrease Oxidative Stress and Inflammation in Macrophages From Patients With Small Abdominal Aortic Aneurysm," *Scientific Reports* 9 (2019): 12978, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49362-z>.
70. L. E. Rhodes, S. O'Farrell, M. J. Jackson, and P. S. Friedmann, "Dietary Fish-Oil Supplementation in Humans Reduces UVB-Erythral Sensitivity But Increases Epidermal Lipid Peroxidation," *Journal of Investigative Dermatology* 103 (1994): 151, <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12392604>.
71. A. A. da Silva Pedroza, A. Lopes, R. F. Mendes da Silva, et al., "Can Fish Oil Supplementation and Physical Training Improve Oxidative Metabolism in Aged Rat Hearts?," *Life Sciences* 137 (2015): 133, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.021>.
72. S. Dasari, M. S. Ganjavi, P. Yellanurkonda, S. Basha, and B. Meriga, "Role of Glutathione S-Transferases in Detoxification of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, Methylcholanthrene," *Chemico-Biological Interactions* 294 (2018): 81, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.023>.
73. N. Suhail, N. Bilal, S. Hasan, A. Ahmad, G. M. Ashraf, and N. Banu, "Chronic Unpredictable Stress (CUS) Enhances the Carcinogenic Potential of 7,12-dimethylbenz(a)Anthracene (DMBA) and Accelerates the Onset of Tumor Development in Swiss Albino Mice," *Cell Stress & Chaperones* 20 (2015): 1023, <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0632-x>.
74. L. Kennedy, J. K. Sandhu, M. E. Harper, and M. Cuperlovic-Culf, "Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies," *Biomolecules* 10 (2020): 1429, <https://doi.org/10.3390/biom10101429>.
75. J. Chen, E. A. Zaal, C. R. Berkers, R. Ruijtenbeek, J. Garssen, and F. A. Redegeld, "Omega-3 Fatty Acids DHA and EPA Reduce Bortezomib Resistance in Multiple Myeloma Cells by Promoting Glutathione Degradation," *Cells* 10 (2021): 2287, <https://doi.org/10.3390/cells10092287>.



CERTIFICATE OF PARTICIPATION



The President of the First International One Health Seminar "IOHS 2024",
(November 27-28, 2024 Annaba, Algeria), certify that:

Hayeme CHENITI

Has presented a **Poster** Communication entitled:

« Carcinome Spino-cellulaire : Impact de l'Application Topique d'Huile de Poisson sur les Paramètres Morphologiques et Anatomopathologiques »

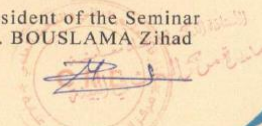
CO-AUTHORS: Assia KADI, Yacine KADI, Hind KHERFI, Nadia CHIHEB et Mahfoud MESSAREH

President of the Organizing Committee
Dr. AOUISSI Hani Amir

Dr. Hani Amir AOUISSI
Maître de Recherche "A"



President of the Seminar
Pr. BOUSLAMA Zihad



People's Democratic Republic of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University August 20, 1955 Skikda
Faculty of Sciences
Department of Agronomic Sciences



Laboratory for the Optimization of Agricultural Production in Sub-humid Zones (LOPAZS)

**INTERNATIONAL SEMINAR ON VALORIZATION OF AGRONOMIC, ECOLOGICAL
AND FOOD RESOURCES (ISVAEFR 2022)- 18, 19 & 20 OCTOBER 2022**

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

The President of the International Seminar on the Valorization of Agronomic, Ecological and Food Resources, certified that :

Mr /Mrs: CHENITI HAYEME

Presented a **poster** communication entitled:

EFFET DE L'HUILE DE POISSON SUR LE DEVELOPPEMENT DES TUMEURS MALIGNES LORS D'UNE CANCEROGENESE CHIMIQUE DE LA PEAU. "COMPARAISON ENTRE DEUX VOIES THERAPEUTIQUES CHEZ DES SOURIS SWISS ALBINO"

CO-AUTEURS : KADI ASSIA, CHIHAB NADIA, DJERRADI M. KHADIDJA, MELLITI HANANE ET MESSARAH MAHFOUD

President of ISVAEFR-2022

Université 20 Août 1955- Skikda
Faculté des Sciences
Département des Sciences Agronomiques
Séminaire International sur la Valorisation des Ressources
Agronomiques, Ecologiques et Alimentaires 18-19-20 Octobre 2022
ISVAEFR 2022



Arab Medical Association Against Cancer (AMAAC)
Algerian Society Of Training & Research In Oncology (SAFRO)



Certificate Of Communication

CHENITI HAYEME, KADI ASSIA, MESSAREH MAHFOUD

Has presented the poster :

ÉVALUATION MORPHOLOGIQUE ET ANATOMOPATHOLOGIQUE D'UNE MISE AU POINT
D'UN MODÈLE ANIMAL D'UN CARCINOME SPINOCELLULAIRE INDUIT PAR LE DMBA ET
L'HUILE DE CROTON "Effets de la dose et de la fréquence d'application dudmba"

At the 14th Oncology Meeting 23-26 November 2022
Sheraton Hotel, Algiers

President of SAFRO
Prof. A. Bounedjar



Activer Win
Accédez aux



Arab Medical Association Against Cancer (AMAAC)
Algerian Society Of Training & Research In Oncology (SAFRO)



Certificate Of Communication

CHENITI HAYEME, ASSIA KADI, MOHAMMED ABDELLAOU, CHIHAB NADIA, ASMA
BOUKHARI, MAHFOUD MESSARAH.

Has presented the poster :

Comparaison du taux de lactate deshydrogenase (ldh) lors d'une cancerogenese chimique de la peau
induite par le 7,12 dimethyl-benz-antracene (dmba)/huile de croton (hc) chez des souris swiss
albinos

At the 14th Oncology Meeting 23-26 November 2022
Sheraton Hotel, Algiers

President of SAFRO
Prof. A. Bounedjar



Activer Win
Accédez aux



CERTIFICATE

Of

PARTICIPATION

Hayeme CHENIT

has participated in 2nd International Conference on Engineering and Applied Natural Sciences on 15-18 October in 2022 at Konya/Turkey.

PAPER TITLE

Carcinogenic Potential Of 7,12 Dimethyl-Benz Antracene, An Environmental Pollutant, In The Induction Of Spinocelular Carcinoma In Swiss Albino Mice

PRESENTATION TYPE

Oral



ICEANS 2022 CONFERENCE CHAIRMAN
Asst. Prof. Dr. Umut ÖZKAYA

Active Windows
Cliquez sur une icône pour accéder aux paramètres

CERTIFICATE

Of

PARTICIPATION

Cheniti Hayeme

has participated in 1st International Conference on Frontiers in Academic Research on 18-21 February in 2023 at Konya/Turkey.

PAPER TITLE

ANTIOXIDANT EFFECT OF FISH OIL IN CHEMICAL CARCINOGENESIS OF THE SKIN

PRESENTATION TYPE

Oral



ICFAR 2023 CONFERENCE CHAIRMAN
Asst. Prof. Dr. Umut ÖZKAYA

Active Windows
Cliquez sur une icône pour accéder aux paramètres



PRAVDURN

PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC OF ALGERIA
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Djilali Bounaâma University of Khemis Miliana
Faculty of Nature and Life Sciences and Earth Sciences
Department of Biological Sciences
Laboratory of Production, Agricultural and Valuation Sustainable Natural Resources



Certificate

of Participation

This certifies that

CHENITI Hayeme,

has actively participated in an 2nd National Seminar of Agrifood and Microbiology of the Environment
and presented a poster communication entitled:

L'huile de poisson, effet de la dose contre une induction chimique d'un carcinome spino-cellulaire chez des souris Swiss albinos

Co-Authors: KADI Assia, CHIHAB Nadia, DJERRADI Meriem Khadidja, MELLITI Hanane et MESSARAH Mahfoud.

Congratulations

In recognition for her active participation in seminar.

This certificate is proudly awarded from ORGANISATOR GROUP on December 5th, 2022.

VISA OF DEAN OF FACULTY



VISA OF PRESIDENT OF AAME-2022

2^{ème} Séminaire National
L'Agronomie et microbiologie
De l'environnement
A.A.M.E 05/12/2022
DR AMROUCHE Fathi

SABC

Société Algérienne de Biologie Clinique

الجمعية الجزائرية للبيولوجيا السريرية

D14

ATTESTATION de COMMUNICATION

LE COMITE SCIENTIFIQUE CERTIFIE QUE

CHENITI HAYEME

A Participé(e) au 8^{ème} Congrès de Biologie Médicale et Médecine de Laboratoire, organisé le 13 et 14 Mars 2022 à Alger, par une
Communication Affichée, Intitulée :

**DESEQUILIBRE DU SYSTEME ANTIOXYDANT LORS D'UNE CANCEROGENESE CHIMIQUE DE LA PEAU INDUITE PAR LE
7,12 DIMETHYL-BENZ-ANTHRACENE (DMBA)/HUILE DE CROTON (HC) CHEZ DES SOURIS SWISS ALBINOS**

Co-Auteurs : KADI ASSIA, BOUKHARI ASMA, DJERRADI MERIEM KHADIDJA, MELLITI HANANE ET MESSARAH MAHFOUD

Président du Comité Scientifique

المركز الاستشفائي الجامعي لباب الوادي
Centre Hospitalier-Université Bab El Oued
Laboratoire Central de Biologie
Pr. M. MAKRELOUF
Chef de Service

Président de la SABC





UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA
Faculté des Sciences, Département de Biochimie
Laboratoire de Recherche de Biochimie et de Toxicologie
Environnementale



Dimanche 19 mai 2024 – Bibliothèque Centrale Sidi Amar
Une journée de vulgarisation scientifique sur

La communication cellulaire et les pathologies associées

Organisée par le Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale

Le Comité d'Organisation a le plaisir de délivrer cette attestation à :

M^{lle} CHENITI Hayeme

Pour sa participation effective à la journée de Vulgarisation Scientifique sur La communication cellulaire et les pathologies associées (JVCCPA) un poster intitulé : **HYPERTENSION**

Co-auteurs: HAMDI Rihem, HAMMADI Djihen, and KADI Assia

Le Directeur du Laboratoire de
Biochimie et de Toxicologie
Environnementale

Pr Messarah Mahfoud

محرر الكيمياء الحيوية
والسُمم البيئي
الأستاذة: الدكتور مزارح محفوظ

La Présidente du Comité
d'Organisation

Dr Alem Karima
Dr. ALEM Karima

Docteur en Biochimie
Université Badji Mokhtar
ANNABA - ALGERIE

Le Chef de Département de
Biochimie

Pr Branes Zidane

رئيس القسم
الأستاذة الدكتور
برانس زيدان



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA
Faculté des Sciences, Département de Biochimie
Laboratoire de Recherche de Biochimie et de Toxicologie
Environnementale



Dimanche 19 mai 2024 – Bibliothèque Centrale Sidi Amar
Une journée de vulgarisation scientifique sur

La communication cellulaire et les pathologies associées

Organisée par le Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale

Le Comité d'Organisation a le plaisir de délivrer cette attestation à :

Miss CHENITI Hayeme

Pour sa participation effective à la **JVCCPA-2024**, en qualité de membre du comité scientifique.

Le Directeur du Laboratoire de
Biochimie et de Toxicologie
Environnementale

Pr Messarah Mahfoud

Pr. MESSARAH Mahfoud
Université Badji Mokhtar - ANNABA
Directeur
Le Labo
de Biochimie et Toxicologie Environnementale

La Présidente du Comité
d'Organisation

Dr Alem Karima

Dr. ALEM Karima
Docteur en Biochimie
Université Badji Mokhtar
ANNABA - ALGERIE

Le Chef de Département de
Biochimie

Pr Branes Zidane

رئيس القسم
الأستاذة الدكتور
برانس زيدان





CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certifies that

HOUYEM CHENITI

has attended the international virtual lab workshop

**The Research Practicum: Conceiving,
Testing, and Validating an idea.**



October, 22nd 2022

Date

Meriem BELABED, PhD

Postdoctoral Fellow, Icahn School of Medicine at
Mount Sinai & immuNOfrontiers founder