

**UNIVERSITÉ BLIDA 1**

**Faculté des Sciences**

**Département de physique**

**THÈSE DE DOCTORAT**

En Physique fondamentale et appliquée

**ETUDE DES OLIGO-ELEMENTS DANS LE SANG TOTAL DES  
PATIENTS ATTEINTS DE PATHOLOGIES CANCEREUSES AU  
MOYEN DE LA TECHNIQUE XRF**

Par

**Loubaba LAHMAR**

Devant le jury composé de :

Mr. M. Derbal	Professeur, Blida1	Président
Mr. A. Rouibi	Professeur, Blida1	Examineur
M <sup>elle</sup> . F. Zermane	Professeur, Blida1	Examinatrice
Mr. M.E.A. Benamar	Professeur, CU.Temanghasset	Directeur de thèse
Mr. Y. Mebdoua	Directeur de recherche, CDTA	Co-directeur de thèse

Blida, Décembre 2020

الى مرضى السرطان

الى المحاربين الأشرار

الى من يواجمون هذا المرض

الى من جعلوا لهذا العمل معنى

الى كل الارواح التي اُضيفت لهذه الاحصاءات الجادة

الى من ذكروا كرموز عينات

الى اولئك الذين غادرونا اولاً

الى اولئك الذين مازالوا يكمفحون

الى كل من لم يسعني ذكركم، برغم من حمزيد عظمي نحم

بارك الله فيكم وشفاكم الله ورعكم

## الملخص:

الزنك، النحاس والحديد من المعادن الاساسية في الجسم التي تتدخل بشكل ما بالإصابة بمرض السرطان. تهدف هذه الدراسة الى تقييم تراكيز هذه العناصر النزرية في عينات الدم لمرضى سرطان جزائريين مقارنة بأصحاء لكلي الجنسين. تم الحصول على عينات الدم للمصابين بداء السرطان من المستشفى الجامعي للبلدية "فرانس فانون" قسم الأورام، حيث تم نقلها لجامعة البلية مخبر الفيزياء الاساسية والتطبيقية لاستخدام تقنية نووية لتحليل الاشعة وهي الومضان بالأشعة السينية. تم هذا بعد ان حللت العينات وُعولجت كيميائيا بطريقة الهضم الرطب للتخلص من الجزء العضوي في الدم. وبعدها طُبِق الاختبار ANOVA One Way في التحليل الاحصائي.

أعطى تحليل تركيز الحديد بتقنية ومضان الاشعة السينية في دم 80 مصابا و98 أصحاء تركيزا متوسطا 1496 مكغ/ل للمرضى مع 1493 مكغ/ل للأصحاء. بعد المقارنة الاحصائية لهذه النتائج عبرت عن عدم وجود اختلاف لكل من متوسط التراكيز لكلا الحالتين بالنسبة للحديد.

كما تم تحليل نفس هذه العينات لمعاينة متوسط تراكيز الزنك والنحاس بتقنية ومضان الاشعة السينية؛ كانت التراكيز المتوسطة للمرضى والاصحاء على التوالي، الزنك: 1344 مكغ/ل و1266 مكغ/ل.

النحاس: 1078 و1172 مكغ/ل وكان هناك فرق كبير بينهما ( $p > 0.05$ )

تراكيز النحاس للمرضى والاصحاء لكلا الجنسين هي على التوالي 1201 و1085 مكغ/ل للنساء و 1148 و1070 مكغ/ل للرجال. اما بالنسبة للزنك 1310 و1325 مكغ/ل للنساء و1231 و1368 مكغ/ل للرجال. التحليل الاحصائي للعنصرين في كلا الجنسين عبر عن وجود انخفاض كبير عند النساء بالنسبة للنحاس على عكس الزنك فقد لوحظ وجود ارتفاع كبير لدى الرجال .

ايضا استطعنا أن نعبر عن العلاقة بين تقدم العمر ونسبة تراكيز العناصر النزرية بمعادلة

تجريبية هي:

$$[TE] = e^{y_0 \ln x} + e^{a_1 \ln x e^{-x/t_1}}$$

كما ودرسنا نسب العناصر النزرية مع مرضى السرطان الرئوي تحديدا والأصحاء المدخنين وغير المدخنين، هناك علاقة نسبية بين نسب التركيز عند المدخنين ومرضى سرطان الرئة مقارنة بالأصحاء الغير مدخنين.

**الكلمات المفتاحية:** العناصر النزرية، الزنك، الحديد، النحاس، السرطان، ومضان بالأشعة السينية.

## Abstract

Zinc, copper and iron are among the essential minerals in the body with direct impact in cancer. This study aims to assess the concentrations of these trace elements in the blood samples from Algerian cancer patients compared to healthy subjects. Blood samples taken for cancer patients at the Blida University Hospital "France Fanon" oncology department. Where it transferred to the laboratory of fundamental and applied physics to use nuclear technology to analyze the samples, which is X-ray fluorescence. This done after the samples treated chemically with wet digestion to remove the organic part from the blood. Then, the ANOVA One-Way test applied to the statistical analysis.

Analysis the concentration of iron with the X-ray fluorescence technique in the blood of 80 patients and 98 healthy subjects gave a mean concentration of 1496 µg/l for patients with 1493 µg/l for healthy subjects. After the statistical comparison of these results, it expressed that there was no difference between the mean concentrations in the two groups for iron. The same samples were analyzed of zinc and copper. The concentrations for patients and healthy subjects were zinc: 1344 µg/l and 1266 µg/l, respectively. Copper: 1078 and 1172 µg/l and there was a significant difference between them ( $p > 0.05$ ).

The concentrations of patients and healthy subjects of copper for the two genders are respectively, 1201 and 1085 µg/l for women and 1148 and 1070 µg/l for men. As for zinc 1310 and 1325 µg/l for women and 1231, 1368 µg/l for men. Statistical analysis of the two trace elements in both genders showed that there was a significant decrease in women compared to copper, unlike zinc, a significant increase was observed in men.

In addition, we were able to express the relationship between age and the rate of trace element concentrations in an experimental equation :

$$[TE] = e^{y_0 \ln x} + e^{a_1 \ln x e^{-x/t_1}}$$

We have also studied the levels of trace elements in patients with lung cancer in particular and in healthy smokers and non-smokers. There is a relative relationship between the concentration of smokers and lung cancer patients compared to healthy non-smokers.

**Keywords** : trace elements, zinc, iron, copper, cancer, X-ray fluorescence.

## Résumé

Le zinc, le cuivre et le fer sont parmi les minéraux essentiels de l'organisme qui interfèrent d'une manière ou d'une autre avec le cancer. Cette étude vise à évaluer les concentrations de ces oligo-éléments dans les échantillons sanguins de patients cancéreux algériens par rapport à des sujets sains. Des échantillons de sang ont été prélevés pour des patients cancéreux à l'hôpital universitaire de Blida, "France Fanon", service d'oncologie. Où elle a été transférée à l'Université de Blida, au laboratoire de physique fondamentale et appliquée pour utiliser une technologie nucléaire pour analyser les échantillons, qui est la fluorescence des rayons X. Cela a été fait après que les échantillons ont été traités chimiquement avec une digestion humide pour éliminer la partie organique du sang. Ensuite, le test ANOVA One-Way ont été appliqués à l'analyse statistique.

L'analyse de la concentration du fer avec la technique de fluorescence X dans le sang de 80 patients et 98 sujets sains a donné une concentration moyenne de 1496 µg/l aux patients avec 1493 µg/l pour les sujets sains. Après la comparaison statistique de ces résultats, il a été exprimé qu'il n'y avait pas de différence entre les concentrations moyennes dans les deux groupes pour fer. Les mêmes échantillons ont été analysés pour le zinc et le cuivre, les concentrations moyennes pour les patients et les sujets sains étaient respectivement de zinc : 1344 µg/l et 1266 µg/l. Le cuivre : 1078 et 1172 µg/l et il y avait une différence significative entre eux ( $p > 0,05$ ).

Les concentrations des patients et des sujets sains de cuivre pour les deux genres sont respectivement de 1201 et 1085 µg/l pour les femmes et de 1148 et 1070 µg/l pour les hommes. Comme pour le zinc 1310 et 1325 µg/l pour les femmes et 1231 et 1368 µg/l pour les hommes. L'analyse statistique des deux éléments chez les deux genres a montré qu'il y avait une diminution significative chez les femmes par rapport au cuivre, contrairement au zinc, une augmentation significative a été observée chez les hommes.

De plus, nous avons pu exprimer la relation entre l'âge et le taux des concentrations des éléments traces dans une équation expérimentale :

$$[TE] = e^{y_0 \ln x} + e^{a_1 \ln x e^{-x/t_1}}$$

Nous avons également étudié les taux d'oligo-éléments chez les patients atteints de cancer du poumon en particulier et chez les fumeurs et les non-fumeurs sains. Il existe une relation relative entre les ratios de concentration des fumeurs et des patients atteints de cancer du poumon par rapport aux non-fumeurs en bonne santé.

**Mots-clés** : oligo-éléments, zinc, fer, cuivre, cancer, La fluorescence X.

## Remerciements

Tous les éloges et remerciements à ALLAH, le plus bienfaisant et le plus miséricordieux, pour m'avoir donné cette opportunité d'évaluer mes connaissances, la force et la patience de terminer ma thèse après tous les défis et difficultés.

Cette thèse a été mise en œuvre au niveau du Laboratoire de physique fondamentale et appliquée (FUNDAPL), Université Blida 1. Je tiens à remercier infiniment le directeur de laboratoire et mon directeur de thèse Pr. Benamar Mohamed Al-Amin, pour son soutien, son partage de temps et ses conseils précieux à chaque étape de réalisation de ma thèse. Il m'a inspiré par sa confiance en mon travail.

Je tiens à remercier aussi ma co-directrice Dr Mabdoua Yamina pour son aide et son orientation le long de mon parcours.

Sincères remerciements au Pr. Derbal, Pr. Rouibi et Pr. Zermane pour avoir accepté d'être les examinateurs de ma présentation de thèse.

Je suis extrêmement reconnaissant au Dr Melzi et au Pr. Bounedjar pour leur soutien et pour m'avoir accepté de travailler dans le service d'oncologie de l'hôpital Frantz Fanon de Blida.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr Benamar DAHMANI de m'avoir accepté comme étudiant visiteur dans le laboratoire de recherche en Spectrochimie de pharmacologie structurale de l'Université de Tlemcen, en Algérie. Un merci spécial aux membres de son équipe pour leur assistance technique pour de nombreuses mesures.

Je suis profondément reconnaissante au Dr Kamel LAHMAR "Université Mohamed Lamine Debaghine -Setif 2", j'ai bénéficié de ses aimables conseils pour améliorer ma langue, de son aide critique et linguistique pour améliorer la qualité de mon manuscrite.

Je dois mes remerciements les plus chaleureux à mes amis et collègues, Fairuz ZAHRA et Sarra MAADADI pour m'avoir encouragé à poursuivre mon rêve en m'aidant et en créant un accompagnement si agréable pendant mes études. Ce qui m'a permis de passer un temps précieux dans le laboratoire FUNDAPL.

Je remercie mes amis et sœurs Asma Fetata, Najet Aisset, Amina Bachouti, Hanaa Naoui et Nihed Guers pour leur aide et leurs encouragements pendant mes études.

Un merci spécial à mes amis et petites sœurs Fatima Naimi, Maroua Rebahi et Hadjer Ben Youcef pour leur aide et leurs encouragements.

Je voudrais remercier tout particulièrement Wissam DJAMAI de m'avoir accepté comme membre de sa famille. Un merci spécial à sa famille pour leur bon accueil et leur hospitalité tout au long de mon séjour à Tlemcen.

Les mots ne suffiront pas à remercier les PARENTS bien-aimés pour leur amour, leurs efforts et leurs prières sans fin, merci à ma chère maman Nadia GHOZLANE qui a sacrifié sa carrière pour ouvrir la voie à moi et à mes frères et sœurs pour éclater dans la vie avec fierté et zèle. Grâce à mon père Kamel LAHMAR qui a été une source d'inspiration pour moi, ses encouragements m'ont donné la force et m'améliorent.

Je remercie également toute ma famille, y compris ma chère tante comme mon amie Nassira GHOZLANE pour son amour sans fin, son soutien et son accompagnement rafraîchissant pendant mon séjour à Blida. Ma gratitude sans fin va à mes sœurs et frères bien-aimés Mohamed, Hala, Ouaisse Taki-Eddinne, Omama et Thouaiba pour m'avoir encouragé toute ma vie et surtout pendant mes moments difficiles en tant que docteur étudiant. Votre soutien moral, vos bons vœux et votre gentil accompagnateur me rappelleront ces jours inoubliables. Merci à la charmante membre de notre famille, tante Régine Petit, pour sa sincérité, son amour et son aide dans mes dures journées.

Il est clair que l'achèvement de cette thèse ne pourrait être réalisé sans l'aide et les encouragements de nombreuses autres personnes à qui je suis très reconnaissant.

Je n'espère que ce doctorat. Cette thèse ne sera pas la fin de mon voyage dans la recherche de plus de connaissances.

## TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	11
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
1. GENERALITE	18
1.1 Le cancer	18
1.1.1. Définition	18
1.1.2. Statistiques	19
1.1.3. Processus de développement d'un cancer	19
1.1.3.1. Origine génique du cancer	19
1.1.3.2. Etapes de la cancérogénèse	21
1.2. Les Oligo-éléments	24
1.2.1. Courbe effet-dose	24
1.2.4. Le Fer	26
1.2.4.1. Fonctions et symptômes de perturbation des doses	26
1.2.4.2. Rôle physiologique	27
1.2.5. Le cuivre (Cu)	29
1.2.5.1. Fonctions et symptômes de perturbation des doses	30
1.2.5.2. Principaux rôles du cuivre dans l'organisme	30
1.2.6. Zinc	31
1.2.6.1. Fonctions et symptômes de perturbation des doses	33
1.2.6.2. Principaux rôles du zinc dans l'organisme	34
1.3. Les oligo-éléments et cancer	35
1.3.1. Fer et cancer	36
1.3.2. Cuivre et cancer	37
1.3.3. Zinc et cancer	37
1.4. Superoxyde dismutase (SOD)	38
1.4.1. CuZn SOD et cancer	38
2. BASES THEORIQUES DES TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES	40



2.1. Nature des rayons X	40
2.2. La production des rayons X	41
2.2.1. Notion spectroscopies	42
2.2.1.1. Le fond continu	42
2.2.1.2. Les raies caractéristiques	42
2.2.1.3. Energie des raies	43
2.2.1.4. Intensité des raies	43
2.3. Interaction des rayons X avec la matière	44
2.3.1. L'effet photoélectrique	44
2.3.2. Diffusion Compton « incohérente »	46
2.3.3. Diffusion Rayleigh	46
2.3.4. Création de pair	47
3.4. Loi d'atténuation	47
2.5. La fluorescence	48
2.5.1. Durées de vie et rendements de fluorescence	48
2.6. La spectroscopie XRF	49
2.6.1. Spectromètre XRF à dispersion d'énergie (EDXRF)	49
2.6.1.1. Détecteur	50
2.6.1.2. La source des rayons X	50
2.6.2. Analyse en spectrométrie de fluorescence X	51
2.6.2.1. Analyse qualitative	51
2.6.2.2. Analyse quantitative	52
2.7. Échantillon biologique	53
2.7.1. La digestion par voie humide	54
2.7.1.1. Réactifs de digestion	55
2.7.1.2. La température de digestion	55
2.7.1.3. Le temps de digestion	56
2.7.2. L'erreur systématique dans la digestion	56
3. MATERIEL ET METHODES	57
3.1. Population cible	57
3.1.1. Témoins contrôle « groupe sains »	57
3.1.2. Patients cancéreux « CD »	58
3.2. Questionnaire général	58
3.3. Description de l'échantillon	58

3.4. Prélèvement et préparation de plasma	59
3.5. Élimination des contaminants	59
3.6. Méthode de digestion humide	60
3.7. Pourcentage de récupération	61
3.8. Préparation des échantillons pour l'analyse	61
3.9. Le spectromètre de fluorescence X "dispersion d'énergie"	62
3.9.1. Tube à rayons X	62
3.9.2. Changeur de filtre	63
3.9.3. Détecteur	64
3.9.4. La chaîne de détection de l'ED-XRF	65
3.10. Mesure des concentrations	65
3.11. Etude de spectre EDXRF	66
3.11.1. La limite de détection	67
3.11.2. Etude d'effet filtre	68
3.12. Spectroscopie infra-rouge	70
3.13. Analyse statistique	70
3.13.1. Le test ANOVA	70
4. RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATION	72
4.1. Validation	73
4.1.1. Assurance de protocole chimique	73
4.1.1.1. Rendement de minéralisation	75
4.1.2. QC/CA de technique et de mode d'analyse ED-XRF	76
4.1.2.1. Analyse par spectroscopie ED-XRF	77
4.2. Traitement des résultats obtenus	79
4.2.1. Les concentrations moyennes des oligo-éléments	79
4.2.2. Interprétation du niveau de signification	82
4.2.2.1. Discussion	83
4.2.3. Influence du genre sur la concentration du Cu, Fe et Zn	85
4.2.3.1. Discussion	88
4.2.4. Influence d'âge sur la concentration du Cu, Fe et Zn	88
4.2.4.1. Discussion	91
4.2.5. Association du genre et l'âge avec la maladie cancéreuse	92
4.3. Facteurs des risques	94
4.3.1. Le rapport Cu / Zn	94

4.3.1.1. L'influence du genre sur le rapport SOD	94
4.3.1.2. Discussion	95
4.3.2. Tabagisme et cancer du poumon	97
4.3.2.1. Discussion	99
4.4. Comparaison avec d'autres études	100
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	102
APPENDICES	104
A Liste des symboles et des abréviations	104
B QUESTIONNAIRE	105
C Glossaire	106
D A-13, Traitement statistique	108
REFERENCE	112

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Les caractéristiques du cancer	20
Figure 1.2 : Étapes de la cancérogenèse	21
Figure 1.3 : Étapes de la formation d'une métastase	23
Figure 1.4 : Dépendance de la fonction biologique de la concentration tissulaire à l'apport d'un nutriment	25
Figure 1.5 : Le fer dans différentes enzymes <b>(a)</b> cytochrome C, <b>(b)</b> NADH déshydrogénase, <b>(c)</b> succinate déshydrogénase	28
Figure 1.6 : Le déséquilibre de la balance redox des cellules cancéreuses par rapport à la cellule normale	36
Figure 2.1 : Le spectre électromagnétique, présenté en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence et de l'énergie	40
Figure 2.2 : Schéma de base d'un tube à rayons X	42
Figure 2.3 : Spectre radiographique général produit avec un tube de potentiel de 90 keV	43
Figure 2.4 : Les principales interactions des rayons X avec la matière	44
Figure 2.5.A : L'effet photoélectrique ; La fluorescence	45
Figure 2.5.B : Processus d'émission d'électron Auger	45
Figure 2.6 : Diffusion Compton ou incohérent	46
Figure 2.7 : Diffusion Rayleigh cohérente	47
Figure 2.8 : Le processus de production de paires électron-positon	47
Figure 2.9 : Obtention du spectre d'émission des rayons X, rayonnements diffusé et les rayonnements fluorescence	48
Figure 2.10 : Un diagramme de Jablonski simplifié pour illustrer la signification des rendements quantiques et des durées de vie	49

Figure 2.11 Division générale des méthodes appliquées à l'analyse quantitative	52
Figure 3.1 : Le questionnaire distribué aux participants	58
Figure 3.2 : Description de population	59
Figure 3.3 : Diagramme démonstrative protocole de digestion humide du sang	60
Figure 3.4 : Dispositif expérimental d'ED-XRF type Epsilon 3XL, PANalytical	62
Figure 3.5 : Diagramme de la cellule de mesure	63
Figure 3.6 : Diagramme de la chaîne de détection	65
Figure 3.7 : Spectre typique pour le standard A13	67
Figure 3.8 : Spectres de rayons X prélevés d'un échantillon avec filtres Ag et Al-200, placée entre le tube à rayons X et l'échantillon	69
Figure 4.1 : Processus de présenté les résultats de notre travail	72
Figure 4.2 : Spectre IR des échantillons avant la digestion : (a) échantillon sain, (b) échantillon patient	73
Figure 4.3 : Spectre IR des échantillons après la digestion : (a) échantillon sain, (b) échantillon patient	74
Figure 4.4 : Courbe de moyenne des concentrations pour les échantillons fortifiés en fonction des concentrations ajoutés	75
Figure 4.5 : Spectre typique d'EDXRF pour le sang digéré d'un sujet cancéreux	77
Figure 4.6 : Spectre typique d'EDXRF pour le sang digéré d'un sujet sain	78
Figure 4.7. Distribution de la concentration de fer (a), de cuivre (b), de zinc (c)	80-81
Figure 4.8 : Concentration moyennes de cuivre, de fer et de zinc dans les groupes des patients (CD) et sains (contrôle)	82
Figure 4.9 : La variation des concentrations de (a) fer (b) cuivre et (c) zinc dans le groupe CD pour les deux genres (femmes et hommes)	85
Figure 4.10 : Variation de la moyenne des concentrations de cuivre, de fer et de zinc par groupe d'âge de la population de CD	89
Figure 4.11 : La variation de la concentration en oligo-éléments avec l'âge : (a) Cu, (b) Fe et (c) Zn	90-91

Figure 4.12 : Moyenne des concentrations de Cu, Fe et Zn de femmes de population CD par groupe d'âge	93
Figure 4.13 : Moyenne des concentrations de Cu, Fe et Zn des hommes de population CD par groupe d'âge	93
Figure 4.14 : Distribution de la concentration de Cu / Zn dans le plasma des groupes CD et groupe témoins	94
Figure 4.15 : La variation des rapports Cu / Zn dans la population CD pour les deux genres	96
Figure 4.16 : Concentrations de cuivre, fer et zinc pour les groupes des sains contrôle non-fumeurs (contrôle), les fumeurs et les patients atteints de cancer du poumon (LCD)	99
Figure 4.17 : Concentrations moyenne ( $\mu\text{g/l}$ ) du Cu, Zn et Fe dans des CD et sains contrôles, de population polonaise et irakienne avec algérienne.	100
Tableau 1.1 : Fonctions du fer et symptômes de leur insuffisance et états excessifs	27
Tableau 1.2 : Fonctions du cuivre et symptômes de leur insuffisance et états excessifs	30
Tableau 1.3 : Fonctions du fer et symptômes de leur insuffisance et états excessifs	33
Tableau 2.1 : Les avantages et les inconvénients de la technique de digestion par voie humide dans le système ouvert par chauffage conventionnel	54
Tableau 3.1 : type de filtre et son état de fonctionnement	64
Tableau 3.2 : Seuil de détection de la technique XRF pour le Fer, Cuivre et le Zinc	68
Tableau 4.1 : Concentrations (mg/kg) mesuré et certifié de A-13 pour Cu, Fe et Zn ; avec le Z-score, U-score et R-biais	76
Tableau. 4.2 : Concentrations plasmatiques des éléments (Fe, Cu et Zn) pour les groupes contrôle et CD : Nombre de participant dans chaque groupe, moyennes et écart-type, intervalles des concentrations des éléments en $\mu\text{l/g}$	79

Tableau 4.3 : Test ANOVA-One-Way pour la concentration de Fe, Cu et Zn dans le plasma des groupes témoins et CD avec le taux de réduction 83

Tableau 4.4 : Concentrations des éléments Fe, Cu et Zn dans le plasma sanguin en  $\mu\text{g/l}$  pour les groupes témoin et CD respectivement pour les femmes et les hommes : nombre de patients dans chaque groupe, moyennes et écart-type, intervalles des concentrations des éléments, taux de réduction (%) et signification 87

Tableau 4.5 : Les concentrations de rapport Cu/Zn pour les groupes témoin et CD : moyenne, écart-type, intervalle des rapports, taux de réduction et la signification p. 95

Tableau 4.6 : le rapport du Cu/Zn SOD pour les groupes témoin et CD respectivement pour les femmes et les hommes : nombre de patients dans chaque groupe, moyennes et l'écart-type, intervalles des concentrations des éléments, taux de réduction (%) et signification 97

Tableau 4.7 : Concentrations plasmatiques des éléments Fe, Cu et Zn en  $\mu\text{g/l}$ , pour les témoins, les fumeurs et les groupes LCD : nombre de patients dans chaque groupe, moyennes et écart-type, taux de réduction (%) avec signification. 99

Le tableau 4.8 résume la variation de taux du fer, cuivre et zinc des travaux issus de la littérature 101

## Introduction général

La compréhension de la maladie cancéreuse et le développement de leur traitement sont des défis pour la santé mondiale, à propre des recherches multidisciplinaires internationales est nécessaire pour surmonter les différents défis scientifiques dans ce domaine [1]. Car le cancer est l'un des principaux risques de morbidité et de mortalité dans le monde.

Actuellement, environ 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (LMICs) [2]. Dans l'Algérie, d'après le Réseau national des registres du cancer, dans les données épidémiologiques, le taux annuel d'incidence du cancer continuera d'augmenter, passant de 41 870 cas en 2015 à 49 000 cas en 2020 et 61 000 cas en 2025 [3].

Malgré le taux des décès élevé, la participation des pays à revenu faible ou intermédiaire, où la plupart sont situés en Amérique du Sud et en Asie, est faible [4-7]. Donc l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) vise à encourager le développement de stratégies anticancéreuses à long terme dans ces pays (LMICs) [8].

La cancérogénèse est bien établie que les radicaux libres en général et les ions radicaux superoxyde en particulier sont des causes possibles de cancer [9]. De plus, l'apparition et la progression du cancer sont liées au stress oxydatif [10, 11]. Les oligo-éléments peuvent produire des espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux hydroxyles, qui attaque la guanine (base purique constitutive de l'ADN) [12]. Ces espèces peuvent attaquer et provoquer une mutation de l'ADN, qui fait partie du processus pathologique du cancer.

En règle générale, le rôle du fer dépend de son statut ; la limitation de la croissance et de la réplication des cellules cancéreuses chez l'homme [13]. Le cuivre est essentiel dans la défense antioxydant, mais les concentrations élevées de cuivre sont liées aux troubles du cancer, par l'induction de la prolifération



cellulaire due aux dommages à l'ADN causés par le radical hydroxyde libre ; tandis que la carence en cuivre peut entraîner une augmentation des dommages oxydatifs. Par conséquent, des niveaux normaux de cuivre sont essentiels pour maintenir l'intégrité structurale de l'ADN pendant le stress oxydatif [14, 15]. D'un autre côté, le zinc joue un rôle important dans la stabilisation de la structure de l'ADN, de l'ARN et du ribosome. Elle est également nécessaire au fonctionnement de plusieurs facteurs de transcription protéique qui reconnaissent certaines séquences d'ADN et contrôlent la transcription des gènes [16, 17].

A côté des oligo-éléments, il existe des enzymes antioxydants qui ont une influence sur la cancérogénèse comme l'enzyme principale du système de défense antioxydante intracellulaire cuivre-zinc superoxyde dismutase (CuZn SOD) ; Diverses études [18, 19] ont montré une relation entre le niveau de CuZn SOD et le cancer.

Plusieurs méthodes physiques telles que XRF, TXRF, ICP-MS, ICP-OES, AAS et INAA sont utilisées pour étudier la concentration en oligo-éléments dans le sérum, le plasma, le sang total humain ou les cheveux. [20-24]. La nature multi-élémentaire et le temps d'analyse court couplés aux petites quantités d'échantillons nécessaires font de ces techniques un outil précieux en analyse clinique. En particulier, la fluorescence X "XRF" est une analyse représentative multi-élémentaire d'oligo-éléments qui ont un certain nombre de caractéristiques intéressantes, telles que la simplicité, la sensibilité élevée et la limite de détection basse, la possibilité d'analyser un grand nombre d'échantillons et détermine la concentration en éléments par précision.

L'objectif de cette étude est de participer à l'effort mondiale face au cancer, par la détermination de la distribution et la corrélation des taux sériques d'oligo-éléments entre les patients cancéreux et les groupes sains de la population algérienne ; Par une technique physique qui est Fluorescence X à dispersion d'énergie (EDXRF).

La présente étude, comme une étude multidisciplinaire, est parmi la première étude en Algérie qui cible la relation des oligo-éléments et le cancer.

Pour bien clarifier les objectifs et les modus operandis de cette étude, on a organisé ce manuscrit en deux parties, à savoir : une partie théorique comprenant des généralités et une synthèse bibliographique, une partie expérimentale suivie

d'annexes. Les deux parties sont divisées en quatre chapitres. Après une introduction générale à ce travail, le premier chapitre présente les généralités sur la maladie ciblée (cancer) et sur les oligo-éléments et en particulier les éléments étudiés (cuivre, fer et zinc). Le deuxième chapitre décrit les bases théoriques de technique spectroscopique utilisée et le traitement chimique suivi. L'approche suivie par l'échantillonnage, le matériel et les méthodes utilisées sont données dans le troisième chapitre. Les résultats obtenus et leur traitement statistique sont présentés et discutés dans le quatrième et dernier chapitre qui est suivi d'une conclusion générale.

## Chapitre I : Généralité

Pour pouvoir comprendre la relation possible entre les oligoéléments fer, cuivre et zinc et le cancer, nous allons, dans ce chapitre, donner des généralités sur le cancer et leur processus de développement, les oligoéléments (fer, cuivre et le zinc). Après un bref aperçu sur le cancer, en tant que principal cible d'étude et une introduction sur les oligo-éléments tel que le fer, le cuivre et le zinc, et leur rôle physiologique dans le corps. Enfin, est donnée une revue des connaissances sur la relation de ces éléments et le cancer.

### 1.1 Le cancer

#### 1.1.1. Définition

Le cancer est un terme général utilisé pour définir un grand groupe de pathologies pouvant affecter différentes parties de l'organisme. Ces maladies sont aussi appelées tumeurs malignes et/ou néoplasmes. Une tumeur est une perturbation pathologique de la croissance cellulaire, caractérisée par une prolifération excessive et anormale des cellules. Les tumeurs sont une masse anormale de tissu qui peut être solide ou liquide. Lorsque la croissance des cellules tumorales se limite au site d'origine et sa forme physique normale, elles sont considérées comme des tumeurs bénignes. Lorsque les cellules sont anormales et peuvent se développer de manière incontrôlable, elles sont considérées comme des cellules cancéreuses, c'est-à-dire une tumeur maligne. Les tumeurs sont également appelées «NEOPLASME». [25]

#### 1.1.2. Statistiques

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a enregistré 7,6 millions de décès causés par le cancer à travers la planète en 2008. Cela correspond à environ 13% de la mortalité mondiale. L'OMS considère que 30% de ces cancers sont évitables. Actuellement, environ 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à

revenu faible ou intermédiaire (PRITI) [26]. Le Réseau national algérien des registres du cancer a rapporté, dans les données épidémiologiques, que le taux d'incidence annuel du cancer continuera d'augmenter, passant de 41 870 cas en 2015 à 49 000 cas en 2020 et 61 000 cas en 2025 [27]. Dans le monde entier, les évolutions de cancer montrent que pour les hommes et les femmes combinés, près de la moitié des nouveaux cas et plus de la moitié des décès par cancer dans le monde en 2018 surviennent en Asie, en partie parce que la région concentre près de 60 % de la population mondiale.

Du total des cas de cancer dans le monde, l'Europe concentre représente 23,4 % des cas et 20,3 % des décès dus au cancer, alors qu'elle ne représente que 9,0 % de la population mondiale. Une proportion de 13,3 % de la population mondiale sont localisés a les Amériques mais concentrent 21,0 % de l'incidence et 14,4 % de la mortalité dans le monde. Par rapport aux régions restons du monde, les décès par cancer en Afrique et en Asie, 57,3 % et 7,3 % respectivement, sont plus élevées que les proportions de cas d'incidence, 48,4 % et 5,8 % respectivement, car ces régions enregistrent une fréquence plus élevée de certains types de cancer associés à un pronostic plus défavorable et des taux de mortalité eux aussi plus élevés, en plus d'un accès limité aux services diagnostiques et aux traitements opportuns dans de nombreux pays. [28]

### 1.1.3. Processus de développement d'un cancer

#### 1.1.3.1. Origine génique du cancer

L'oncogenèse est le processus par lequel les cellules saines se transforment en cellules cancéreuses. Elle est caractérisée par une série de changements génétiques et cellulaires, y compris l'activation oncogène, qui conduisent la cellule à se diviser de manière incontrôlée. À la suite de mutations ou de réarrangements chromosomiques, les protéines impliquées dans les processus de division cellulaire acquièrent la capacité de transformer les cellules et d'induire un processus de cancérisation [29]. Ce sont des gènes codant pour des protéines dont l'expression conduit normalement à un phénotype prolifératif et à la suppression de l'apoptose. [30]

Pour comprendre comment contrecarrer les mécanismes qui sous-tendent la capacité des cancers à tuer le patient ou, en d'autres termes, à être malin. À cette

fin, la complexité déroutante de nombreuses propriétés interdépendantes des cancers a été distillée il y a 20 ans en «six altérations essentielles de la physiologie cellulaire qui dictent collectivement la croissance maligne: autosuffisance en signaux de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, évasion de la mort cellulaire programmée (apoptose), potentiel de réplication illimité, angiogenèse soutenue et invasion tissulaire et métastase »(figure1.1). [31]

En effet, l'amélioration des connaissances sur les différents mécanismes régulant la division cellulaire a permis de montrer l'importance du rôle des molécules régulatrices du cycle cellulaire dans les processus cancéreux [32].

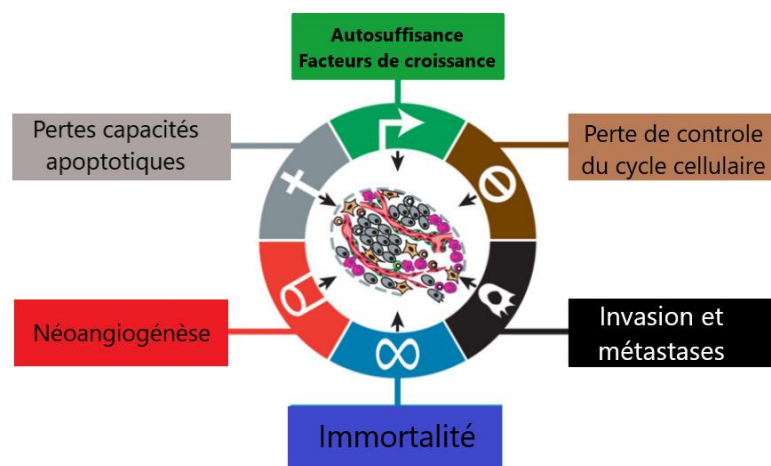


Figure 1.1 : Les caractéristiques du cancer. [32]

- 1) Autosuffisance, facteurs de croissance : Les cellules normales dépendent de la signalisation de croissance d'un cycle cellulaire étroitement régulé pour proliférer de manière contrôlable et maintenir l'homéostasie tissulaire - ceci est perturbé en cas de cancer, où les cellules cancéreuses n'ont pas besoin de stimulation par des signaux externes (sous forme de facteurs de croissance) pour se multiplier. [33, 34]
- 2) Perte du contrôle du cycle cellulaire : Les cellules cancéreuses sont généralement résistantes aux signaux de croissance empêchant leurs voisins. [32, 35]
- 3) Pertes capacités apoptotiques : L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée (suicide cellulaire), le mécanisme par lequel les cellules sont programmées pour mourir en cas d'endommagement. Les cellules

cancéreuses sont typiquement capables de contourner ce mécanisme. [32, 36]

- 4) Immortalité : Les cellules non cancéreuses meurent après un certain nombre de divisions. Les cellules cancéreuses échappent à cette limite et sont apparemment capables de croissance et de division indéfinie. Mais ces cellules immortelles ont des chromosomes endommagés, qui peuvent devenir cancéreux. [32,37]
- 5) Néo-angiogenèse : L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment. Les cellules cancéreuses semblent être capables de relancer ce processus, en s'assurant que ces cellules reçoivent un approvisionnement continu en oxygène et autres nutriments. [32, 38]
- 6) Invasion et métastases : Les cellules cancéreuses peuvent se détacher de leur site ou organe d'origine pour envahir les tissus environnants et se propager (métastaser) vers des parties du corps éloignées. [32, 39]

### 1.1.3.2. Etapes de la cancérogénèse

C'est en 1947 que Berenblum et Shubik [40] décrivent pour la première fois ce concept de cancérogénèse en trois étapes : la phase d'initiation et les phases de promotion et progression. Des changements dans la structure du génome ont lieu lors des trois phases de développement néoplasique. [41]. (Figure 1.2)

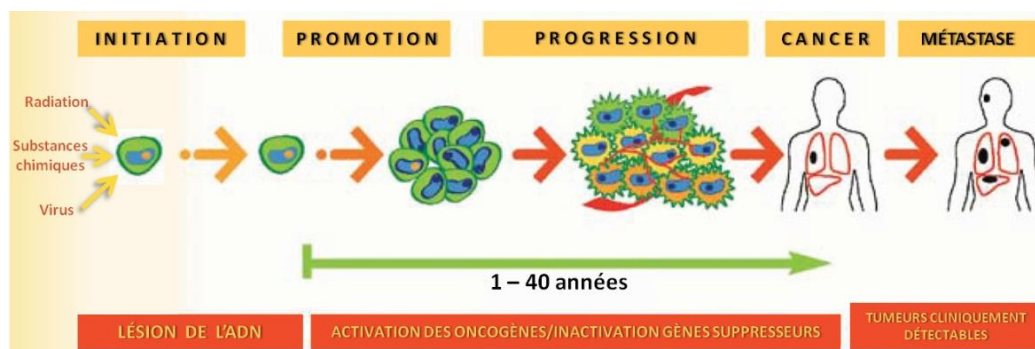


Figure 1.2 : Étapes de la cancérogénèse [42].

#### a). Initiation

L'initiation est la première étape de la cancérogénèse. Elle correspond à l'apparition d'une lésion détectable et irréversible de l'ADN due à l'exposition à un carcinogène environnemental ou endogène (stress oxydatif par exemple). Cependant, à ce stade de la cancérogénèse, les gènes suppresseurs peuvent

encore exercer leur fonction cellulaire en bloquant la prolifération cellulaire lorsque des anomalies de l'ADN sont détectées. Les gènes de réparations qui codent pour des enzymes de réparation de l'ADN permettent aussi d'échapper au processus de cancérogénèse. D'un point de vue phénotypique, la cellule mutée en phase initiale est similaire aux cellules « normales », de départ. Elle a subi des mutations induisant des proliférations cellulaires mais n'a pas encore subi de différenciation. Lors de cette phase d'initiation, certains facteurs comme l'alimentation ou l'activité physique peuvent agir sur ces gènes de réparation en stimulant les enzymes qui en découlent. [43, 44].

#### b). Promotion

La phase de promotion de la cancérogénèse a lieu lorsqu'il y a une exposition prolongée, répétée ou continue, à un nouvel agent appelé 'promoteur'. La substance va alors stabiliser la mutation et provoquer une désorganisation tissulaire. Une substance promotrice n'interagit pas avec l'ADN sans avoir été activée par métabolisation. Les promoteurs sont des activateurs des gènes modifiés. En fonction des gènes touchés, le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire peuvent être perturbés. La promotion est une phase réversible. Lorsqu'il n'y a plus de stimulation par le promoteur, on observe une régression de la prolifération cellulaire. A ce stade-là de la cancérogénèse (initiation et promotion), il peut encore exister une balance entre l'apoptose cellulaire et la prolifération. [45, 46]

#### c). Progression

C'est l'ensemble de ces trois étapes de modifications génomiques qui assure la génération d'un cancer. La progression est d'ailleurs caractérisée par l'irréversibilité [47], l'instabilité génétique, une croissance accélérée avec invasion tissulaire rapide et des changements morphologique, métabolique et biochimique caractéristiques des cellules. La cellule cancéreuse prolifère désormais sans les contraintes normalement imposées. Plus les cellules prolifèrent, plus l'instabilité génétique apparaît. Finalement, l'angiogenèse est essentiel au développement néoplasique et son inhibition rapide doit être établie pour retarder le développement du cancer.

Une fois la tumeur est installée, elle va se proliférer, et augmenter sa taille, d'où un mécanisme spécial de croissance va être impliqué. [48, 49]

#### d). Métastases

Si les cellules cancéreuses restent dans leur tissu d'origine, elles peuvent être détruites. Pour survivre, celles-ci doivent migrer. Ainsi, une revascularisation va se former et leur permettre de quitter la tumeur primitive pour créer des métastases [50]. La métastase est la véritable cause de la malignité des cancers. Le mécanisme de développement des métastases est complexe, en effet, il met en jeu des voies de prolifération et de survie cellulaire ainsi que différentes voies d'adhésion et de motilité. [51, 52]. La cellule cancéreuse emprunte deux voies principales de dissémination :

- la voie lymphatique, responsable de l'invasion des ganglions lymphatiques
- la voie sanguine, responsable de l'invasion d'autres organes à distance tels que les poumons, le cerveau, le foie ou les os [53].

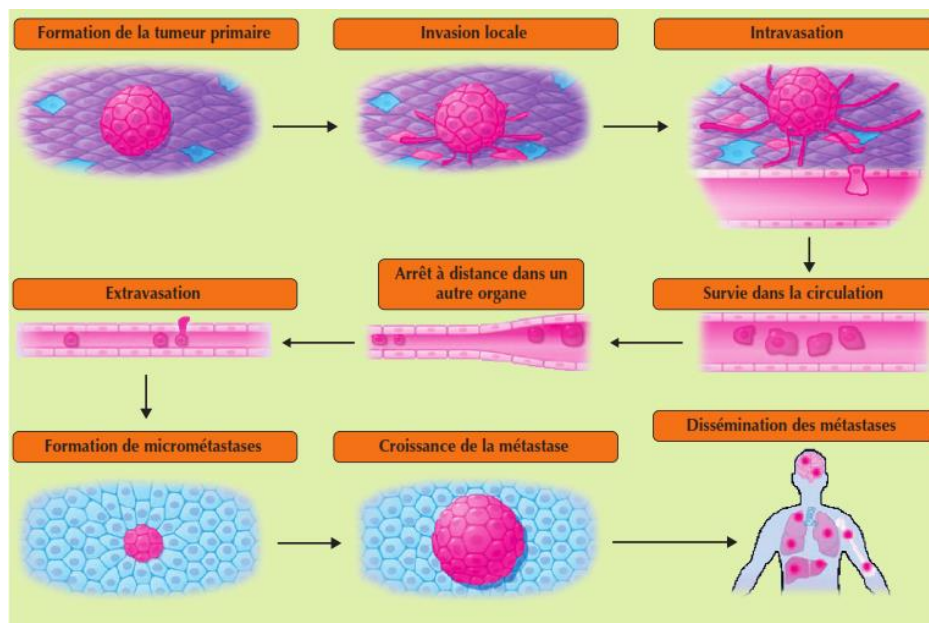


Figure 1.3 : Etapes de la formation d'une métastase. [53]

Pour former une métastase, les cellules cancéreuses doivent être capables de se détacher de la tumeur primitive, de franchir les barrières afin de pénétrer dans la circulation lymphatique ou sanguine, et d'en sortir tout en évitant les cellules immunitaires. Elles doivent enfin être capables de se fixer sur un nouveau support



ou elles développeront des capacités de prolifération afin de former une nouvelle tumeur (figure.1.3.) [53].

## 1.2. Les Oligo-éléments

Le corps humain est composé d'éléments qui peuvent être grossièrement divisés en éléments abondants et oligo-éléments [54]. Les éléments abondants sont constitués des éléments majeurs impliqués dans la formation des liaisons covalentes et sont des constituants importants des tissus (oxygène, carbone, hydrogène, azote, etc.) et des éléments semi-majeurs, qui existent souvent à l'état ionique, et sont impliqués dans les fonctions du corps vivant par le maintien de la pression osmotique et des potentiels membranaires (potassium, sodium, etc.) [55]

Les oligo-éléments essentiels du corps humain comprennent le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le sélénium (Se), le chrome (Cr), le cobalt (Co), l'iode (I), le manganèse (Mn) et le molybdène (Mo). Bien que ces éléments ne représentent que 0,02% du poids corporel total [56], ils jouent un rôle important, par exemple en tant que centres actifs d'enzymes ou en tant que traces de substances bioactives.

Les oligo-éléments font référence à «des éléments qui se trouvent dans des environnements naturels et perturbés en petites quantités et qui, lorsqu'ils sont présents en concentrations bio-disponibles suffisantes, sont toxiques pour les organismes vivants [57].

### 1.2.1. Courbe effet-dose

Selon la définition de Mertz en 1981, « Un éléments est essentiel quand sa carence se traduit objectivement par trouble fonctionnel et quand son apport à doses physiologiques .... Prévient ou guérit ce trouble » [58], C'est à dire l'effet de l'apport d'un oligo-élément dépend de la dose. Lorsque l'oligo-élément est essentiel l'absence comme l'apport massif seront létaux.

La dépendance de la sévérité des signes et des effets du réapprovisionnement sur le degré de carence a été formulée mathématiquement par Bertrand au début de ce siècle [59].

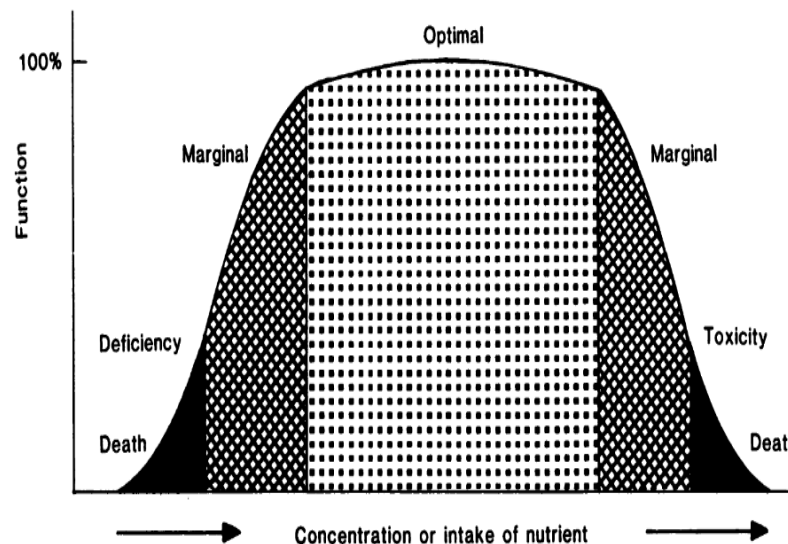


Figure 1.4 : Dépendance de la fonction biologique de la concentration tissulaire à l'apport d'un nutriment. [58]

Comme l'illustre la figure 1.4, la règle de Bertrand stipule qu'une fonction pour laquelle un nutriment est essentiel est très faible ou absente dans une carence théorique absolue, et augmente avec l'augmentation de l'exposition au nutriment essentiel. Cette augmentation est suivie d'un plateau représentant le maintien d'une fonction optimale grâce à la régulation homéostatique, et d'un déclin de la fonction vers zéro lorsque les mécanismes de régulation sont surmontés par des concentrations croissantes qui deviennent toxiques. Bien que chaque nutriment essentiel ait sa propre courbe spécifique qui diffère de celle des autres nutriments (par exemple, par la largeur du plateau), le principe du modèle de Bertrand est probablement applicable à tous les nutriments essentiels, y compris l'eau, et l'oxygène, ainsi que les oligo-éléments individuels. Deux conclusions de ce modèle sont pertinentes pour la compréhension de la recherche sur les éléments traces : (i) pour chaque élément, il existe une gamme d'expositions sûres et adéquates, dans lesquelles l'homéostasie est capable de maintenir des concentrations tissulaires et des fonctions optimales ; et (ii) chaque oligo-élément est potentiellement toxique lorsque la plage d'exposition sûre et adéquate est dépassée.

#### 1.2.4. Le Fer

Le fer est un élément chimique avec le symbole Fe et le numéro atomique 26. C'est un métal qui appartient à la première série de transition et au groupe 8 du tableau périodique [60]. Le fer est présent dans l'organisme sous forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et ferrique (Fe). Les processus redox médiés par le fer sont impliqués dans le transport d'électrons dans la respiration mitochondriale. Parallèlement à la participation aux processus physiologiques, le rôle du fer dans la génération de radicaux libres est bien connu [61].

L'organisme humain adulte contient environ 3 à 5 g de fer et près des 2/3 du fer total sont incorporés à l'hémoglobine. Les globules rouges, le foie, les muscles et les os sont riches en fer [62].

Le fer plasmatique a trois sources principales : 1) le fer absorbé par les entérocytes dans le duodénum proximal (alimentaire) ; 2) fer libéré des hépatocytes (déposé) ; 3) métal libéré par les macrophages et les cellules réticuloendothéliales (réutilisation). Le fer libérant des entérocytes dans la circulation sanguine est oxydé par la céruloplasmine (hephestine) [63]. Le taux sérique de fer doit être déterminé 4 à 6 heures après l'ingestion. Les taux sériques de fer normaux sont de 50 à 150 mg/dL [64].

Le fer se dissout plus rapidement dans l'acide nitrique que dans les autres acides dilués, ce qui indique que le nitrate agit comme dépolarisant ; et les composés nitrés sont réduits par le fer et l'acide sans dégagement d'hydrogène [65].

#### 1.2.4.1. Fonctions et symptômes de perturbation des doses

Le fer est un composant essentiel des enzymes où ils attirent ou soustraient des molécules et facilitent leur conversion en produits finaux spécifiques.

Le tableau 1.1 répertorie les enzymes contenant du fer et résume les fonctions physiologiques des oligo-éléments et les caractéristiques de leurs états de carence et d'excès.

Tableau 1.1 : Fonctions du fer et symptômes de leur insuffisance et états excessifs.

Oligo-élément	Enzymes contenant et les formes actives	Fonctions physiologiques	Symptômes de l'état de carence	Symptômes d'un état excessif
Fer	cytochrome a-c, cytochrome c réductase, catalases, peroxydases, xanthine oxydases, tryptophane pyrrolase, succinate déshydrogénase, glucose-6-phosphate déshydrogénase, et la choline déshydrogénase. [66]	Photosynthèse Oxydation aérobie des glucides. fer dans l'hème : Oxydation d'aldéhyde Transfert d'électrons Protection contre le peroxyde d'hydrogène Transport d'oxygène [67].	Anémie Fatigue Fonction cognitive diminuée. Adaptation aérobie Syndrome des jambes sans repos. Alopécie [68].	maladie hépatique chronique, cirrhose et conduire à un carcinome hépatocellulaire . insuffisance cardiaque et rythmes cardiaques irréguliers. taux de glucose sanguin élevés et diabète. fatigue, perte de cheveux, infertilité et diminution de la libido. arthrite. accélérer les maladies neurodégénératives [69].

#### 1.2.4.2. Rôle physiologique

Le fer occupe une place de grande importance dans la physiologie humaine, car il participe dans plusieurs mécanismes et processus cellulaires fondamentaux, dont le transport de l'oxygène [70], la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) et d'ADN (acide désoxyribonucléique) ainsi qu'à la prolifération cellulaire [71].

D'abord, il participe aux mécanismes de respiration cellulaire dans la mitochondrie, où dans la chaîne respiratoire : le fer contenu dans différentes enzymes (cytochrome c, NADH déshydrogénase, succinate déshydrogénase) permet le transfert des électrons, grâce à sa capacité d'oxydoréduction (figure.1.5.).

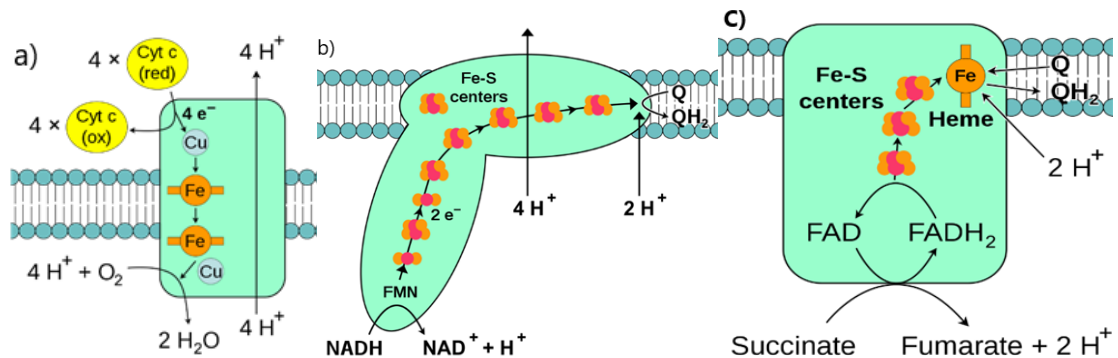
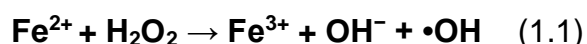


Figure 1.5 : Le fer dans différentes enzymes **(a)** cytochrome C [72], **(b)** NADH déshydrogénase [73], **(c)** succinate déshydrogénase [74].

Aussi, il joue un rôle métabolique important dans la régulation du cycle cellulaire. Il active les complexes de kinases cycline-dépendantes, favorisant la progression du cycle cellulaire vers la phase de réplication de l'ADN. D'autres protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN utilisent le fer comme cofacteur, telles les ADN polymérases, les ADN hélicases ou encore la ribonucléotide réductase, enzyme qui catalyse la conversion des ribonucléotides en deoxy-ribonucléotides [75].

En plus, il prend part dans des diverses mécanismes, telle la destruction des peroxydes dans le cerveau, par stimulation des catalases et des peroxydases ; l'hydroxylation des stéroïdes au niveau des glandes surrénales, ainsi que le métabolisme des catécholamines par action sur les mono-amine-oxydases.

En effet, lorsqu'il est présent en trop grandes quantités, le fer peut induire la formation de radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène, ERO) en catalysant la réaction chimique de Fenton :



Les radicaux libres ainsi générés altèrent les protéines (inactivation d'enzymes), les lipides (peroxydation lipidique) ainsi que l'ADN (cassure des brins d'ADN) et représentent donc une source possible de stress oxydatif et de mort cellulaire [76].

### 1.2.5. Le cuivre (Cu)

Le cuivre, élément chimique, un métal rougeâtre extrêmement ductile du groupe 11 (Ib) du tableau périodique qui est de numéro atomique 29, de symbole Cu [77]. Le corps simple cuivre est un métal qui est un conducteur exceptionnellement bon d'électricité et de chaleur [78]. Le cuivre se trouve dans la nature à l'état métallique libre. La plupart des composés de cuivre présentent deux états d'oxydation : cuivre(I) et cuivre (II) qui sont nommés cuivreux pour cuivre(I), et cuivrique pour le cuivre (II). [79]. Le cuivre liquide apparaît verdâtre, une caractéristique qu'il partage avec l'or lorsque la luminosité est faible [80].

Le cuivre métal ne réagit pas avec les solutions acides non oxydantes comme l'acide chlorhydrique (réaction très lente avec l'acide sulfurique concentré). Par contre, des solutions acides ayant des propriétés oxydantes marquées (comme l'acide nitrique ou des solutions diluées d'acide sulfurique aérées et oxygénées) peuvent attaquer le cuivre pour conduire au di-nitrate de cuivre dans le cas d'une attaque à l'acide nitrique [81].

Le cuivre est un oligo-élément essentiel présent dans tous les organes et cellules. La chimie redox de cet élément rend le cuivre très approprié comme cofacteur catalytique dans les enzymes oxydantes. Le cuivre est impliqué dans de nombreux processus biologiques, principalement en tant que partie intégrante d'enzymes, telles que celles impliquées dans la respiration cellulaire (cytochrome c oxydase), la défense antioxydante (superoxyde dismutase), la formation du tissu conjonctif (lysyl oxydase et protéines apparentées), la biosynthèse des neurotransmetteurs (dopamine bêta-hydroxylase), la maturation des hormones peptidiques (peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygénase), la pigmentation (tyrosinase), la kératinisation (sulfhydryl oxydase) et l'homéostasie du fer (céruloplasmine et hephaestine) [82].

Il ne semble pas y avoir de problèmes méthodologiques majeurs, ni de risques de contamination évidents associés à la mesure du cuivre dans les fluides biologiques. Aucune précaution analytique particulière n'est à prendre en compte pour la mesure du Cu dans les fluides biologiques [83]. La concentration de cuivre dans le sérum ou le plasma d'individus en bonne santé couvre une plage de 0,8 à 1,4 mg/L [84, 85].

### 1.2.5.1. Fonctions et symptômes de perturbation des doses

Le cuivre est impliqué dans de nombreux processus biologiques, principalement en tant que partie intégrante d'enzymes. Le tableau 1.2 répertorie les enzymes contenant du fer et résume les fonctions physiologiques des oligo-éléments et les caractéristiques de leurs états de carence et d'excès.

Tableau 1.2 : Fonctions du cuivre et symptômes de leur insuffisance et états excessifs. [62]

Oligo-élément	Enzymes contenant et les formes actives	Fonctions physiologiques	Symptômes de l'état de carence	Symptômes d'un état excessif
Cuivre	Céruroplasmine Monoamine oxydase. Cytochrome oxydase. Acide ascorbique oxydase. Dopamine hydroxylase. Superoxyde dismutase. Etc.	Hémopoïèse <sup>1</sup> Métabolisme osseux. Métabolisme du tissu conjonctif.	Anémie Leucopénie Neutropénie Maturation perturbée des leucocytes myéloïdes. Changement osseux (enfants) : Réduction de l'âge osseuse. Irrégulier / Stimuler la métaphyse, Radiotransparence osseuse, Amincissement du cortex osseux	Nausées, vomissement, brûlures d'estomac, diarrhée, jaunisse, hémoglobinurie, hématurie, oligurie, anurie, hypotension, coma, méléna

### 1.2.5.2. Principaux rôles du cuivre dans l'organisme

- Cofacteur des réactions d'oxydo-réduction : Par son potentiel oxydatif, le cuivre participe à la production d' « oxygène réactif ». Les ROS (Reactive

<sup>1</sup> Ensemble des processus cellulaires qui conduisent à la production des diverses cellules du sang.

Oxygene Species) ont pour conséquences, la peroxydation des lipides transmembranaires dégradant les membranes plasmiques, l'oxydation de protéines (provoquant par exemple des cassures des brins d'ADN, d'ARN). Ces dégradations et oxydations favorisent le processus de vieillissement cellulaire, la survenue de cancers. De plus, le cuivre est un catalyseur de la SOD, participant à la lutte contre les radicaux libres. Il peut alors être considéré comme un anti-oxydant [86, 87].

- Cuivre et système immunitaire : L'action anti-inflammatoire du cuivre passe par un mécanisme d'inhibition de l'activité des prostaglandines et des leucotriènes. Il stimule également le système immunitaire lors d'infections virales ou bactériennes [88, 89].
- Cuivre et hématopoïèse : Le cuivre est un cofacteur de la Céruloplasmine, transporteur du fer, permettant la délivrance du fer, constituant de l'hème [90].
- Cuivre et système nerveux : Cofacteur de la tyrosine-hydrolase, et dopamine-hydrolase, il intervient comme stimulant de l'activité neuronale, avec une action sur la myéline [91, 92].
- Cuivre et éléments de structure de tissus de soutien : Le cuivre est également un cofacteur de la lysyl-oxydase, participant à la synthèse de collagène, d'élastine et de constituants matriciel, nécessaires aux tropismes et trophismes des tissus cartilagineux, osseux, vasculaires, pulmonaires et cutanés [93].
- Cuivre et mélanine : Le cuivre participe à la synthèse de mélanine, constituant de la peau, et des yeux [94].

#### 1.2.6. Zinc

Le zinc est un élément chimique relativement abondant. Il est un métal de transition, de numéro atomique 30 et de masse atomique 65,38. Il appartient au groupe 12, de période IV et de bloc d de la classification périodique [95]. C'est l'élément le plus abondant après le fer, présent très souvent à l'état de traces dans les sulfures naturels où il se substitue au soufre. Il est présent dans la nature sous forme de cinq isotopes :  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{67}\text{Zn}$ ,  $^{68}\text{Zn}$  et  $^{70}\text{Zn}$  [96].



Chauffé à des températures élevées, le zinc brûle dans l'air avec émission de fumées bleu-verdâtre d'oxyde de zinc, la poudre de zinc peut s'enflammer spontanément en présence d'humidité. A températures ordinaire et en atmosphère parfaitement sèche, le zinc pur est stable. L'oxydation ne commence d'une manière sensible que vers 225 °C.

- Il peut être attaqué lentement par l'acide sulfurique et l'acide chlorhydrique dilués avec dégagement d'hydrogène : la réaction est favorisée par la présence d'impuretés dans le métal tel que le cuivre, le fer, le nickel...
- Le zinc réagit lentement avec l'ammoniaque et l'acide acétique, plus rapidement avec l'acide nitrique (avec formation d'oxyde d'azote et parfois d'azote).
- Il est sensible à la plus part des substances organiques, à conditions que celles-ci soient exemptes d'acidité et d'humidité.

La poudre de zinc peut réagir de manière explosive avec divers produits : soufres, chlorates, chlorures, fluorures, nitrates de potassium [97, 98].

Il représente 0,004 % de la croûte terrestre. C'est un oligo-élément essentiel intervenant notamment dans le développement cellulaire et présent dans près de 200 enzymes [99].

Les niveaux de zinc dans le sérum et le plasma sont normalement d'environ 1 mg/L [100]. Les concentrations plasmatiques de zinc étaient significativement plus faibles chez les végétariens (0,81 mg/L chez les hommes et les femmes) que chez les non-végétariens (0,95 mg/L chez les hommes et 0,87 mg/L chez les femmes) [101]. La concentration de zinc dans le sang total est environ cinq fois plus élevée. Plusieurs études ont signalé une augmentation des taux de zinc dans le sérum après une exposition professionnelle au zinc. Les criblages de zinc sont largement appliqués dans la pratique clinique. Le prélèvement le matin après un jeûne nocturne est obligatoire en raison de changements diurnes prononcés et d'une baisse de la concentration plasmatique de zinc après les repas. La concentration de zinc dans les concentrés cellulaires est environ 10 fois supérieure à celle du plasma et il est nécessaire d'éviter l'hémolyse [102].

### 1.2.6.1. Fonctions et symptômes de perturbation des doses

Le fer est un composant essentiel des enzymes présent dans près de 200 enzymes. Leur niveau de concentration dans les tissus est sensible. Le tableau 1.3 répertorie les enzymes contenant du fer et résume les fonctions physiologiques des oligo-éléments et les caractéristiques de leurs états de carence et d'excès.

Tableau 1.3 : Fonctions du Zinc et symptômes de leur insuffisance et états excessifs. [62]

Oligo-élément	Enzymes contenant et les formes actives	Fonctions physiologiques	Symptômes de l'état de carence	Symptômes d'un état excessif
Zinc	Anhydrase carbonique Peptidase Alcool déshydrogénase Phosphatase alcaline Polymérase Doigt de zinc Ect.	Métabolisme des protéines Métabolisme lipidique Le métabolisme des glucides Métabolisme osseux	Principaux symptômes : Éruptions progressivement exacerbées, affectant d'abord le visage et le périnée Symptômes associés : Stomatite, glossite, alopecie, modifications des ongles, symptômes abdominaux (diarrhée, vomissements), fièvre Cicatrisation retardée des plaies, nanisme Retard de croissance, bilan N négatif,	Aigu : Carence relative en Fe-Cu, nausées, vomissements, douleurs abdominales, méléna, hyperamylasémie, somnolence, hypotension, œdème pulmonaire, diarrhée, jaunisse, oligurie Chronique : Fonction de reproduction réduite, nanisme, trouble du test,

			Immunosuppression, Symptômes mentaux (dépression), Trouble du goût, anorexie	hyposmie, anémie
--	--	--	--	------------------

#### 1.2.6.2. Principaux rôles du zinc dans l'organisme

- Permet la synthèse de nombreuses hormones, prostaglandines, insuline, hormones de croissance, prolactine, testostérone, thymuline, gustine, etc. [103].
- Participe aux métabolismes des lipides et des glucides, via une action sur la synthèse d'hormones (insuline) [104].
- Indirectement, favorise la croissance, via les hormones de croissance, la croissance cellulaire, la multiplication et la mort cellulaire, incluant les processus de cicatrisation [105].
- S'inclut au fonctionnement du système immunitaire, des réactions inflammatoires et de la protection contre les radicaux libres [106].
- Dans le système nerveux central, le zinc est présent dans les vésicules synaptiques. Il intervient notamment dans le métabolisme hypothalamique et hypophysaire. Le zinc synaptique modulerait les signaux inter-neuronaux. A été constaté qu'une carence en Zn a pour conséquence cérébrale, une diminution du nombre de neurones et du volume global cérébral. Un déficit hippocampique en zinc augmenterait le seuil épileptique, induisant une maladie épileptique [107].
- Indirectement favorise la bonne vision. Le zinc est nécessaire au métabolisme de la vitamine A, à la synthèse de RBP (Rétinol Binding Proteine) et comme catalyseur de la rétinol-déshydrogénase [108].

### 1.3. Les oligo-éléments et cancer

De nos jours, les oligo-éléments (Co, Cu, Cr, F ; Fe, I, Mn, Mo, Se and Zn) jouent un rôle essentiel dans nombreux processus biochimiques dans les organismes sont bien acceptée. L'insuffisance ou excès d'oligo-éléments de concentration engendre des troubles et peut avoir certaines maladies y compris le cancer [109, 110]. Certaines études ont prouvé qu'ils aient un grand potentiel biomarqueur de cancer et possible d'aider à diagnostiquer et dans l'étiologie et le développement du cancer. [111,112]

Parmi les rôles essentiel des oligo-éléments (Fe, Cu, Zn) l'activité anti-oxydant et a été prouvé depuis longtemps que le stress oxydant est capable d'induire des modifications au niveau de fortune génétique d'une cellule, qu'il peut participer ainsi aux différents processus d'initiation de la cancérogenèse. Ainsi, les mécanismes de la pathogenèse cancéreuse pourraient être influencés par les effets directs de certains oligo-éléments (comme le Fer, Cuivre et zinc) sur la formation de radicaux libres hydroxyles à partir de peroxyde d'hydrogène et de superoxyde via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, à travers concentrations intracellulaire de Fe, Cu et Zn. [113,114]

En ce qui concerne les cellules cancéreuses, le déséquilibre durable de la balance redox est lié à la production permanente des espèces réactives de l'oxygène .La cellule tumorale essaie faire des mécanismes de compensation néanmoins ne parviennent pas à rétablir un taux normal des espèces réactives de l'oxygène mais évitent un déséquilibre létal pour la cellule (figure.I.10.).

Il est connu que les cellules cancéreuses ont une caractéristique commune de voir l'activité de leur superoxyde dismutase (SOD) diminuer par rapport aux cellules saines. [115, 116] Cette modification du potentiel redox favorise la prolifération et la survie cellulaire. [117, 118]

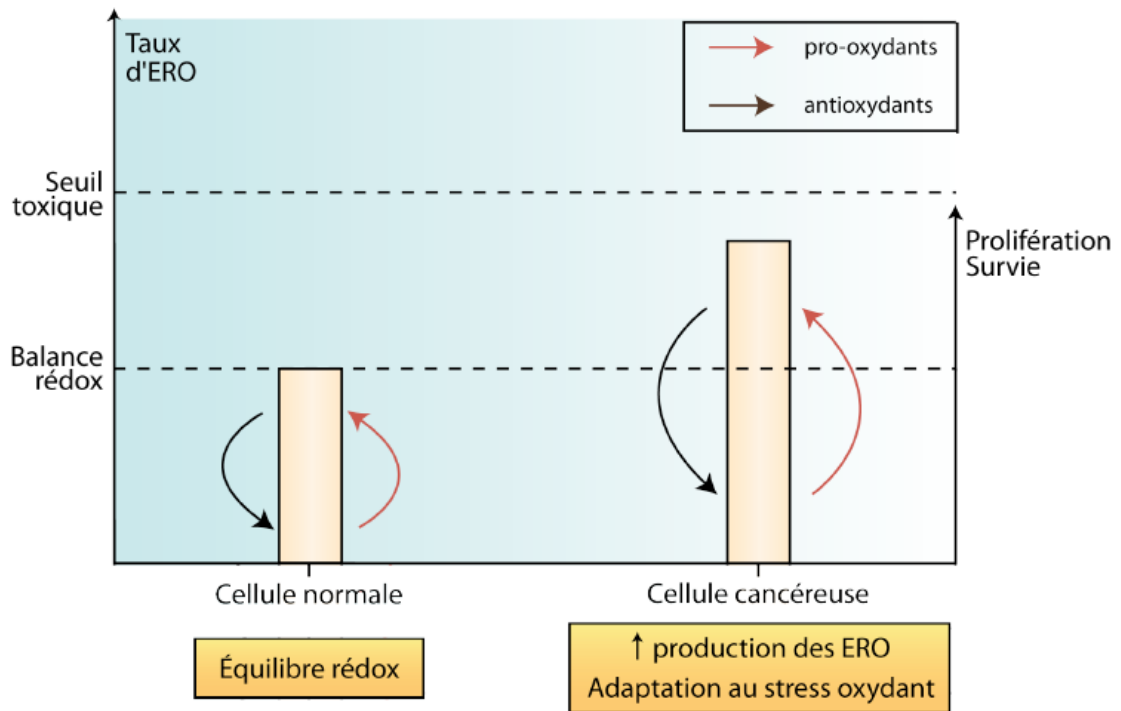


Figure 1.6 : Le déséquilibre de la balance rédox des cellules cancéreuses par rapport à la cellule normale. [119]

### 1.3.1. Fer et cancer

La cancérogénicité du fer a été clairement démontrée dans des modèles animaux [120], et des expériences humaines [121]. Le fer non lié aux protéines (fer «libre» ou catalytique) est un peroxydant, car sa participation au cycle redox est associée à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que les radicaux hydroxyles. Les ROS sont des molécules hautement réactives capables d'induire la peroxydation lipidique et les dommages oxydatifs de l'ADN [122]. De plus, le fer hème peut être impliqué dans la cancérogenèse en agissant comme un agent nitrosant (11), formant des composés N-nitroso qui sont des cancérogènes connus [123]. Cela pourrait expliquer l'association entre la principale source de fer hème et certains types de cancer [124].

Dans certaines conditions, comme dans l'hémochromatose héréditaire, des mutations génétiques dans le gène HFE conduisent à une accumulation de ce minéral dans les cellules parenchymateuses du foie et d'autres tissus, provoquant une surcharge en fer [125]. Cette condition est associée à un risque accru de

carcinome hépatocellulaire, principalement chez les patients atteints de cirrhose [126]. De plus, chez les sujets porteurs d'une mutation HFE, il existe des suggestions de risque accru pour d'autres types de cancer [127-129]. Toyokuni S. est bien expliqué comment le fer est cancérigène in vivo. [121]

### 1.3.2. Cuivre et cancer

Le cuivre est un métal redox actif qui peut améliorer la production de ROS et peut catalyser la production de radicaux libres et cela peut endommager les lipides, les protéines, l'ADN, d'autres biomolécules [130, 131]. Le stress oxydatif et l'inflammation chronique sont intrinsèquement liés à la transformation maligne des cellules [132]. Par conséquent, il a été proposé qu'une élévation du cuivre dans les tissus ou le sérum puis être un facteur de risque de carcinogenèse [133]. Margalith et al. [134] ont suggéré que le rôle des ions cuivre dans les dommages biologiques est causé par les radicaux super oxyde ou par d'autres agents réducteurs qui réduisent le complexe de cuivre. Où ils réagissent avec le peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux hydroxyles. Ces derniers endommagent la protéine, l'ARN et l'ADN qui ne sont pas réparables par les mécanismes cellulaires, déclenchant ainsi le processus malin. Le cuivre est impliqué dans le développement et la progression du cancer et peut faciliter la croissance du cancer, l'angiogenèse et les métastases.

### 1.3.3. Zinc et cancer

Le rôle du zinc dans un large éventail de processus cellulaires, y compris la prolifération cellulaire, la reproduction, la fonction immunitaire et la défense contre les radicaux libres, a été bien établi [135, 136]. Dont un rôle important dans la protection de l'ADN contre les dommages en tant qu'antioxydant, anti-inflammatoire [137], activité pré-apoptotique (Régulation de la mort cellulaire programmée) [138, 139] et composant de nombreuses protéines de réparation de l'ADN, même joue un rôle important dans la fonction des facteurs de transcription. Il semble que les effets d'une carence en zinc sur l'intégrité de l'ADN sont un effet multicouche impliquant à la fois le stress oxydatif et les voies de signalisation. Une partie importante des mutations génétiques qui augmentent le risque de cancer sont celles impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'ADN et la réparation de l'ADN.

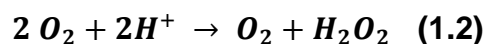
La supplémentation en zinc a le potentiel de cibler plusieurs points de la cascade de la carcinogénèse. Plusieurs études ont montré que des niveaux élevés de zinc cellulaire inhibent la croissance des cellules cancéreuses de la prostate [140, 141].

Cependant, ce phénomène peut rendre la prostate sensible aux changements de l'apport en zinc. Ils ont montré dans d'autres types de cellules que les modifications du zinc intracellulaire ont un effet dramatique sur les dommages et la réparation de l'ADN et donc sur le risque de cancer [142]. Il est possible qu'une carence alimentaire en zinc augmente le risque d'un individu de dommages oxydatifs à l'ADN dans la prostate et cancer de la prostate.

#### 1.4. Superoxyde dismutase (SOD)

La première fois de décrite le SOD est extrait des corpuscules rouge de bovins par Mann et Keilin en 1939. Puis McCord et Fridovich, en 1969, ont établi son activité enzymatique qui catalyse l'obtention de peroxyde d'hydrogène à partir de la dismutation du radical superoxyde, c. à. d. catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène (1.2). C'est pour ça, cette enzyme représente une partie importante du système de défense contre les radicaux libres. Leur nature varie en fonction de leur lieu d'activité : La mitochondrie abrite la forme à manganèse Mn SOD, tandis que le cytosol et le milieu extracellulaire voient évoluer la forme cuivre-zinc CuZn SOD. Ce sont des enzymes indispensables à la survie de tout organisme aérobie. [143, 144]

La Réaction de dismutation du radical superoxyde catalysée par la SOD :



##### 1.4.1. CuZn SOD et cancer

La CuZn SOD possède un rôle important dans les phénomènes d'invasion cellulaire et métastatiques. La surexpression de la CuZn SOD entraîne une inhibition de la croissance tumorale et peut annihiler une partie des phénotypes malins parmi les cellules cancéreuses. Où une trop faible teneur en SOD dans les cellules par rapport à d'autres systèmes antioxydants enzymatiques (AEs) entraîne une accumulation de radical superoxyde. Même le taux trop élevé de SOD par rapport à ces AEs donne lieu à une surproduction de peroxyde d'hydrogène qui, ne

pouvant être transformé en eau, est converti en radical hydroxyle via la réaction de Fenton. Les propriétés anti-tumorales d'une surexpression en CuZn SOD sont donc intimement liées à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène au sein de la cellule. [145]

De nombreuses études anciennes [146, 147] ont révélé que l'enzyme principale du système de défense anti-oxydant intracellulaire cuivre-zinc superoxyde dismutase (CuZnSOD) est présente dans les mitochondries et le radical superoxyde provient de sa membrane dans les cellules normales et malignes pour fabriquer de l'hydrogène peroxyde. Mais les mitochondries malignes contiennent peu d'activité SOD, elles ne peuvent donc pas produire de peroxyde d'hydrogène, contrairement aux cellules normales.



## Chapitre II :

### Bases théoriques des techniques spectroscopiques

La spectroscopie est l'étude de l'interaction du rayonnement électromagnétique avec la matière. Il y a trois aspects à une mesure spectroscopique : l'irradiation d'un échantillon avec un rayonnement électromagnétique ; mesure de l'absorption, de l'émission spontanée (fluorescence, phosphorescence) de l'échantillon ; et l'analyse et l'interprétation de ces mesures. La spectrométrie d'émission des rayons X est devenue une importante méthode d'analyse élémentaire non destructive. Pour pouvoir utiliser à fond les aspects qualitatifs et surtout quantitatifs de cette méthode, il est nécessaire d'en connaître les bases physiques. Le but est de faire un rappel court et élémentaire.

#### 2.1. Nature des rayons X

Les rayons X font partie du spectre de rayonnements électromagnétique. Les rayons X se situent entre les rayons ultra-violet et les rayons  $\gamma$  avec une longueur d'onde comprise couramment entre environ 1nm (rayons X mous) et  $10^{-3}$  nm (rayons X durs), soit avec une énergie des photons située en gros en 1keV et 1MeV (Figure 2.1).

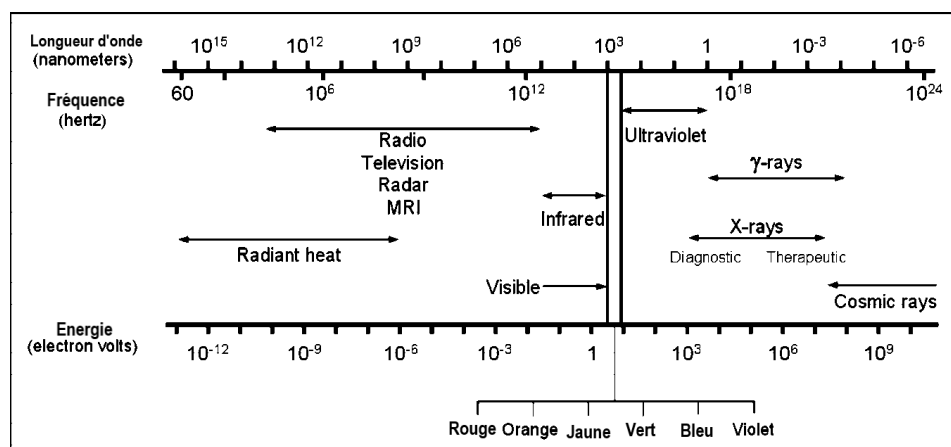


Figure 2.1 : Le spectre électromagnétique, présenté en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence et de l'énergie. [148].

Les rayons X proviennent d'interaction en dehors du noyau atomique. Les rayons X sont créés à la suite de la conversion et la conversion de l'énergie. [148]. Il existe des sources naturelles des rayons X dans l'univers et sur la terre. [149]. Les sources artificielles créées par l'homme sont basées principalement sur l'interaction des électrons avec la matière (tube à rayon X).

## 2.2. La production des rayons X

Les rayons X sont générés lorsque des électrons accélérés interagissent avec la matière. Dans un tube radiographique à rayons X, les électrons énergétiques interagissent avec un matériau cible et une partie de l'énergie cinétique des électrons est convertie en rayonnement électromagnétique, ou rayons X (la majeure partie de l'énergie cinétique des électrons est dissipée sous forme de chaleur). [148, 150]

Un tube à rayons X est le composant nécessaire pour la production et le contrôle des rayons X. En 1895, Wilhelm Conrad Roentgen a découvert les rayons X en utilisant un appareil similaire à celui illustré à la figure 2.2. Le tube à rayons X fournit l'environnement et les composants appropriés pour produire des rayons X, tandis que la source haute tension fournit une tension électrique et des commandes utilisateur pour alimenter le tube à rayons X. Le tube à rayons X ont 2 électrodes, la cathode et l'anode, sont situées à une petite distance l'une de l'autre (environ 1 à 2 cm) dans une enceinte à vide appelée insert, en verre ou en métal. Connectés à la cathode et à l'anode sont des câbles haute tension négatifs et positifs, respectivement, provenant de la source haute tension. L'application d'une haute tension, généralement comprise entre 50 000 et 150 000 V (50-150 kV), à la cathode et à l'anode. L'émission continue d'électrons continus à partir de la surface du filament à une vitesse dépendant de la température du filament (c'est-à-dire le courant du filament) pendant l'exposition. Le courant du tube, défini comme le nombre d'électrons circulant entre les électrodes, est exprimé en unités milliampères (mA), où 1A est égal à  $6,24 \cdot 10^{18}$  électrons/s. Ainsi, la tension du tube (kV), le courant du tube (mA) et la ou les durée (s) d'exposition sont des paramètres sélectionnables par l'utilisateur pour la production de rayons X. [148, 151]

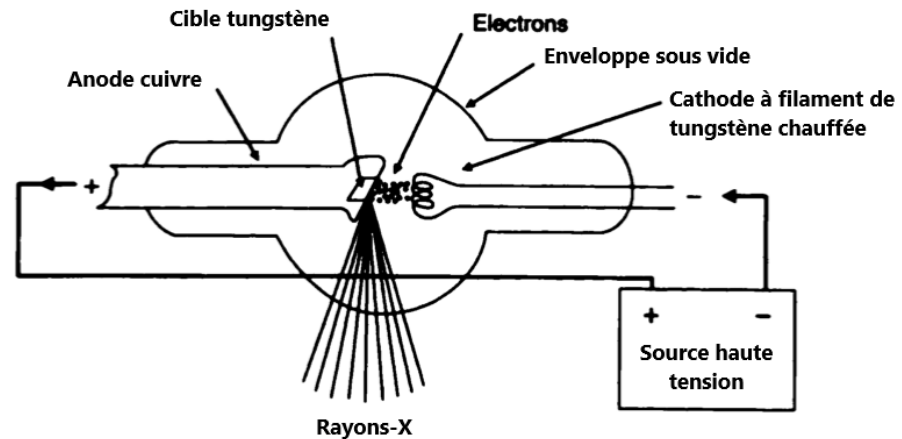


Figure 2.2 : Schéma de base d'un tube à rayons X. [152].

### 2.2.1. Notion spectroscopies

L'émission des rayons X résulte de l'interaction de rayonnements, ondes et particules, d'énergie suffisante, avec la matière. Ces rayonnements incidents peuvent être les électrons, les rayons X, les ions, les rayonnements,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  etc.

Le spectre de rayons X émis consiste en la superposition de fond continu et des raies caractéristiques.

#### 2.2.1.1. Le fond continu

Le rayonnement de freinage «bremsstrahlung», qui décrit le processus de production de rayons X résultant de la décélération d'électrons hautement énergétiques au voisinage d'un noyau atomique de la cible (anode) du tube à rayons X. Un enregistrement des énergies continues des rayons X produites à la suite de l'interaction bremsstrahlung. Ceci est également connu sous le nom de spectre de rayons X polychromatique, "spectre de bremsstrahlung continu". [151]

#### 2.2.1.2. Les raies caractéristiques

Si l'énergie des électrons accélérés vers la cible est suffisamment élevée, un rayon X caractéristique peut être produit à la suite de l'interaction de l'électron accéléré avec un électron orbital de couche interne dans le matériau cible. Les électrons orbitaux du matériau cible sont liés au noyau à des énergies de liaison discrètes, énergie caractéristique.

La figure 2.3 présente un Spectre radiographique général produit avec un tube à rayon X.

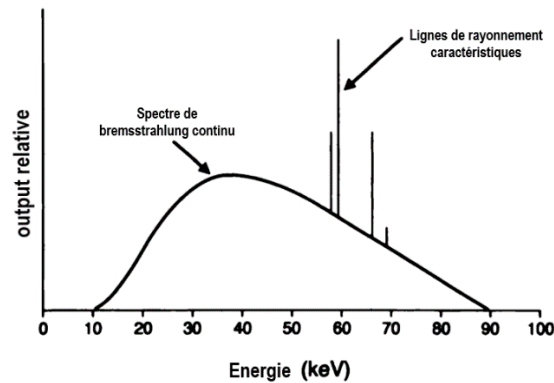


Figure 2.3 : Spectre radiographique général produit avec un tube de potentiel de 90 keV. Le spectre continu-bremsstrahlung englobe une large gamme d'énergies, et les rayons X caractéristiques se retrouvent dans des bandes d'énergie étroites. [152]

### 2.2.1.3. Energie des raies

Lors de l'ionisation de l'atome cible, une lacune électronique est créée, et se trouve en un temps très court (de l'ordre de  $10^{-15}$  s) comblée par un électron d'une couche plus externe, La transition de l'électron de sa couche initiale (L) vers une couche plus profonde (K) implique un changement de son énergie de liaison qui se traduit par une émission d'un rayonnement X, L'énergie E de l'émission X varie, d'après la loi de Moseley, en fonction du numéro atomique Z de l'atome. [153].

$$E = R\left(\frac{1}{n_f^2} - \frac{1}{n_i^2}\right)(Z - \sigma)^2 \quad (2.1)$$

Où R est la constante de Rydberg en eV,  $n_f$  et  $n_i$  sont respectivement les niveaux d'énergie final et initial, Z est le numéro atomique et  $\sigma$  est constante d'écran. Les transitions entre niveaux atomiques correspondent à des énergies discrètes se traduit par un spectre caractéristique en énergie des photons émis constitué par une série de raies discontinue.

### 2.2.1.4. Intensité des raies

L'intensité du rayonnement mesuré dépend de plusieurs facteurs, certains fondamentaux (Section efficace d'ionisation, rendement de fluorescence, atténuation des rayonnements, d'autres instrumentaux (puissance de la source de rayonnement incident, ouverture du faisceau, angle d'incidence du faisceau primaire sur l'échantillon et angle d'émergence du rayonnement X vers le spectromètre). Dans toute méthode de spectrométrie quantitative, on cherche à relier la concentration massique  $C_j$ , d'un élément j du matériau à analyser à

l'intensité mesurée  $I_j$  d'une raie X caractéristique de cet élément. Les interactions du faisceau incident et des rayonnements engendrés avec tous les éléments du matériau rendent la relation complexe. Différents modèles ont été développés et sont constamment perfectionnés.

### 2.3. Interaction des rayons X avec la matière

Pour analyser les matériaux en général, nous utilisons le rayonnement dans les méthodes de diffractions et spectrométries (XDR, XRF, EDX...). Ces méthodes sont basées sur l'interaction du rayonnement avec la matière. En réalité, cette interaction est plus complexe que le simple «passage». Lorsque le photon à rayons X pénètre dans une couche de matière, il peut pénétrer à travers sans aucune interaction (figure 2.3A), ou il peut interagir et transférer de l'énergie à la matière (figure 2.4 B, C, D). Il existe quatre principaux types d'interactions : l'effet photoélectrique, la diffusion incohérente ou Compton, la diffusion cohérente ou «photon de Rayleigh» et la création de pair. Les trois premières interactions jouent un rôle important en radiologie diagnostique. L'explication de chaque interaction est présentée dans les paragraphes suivants.

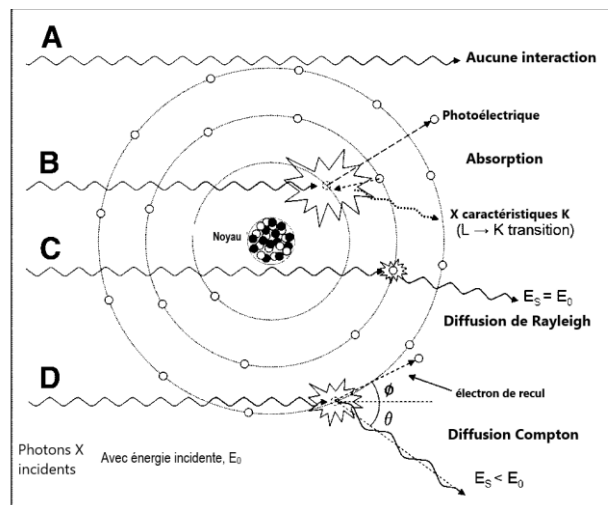


Figure 2.4 : Les principales interactions des rayons X avec la matière. [148]

#### 2.3.1. L'effet photoélectrique

Comme les photons incidents sont complètement absorbés, l'effet photoélectrique est appelé «vraie absorption». C'est le processus dominant pour l'absorption des rayons X jusqu'à des énergies d'environ 500 keV (figure 2.5 A). Lorsque l'énergie incidente est égale ou supérieure à l'énergie de liaison de l'atome

alors le photon sera « arrache » l'un des électrons de la couche. En conséquence, l'atome ionisé doit retourner dans l'espace neutre. Un électron d'un niveau d'énergie supérieur passera au niveau d'énergie non rempli. Cela peut se produire comme une cascade de la couche L à la couche K et de la couche M à la couche L. Cet électron en mouvement a un excès d'énergie pour s'en débarrasser. Par conséquent, pendant la transition, un photon est produit. L'émission de ce photon s'appelle la fluorescence ou le rayonnement caractéristique. Ce processus est fréquent pour les atomes à numéro atomique élevé [154].

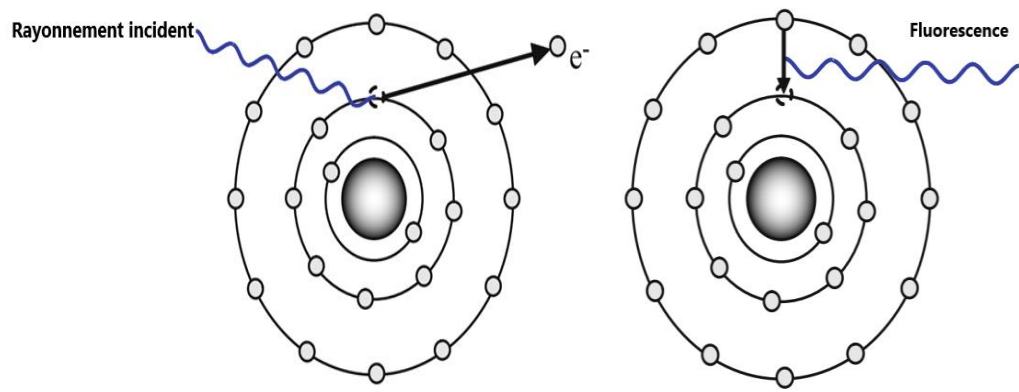


Figure 2.5.A : L'effet photoélectrique ; La fluorescence. [155].

Parfois, pendant la transition, le photon produit est transféré à un électron externe, est éjectant de l'atome (la figure 2.5.B), c'est qu'on appelle l'électron Auger [156].

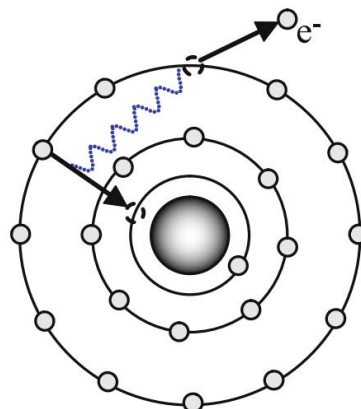


Figure 2.5.B : Processus d'émission d'électron Auger. [155]

La probabilité d'absorption photoélectrique dépend de l'énergie des rayons X, de l'énergie de liaison des électrons et du numéro atomique de l'atome. La probabilité

est donnée approximativement par l'équation (2.1), qui montre que l'interaction est plus importante pour les atomes lourds et les rayons gamma de faible énergie [157]:

$$\tau \propto Z^4/E^3 \quad (2.2)$$

Où  $\tau$  coefficient d'atténuation massique photoélectrique. Lorsque l'énergie des rayonnements diminue, la probabilité d'absorption photoélectrique augmente rapidement.

### 2.3.2. Diffusion Compton « incohérente »

Le photon incident entre en collision avec un électron atomique, Figure 2.6, Le photon est diffusé avec une énergie réduite. L'électron reçoit l'énergie cinétique [156] :

$$E_c = h\nu - h\nu' \quad (2.3)$$

Où  $h\nu$  est l'énergie du photon incident et  $h\nu'$  est celle du photon diffusé.

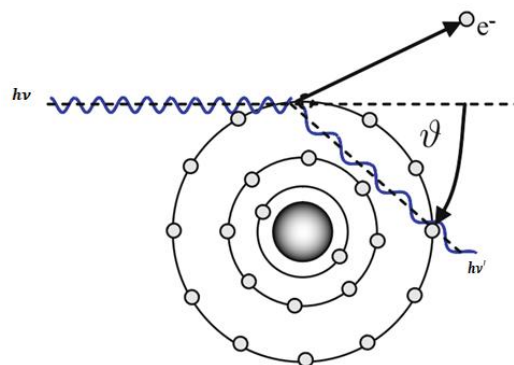


Figure 2.6 : Diffusion Compton ou incohérent. [155]

### 2.3.3. Diffusion Rayleigh

Aussi appelée diffusion Thomson, elle se produit lorsqu'un photon s'approche de l'échantillon avec une énergie insuffisante pour ioniser l'atome. Son énergie est généralement d'environ 10 à 70 keV. Le photon incident est dévié dans une nouvelle direction sans aucune perte d'énergie. Il garde sa même longueur d'onde et son pouvoir pénétrant. La diffusion cohérente (figure 2.7) est de peu d'importance en imagerie médicale et a une contribution mineure au coefficient d'absorption. [158]

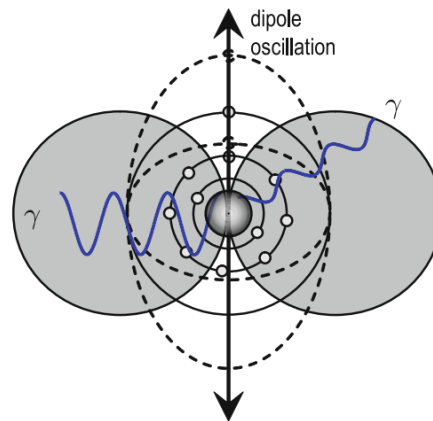


Figure 2.7 : Diffusion Rayleigh cohérente [155]

La possibilité de diffusion de Rayleigh augmente avec l'augmentation de  $Z$  de l'absorbé et la diminution de l'énergie des rayons X.

#### 2.3.4. Création de pair

Lorsqu'un photon d'énergie  $h\nu$  supérieure à deux fois la masse de l'électron (1,022 MeV) rencontre la matière, il peut y avoir le processus de matérialisation (Figure 2.8), c'est-à-dire la transformation de ce photon en deux particules qui sont un électron ( $e^-$ ) et un positron ( $e^+$ ).

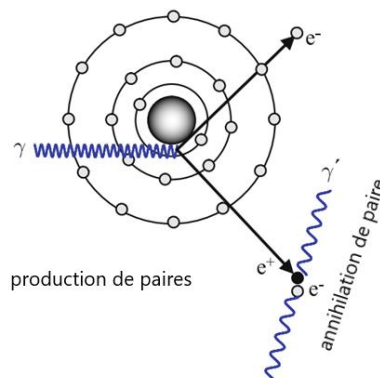


Figure 2.8 : Le processus de production de paires électron-positon. [155]

#### 3.4. Loi d'atténuation

L'atténuation ou l'absorption des rayons X par un matériau se traduit par une diminution de l'intensité du rayonnement (donc du nombre de photons par seconde) dans la direction incidente après traversée de ce matériau. L'absorption est due essentiellement (95% env.) à l'effet d'ionisation ou photoélectrique ; la diffusion



n'intervient que pour une très faible part (5% env.) et peut être négligée. Lorsqu'un rayonnement incident d'intensité  $I_0$ , un absorbeur d'épaisseur  $x$  et de coefficient d'atténuation  $\mu$ . L'intensité émergente ( $I$ ) transmise par l'absorbeur est donnée par l'expression exponentielle [157] :

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (2.4)$$

## 2.5. La fluorescence

La fluorescence est le phénomène physique obtenu à la suite de l'effet photoélectrique, en concurrence avec l'émission d'électrons Auger comme processus de désexcitation, lorsqu'on irradie une substance avec un faisceau de rayons X de fréquence déterminée, elle atténue le faisceau (par différentes interactions) et se comporte à son tour comme source de rayons X. L'analyse spectrale de cette nouvelle source de rayonnement permet d'y distinguer des rayonnements diffusés et rayonnements de fluorescences (figure 2.9).

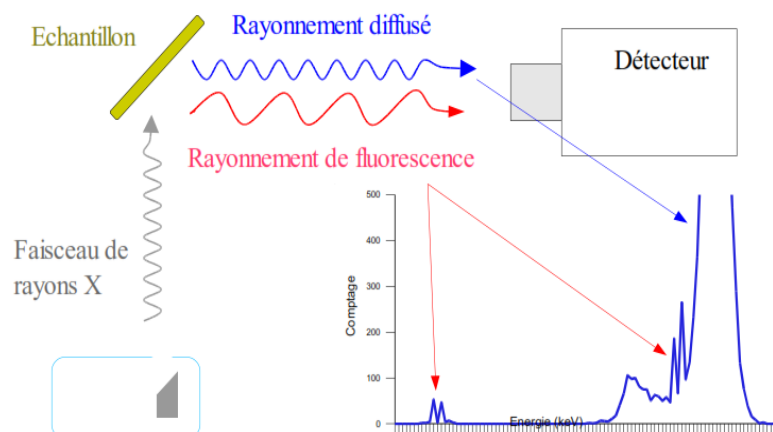


Figure 2.9 : Obtention du spectre d'émission des rayons X, rayonnements diffusés et les rayonnements fluorescence. [159]

Le rayonnement fluorescent est dans la région des rayons X et se compose uniquement des spectres de raies caractéristiques [160].

### 2.5.1. Durées de vie et rendements de fluorescence

La durée de vie de fluorescence et le rendement sont peut-être les caractéristiques les plus importantes. Le rendement de fluorescence est le nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés. La durée de vie est

également importante, car elle détermine le temps disponible pour que la fluorescence interagisse ou se diffuse dans son environnement, et donc les informations disponibles à partir de son émission [161].

Les significations du rendement de fluorescence et de la durée de vie sont mieux représentées par un diagramme de Jablonski simplifié, illustré dans la figure 2.10 :

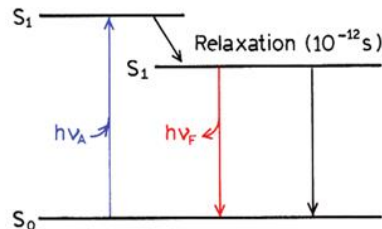


Figure 2.10 : Un diagramme de Jablonski simplifié pour illustrer la signification des rendements quantiques et des durées de vie. [162]

Le rendement quantique de fluorescence est le rapport du nombre de photons émis au nombre absorbé. La durée de vie de l'état excité est définie par le temps moyen que la molécule passe dans l'état excité avant de revenir à l'état fondamental. En général, les durées de vie de fluorescence sont proches de 10 ns. [162]

## 2.6. La spectroscopie XRF

Dans cette technique, d'après le spectre des rayons X émis par la matière analysée on peut déduire la composition élémentaire, c'est-à-dire analyse qualitative. Même ces photons (rayons x) recueillis comme comptes sous forme de pics, qui sont directement proportionnels à la concentration de l'élément d'intérêt c'est à dire l'analyse quantitative. Généralement, dans la spectroscopie par fluorescence de rayons X on distingue des méthodologies différentes selon les angles d'incidence, de réflexion et selon le mode de détection entre autres.

### 2.6.1. Spectromètre XRF à dispersion d'énergie (EDXRF)

Dans un spectromètre EDXRF, l'optique est plus simple que pour d'autres spectromètres tels que WDXRF, puisqu'il n'utilise pas de cristaux, le photon de fluorescence de l'échantillon frappe le détecteur directement, le signal détecté est proportionnel à l'énergie du photon. Les éléments et leurs concentrations sont identifiés en comptant les signaux à différents intervalles d'énergie. Généralement

un analyseur multicanal est utilisé pour visualiser et fournir les données ; chaque canal prend en compte simultanément le nombre de photons avec une certaine énergie [163]. Les limites de détection des spectromètres ED-XRF se situent généralement au niveau des parties par million (ppm) [164,165].

#### 2.6.1.1. Détecteur

Sa fonction est de transformer les photons en charges électriques proportionnelles à l'énergie des photons incidents [166]. Le choix d'un type spécifique de détecteur dépend de la gamme d'énergie des photons, de l'efficacité de la résolution et du temps de réponse court.

##### a). La résolution

La résolution du détecteur est la capacité de différencier les photons d'énergies différentes et les énergies proches ; est mesurée par la largeur à mi-hauteur de la raie  $K_{\alpha}$  du manganèse. Elle est donnée par [167] :

$$\text{Résolution en énergie} = \frac{FWHM}{\text{hauteur d'impulsion au centre du pic}} 100\% \quad (2.5)$$

##### b). Le temps de réponse

Est le temps mis par le détecteur pour produire un signal après avoir reçu le rayonnement. Plus précisément, lorsqu'un événement est enregistré, le temps mort est le temps pendant lequel le signal est incapable d'enregistrer un autre événement. Les principales causes de temps mort sont soit un chevauchement des impulsions, soit le comptage des pertes. [167]

#### 2.6.1.2. La source des rayons X

Les tubes à rayons X à l'analyse EDXRF doivent être caractérisés par [168] : Anode en diffusion avec matériau approprié ; haute tension, Henrich et al. [169] reportent des conditions de fonctionnement de 60 kV et 60 mA pour un tube à rayons X avec anode de Ag. Des courants compris entre 10  $\mu$ A et 10 mA, qui donnent lieu à une intensité photonique de plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle des radio-isotopes, et bonne stabilité dans le temps.

##### a). Choix de la tension d'accélération

La tension entre la cathode et l'anode est le paramètre qui intervient le plus sur l'allure du spectre, dépendent également l'intensité du fond continu, le volume excité, en particulier la pénétration des électrons et donc la profondeur de la zone

d'émission. La tension d'accélération intervient sur le rapport pic sur bruit de fond ; l'augmentation de la tension d'accélération permet de détecter les éléments les plus lourds sans sacrifier la limite de détection des éléments légers.

- Limite de détection : est le niveau de concentration le plus bas, elle est exprimée en concentration ou en quantité dérivée de la plus petite valeur mesurée  $x$ . Donne selon l'équation [166] :

$$LLD = \frac{3\sqrt{\text{fond continu}}}{I} \times C \quad (2.6)$$

$I$  : l'intensité du pic,  $C$  : la concentration de l'élément

#### b). choix de courant d'excitation

Le choix du courant du tube n'est pas critique car les taux de comptage de pic et de fond continu augmentent plus ou moins linéairement avec l'augmentation du courant. [170]

#### c). Bruit de fond et effet de matrice

Le fond provient essentiellement de deux sources : la diffusion du rayonnement primaire par l'échantillon et le bruit général de l'instrument. La diffusion se présente sous deux formes : la diffusion cohérente ou Rayleigh et la diffusion incohérente ou Compton [171]. La diffusion cohérente et incohérente dépend de la matrice, l'intensité du pic de Compton et le coefficient d'absorption de masse sont inversement liés [172].

### 2.6.2. Analyse en spectrométrie de fluorescence X

#### 2.6.2.1. Analyse qualitative

Lors d'une analyse qualitative, le spectre est enregistré ; les lignes et les éléments sont identifiés et parfois qualifiés de majeurs, mineurs ou traces, Cela ne peut être fait qu'avec des systèmes séquentiels. Pendant de nombreuses années, cela a dû être fait manuellement, des logiciels d'évaluation automatique ou interactive des spectres ont été proposés très tardivement par les fabricants de spectromètres à dispersion de longueur d'onde [173]. Par conséquent, la XRF à dispersion d'énergie (EDX) a été considérée comme la technique préférée pour obtenir une vue d'ensemble qualitative.

### 2.6.2.2. Analyse quantitative

Lorsqu'un faisceau de rayons X se propage à travers un échantillon, son intensité est modifiée par les effets des éléments de matrice, concordant avec la génération de rayons X caractéristiques, l'absorption des rayons X émis le long de leurs trajets et l'effet d'enrichissement dû à l'excitation secondaire. Les études de ces processus de modification et des phénomènes physiques liés aux rayons X conduisent à la dérivation de formules mathématiques de correction. De nombreuses méthodes, à la fois empiriques et théoriques, ont été proposées pour la correction. Ils sont divisés en deux grands groupes : les méthodes de compensation et de correction matricielle (Figure 2.11). De plus, une seule méthode permet de minimiser les effets de matrice. Cette méthode est basée sur la préparation d'échantillons minces. Pour ces échantillons, les effets de matrice ne sont pas observés dans les conditions de mesure et une relation linéaire entre l'intensité du rayonnement et la concentration d'analyte est observée. Dans d'autres méthodes quantitatives, les effets de matrice sont toujours présents mais ils sont corrigés ou compensés.

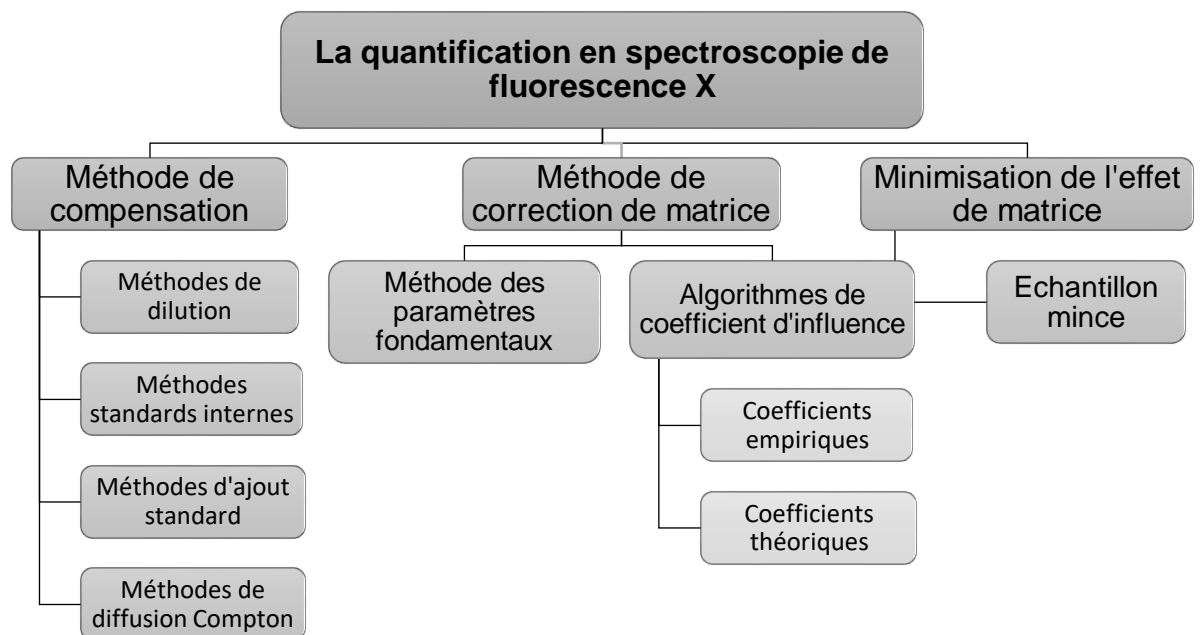


Figure 2.11 : Division générale des méthodes appliquées à l'analyse quantitative XRF. [174]

Les méthodes de compensation (les variations des effets de matrice résultant de diverses compositions d'échantillons sont minimisées), à l'exception de la diffusion Compton, sont toutes bien connues dans d'autres techniques analytiques, par ex.

spectrométrie d'absorption ou d'émission atomique. Dans ces méthodes, une préparation spéciale des échantillons est requise et un seul ou quelques éléments peuvent être déterminés quantitativement. Par conséquent, les méthodes de compensation sont moins populaires que les méthodes de correction de matrice. Il convient de souligner que l'intensité de rayonnement de l'analyte peut être calculée à partir de la théorie. Cette fonction est propre aux techniques de spectrométrie X. Aucune autre technique analytique ne permet une telle combinaison de calculs théoriques et de résultats expérimentaux. [174]. Plusieurs logiciels de la spectroscopie de fluorescence utilisant la méthode des paramètres fondamentaux ont été décrits. Six paquets sont comparés dans [175].

Méthode des standards : La XRF est une méthode analytique relative et nécessitera toujours une fonction analytique, qui relie les intensités mesurées aux concentrations d'éléments ou de composés. Le but de l'utilisation des standards est double : en établissant des rapports de taux de comptage, les facteurs inconnus dans les équations des Paramètres Fondamentales s'annulent. En négligeant la géométrie réelle (par exemple, les divergences de faisceau), plusieurs types d'interactions (comme la diffusion) et d'autres facteurs d'influence (microstructure, état chimique, variation spectrale distribution du faisceau primaire à travers l'échantillon, etc.). On suppose que les intensités de ligne mesurées à partir d'échantillons inconnus et de standard soient affectées de la même manière et du même facteur par ces erreurs, ce facteur peut s'annuler en établissant des ratios appropriés. [176]

## 2.7. Échantillon biologique

L'intérêt pour les applications cliniques augmente d'année en année. D'autres applications de l'analyse XRF comprennent les échantillons biologiques, les matériaux biologiques étant hétérogènes. Par conséquent, des tests de séchage, de poudrage, d'homogénéisation et d'homogénéité peuvent être nécessaires avant de préparer les échantillons pour la mesure. Divers traitements de matériaux biologiques comprennent en outre la lyophilisation, l'incinération et la digestion humide. La méthode de digestion doit être optimisée et la récupération des éléments et la précision de la procédure doivent être testées.

### 2.7.1. La digestion par voie humide

La complexité des matériaux biologique oblige à choisi une des technique de décomposition des échantillons compatible avec l'objectif spécifique de l'analyse.

LA technique de digestion avec un système ouvert et un chauffage conventionnel, par réactifs nécessaires ; cette technique très peu couteuse pour l'analyse de routine car elle peut être facilement automatisée ; tous les paramètres pertinents (temps, température, introduction des réactifs digestive) se dirigent vers un contrôle simple. La majorité des méthodes de digestion humide (décomposition totale et forte attaque) impliquent l'utilisation d'une combinaison d'acides oxydants ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HClO}_4$  const. chaud,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) et d'acides non oxydants ( $\text{HCl}$ ,  $\text{HF}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$  dilué) et le peroxyde d'hydrogène [177,178]. La digestion humide détruit ou supprimé souvent la matrice de l'échantillon, contribuant aussi à réduire ou éliminer certains types d'interférences.

Les avantages et les inconvénients de la technique de digestion par voie humide dans le système ouvert par chauffage conventionnel [179], en ce qui concerne le perte d'analyte, source des risque, la taille de l'échantillon, le temps et le degré de digestion et les aspects économiques sont résumé dans le tableaux 2.1.

Tableau 2.1 : Les avantages et les inconvénients de la technique de digestion par voie humide dans le système ouvert par chauffage conventionnel.

Voie possible des pertes	Source de risque	Taille d'éch.		T max (°C)	Temps	degré	Aspects économiques
		Organique	Inorganique				
Volatilisation	Acides, air, conteneur	< 5 (g)	< 10 (g)	<400	Plusieurs heures	Incomplète	Peu couteux A besoin de surveillance

La nature d'échantillon biologique, l'analyte, la disponibilité des réactifs et l'équipement jouent généralement un rôle décisif dans le choix de la procédure de digestion car ils aident à sélectionner les meilleures conditions appropriées pour donner le rendement le plus élevé de matériaux extractibles. Les variables à optimiser comprend : 1. Réactifs de digestion, 2. Température de digestion 3. Temps de digestion.

### 2.7.1.1. Réactifs de digestion

Les acides les plus efficaces utilisées dans la digestion d'échantillon inorganique et organique sont HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HF et HNO<sub>3</sub> en raison de leur fort pouvoir oxydant, leur force oxydante peut être augmentée par l'addition de chlorate, de permanganate et de peroxyde d'hydrogène

- L'acide nitrique HNO<sub>3</sub> : Est l'acide le plus couramment utilisée pour l'oxydation des matrices organiques cette dernière déroule lentement et est généralement réalisée en chauffant à plusieurs reprises la solution aux fumées, mais HNO<sub>3</sub> est rarement utilisé seul pour décomposer les matières organiques [180]. Son pouvoir oxydant peut être augmenté. Lorsqu'il est utilisé en conjonction avec d'autre acide [181].
- L'acide perchlorique HClO<sub>4</sub> : est l'un des acides minéraux forts et possède de puissantes propriétés et déshydratantes lorsqu'il est concentré et chaud. Tous les perchlorates, à l'exception de ceux de K, RB et Cs, sont facilement solubles dans l'eau. [178]. Le HClO<sub>4</sub> a des propriétés oxydantes uniquement dans les solutions concentrées chaudes ; une fois dilué, ses propriétés oxydantes sont perdue [182]. L'évaporation de HClO<sub>4</sub> doit être effectuée dans une hotte spécialement conçue à cet effet [178]. Même il réagit de manière explosive avec les substances organiques.
- La mixture des acides HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub> : Un mélange de HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub> est utilisé pour l'oxydation des composants organiques. L'acide perchlorique assuré une oxydation rapide et complète, et la présence de HNO<sub>3</sub> lors d'oxydation par HClO<sub>4</sub> a éliminé tout risque d'explosion [183]. Le HNO<sub>3</sub> est partiellement déshydraté par HClO<sub>4</sub>. En augmentant la température lors de l'évaporation du HClO<sub>4</sub>, le HNO<sub>3</sub> est facilement éliminé [182].

### 2.7.1.2. La température de digestion

La température est un facteur important qui affecte sur l'efficacité de la digestion acide. Le maximum de température limité par le point d'ébullition de solution. Pour le HNO<sub>3</sub>, le point d'ébullition est 122°C pour 68% d'acide, et son effet oxydant augmente fortement à des températures proches de 120°C. Pour le HClO<sub>4</sub>, le point d'ébullition est 203 °C pour 70% d'acide, l'oxydation est très rapide à 150°C. [182]



Dans le système ouvert, en augmentant la température au cours du temps pour éviter les réactions spontanée au démarrage.

#### 2.7.1.3. Le temps de digestion

La durée de la digestion acide dans un système ouvert est de 2h à 15 heures, On besoin de réduire le temps de la digestion pour éviter l'usure inutile de l'équipement en raison de la vaporisation des acides la haute température diminue le temps d'oxydations.

#### 2.7.2. L'erreur systématique dans la digestion

Lors de la digestion, il existe des difficultés associées à la manipulation quantitative et à la récupération de quantités sous microgrammes d'oligo-élément. Les erreurs systématiques dépendent fortement de l'élément à déterminer, de la matrice, de la méthode et du mode opératoire utilisés, des conditions du laboratoire et de certains autres paramètres. Les sources les plus importantes d'erreurs systématique [184] sont :

- 1) Echantillonnage, manipulations et stockage des échantillons inadéquats, inhomogénéité de l'échantillon.
- 2) Contamination de l'échantillon et/ou de la solution d'échantillon par des outils, appareils, conteneurs, réactifs et poussières en suspension dans l'air pendant la procédure d'analyse.
- 3) Effets d'adsorption et de désorption à la surface des conteneurs et aux limites de phase (par exemple Hg, As, Se, Cd, Zn) et de composant (par exemple oxydes, halogénures, hydrures des éléments) dues à la volatilisation.
- 4) Réactions chimiques non désirées ou incomplètes (par exemple changement de la valence des ions, précipitation, échange d'ions, formation des composés et des complexes).

## **Chapitre III : Matériel et méthodes**

Dans la section précédente, nous avons présenté le contexte théorique des méthodes utilisées dans cette étude (XRF, digestion humide ...). Dans ce chapitre, nous introduisons la méthodologie, les conditions expérimentales et les caractéristiques instrumentales utilisées dans cette étude. Comme notre travail vise à évaluer la concentration des oligo-éléments dans la population cancéreuse algérienne adulte.

### 3.1. Population cible

La population étudiée constituée des adultes algériens des deux genres, de différentes régions et qui ont participé suite à un consentement écrit ; la population comporte deux groupes.

#### 3.1.1. Témoins contrôle « groupe sains »

Les participants ont été évalués par analyse clinique (examen médical, tension artérielle...) et les critères d'exclusion des contrôles sains adultes étaient les maladies chroniques, la prise de médicaments au cours des 15 derniers jours, les toxicomanes c'est à dire :

- pas d'hypertension, d'anémie, de maladie cardiovasculaire, de diabète, de pathologie inflammatoire, ...).

- Aucune opération chirurgicale ou accouchement majeur au cours des 12 derniers mois.

- Pas de situation à risques (drogues, maladie sexuelle ...).

- Pas de prise de certains médicaments (antibiotique, suppléments : minéraux ou vitamines ...).

Les témoins présents dans les services d'intérêt de santé public (hôpital, polyclinique).

### 3.1.2. Patients cancéreux « CD »

Patients diagnostiqués d'un cancer (sein, prostate, vessie et gastro-intestinal), sous traitement de chimiothérapie. Les patients cancéreux représentant au niveau de l'hôpital universitaire de la Wilaya de Blida.

### 3.2. Questionnaire général

Le questionnaire est inspiré de l'enquête sur la santé des participant de Mansouri 2013, il comporte deux partis (figure 3.1) :

a). La partie 1 : Caractérisation des participants, comporte quatre volets : identification, localisation géographique, régime alimentaire, fumeur ou non et teinture des cheveux.

b). La partie 2 : Etat sanitaire des participants, sain avec les critères d'inclusion ou malade : traitement, type de maladie, stade, l'évolution et traitement suivi.

QUESTIONNAIRE

N° de questionnaire            date de questionnaire : .../.../2015

**Identification**

Nom : ..... Prénom : .....

Date de naissance : ..... Lieu de Naissance : .....

Genre :      Féminin :       Masculin :

Adresse : .....

Commune : ..... Daira : ..... Wilaya : .....

Localisation géographique : Urbaine :       Rurale :

Régime alimentaire :    Riche en gras   
    Riche en sucre   
    Régime spécial

Fumeur :    Oui :     Non :     Quantité : .....

Teinture des cheveux :    Oui :     Non :     Combien de fois : .....

**Etat de santé :**

Sain :

\*Doit se sentir en bonne santé (pas de : hypertension, anémie, maladie cardio-vasculaire, diabète, pathologie inflammatoire, ...)

\*Aucune grande opération chirurgicale ni aucun accouchement au cours des 12 derniers mois.

\* Pas de situation à risque (drogues, nouveaux partenaires sexuels ou multiples...).

\*Pas de prise de certains médicaments (antibiotique, suppléments : minéral ou vitamine,....)

Malade :

Service : ..... Médecin traitant : .....

Type de cancer : ..... Date de diagnostic : .....

Stade : ..... l'évolution : .....

Traitement suivi :    Chirurgie :   
    Radiothérapie :   
    Chimiothérapie :

Figure 3.1 : Le questionnaire distribué aux participants.

### 3.3. Description de l'échantillon

Les 80 patients cancéreux adultes, avant et sous traitement chimiothérapie. Il s'agissait de 45 (56%) femmes et 35 (44%) hommes âgés de 21 à 79 ans, tous ayant reçu un diagnostic de cancer du poumon, du sein, de la vessie, de la prostate, gastro-intestinal (vésicule biliaire, gastrique, colorectal), à différents stades de la maladie. Les 98 témoins sains adultes étaient 44 (45%) femmes et 54 (55%) hommes dans la tranche d'âge de 18 à 64 ans. Ils étaient étudiants et se portaient

volontaires dans les centres hôpitaux publics. (Figure III.2) Par une étude multicentrique (différent centre de différent Willaya)

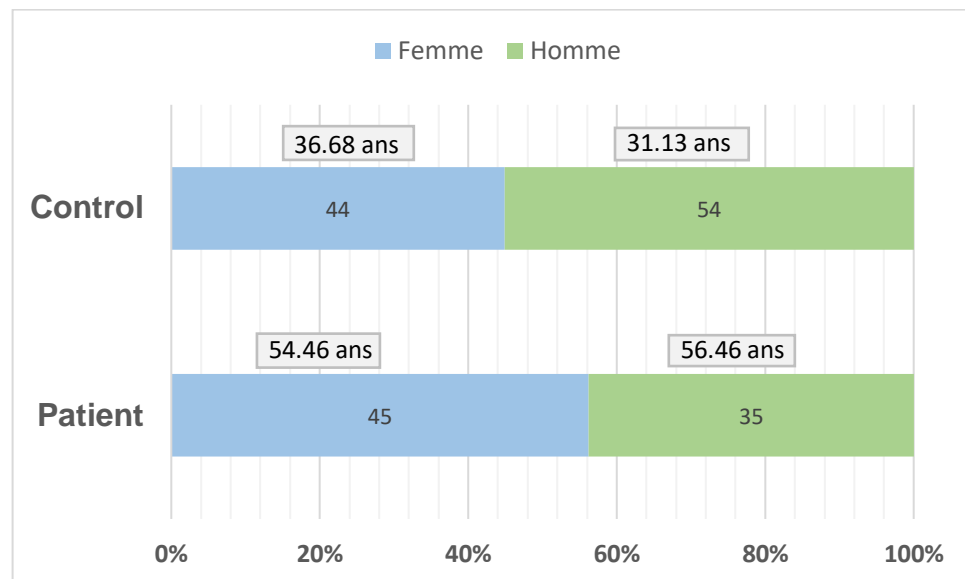


Figure 3.2 : Description de population.

#### 3.4. Prélèvement et préparation de plasma

Pour des raisons évidentes de praticabilité, d'intégrité et de standardisation, nous avons choisi un seul milieu biologique pour voir le sang total des individus témoins et malades. Pour garantir la qualité des échantillons de sang, différentes règles doivent être respectées [185]. Les échantillons de sang ont été prélevés par ponction veineuse standard, après une nuit de jeûne avec des seringues stérilisées, ont été transférés dans des tubes en polyéthylène héparine {héparinate de sodium} puis centrifugés à 2400 trs / min. Le plasma obtenu, de cinq ml a été pipeté dans des tubes en polyéthylène sec, il a été immédiatement placé dans une glacière et transporté vers le lieu de conservation où il a été conservé à ~ -20°C.

#### 3.5. Élimination des contaminants

L'appareil et les flacons (tube à essai) utilisés pour les procédures de digestion humide doivent être strictement nettoyés et testés pour toute contamination éventuelle. Il suffit généralement de faire bouillir les flacons dans de l'acide nitrique concentré, puis de les rincer plusieurs fois à l'eau ultra-pure (Milli-Q water system, 18.2 MΩ Cm) avant l'utilisation. Dans les cas où cette procédure n'est pas disponible, l'une des procédures de nettoyage les plus puissantes consiste à évaporer l'acide nitrique ou chlorhydrique dans les récipients avec un four à micro-onde [186].

### 3.6. Méthode de digestion humide

Les échantillons ont été digérés selon la procédure utilisée par Attar et al. [187] et Tripathi et al. [188] avec quelques modifications. Une 0.5000g de chaque échantillon de plasma est digeste par voie humide en double avec l'acide nitrique et l'acide perchlorique.  $\text{HNO}_3$  (69.5%, Fluka)/ $\text{HClO}_4$  (70-72%, Merck) (3 :1, v/v). Les échantillons digérés ont été complétés à 5ml en utilisant 0.25% d'acide nitrique. L'ensemble de ce processus est résumé dans un diagramme schématique de la figure 3.2.

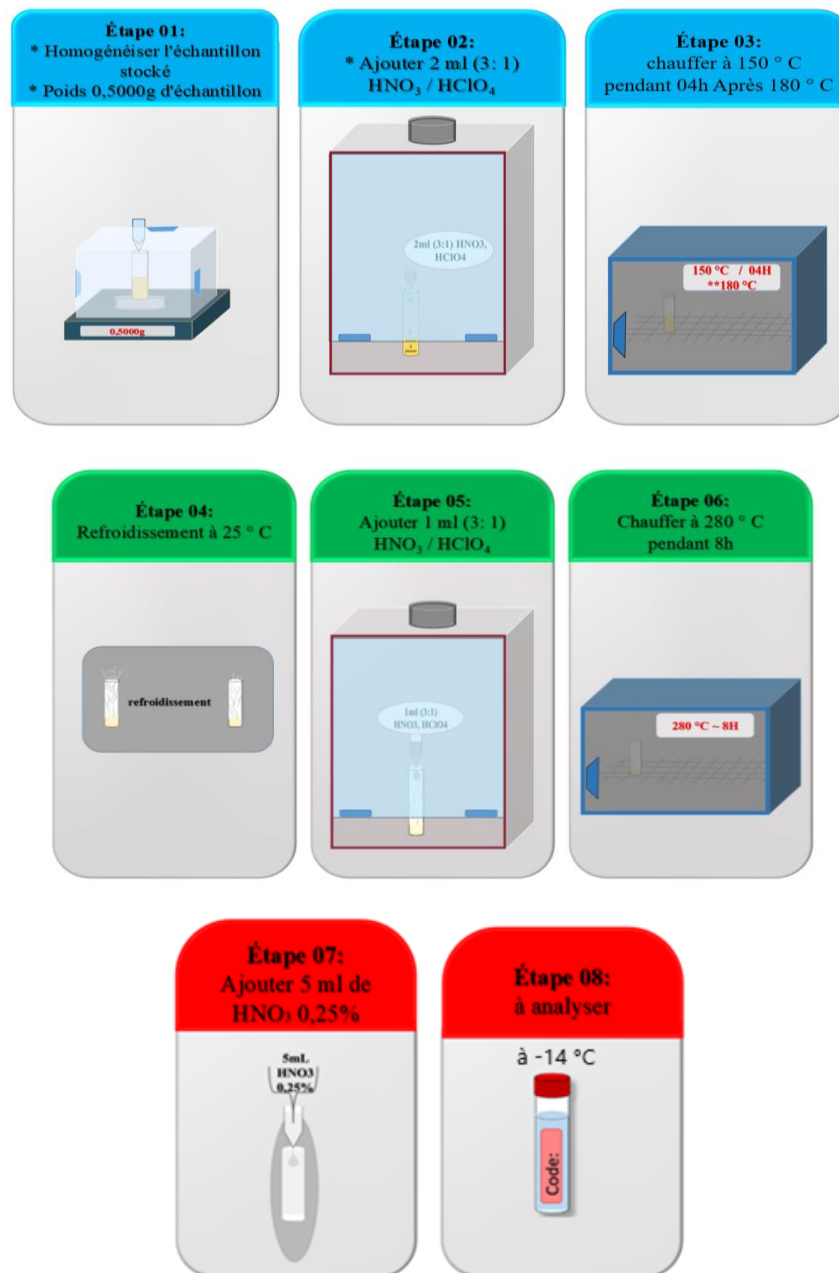


Figure 3.3 : Diagramme démonstrative protocole de digestion humide du sang.

### 3.7. Pourcentage de récupération

Le paramètre de performance « pourcentage de récupération » est requis pour la validation quantitative des composants majeurs ou l'analyse des traces. La procédure de calculer le pourcentage de récupération ; qu'on utilise un échantillon enrichi et analysé par la méthode en cours de validation à la fois dans son état d'origine et après ajouté d'une masse connue de l'analyte à la prise d'essai [189]. Alors la récupération est la proximité entre la concentration obtenue en appliquant une méthode analytique à un échantillon enrichi et la concentration réelle enrichie à la matrice [190] ; et la précision fait référence à l'étroitesse de l'accord entre la valeur réelle de la concentration analytique et le résultat moyen obtenu en appliquant la procédure expérimentale à un grand nombre d'échantillon homogènes. Elle est liée à l'erreur systématique et peuvent être établies en utilisant des matériaux de référence certifier appropriés (matriciels) ou en appliquant des techniques analytique alternatives.

La récupération est définie comme le rapport entre la concentration calculée et la concentration enrichie dans la matrice ; Alors la valeur la plus exceptionnelle est le 100%, ce rapport tient compte de la transformation chimique qui s'est produite, s'il y a lieu. Ce taux est donc exprimé comme suit [191] :

$$\tau (\%) = \frac{C_f - C_i}{C_{aj}} \times 100 \quad (3.1)$$

$C_f$  : concentration final,  $C_i$  : concentration initiale,  $C_{aj}$  : concentration ajoutée.

- La récupération doit être mesurée à plusieurs niveaux de concentration.
- Si l'étalonnage a été effectué à l'aide de solutions standard, la récupération doit obligatoirement être effectuée à l'aide d'une matrice à blanc enrichi.
- Si l'étalonnage a été effectué dans la matrice étudiée, mais que l'analyte devrait se trouver dans l'autre matrice, la récupération doit être répétée dans ces nouvelles matrices.

### 3.8. Préparation des échantillons pour l'analyse

Pour l'analyse au moyen de la technique XRF, réalisée au niveau du FUNDAPL ; Les échantillons sont préparés après la préparation des portes échantillons (une cellule en polyéthylène à une base des feuilles de mylar d'épaisseur 3.6  $\mu\text{m}$  avec un diamètre de 25 mm). Un gramme de poids humide du

sang digesté est mis dans les portes échantillons à l'aide d'une pipette jetable sont analysés l'un après l'autre par la spectrométrie de fluorescence à dispersion en énergie (EDXRF). L'analyse est refaite pour chaque échantillon trois fois. On utilise une correction pour le mylar 3.6 (impuretés typiques de ppm : Ca, P, Sb, Se, Zn).

### 3.9. Le spectromètre de fluorescence X "dispersion d'énergie"

Epsilon 3 XL PANalytical (Figure 3.4) possède une puissante source de rayons X de 15 watts, 0-50 kV, avec une anode en argent (Ag). Disponible pour tous les types d'échantillons : solide (27-51,5 mm) diamètre et hauteur 10 cm max, généralement 10 ml de liquide ou de poudre dans une boîte d'échantillon. Le passeur d'échantillons est une fileuse incluse avec un plateau amovible à 10 positions.



Figure 3.4 : Dispositif expérimental d'ED-XRF type Epsilon 3XL, PANalytical.

#### 3.9.1. Tube à rayons X

Les rayons X générés par un tube à rayons X en métal-céramique et fenêtre latérale, les matériaux d'anode : Rh, Ag, Mo. Paramètres du tube : Tension 50 kV max, courant 30 mA max, puissance du tube 15W, contrôlé par logiciel. Les rayons

X sont d'abord filtrés par l'un des six filtres optiques différents, ensuite voyagent à travers une fenêtre mince (fenêtre de béryllium de 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) avant de toucher l'échantillon (Figure 3.5).

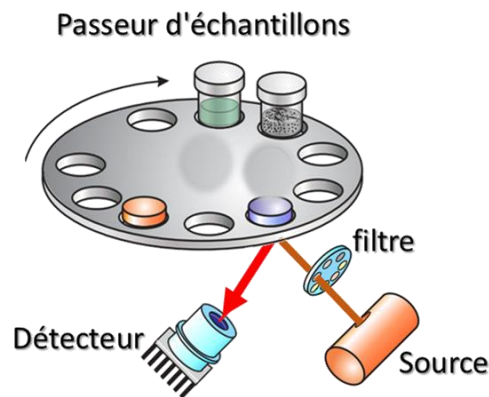


Figure 3.5 : Diagramme de la cellule de mesure.

### 3.9.2. Changeur de filtre

Les rayons X d'élément intérêt peuvent être mesurés plus facilement si des rayons X d'énergie inférieure peuvent être absorbés avant qu'ils n'atteignent le détecteur. Les rayons X d'énergie inférieure peuvent entraîner des pertes significatives liées au taux de comptage dans le détecteur et une distorsion spectrale s'ils ne sont pas supprimés. Pour suppression ces rayons utilisaient un filtre. Un matériau filtrant parfait aurait une transmission de zéro en dessous de l'énergie d'intérêt et une transmission de l'unité au-dessus de cette énergie, mais un tel matériau n'existe pas. Cependant, des filtres utiles peuvent être obtenus en sélectionnant des absorbeurs de numéro atomique approprié de telle sorte que la forte augmentation de la section transversale photoélectrique soit proche de l'énergie des rayons X qui doivent être atténués mais bien en dessous de l'énergie des rayons X d'élément intérêt. [192]

Les filtres sont fréquemment placés dans le trajet des rayons X entre le tube à rayons X et l'échantillon afin de modifier la forme du spectre source. Les filtres peuvent être constitués de tout élément qui peut être formé en un solide ou un film stable. Ils sont généralement en métal ou en plastique, bien que les filtres en plastique se détériorent sous un bombardement prolongé par les rayons X. Ces



filtres sont destinés à filtrer les rayons X de la source d'énergie inférieure afin de réduire le bruit de fond dans la région de l'élément d'intérêt.

La combinaison de puissance de tube et de différents filtres peut également rendre l'instrument plus sensible. Le tableau ci-dessous représente les filtres et sa caractéristique.

Tableau 3.1 : type de filtre et son état de fonctionnement.

Nom de Filtre	éléments Considéré	Comp.	Epaisseur ( $\mu\text{m}$ )	Densité ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Condition d'excitation	
					V (kV)	A ( $\mu\text{A}$ )
None	de F à Si	***	***	***	5	3000
Ti	de P à Cl	Ti	7	4.54	9	1666
Al-50	de K à V	Al	50	2.70	12	1250
Al-200	de Cr à Co	Al	200	2.70	20	750
Ag	de Ni à Mo	Ag	100	10.50	50	300
Cu-500	de Rh à Sb	Cu	500	8.96	50	300
Cu-300		Cu	300	8.96	50	300

Un filtre fin à densité neutre peut être utile pour mesurer des éléments tels que S ou P avec cible de tube à rayons X Rh, Pd ou Ag, tandis que des filtres plus épais peuvent éliminer ces pics cibles entièrement, créant ainsi une source qui est bonne pour analyser les rayons X (lignes  $K_{\alpha}$ ) entre 2 et 10 keV (éléments P – Ge) [193].

### 3.9.3. Détecteur

Le détecteur utilisé est le SDD « Silicon Drift Detector », détecteur des rayons X à dispersion d'énergie, possède une fine fenêtre de béryllium avec 8  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, une surface active de 5  $\text{mm}^2$  et une haute résolution : 132 eV à 5.858 keV. Refroidi par une étage Peltier atteint une température de -15 °C.

### 3.9.4. La chaîne de détection de l'ED-XRF

La chaîne de détection de l'EDXRF est illustrée dans le diagramme ci-dessous (Figure 3.6). Dans la chambre de mesure (sous air), la source des rayons X a une tension d'excitation et un courant de fonctionnement définis, émette des rayons X primaire interagies avec l'échantillon, après la filtration par des filtre spécifique, qui donne une réponse « rayons X secondaire » sous forme de fluorescence de raie caractéristique ; Ces dernier collecter par le détecteur SDD et converti en signal électrique. Le spectre récupéré par PC multicanal avec le logiciel Epsilon 3 sera convertie en un spectre de coups en fonction d'énergie par une chaine électronique.

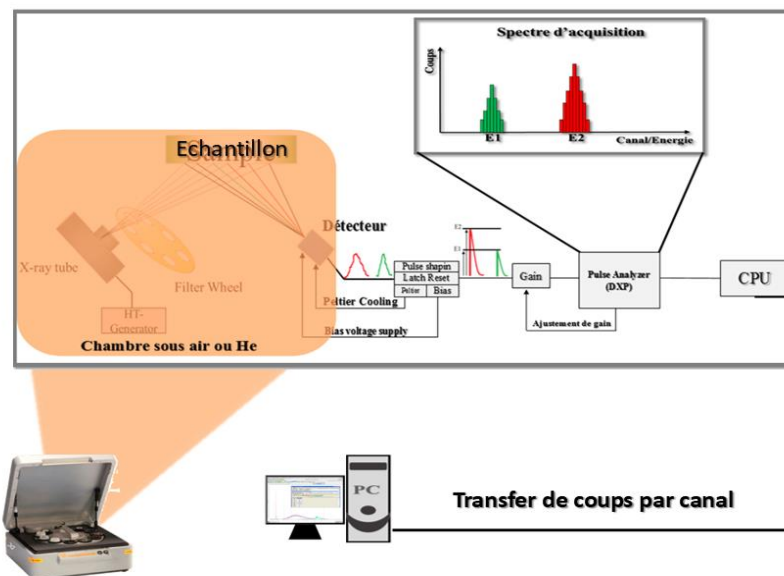


Figure 3.6 : Diagramme de la chaîne de détection.

### 3.10. Mesure des concentrations

Les concentrations des oligo-éléments sont mesurées par la méthode des standards externes après une calibration de l'appareil. Le calibrage effectué périodiquement en utilisant les options de programme appropriées de l'appareil. L'opération qui démontré que l'instrument particulier produit des résultats dans des limites spécifiques par comparaison avec ceux produits par un étalon traçable sur une plage de mesure appropriée [194], fait par un moniteur «Omnia Monitor ».

Pour la méthode relative des standards externes. On utilise des matériaux certifiée de même matrice avec l'échantillon, l'irradiation des standards et des échantillons à analyser dans les mêmes conditions. Le standard utilisé ici, l'A-13 est un sang lyophilisé certifié par l'AIEA.

La comparaison de valeurs obtenues à celle certifiée doit être faite pour déterminer les paramètres statistique qui liées le processus d'évaluation de qualité d'assurance et contrôle de qualité. Ces paramètres statistiques Zscore, U score et le Relative Bias sont donnée par les équations suivantes (3. 2, 3, 4) : [195]

$$RB = \frac{X_{Lab} - X_{Ref}}{X_{Ref}} \cdot 100\% \quad (3.2)$$

$$Z_{score} = \frac{|X_{Lab} - X_{Ref}|}{\mu_{Ref}} \quad (3.3)$$

$$U_{score} = \frac{|X_{Lab} - X_{Ref}|}{\sqrt{\mu_{Lab}^2 + \mu_{Ref}^2}} \quad (3.4)$$

Lorsque  $X_{lab}$  correspond aux résultats de mesures en laboratoire,  $\mu_{ref}$  correspond aux incertitudes standard globales / combinées,  $X_{ref}$  correspond aux valeurs attribuées et  $\mu_{ref}$  correspond aux incertitudes standard.

Ces paramètres calculent avec une différence entre la moyenne obtenue à partir d'un grand nombre de mesures répétées avec un échantillon ayant une valeur de référence. Tell que le Zscore et Uscore, mesure la distance (nombre de l'écart type) par rapport à la valeur certifiée. Le relatif biais donne une estimation de l'erreur systématique de mesure.

La performance du matériel de laboratoire est considerée comme satisfaisant si  $Z \leq 2$ , discutable pour  $2 < Z < 3$  et insatisfaite pour  $Z \geq 3$  ; et pour le RB faible.

### 3.11. Etude de spectre EDXRF

Afin d'avoir une excitation adéquate pour une large gamme d'éléments, le tube à rayons X "Ag" a fonctionné à 50 kV et 300  $\mu$ A. Un gramme d'échantillons ont été placés dans une boite en plastique à base de filme Mylar (3.6 $\mu$ m). Les échantillons ont été irradié dans une atmosphère d'air, à l'aide d'un tube à rayons X Ag fonctionnant à 20 kV (Cr-Co) et 50 kV (Ni-Mo) pendant 300 s et 300 s, respectivement. La détection a été réalisée à l'aide du détecteur SDD refroidi à partir un étage Peltier. Trois mesures ont été effectuées pour chaque échantillon. Une valeur spectrale moyenne a été calculée pour chaque échantillon.

Un spectre typique pour le standard IAEA-A13, est présenté dans a figure 3.7.

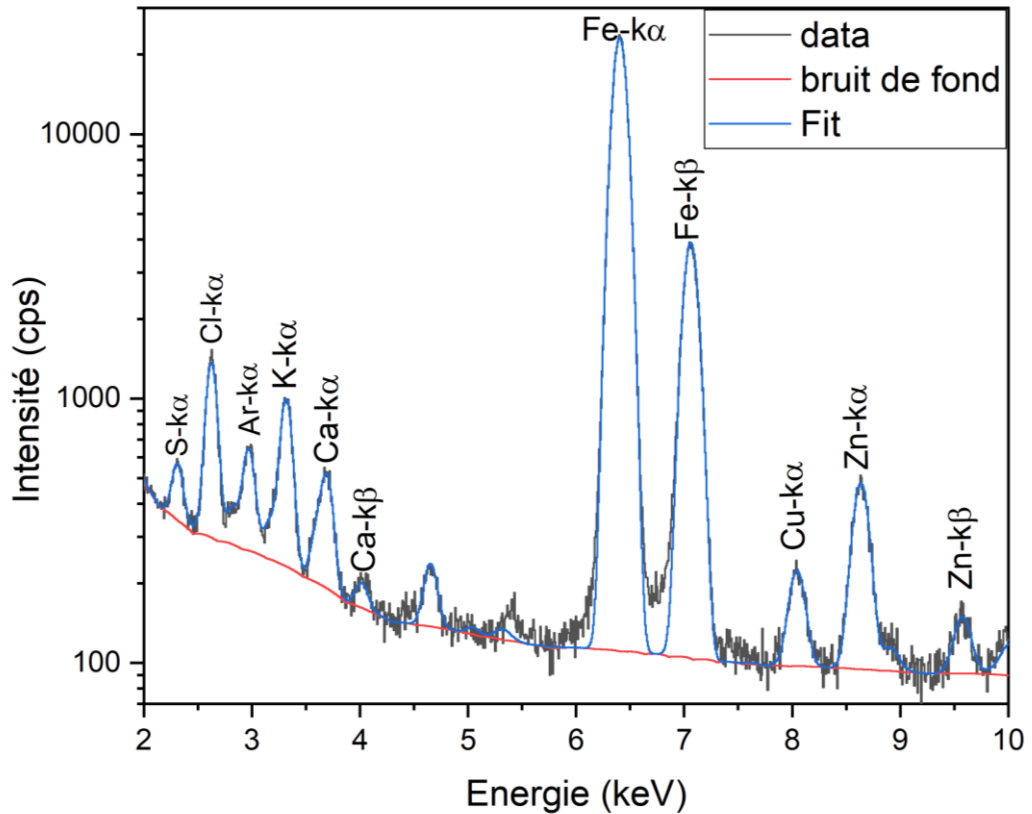


Figure 3.7 : Spectre typique pour le standard A13.

La figure 3.7 montre le spectre d'A-13 dans la gamme d'énergie entre 2keV et 10keV, avec démonstration de l'allure de data complète, sa fitting et le bruit de fond de mesure ; Le spectre a été identifié chaque élément avec son raie d'excitation.

### 3.11.1. La limite de détection

Le calcul de la limite de détection se fait selon l'équation (2.6) :

$$LDD = \frac{3\sqrt{\text{aire de bruit de fond}}}{\text{facteur instrumental}}$$

Le facteur expérimental est la sensibilité donnée par la formule suivante :

$$S_i = \frac{I_i}{C_i}$$

Où  $I_i$  : Intensité de la raie caractéristique de l'élément  $i$  ;  $C_i$  : Concentration de l'élément  $i$ .

Le tableau 3.2 est portée les valeurs de limite de détection des éléments (Fe, Cu, Zn) de la technique XRF.

Tableau 3.2 : Seuil de détection de la technique XRF pour le Fer, Cuivre et le Zinc.

Elément	Aire de bruit de fond	Facteur instrumental	LDD (mg/g)
Fe	109.75	3.925	8.007
Cu	12.292	3.628	2.899
Zn	27.5	4.844	3.247

### 3.11.2. Etude d'effet filtre

La figure 3.7, présente le spectre d'un échantillon pour deux filtres, Al-200 et le Ag et aucun filtre, les deux filtres ont comme tension d'accélération 20 kV, 50kV Afin de réduire les rayons X continus « bruit de fond », des filtres métallique mince a été placé entre la sortie de faisceau des rayons X primaire et l'échantillon. Dans ce travail, une feuille d'Al-200 (200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, et densité de 2.70 g/cm<sup>3</sup>) et une feuille d'Ag (100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, densité de 10.50 g/cm<sup>3</sup>) ont été utilisées pour l'atténuation des rayons x continu. Les deux raies d'absorption K étaient de 1.486 keV pour Al et 22.101 keV pour Ag. Ainsi, l'Al de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a été utilisé pour couper les rayons X à faible énergie (2 à 7 keV) et l'Ag de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a été utilisée pour couper les rayons X à haute énergie (6 à 10 keV). Nous avons tenté d'insérer ces filtres entre le tube à rayons X et l'échantillon. La figure 3.8 montre les spectres XRF pris à partir d'un échantillon avec filtres Ag et Al-200.

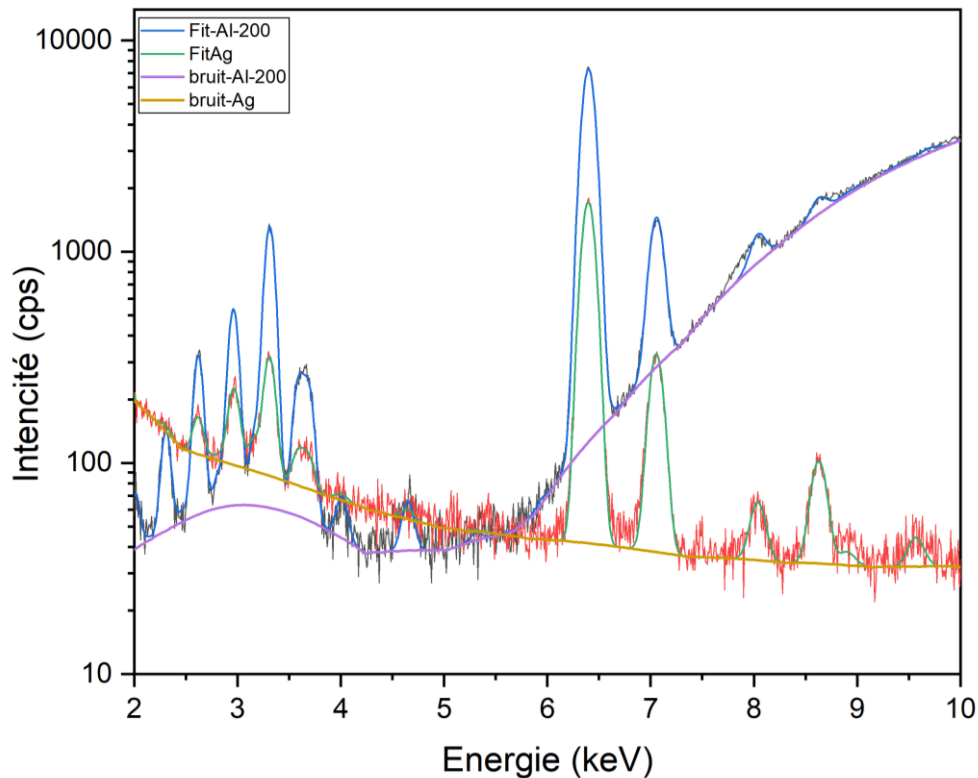


Figure 3.8 : Spectres de rayons X prélevés d'un échantillon avec filtres Ag et Al-200, placée entre le tube à rayons X et l'échantillon.

Comme le montre la figure 3.8 ; Pour le filtre Al-200 $\mu$ m, les rayons X continus, qu'il existe largement de 6keV jusqu'à 10keV, ont été atténué et des excitations des rayons X monochromatiques a été obtenue. Pour le filtre Ag-100 $\mu$ m, les rayons X continus, qu'il existe entre 2keV et 5.5keV, ont été atténué et des excitations des rayons X caractéristique or monochromatiques a été obtenue.

A la fin, la diminution de tension (notre cas : Al-20kV, Ag-50kV) déplace le spectre vers les basses énergies [196]. Alors la haute tension affect la qualité de rayons X. [197]

La diminution de l'intensité (Al-750 $\mu$ A, Ag-300 $\mu$ A) aplatit le spectre, dans notre cas le temps d'exposition est constant, et l'augmentation surélève le spectre, alors l'intensité d'excitation affect la quantité des rayons X [198]. Pour les filtres, plus le faisceau est filtré, plus les photons de faible énergie sont atténués [199]. Plus le filtrage est important, plus l'énergie moyenne des photons de faisceau augmente [200].

### 3.12. Spectroscopie infra-rouge

Dans cette section, nous présentons la spectroscopie infrarouge utilisée pour confirmer la méthode de digestion.

L'IRAffinity-1S, un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier de SHIMADZU, offre un rapport S / B élevé (30000: 1, accumulation de 1 minute, quart de 2100 cm<sup>-1</sup>, détection automatique des pics), une résolution maximale de 0,5 cm<sup>-1</sup> et dimensions compactes. L'interféromètre est optimisé en continu par un mécanisme d'alignement dynamique et un système de séchage automatique.

### 3.13. Analyse statistique

Dans cette étude, nous travaillons sur une population biologique c'est-à-dire que la localisation de la valeur moyenne dépend de la définition de la population : vérité + erreurs dans les observations basées sur plusieurs individus pour arriver à une "vraie" moyenne pour définir le groupe et comparer aux autres [201].

À partir des mesures effectuées pour chaque famille sont calculés, le taux moyen de fer, de cuivre et de zinc, l'erreur sur la moyenne et la dispersion des valeurs, pour faciliter la comparaison des familles entre elles. La réduction ou l'augmentation du taux de fer, de cuivre et de zinc est calculée par rapport à la famille des sujets normaux. Le test statistique a été appliqué au CD et aux sujets témoins dans les populations, féminines et masculines pour indiquer la différence des niveaux de Fe, Cu et Zn, test t Student et ANOVA One-Way [202].

#### 3.13.1. Le test ANOVA

Est l'une des méthodes statistiques les plus utilisées en recherche médicale. Il s'agit d'une extension du test t pour l'échantillon indépendant. Le besoin d'ANOVA provient de l'erreur d'inflation au niveau alpha, qui augmente la probabilité d'erreur de type 1 (faux positif) et est causée par des comparaisons multiples. L'ANOVA utilise des statistiques F [203]

Le but du test ANOVA sera le même que le test t, pour vérifier l'hypothèse nulle. L'hypothèse nulle pour le test est que les deux moyennes sont égales. Par conséquent, un résultat significatif des valeurs moyennes pour deux populations avec l'hypothèse nulle montre que les deux valeurs moyennes sont inégales. Ensuite, nous ne comparons pas les valeurs moyennes de manière aléatoire, au

contraire, nous les comparons sur la base d'hypothèses formulées (réponse hypothétique à la question posée) en utilisant l'ANOVA et le test t.

Dans notre cas, l'hypothèse est la différence de moyenne des deux populations pour Cu, Fe et Zn sont une différence significative ou non avec l'hypothèse nulle.



## Chapitre IV :

### Résultats expérimentaux et interprétation

Dans ce chapitre les résultats de validation et performance de la digestion et la technique XRF sont exposé avec les différents résultats des concentrations du cuivre, du fer et du zinc dans le sang humain des patients cancéreux et des témoins obtenus par la XRF, selon les paramètres étudiés.

La figure 4.1 montre un processus en quatre étapes qui suit pour présenter les résultats dans l'objectif du projet.

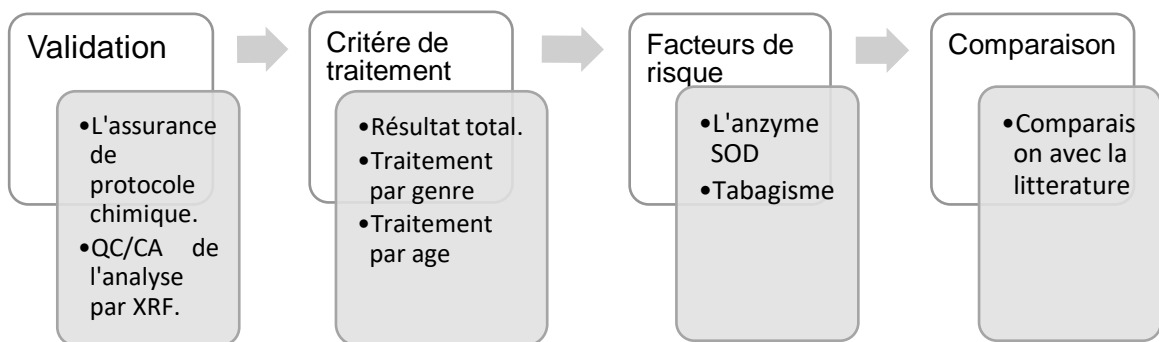


Figure 4.1 : Processus de présenté les résultats de notre travail.

Comme montre la figure 4.1, notre résultat est divisé en quatre parties : le premier parti est validation où on présente l'efficacité de méthode utilisée pour la digestion par analyse IR et pourcentage de récupération puis la performance de la technique utilisée XRF et validité d'analyse par des paramètres calculés à l'aide d'un standard certifié. La deuxième parti est de traitement des résultats par deux paramètres physiologiques : l'âge et le genre<sup>2</sup>, qui influence sur la concentration des éléments dans le sang humain ; La troisième parti est de montré deux facteurs l'enzyme SOD et le tabagisme, qui affecte directement la maladie cancéreuse ; la dernière parti on compare notre résultats avec la littérature.

<sup>2</sup> Pendant plusieurs décennies, les chercheurs ont profité de l'occasion pour écrire sur le sexe et le genre lorsqu'ils étudient des hommes et des femmes et des femmes et des hommes. Prizgoda 2000, dit : Le mot «genre» peut être utilisé comme synonyme du mot «sexe». Il est toujours correct d'utiliser le mot genre pour décrire une personne comme étant un homme ou une femme. [Prizgoda, J., Chrisler, J.C. Definitions of Gender and Sex: The Subtleties of Meaning. *Sex Roles*, 2000. 43: 553–569.]

## 4.1. Validation

### 4.1.1. Assurance de protocole chimique

Pour voir l'efficacité de la méthode utilisée de digestion humide par mélange d'acide et avec chauffage conventionnel ; On a fait une analyse spectrale par l'infrarouge, d'échantillons et du résidu obtenu, pour voir le degré d'élimination de matrice organique d'échantillons [203]. Les conditions de travail avec la TFIR, temps 12min, préparation : échantillon non dilué, à nettoyer entre les analyses [204].

La figure 4.2 présente les spectres d'absorption IR d'échantillon sain et patient qu'ont sélectionné au hasard.

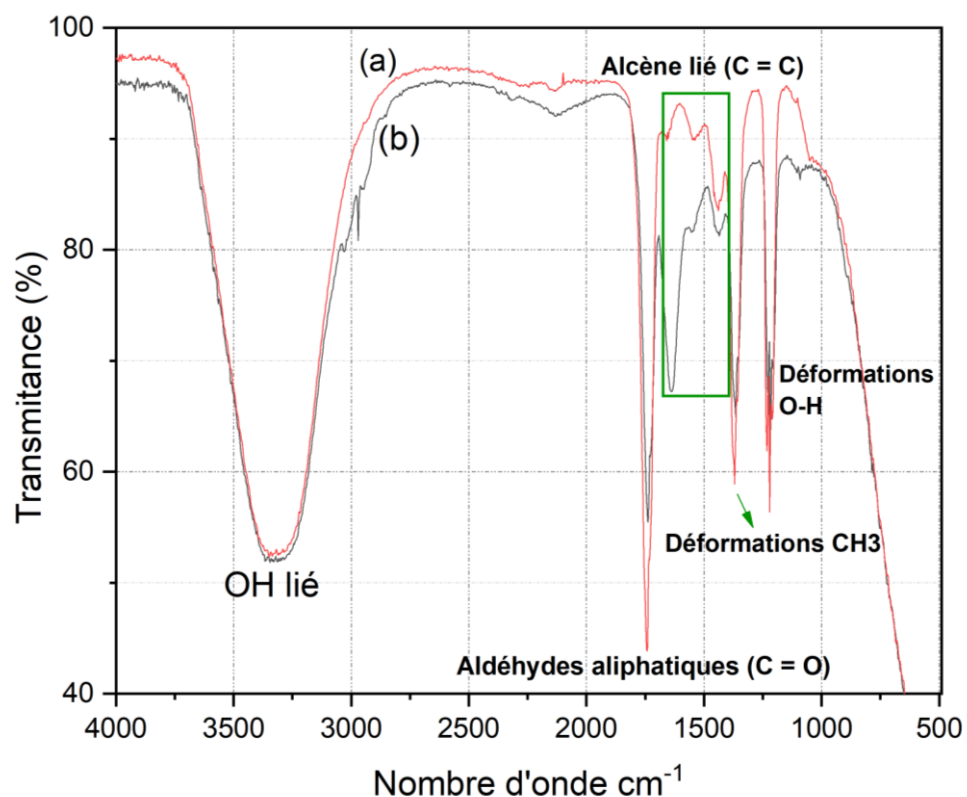


Figure 4.2 : Spectre IR des échantillons avant la digestion : (a) échantillon sain, (b) échantillon patient.

Le spectre IR des échantillons avant la digestion montre l'existence de cinq pics, un dans la zone de liaison simple, le grand pic centré à  $3300\text{ cm}^{-1}$  correspond au groupe lié O-H. Deux dans la zone de doubles liaisons, le pic net et intense situé à  $1731\text{ cm}^{-1}$  présente un groupe d'aldéhydes aliphatiques (C = O), le groupe multiple de pics entre  $1500$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$  est lié à l'alcène lié (C = C). Et deux déformations,

deux pics étroits à  $1373\text{ cm}^{-1}$  et  $1206\text{ cm}^{-1}$  représentent respectivement les déformations  $\text{CH}_3$  et O-H.

D'après Baker M. J., [205] ce que nous avons trouvé de groupe fonctionnel est en accord avec les lipides ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}$ ,  $\text{C}=\text{C}$ ) et les carbohydrates ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{OH}$ ).

Après la digestion, nous avons mesuré le spectre vibrationnelle IR des mêmes échantillons précédents avec même condition de travail. La figure 4.3 présente les spectres IR des échantillons de plasma des patients et des témoins après le processus de digestion.

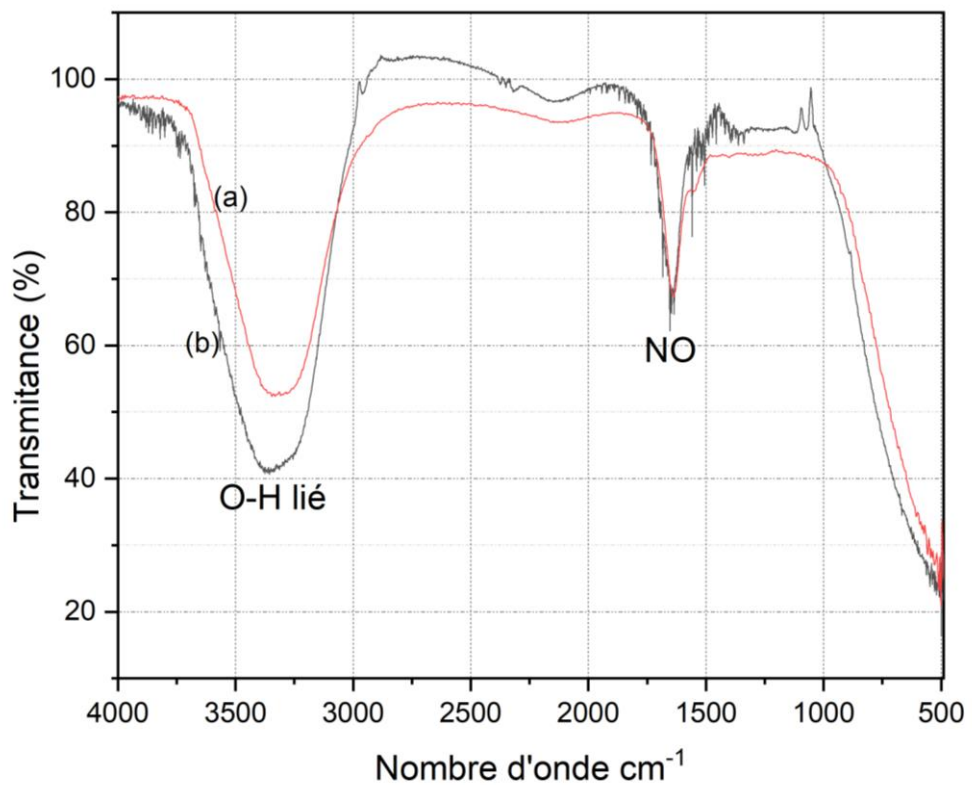


Figure 4.3 : Spectre IR des échantillons après la digestion : (a) échantillon sain, (b) échantillon patient.

Comme le montre la figure 4.3, les deux spectres présentent un pic net à  $1530\text{ cm}^{-1}$  correspondant au groupe NO, et un grand pic à  $3300\text{ cm}^{-1}$  lié au groupe à O-H. Il est important de noter la disparition des pics des groupes carbonés.

La disparition des groupes carboniques est produite par la réaction violente avec le mélange d'acide ; la présence de groupe Nitro NO est apparu dans la réaction de  $\text{HNO}_3$  avec la matière organique, le groupe hydroxyle enlèvera typiquement un

hydrogène de la molécule organique pour former de l'eau, et le groupe nitro restant prend la place de l'hydrogène.

Enfin, l'analyse infrarouge prouve que la méthode utilisée de digestion détruit la majorité de la matrice organique après la digestion. Par conséquent, cela confirme que la digestion réussie.

#### 4.1.1.1. Rendement de minéralisation

Le rendement de la digestion calculé par la méthode des ajouts dosés par l'équation (3.1), La concentration de trois échantillons fortifiés, après l'ajout d'une concentration défini, et la concentration du même échantillon non fortifié a été mesuré. Un essai de cinq fois est fait pour l'évaluation de la méthode. La figure 4.4 présente la moyenne des mesures des concentrations.

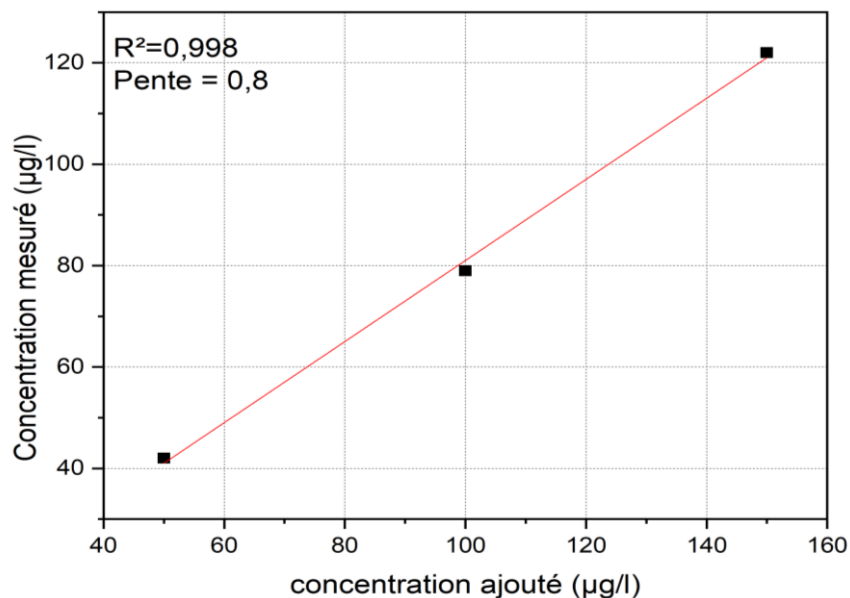


Figure 4.4 : Courbe de moyenne des concentrations pour les échantillons fortifiés en fonction des concentrations ajoutés.

Le taux de récupération est de 81,6% de l'échantillon et la perte de masse est de 18,4% de la masse totale de l'échantillon. La linéarité de la méthode est évaluée par le calcul du coefficient de régression  $R^2$  des valeurs moyennes obtenues, est égale à 0,998.

Cela confirme que le protocole de digestion suivit dans notre étude à des performances élevées avec une perte de masse minimale.

#### 4.1.2. QC/CA de technique et de mode d'analyse ED-XRF

Avant d'effectuer les analyses des échantillons par ED-XRF, la validation de la méthode est essentielle. Pour estimer la différence entre la valeur mesurée et la valeur réelle, dans les limites de l'incertitude des valeurs. Une évaluation statistique des données d'analyse liées à l'évaluation AQ / CQ doit être utilisée pour déterminer les paramètres statistiques : score Z, score U et biais relatif (RB%), par les équations (3, 2, 3, 4). La mesure d'A-13 effectué dans le laboratoire FUNDAPL 17 fois, sous conditions de travail : temps 30min, filtre utilisé Al-200 (200µm, 2,7 g/cm<sup>3</sup> avec 20 kV, 750 µA) et Ag (100µm, 10,5 g/cm<sup>3</sup> avec 50 kV, 300 µA), avec une correction de Mylar 3.6µm. Les valeurs mesuré et certifié avec l'incertitude pour les oligo-éléments Fer, Cuivre et Zinc, sont présentées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Concentrations (mg/kg) mesuré et certifié de A-13 pour Cu, Fe et Zn ; avec le Z-score, U-score et R-biais.

Elément	Valeur mesuré ± SD (**)	Intervalle de valeur certifié (95%)	Valeur Certifié	Z- score	U- score	RB (%)
Fe	2276±173 (17)	2200 – 2500	2400±158(35)	0.78	0.52	-5.13
Cu	4,79±0.39 (17)	3.7 - 4.8	4.30±0.55(33)	0.89	0.73	11.39
Zn	11.5±0.75 (17)	12 – 14	13.00±1(15)	1.5	1.2	- 11.53

\* SD : écart-type (SD) \*\* (nombre de tests d'analyse).

Le tableau 4.1 indiqué que les concentrations mesurées par la XRF de Cu, Fe et Zn sont dans l'intervalle de confiance 95% des valeurs certifiées. Le Z-score pour la Fe, Cu et Zn est, 0.79, 0.89, 1.5 respectivement, inférieur strictement à 2 ; U-score pour Fe, Cu et Zn est, 0.52, 0.73, 1.2 respectivement, inférieur strictement de 1.6. C.à.d. la distance est proche (le nombre d'écart types) entre la concentration mesurée et la valeur certifiée ; alors nos résultats sont satisfaits.

Le relatif biais, donne une estimation de l'erreur systématique de mesure, pour la Fe, Cu et Zn (-5.13%, 11.39%, -11.53% resp.) est faible. Alors la moyenne des concentrations mesurées répliquées est étroitement en l'accord avec les concentrations certifié.

Après toutes ces analyses et calcule d'élimination de l'effet de matrice, de perte de l'analyte lors de la préparation de l'échantillon, et performance de l'équipement de laboratoire et l'erreur systématique liée aux méthodes mesure, prouve que tous les types des erreurs sont dans les normes et ne perturbe pas l'analyse par XRF.

#### 4.1.2.1. Analyse par spectroscopie ED-XRF

Le dosage des oligo-éléments le fer, cuivre et zinc par la spectrométrie de fluorescence X, dans le sang digéré de quatre-vingt-dix-huit sujets sains et quatre-vingt patients, fait par une analyse répété trois fois, dans les conditions qui ont été optimisées précédemment, temps 30min, filtre utilisé Al-200 (200 $\mu$ m, 2,7 g/cm<sup>3</sup> avec 20 kV, 750  $\mu$ A) et Ag (100 $\mu$ m, 10,5 g/cm<sup>3</sup> avec 50 kV, 300  $\mu$ A), avec une correction de Mylar 3.6 $\mu$ m . La figure 4.5 représente un spectre relatif à un échantillon de patient de sang digéré.

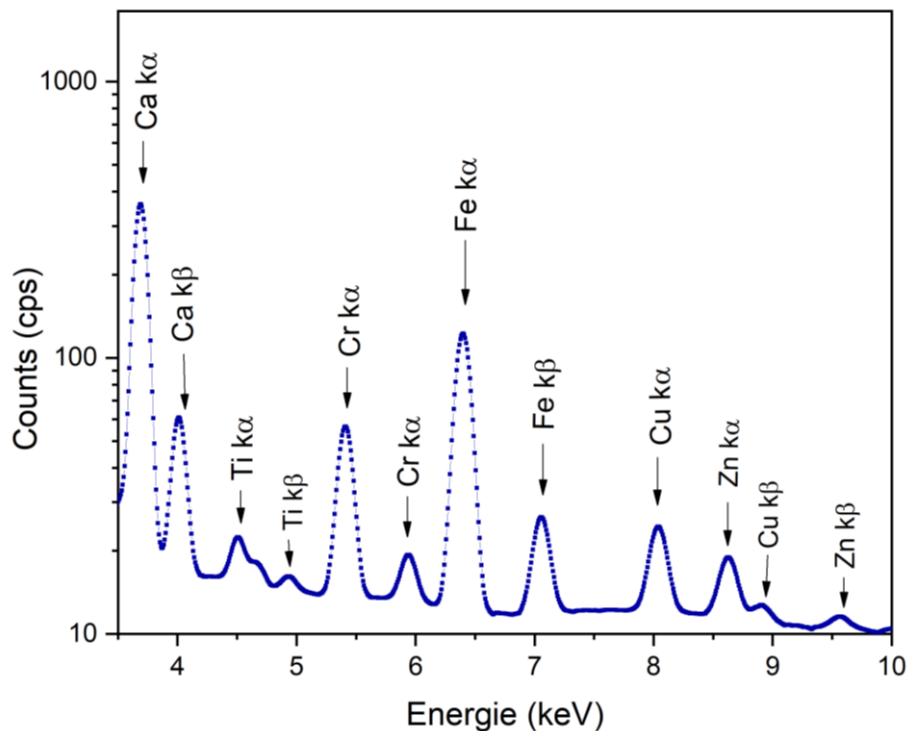


Figure 4.5 : Spectre typique d'EDXRF pour le sang digéré d'un sujet cancéreux.

Le spectre de fluorescence de sang minéralisé pour un sujet cancéreux montre la présence de quelques oligo-éléments avec les deux raies entre la gamme d'énergie entre 3.5 keV et 10 keV, tel que le calcium ( $k_{\alpha} = 3.690\text{keV}$ ,  $k_{\beta} = 4.012\text{keV}$ ), le titane ( $k_{\alpha} = 4.931\text{keV}$ ,  $k_{\beta} = 4.508\text{keV}$ ), le chrome ( $k_{\alpha} = 5.411\text{keV}$ ,  $k_{\beta} = 5.964\text{keV}$ ), le fer ( $k_{\alpha} = 6.398\text{keV}$ ,  $k_{\beta} = 7.057\text{keV}$ ), le cuivre ( $k_{\alpha} = 8.040\text{keV}$ ,  $k_{\beta} = 8.904\text{keV}$ ) et le zinc ( $k_{\alpha} = 8.630\text{keV}$ ,  $k_{\beta} = 9.570\text{keV}$ ).

La figure 4.6 présente un spectre relatif du sang minéralisé d'un sujet sain.

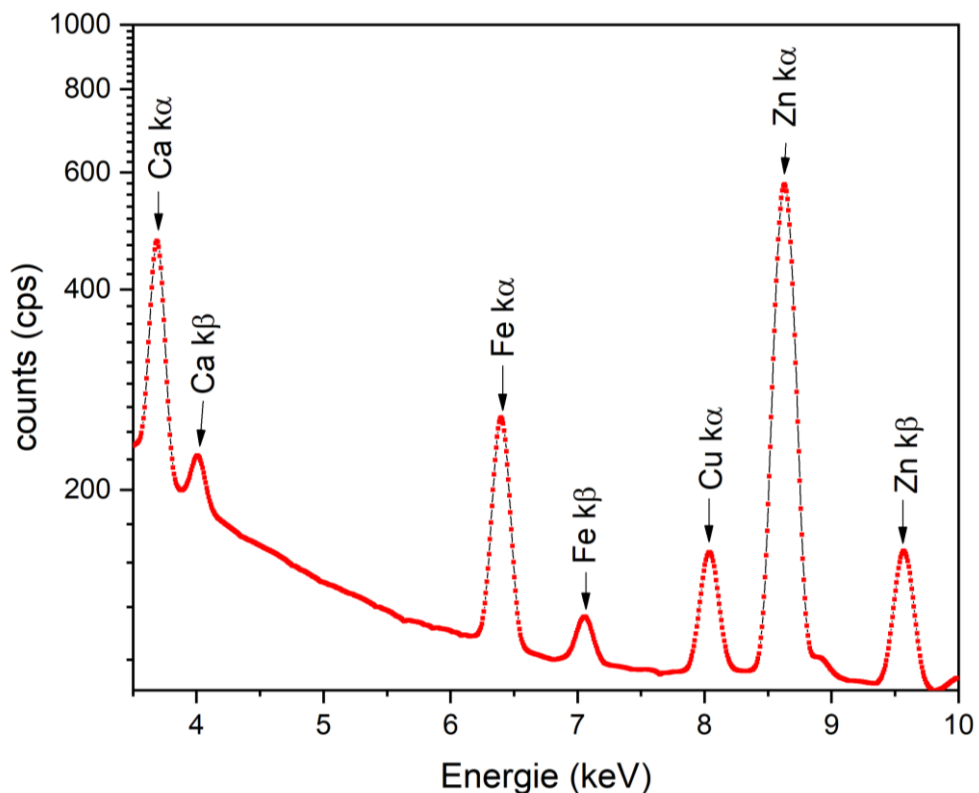


Figure 4.6 : Spectre typique d'EDXRF pour le sang digéré d'un sujet sain.

Le spectre de l'EDXRF pour un échantillon du sujet sain montre la présence des oligo-éléments, le calcium, le fer, le cuivre et le zinc avec les deux raies ( $k_{\alpha}$ ,  $k_{\beta}$ ).

La comparaison entre le spectre du sang minéralisé pour un sujet cancéreux et pour un sujet sain apparaît une existence des éléments en plus (Ti, Cr) dans les patients par rapport au sains et une différence d'intensité des raies pour les oligo-éléments commun.

## 4.2. Traitement des résultats obtenus

### 4.2.1. Les concentrations moyennes des oligo-éléments

Selon l'étude de Rayman [206], un effet négatif de certains minéraux sur la croissance cellulaire, l'ADN, l'ARN et la synthèse des protéines dans les cellules transformées peuvent provoquer le cancer. Pour cette raison, le statut du cuivre, du fer et du zinc dans le plasma des patients CD doit être détecté.

Dans cette étude, on a évaluée les concentrations des oligo-éléments dans le sang des patients atteints de cancer pour le comparais avec les concentrations des éléments sang les sangs des sujets sains ; comme nous travaillons sur une population biologique, l'utilisation de la valeur moyenne de teneurs en oligo-élément à cause de l'observation qui basées sur plusieurs individus « population des cancéreux » pour arriver à une vraie teneur pour définir le groupe des patients et comparer aux sains. Le tableau 4.2 descriptive des concentrations des oligo-éléments (Fe, Zn, Cu) dans les deux populations patients (CD) et sains (contrôle).

Tableau. 4.2 : Concentrations plasmatiques des éléments (Fe, Cu et Zn) pour les groupes contrôle et CD : Nombre de participant dans chaque groupe, moyennes et écart-type, intervalles des concentrations des éléments en µl/g.

<b>Elément</b>	<b>Groupe</b>	<b>N</b>	<b>Moyenne</b>	<b>SD*</b>	<b>Intervalle</b>
<b>Fe</b>	Control	98	1493	105	1260 – 1815
	CD	80	1496	86	1197 – 1659
<b>Cu</b>	Control	98	1172	229	812 – 1996
	CD	80	1078	283	727 – 2259
<b>Zn</b>	Control	98	1266	202	670 – 1854
	CD	80	1344	208	848 – 2038

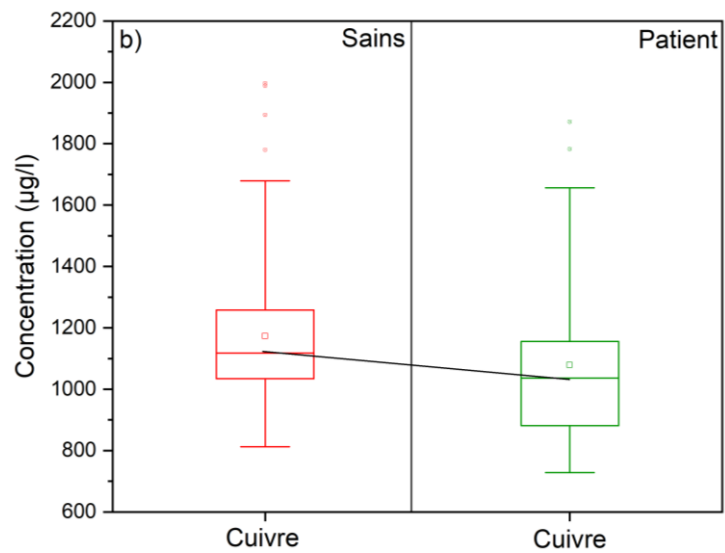
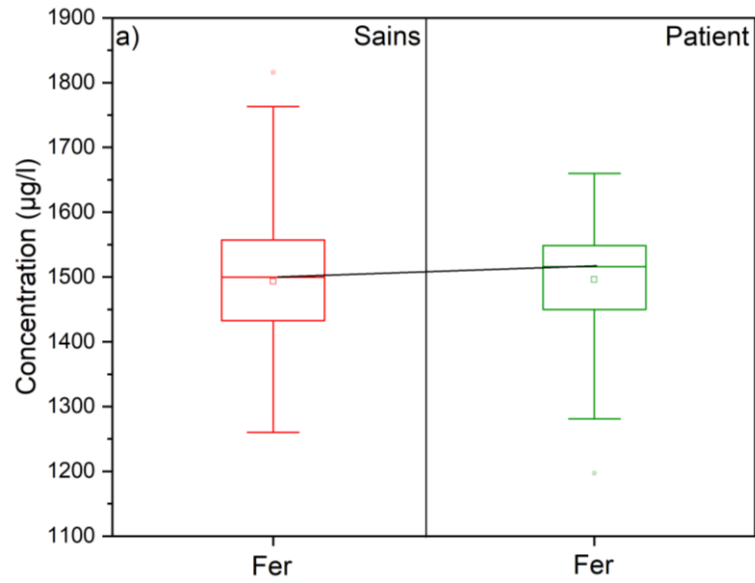
\*SD avec une confiance de 95%

Le tableau 4.2 présente les concentrations de fer varient de 1197 à 1659 µg/l pour les patients et de 1260 à 1815 µg/l pour le groupe contrôle. Pour la concentration de cuivre varie de 727,90 à 2259 µg/l pour les patients et de 812 à 1996 µg/l pour les contrôles. La concentration de zinc varie de 848 à 2038 µg/l pour les patients et de 670 à 1854 µg/l pour les sains. L'écart type (SD) montre une dispersion des valeurs, plus la dispersion est grande, plus l'écart-type est grand.

Pour visualiser et décrire la distribution des concentrations et la différence entre elles des deux populations, sain et patient, c.à.d. pour tous les individus, en utilisent



les box plot des oligo-éléments pour présenter la distribution des concentrations des deux populations. La figure 4.8a, b, c, montre les box plot de chaque oligo-élément.



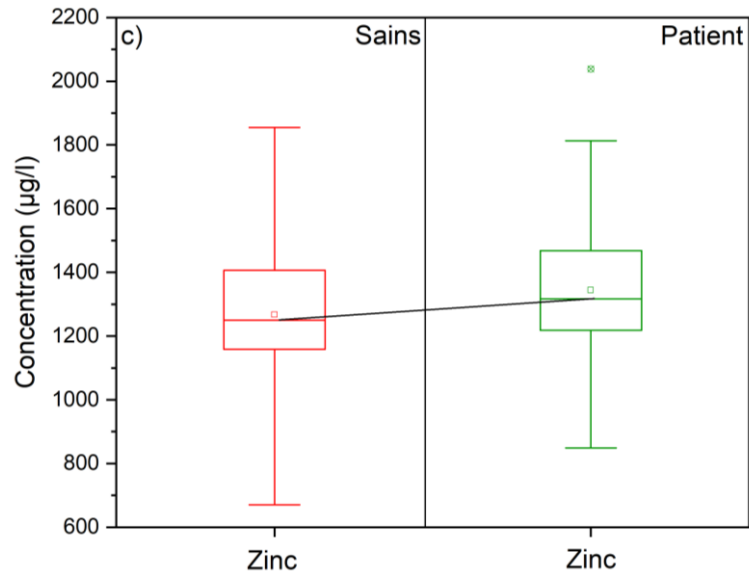


Figure 4.7. Distribution de la concentration de fer (a), de cuivre (b), de zinc (c).

La figure 4.7 présente une distribution des concentrations non symétriques pour les trois éléments (Cu, Fe, Zn), tel que la moyenne des concentrations est différente de la valeur de médian ; les concentrations globales ont un niveau élevé d'accord en elle-même, due à une même population, où tous les box plot sont courts. La comparaison de la distribution de fer (fig. 4.7a) montre qu'il y a une augmentation légère entre les deux populations saines et malades, pour la figure 4.7 b, il est évident que les patients ont en général des taux de cuivre inférieurs que les sains, la figure 4.7c introduit un taux général de zinc supérieur dans les patients par rapport au sain.

La figure 4.8 introduit la différence entre les moyennes des concentrations des oligo-éléments étudiés pour les deux groupes sains (contrôle) et malades (CD).

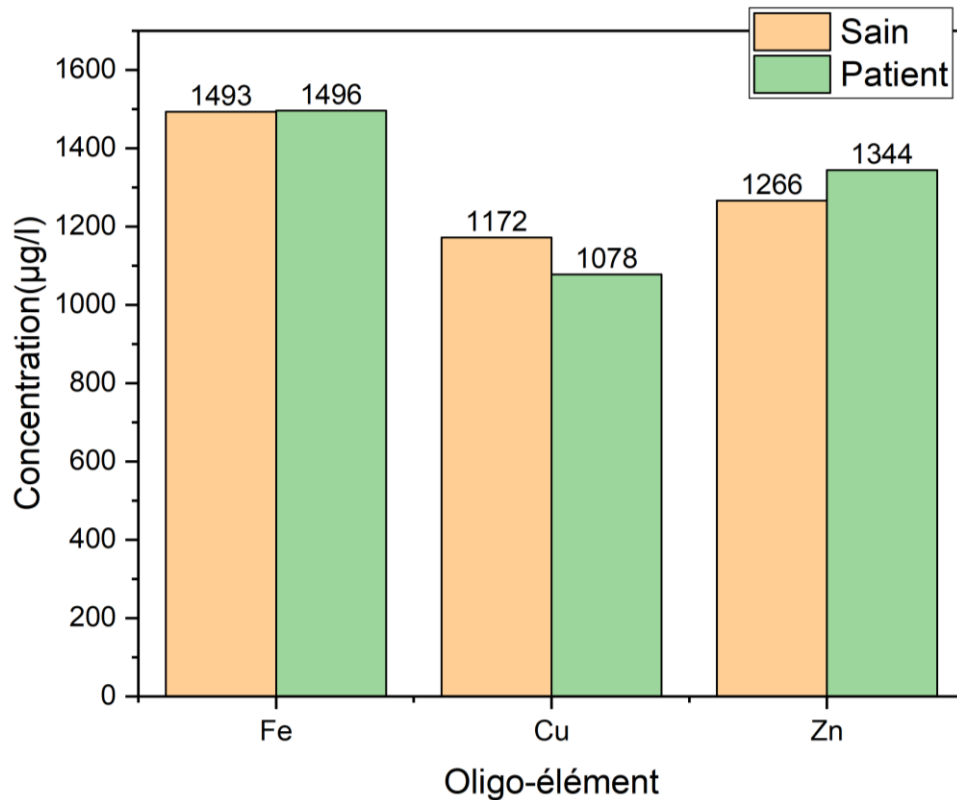


Figure 4.8 : Concentration moyennes de cuivre, de fer et de zinc dans les groupes des patients (CD) et sains (contrôle).

La comparaison des moyennes des concentrations pour les patient atteint du cancer et les sujet sains contrôle prouve que le taux des patients est légèrement supérieure à celle des sains concernant le zinc ; Bien qu'il soit légèrement inférieur à celui des témoins pour le cuivre et quasiment pas de différence pour le fer.

#### 4.2.2. Interprétation du niveau de signification

Lorsque l'on compare deux échantillons indépendants, ces deux échantillons ne doivent pas avoir nécessairement la même taille. Il est possible de faire des comparaisons de moyenne. Pour comparer deux moyennes, il faut habituellement employer un test paramétrique, qui suppose la normalité des distributions et l'égalité des variances, hypothèses invérifiables avec des effectifs faibles. Ici nous avons deux moyennes d'échantillon. Une moyenne d'échantillon est-elle significativement différente de (ou bien plus grande/petite que) l'autre ? Ou, d'un autre côté, est-il raisonnable de dire que les deux moyennes de l'échantillon pourraient provenir de

la même population ? Deux questions besoin des réponses par une analyse statistique plus approfondie.

La signification de différence entre les deux moyennes des concentrations des oligo-éléments n'est confirmé qu'après la vérification des deux hypothèses, l'hypothèse nulle : la variance de la population CD est égale à la variance de population sain (même population ou non), l'hypothèse alternative où la variance de la population CD est plus petit /plus grand a la population sain. Le test d'hypothèse approprié est le test F par ANOVA-One-Way). Nous avons appliqué le test ANOVA One-Way pour calculer le facteur de signification «p» des résultats par le statistique  $F^3$ . Le niveau de signification est toujours fixé à  $P < 0,05$ . Les résultats obtenus du calcul du test ANOVA pour la concentration en Cu, Zn et Fe dans le plasma des groupes CD et sains contrôle sont présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Test ANOVA-One-Way pour la concentration de Fe, Cu et Zn dans le plasma des groupes témoins et CD avec le taux de réduction.

Elément	F	P	Taux de réduction (%)
Fe	0.038	0.846	+0.19
Cu	5.916	0.016	-7.98
Zn	6.244	0.013	+6.10

Selon le test ANOVA, il n'y a pas de différence significative ( $p=0.846 >0.05$ ), a un intervalle de confiance 95%, entre la concentration de fer pour les deux groupes de CD et sains contrôle. Pour le cuivre, le tableau montre une différence significative entre la concentration moyenne des CD et la concentration des sains contrôle avec un taux d'abaissement -7.98% ; le zinc a une augmentation significative avec un taux de +6.10%.

#### 4.2.2.1. Discussion

Le zinc est un élément essentiel dont l'importance pour la santé est de plus en plus appréciée. Ses fonctions dans les voies antioxydantes sont au cœur de ses

---

<sup>3</sup> On utilise la statistique F pour ANOVA one way :  $F = \frac{\text{variation entre la moyenne de l'échantillon}}{\text{variation au sein de l'échantillon}}$

prétendus effets protecteurs du cancer. En raison de l'effet positif du zinc chez les patients cancéreux, il est limitant le stress oxydatif et en améliorant la réponse immunitaire chez les patients cancéreux [207].

En revanche, cette étude a également démontré que des taux sériques élevés de Zn étaient associés au risque de cancer, ce qui est conforme à d'autre étude [208].

Une étude in vivo a indiqué que des niveaux élevés de Zn pourraient activer l'activité de la télomérase (enzyme a pour mission d'habiller les chromosomes de télomères, des séquences nucléotidiques placées à leur extrémité et servant à les préserver), ce qui pourrait conduire à une prolifération illimitée des cellules tumorales [209]. Cela peut être l'un des mécanismes possibles par lesquels des concentrations élevées de Zn entraînent un risque accru de cancer de la bouche par exemple [210].

Pour le cuivre, un certain nombre d'études ont montré qu'en comparaison avec les populations témoins, les taux sérique du cuivre sont liés à la pathologie cancéreuse [211, 212], notre résultat était en accord avec ces études.

Une diminution de concentration sérique du cuivre dans les patients cancéreux sous traitement chimiothérapie pour la population algérienne ; les raisons de la baisse des taux des taux de cuivre, ils ont été montrés que les taux diminuent après le traitement contre le cancer et augmentent avant la rechute. [213]

Dans le contexte des maladies cancéreuses, le rôle du cuivre dans l'angiogenèse tumorale a été démontré, et la réduction du taux de cuivre chez les patients cancéreux est devenue l'une des approches des traitements anti-angiogéniques [214]

Puisque le Zn et le Cu pourraient entrer en compétition dans l'intestin grêle, si l'un d'eux augmente ou diminue, cela interférerait avec l'absorption de l'autre [215]. Les niveaux accrus de Zn peuvent être attribués à l'antagonisme entre Cu et Zn.

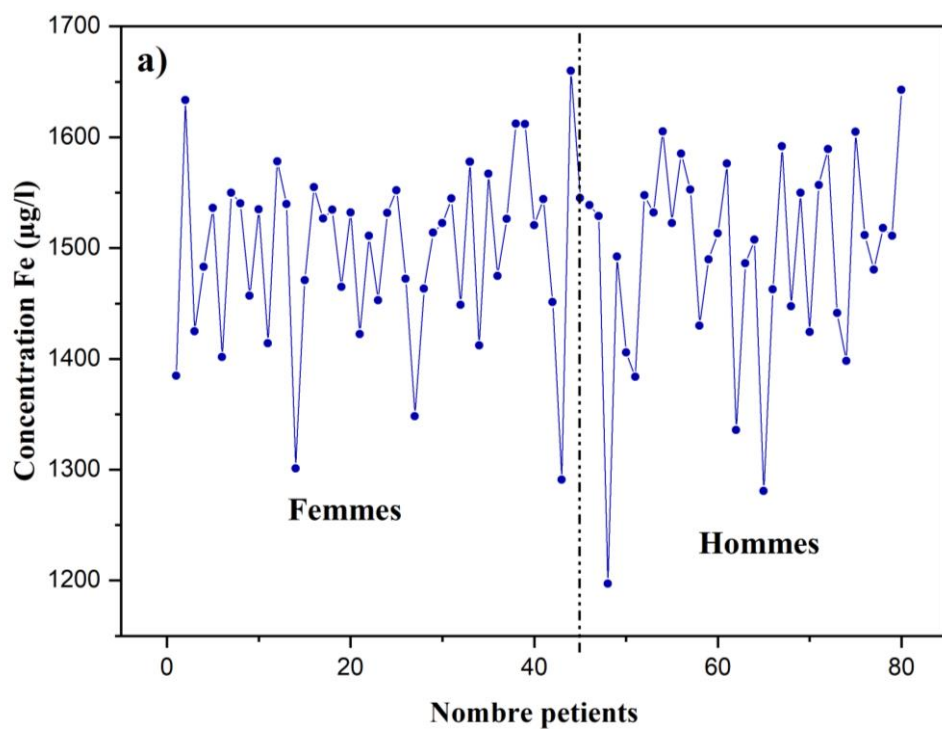
Le fer est à la fois essentiel à la vie et potentiellement toxique à des niveaux élevés. Dans notre étude, nous n'avons trouvé aucune association entre le fer sérique et le cancer dans la population algérienne.

Des études basées sur un ensemble complet de biomarqueurs du fer (fer, ferritine, transferrine) et une grande taille d'échantillon pourraient aider à clarifier les relations entre le fer et le cancer. [216-218]

#### 4.2.3. Influence du genre sur la concentration du Cu, Fe et Zn

M. Ghayour - Mobarhan et al. [219] ont rapporté que les conditions physiologiques (âge, alimentation et genre) affectent les concentrations de cuivre et de zinc dans le sérum humain. Pour le cancer, il existe une disparité de mortalité entre les deux genres, le taux est plus élevé chez les hommes que chez les femmes, les différences entre les genres dans la détection précoce peuvent également être un facteur contributif [220].

Pour observer la variation entre la concentration des oligo-éléments des femmes par rapport aux hommes dans la population CD, nous avons tracé la concentration des individus de la population totale en différenciant les deux genres (figure 4.9). Cela donnera une information principale sur la différence de concentration entre les deux genres.



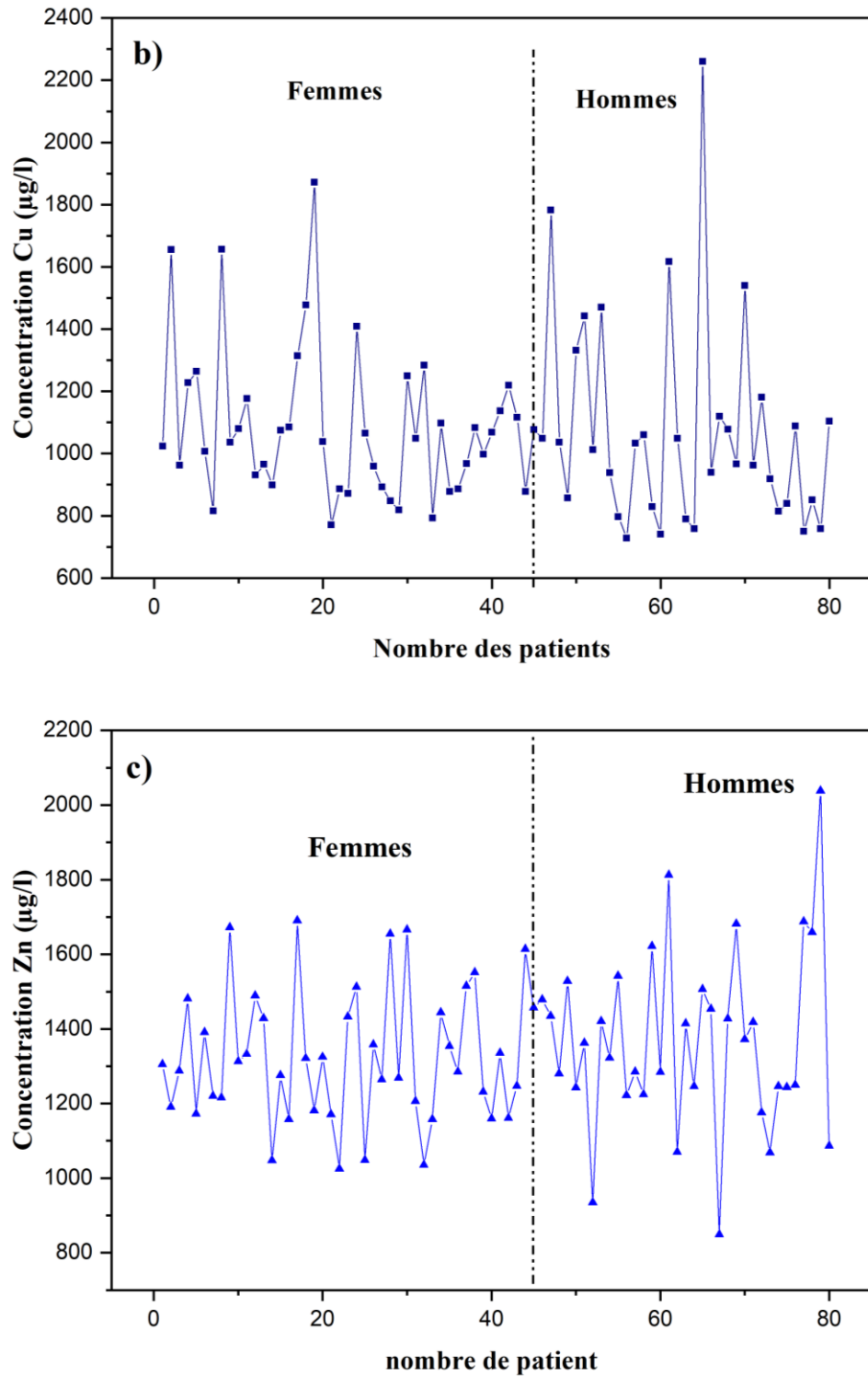


Figure 4.9 : La variation des concentrations de (a) fer (b) cuivre et (c) zinc dans le groupe CD pour les deux genres (femmes et hommes).

La figure 4.9 présente une distribution non normalisé pour les valeurs des concentrations des individus des deux genres de la population CD, avec l'existence des valeurs aberrante au milieu ; l'allure générale de distribution des valeurs entre

les concentrations sanguine des femmes et hommes montre une différence d'apparence.

Pour voir l'effet du genre sur la concentration des oligo-éléments dans la population des patients cancéreux. On va faire une comparaison par genres entre les deux groupes sains contrôle et CD ; le tableau 4.4 résume les moyennes des concentrations des oligo-éléments (Fe, Cu, Zn) des femmes et hommes pour les deux populations témoins et CD.

Tableau 4.4 : Concentrations des éléments Fe, Cu et Zn dans le plasma sanguin en µg/l pour les groupes témoin et CD respectivement pour les femmes et les hommes : nombre de patients dans chaque groupe, moyennes et écart-type, intervalles des concentrations des éléments, taux de réduction (%) et signification.

<b>Femme</b>								
<b>Elément</b>	<b>groupe</b>	<b>N</b>	<b>Moyenne</b>	<b>SD*</b>	<b>Intervalle</b>		<b>Taux de réduction (%)</b>	<b>Sig. (p)</b>
					<b>Min</b>	<b>Max</b>		
<b>Fe</b>	Contro l	44	1497	100.70	1274	1669	+0.106	0.934
	CD	45	1498	79.92	1290	1659		
<b>Cu</b>	Contro l	44	1201	300.25	812	1996	-9.65	0.046
	CD	45	1085	238.63	770	1871		
<b>Zn</b>	Contro l	44	1310	188.45	995	1854	+1.14	0.698
	CD	45	1325	177.44	1024	1690		
<b>Homme</b>								
<b>Elément</b>	<b>groupe</b>	<b>N</b>	<b>Moyenne</b>	<b>SD*</b>	<b>Intervalle</b>		<b>Taux de réduction (%)</b>	<b>Sig. (p)</b>
					<b>Min</b>	<b>Max</b>		
<b>Fe</b>	Contro l	54	1461	228.14	1260	1815	+2.076	0.255
	CD	35	1492	94.53	1197	1642		
<b>Cu</b>	Contro l	54	1148	147.33	828	1470	-7.309	0.137
	CD	35	1070	336.96	727	2259		
<b>Zn</b>	Contro l	54	1231	209.07	670	1734	+9.994	0.006
	CD	35	1368	242.58	848	2038		



Concernant le zinc, l'influence du genre sur le taux de Zn explique une différence non significative ( $p=0,698$ ) pour les femmes, contrairement aux hommes qui affichent un taux d'augmentation significative ( $T=9.994\%$ ,  $p= 0,006$ ). En ce qui concerne le cuivre, il y a une diminution significative des femmes du groupe CD par rapport aux témoins ( $T=-9.65\%$ ,  $p = 0,046$ ) ; mais pour les hommes, la différence de moyenne n'est pas significative ( $p=0,137$ ). Alors que pour le fer, la différence de moyenne n'est pas significative pour les deux genres entre les deux groupes CD et témoin. Par conséquent, la Fe, le Cu et la Zn présentent un taux de diminution significative du cuivre ( $p < 0,05$ ) pour les femmes et un taux d'augmentation significative du zinc ( $p < 0,05$ ) pour les hommes. Alors que, pour le reste, la différence de moyenne n'est pas significative ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.3.1. Discussion

Dans notre étude on montre qu'il existe une différence de concentration des oligo-éléments dans les patients cancéreux par rapport au genre. Nous voyons une baisse concentration sérique du cuivre chez les femmes avec aucune différence chez les hommes, est une augmentation de concentration du zinc chez les hommes avec aucune différence chez les femmes.

Dans des études génétiques et moléculaires [221-223] la susceptibilité à la maladie varie selon les genres. Les disparités génétiques et moléculaires entre les hommes et les femmes contribuent aux différences dans l'incidence, le développement et le traitement de divers cancer.

#### 4.2.4. Influence d'âge sur la concentration du Cu, Fe et Zn

L'âge ainsi que le genre, la race et l'origine ethnique étaient généralement classés par les paradigmes causaux du cancer comme des caractéristiques individuelles qui ne se prêtent pas à une intervention [224]. Plus de la moitié des nouveaux cas de cancer survient chez des patients âgés > 65 ans [225]. Même si les taux d'incidence actuels restent inchangés, le nombre d'adultes atteignant un âge avancé augmentant rapidement, le nombre de nouveaux cas de cancer augmentera également. Malgré la bonne compréhension des bases moléculaires de l'oncogénèse et du vieillissement, le chevauchement du cancer et du vieillissement à ce niveau reste un domaine de recherche très ouvert [226].

Pour étudier l'influence de l'âge sur la concentration en oligo-éléments dans le plasma humain des patients CD. Nous avons réparti la concentration selon l'âge en quatre groupes : premier groupe <30, 2<sup>ème</sup> groupe : 30-50, 3<sup>ème</sup> groupe : 51-60 et le dernier groupe : > 60 ans. La variation des moyennes des concentrations des oligo-éléments Fe, Cu et Zn en fonction des tranches d'âge présenté dans la figure 4.10.

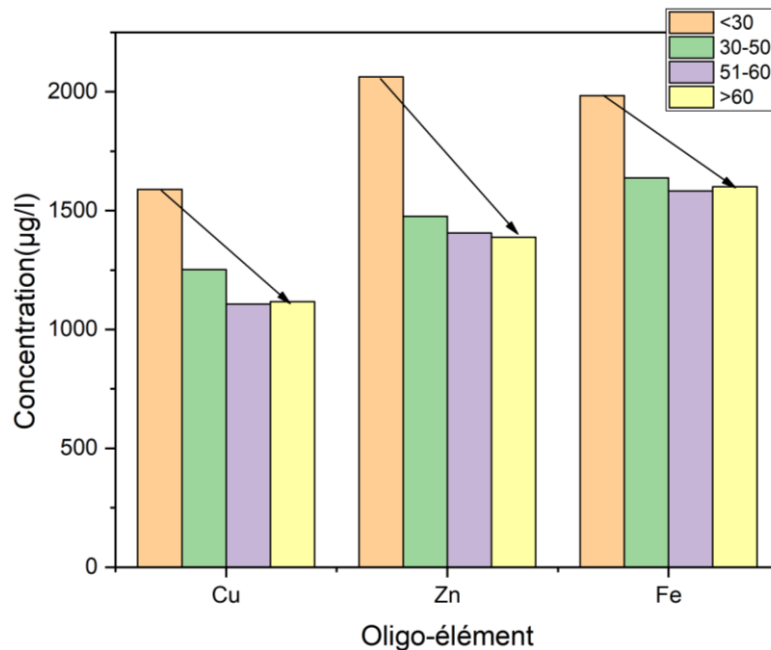
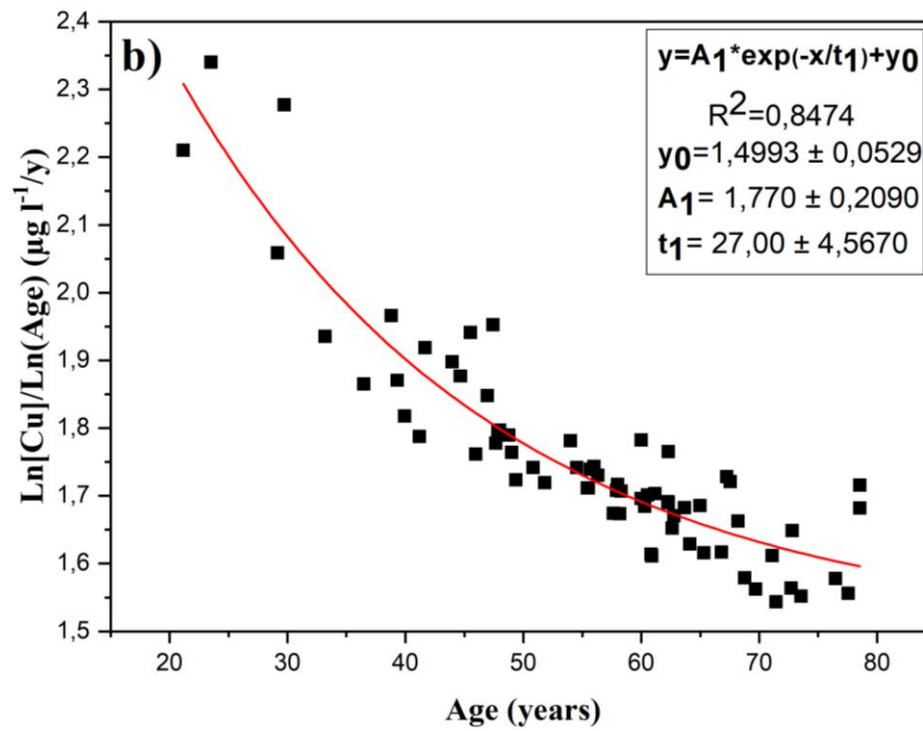
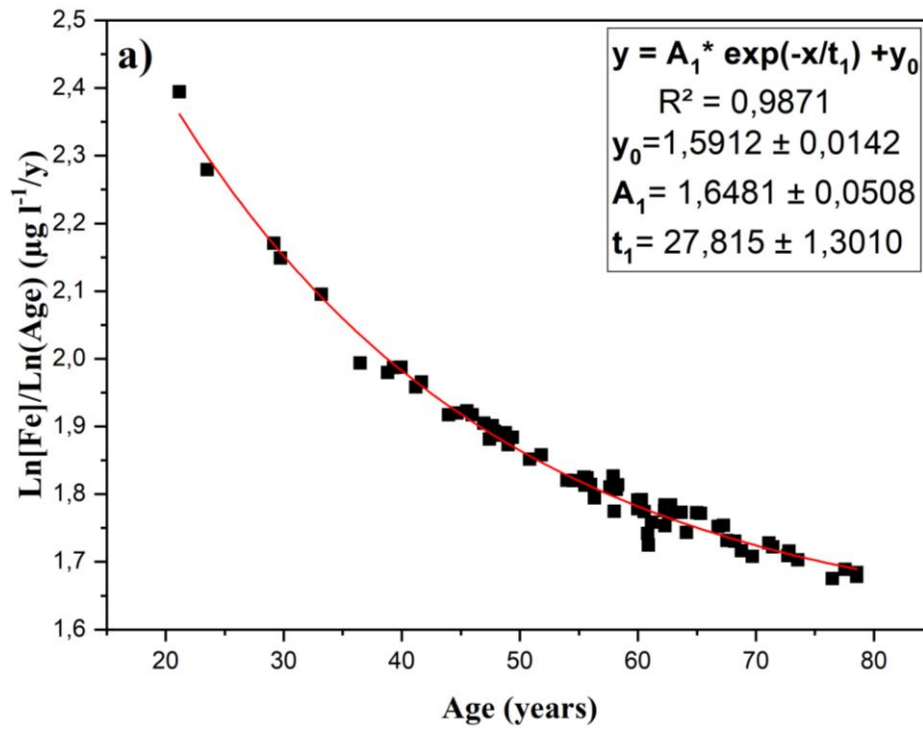


Figure 4.10 : Variation de la moyenne des concentrations de cuivre, de fer et de zinc par groupe d'âge de la population de CD.

La figure 4.10 montre une différence des moyennes des concentrations de chaque élément par rapport à l'âge des patients, une différence qui est claire et diminution en fonction d'exponentiel. Cette observation nous a laissés penser à quoi ça ressemblerait la variation des concentrations des oligo-éléments par rapport à l'âge dans le sang des patients atteint de la pathologie cancéreuse.

La distribution des concentrations observées en fonction d'âge a un ajustement non linéaire ; pour voir la variation de chaque oligo-élément (Cu, Fe et Zn) en fonction de l'âge et l'équation empirique identique on a fait une simple transformation à un ajustement affiné. On a tracé des graphes des rapports logarithmiques (axes-y) en fonction de l'âge (axe-x), où l'axe des 'y' est  $\ln[TE] / \ln(age)$ , l'axe des 'x' est âge des patients ; [TE] est la concentration de l'oligo-élément en µg/l.



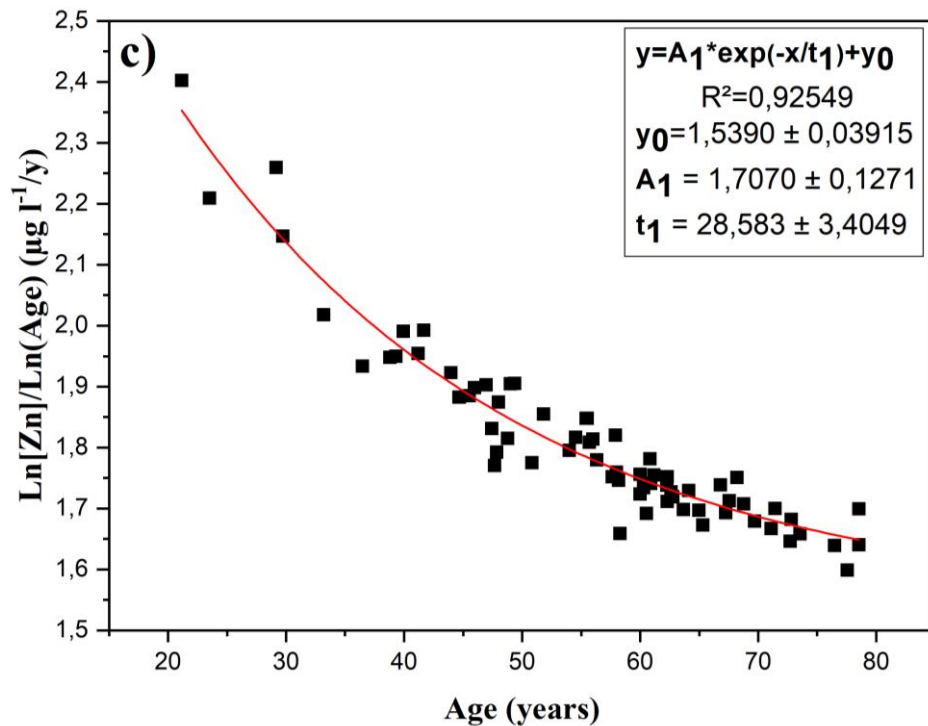


Figure 4.11 : La variation de la concentration en oligo-éléments avec l'âge : (a) Cu, (b) Fe et (c) Zn.

L'ajustement des trois tracés à l'aide du logiciel Origin8, les trois graphes montre une décline exponentiel avec un coefficient de détermination  $R^2$ , 0.987, 0.847, 0.925 pour le fer, cuivre et zinc respectivement, c. à. d. il y a une adéquation très forte entre les équations développées et les données observées. L'équation exponentielle déduite d'après les graphes, qui présentent un rapport du logarithme des concentrations sur logarithme d'âge en fonction d'âge, est :

$$y = a_1 e^{-x/t_1} + y_0 \quad (4.1)$$

$a_1, t_1, y_0$  Sont des paramètres graphiques, indiqués dans le graphe.

Par conséquent, l'équation empirique représentant la concentration en oligo-éléments dans le plasma sanguin en fonction d'âge du groupe CD est décrite comme suit :

$$[TE] = e^{y_0 \ln x} + e^{a_1 \ln x e^{-x/t_1}} \quad (4.2)$$

#### 4.2.4.1. Discussion

Pour de nombreuses personnes âgées, le cancer rejoint les rangs des autres maladies chroniques liées à l'âge. Dans cette étude, nous avons observé

l'abaissement significatif des concentrations des oligo-éléments (Fe, Cu et Zn) dans le sérum des cancéreux par rapport à l'âge. Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer les interactions entre la cancérogenèse en général et le processus de vieillissement. Premièrement, à mesure que les individus vieillissent, ils subissent une exposition environnementale cumulative à des cancérogènes (en particulier avec le tabagisme et l'exposition à des cancérogènes sur le lieu de travail ou dans des conditions de vie très polluées). Deuxièmement, le vieillissement laisse le temps au développement et à l'accumulation d'événements cellulaires pouvant conduire à une transformation néoplasique. L'existence d'un temps de latence entre ces expositions, les événements cellulaires et l'expression clinique de la malignité pourrait expliquer la première apparition de cancer dans une population plus âgée. Troisièmement, le vieillissement pourrait s'accompagner d'une diminution de la capacité de métaboliser correctement les oligo-éléments [227]

#### 4.2.5. Association du genre et l'âge avec la maladie cancéreuse

Pour une meilleure compréhension des maladies liées au mode de vie, notamment certains type de cancer ; On fait une association des deux facteurs a une influence sur la maladie cancéreuse, l'âge et le genre. Quelle information donne cette combinaison ?

On a classé les concentrations des individus de population CD pour chaque oligo-élément selon les quatre groupes d'âge précédent, la figure 4.12-13 présente la moyenne des concentrations des oligo-éléments Fe, Cu et Zn par rapport aux groupes d'âge.

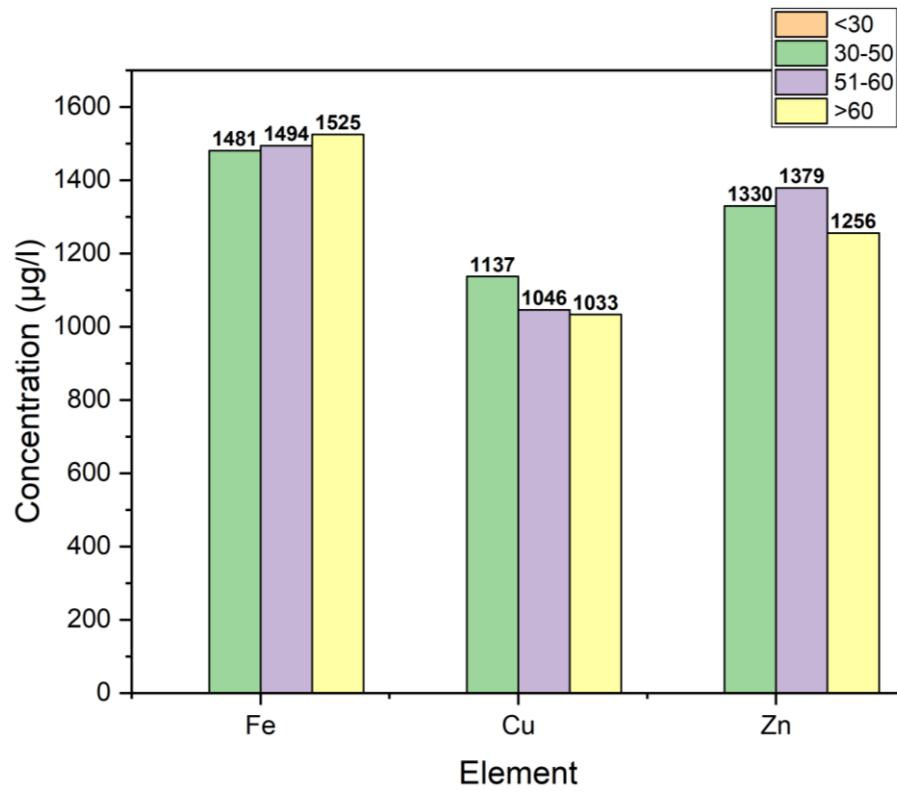


Figure 4.12 : Moyenne des concentrations de Cu, Fe et Zn de femmes de population CD par groupe d'âge.

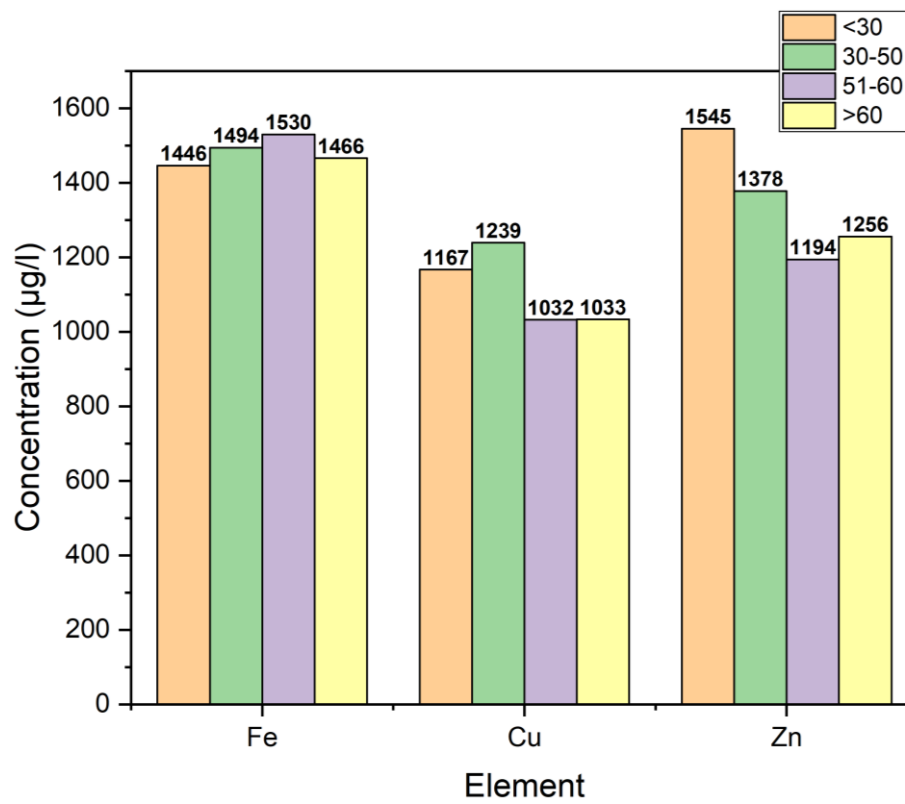


Figure 4.13 : Moyenne des concentrations de Cu, Fe et Zn des hommes de population CD par groupe d'âge.

Les deux présentations graphiques ne permettaient pas d'extraire aucune information, ni de tendance ni de dispersion ; où la valeur moyenne de concentration n'indique pas une pondération des concentrations à sa fréquence propre. La dispersion des concentrations autour des groupes d'âge, ne peut pas le quantifier de façon grossière par l'étendue de la distribution.

Dans cette étude l'influence d'âge sur le genre dans la maladie cancéreuse reste questionnable.

### 4.3. Facteurs des risques

#### 4.3.1. Le rapport Cu / Zn

Des études ont montré que le cancer gastrique peut être causé par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et les antioxydants alimentaires peuvent protéger contre cette maladie.<sup>1</sup> Superoxyde dismutase (SOD), qui est connue pour être présente sous au moins deux formes, cuivre cytoplasmique/zinc SOD (Cu/Zn SOD) et le manganèse mitochondrial (Mn-SOD), jouent un rôle clé dans la détoxification des radicaux superoxydes.

Le long de cette partie on a calculé la concentration du Cu/Zn dans la population sains contrôle et la population CD ; la distribution des concentrations de Cu/Zn est présenté dans la figure 4.14.

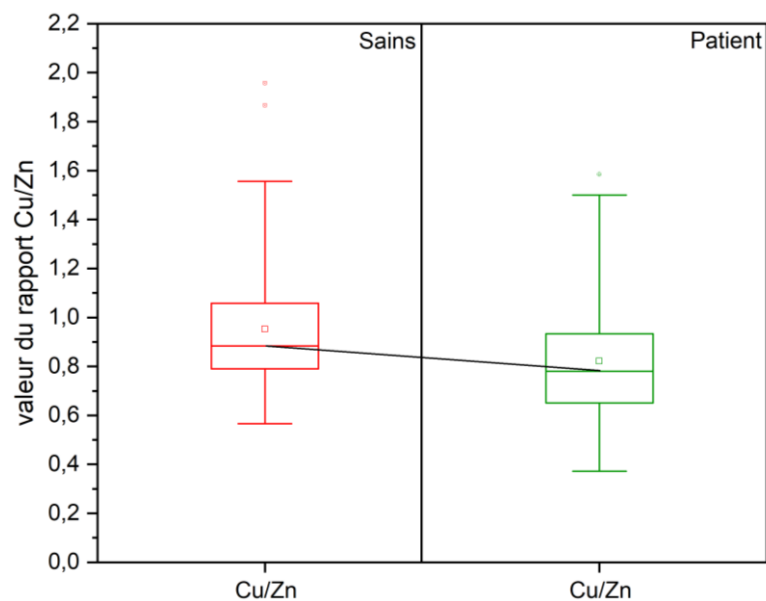


Figure 4.14 : Distribution de la concentration de Cu / Zn dans le plasma des groupes CD et groupe témoins.

La figure 4.14 montre une disparition cohérente des rapports Cu/Zn des deux groupes, c. à d. les concentrations des individus ont un niveau élevé d'accord entre elles ; la comparaison entre les deux populations sains contrôle et patients CD présente une diminution du rapport Cu/Zn SOD dans le CD par rapport aux témoins.

Le tableau 4.5 résume les concentrations des deux populations (contrôle et CD) par les concentrations moyennes.

Tableau 4.5 : Les concentrations de rapport Cu/Zn pour les groupes témoin et CD : moyenne, écart-type, intervalle des rapports, taux de réduction et la signification p.

		N°	Moyenne	SD*	Intervalle	Taux de réduction (%)	Sig. (p)
Cu/Zn	Contrôle	98	0,95	0,25	0,56-1,95	-15,85	7,35E-04
	CD	80	0,82	0,24	0,40-1,59		

En ce qui concerne le rapport Cu/Zn SOD1, il y a une diminution significative ( $T=-15.85\%$ ,  $p=7,35E-04$ ) dans les patients atteints de pathologie cancéreuse par rapport au sains contrôle dans la population algérienne.

#### 4.3.1.1. L'influence du genre sur le rapport SOD

La variation de rapport Cu/Zn entre les femmes et hommes dans la population CD, est tracée par le rapport de chaque individu de la population totale en différenciant les deux genres (figure 4.15). Cela donnera une information principale sur la différence de concentration entre les deux genres.



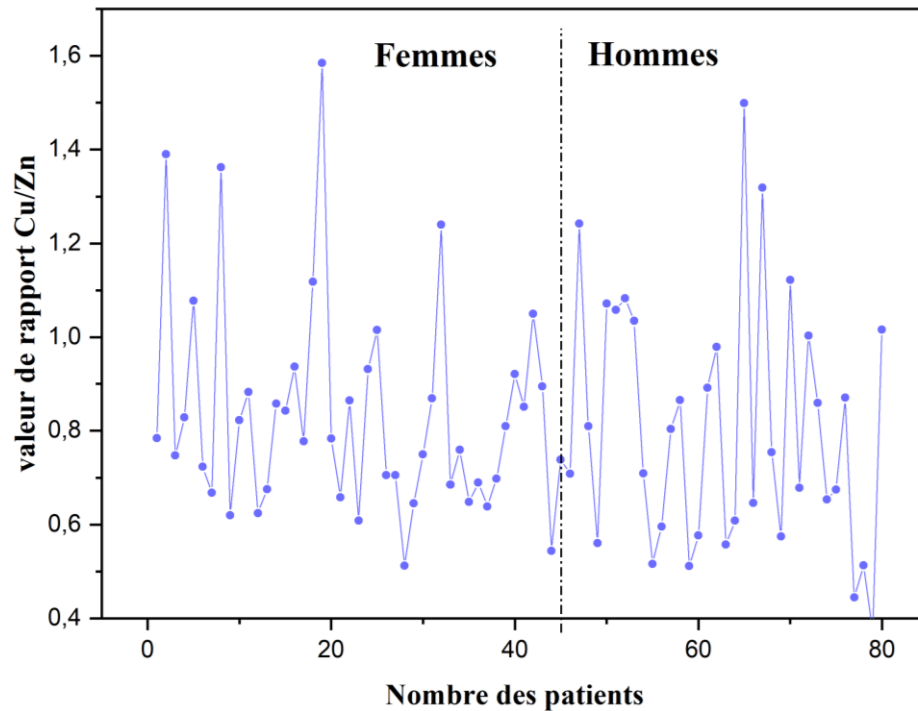


Figure 4.15 : La variation des rapports Cu / Zn dans la population CD pour les deux genres.

La figure 4.15 présente une distribution non normalisé pour les rapports de Cu/Zn des individus des deux genres de la population CD, avec l'existence des valeurs aberrante au milieu ; l'allure générale de distribution des valeurs entre les concentrations sanguine des femmes et hommes montre une différence d'apparence.

Pour voir l'effet du genre sur le rapport Cu/Zn dans la population des patients cancéreux. On va faire une comparaison par genres entre les deux groupes sains contrôle et CD ; le tableau 4.6 résume les moyennes des rapports, des femmes et hommes pour les deux populations témoins et CD.

Tableau 4.6 : le rapport du Cu/Zn SOD pour les groupes témoin et CD respectivement pour les femmes et les hommes : nombre de patients dans chaque groupe, moyennes et l'écart-type, intervalles des concentrations des éléments, taux de réduction (%) et signification.

Femme								
Elément	groupe	N	Moyenne	SD*	Intervalle		Taux de réduction (%)	Sig. (p)
Cu/Zn	<b>Control</b>	44	0.94	0.28	0.56	1.86	-12.37	0.062
	<b>CD</b>	45	0.83	0.22	0.51	1.58		
Homme								
Elément	groupe	N	Moyenne	SD*	Intervalle		Taux de réduction (%)	Sig. (p)
Cu/Zn	<b>Control</b>	54	0.96	0.23	0.57	1.95	-19.77	0.004
	<b>CD</b>	35	0.80	0.26	0.37	1.5		

Le rapport Cu / Zn (tableau 4.6) montre une diminution significative ( $p = 0,004$ ) de la valeur moyenne pour les hommes CD par rapport au témoin avec un taux de réduction de -19.77%. Le tableau montre une différence non significative ( $p = 0.062$ ) pour les femmes de CD et les témoins.

#### 4.3.1.2. Discussion

Le superoxyde dismutase convertit le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, tandis que la catalase et la glutathion peroxydase convertissent le peroxyde d'hydrogène en eau. De cette manière, deux espèces toxiques - le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène - sont converties en un produit inoffensif, l'eau. Ces fonctions enzymatiques sont nécessaires à la vie de toutes les cellules métabolisant l'oxygène.

Dans les cas où les niveaux d'enzymes antioxydantes sont diminués dans les tumeurs humaines, suggère que la plupart des types de cellules cancéreuses ne peuvent pas détoxifier le peroxyde d'hydrogène. [228-230]

#### 4.3.2. Tabagisme et cancer du poumon

Malgré l'importance des espèces réactives de l'oxygène dans le développement des cancers liés au tabagisme, on en sait peu sur le modèle d'expression des

piégeurs de ROS dans ces cancers. Le tabac contient au moins 70 produits cancérigène, des produits qui augmentent les formations des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Dans cette étude, nous avons essayé de détecter les concentrations des oligo-éléments (Fe, Cu et Zn) dans le plasma sanguin des fumeurs et des patients atteints de cancer du poumon par rapport aux personnes en bonne santé dans la population algérienne, la figure 4.16 présente les moyennes des concentrations des oligo-éléments Cu, Fe et Zn pour les trois groupes sains contrôle non-fumeurs (contrôle), les fumeur et les patients atteint de cancer du poumon (LCD).

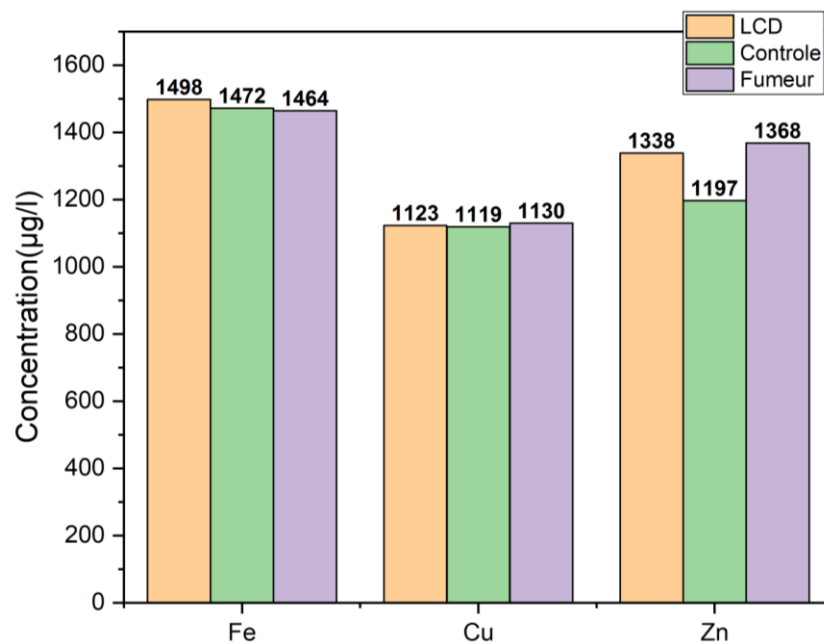


Figure 4.16 : Concentrations de cuivre, fer et zinc pour les groupes des sains contrôle non-fumeurs (contrôle), les fumeurs et les patients atteints de cancer du poumon (LCD).

Comme l'indique la figure 4.16, il existe une différence évidente entre les deux groupes LCD et les fumeurs avec les contrôles ; pour les deux autres éléments (Fe, Cu) la différence est petite.

La signification de cette différence de concentration est présentée dans le tableau 4.7 avec le taux de réduction.

Tableau 4.7 : Concentrations plasmatiques des éléments Fe, Cu et Zn en µg/l, pour les témoins, les fumeurs et les groupes LCD : nombre de patients dans chaque groupe, moyennes et écart-type, taux de réduction (%) avec signification.

		Nombre	Moyenne	SD*	Taux de réduction (%)	Sig. (p)
<b>Cu</b>	Contrôle	20	1119	104	/	/
	Fumeur	14	1130	184	-0.98	0.81
	LCD	10	1123	305	-0.35	0.95
<b>Fe</b>	Contrôle	20	1472	113	/	/
	Fumeur	14	1464	104	0.54	0.85
	LCD	10	1498	108	-1.35	0.4
<b>Zn</b>	Contrôle	20	1197	252	/	/
	Fumeur	14	1368	161	-0.14	0.006
	LCD	10	1338	170	-0.12	0.04

\*Écart type avec une confiance de 95%.

Les résultats présentés dans le tableau 4.7 ne montrent aucune différence significative entre les fumeurs et les LCD par rapport aux sains non-fumeurs pour les deux oligo-éléments fer et cuivre ( $p=0.81, 0.95$  ;  $p=0.85, 0.4$  respectivement). Sinon pour le zinc existe une diminution significative entre les fumeurs et les LCD avec les sains non-fumeurs ( $p=0.006, 0.04$  resp.).

#### 4.3.2.1. Discussion

Dans notre étude on trouve que les oligo-éléments étudiés (Cu, Zn et Fe) affectés de la même manière dans les sains fumeurs et les LCP par rapport à les témoins ; avec une faible concentration plasmique du zinc chez les patients atteint du cancer du poumon dans la population algérienne.

La faible concentration du zinc dans les patients du cancer de poumon a été bien reportée par plusieurs études d'autre population [231-233]. Il est suggéré que le faible niveau de zinc pourrait réduire la synthèse de protéine de liaison du rétinol, qui est le responsable sur le transport de vitamine A dans le plasma, et ainsi réduire la mobilisation de la vitamine A à partir de foie [234].

L'effet de taux des oligo-éléments dans les patient de cancer du poumon et les fumeurs, est le même car le tabagisme a été le rôle bien connu dans le développement du cancer de poumon [235].

Le zinc fait partie intégrante de la santé pulmonaire des gens, du cancer aux maladies respiratoires chroniques comme tuberculose [236], et même le covid-19 ne peut pas être exclu [237]

#### 4.4. Comparaison avec d'autres études

Pour enrichir cette étude et voire de quelle façon les caractéristiques de population algérienne influé sur les niveaux sérique des oligo-éléments dans les patients atteints de la pathologie cancéreuse par rapport aux autres populations, Nous avons effectué une comparaison des valeurs moyennes des concentrations des oligo-éléments des autre ouvrages et de notre travail, puis une comparaison de variation des taux des oligo-éléments Fe, Cu et Zn dans d'autre études.

La figure 4.17 illustre les concentrations moyenne du Cu, Zn et Fe dans des CD et sains contrôles, de population polonaise et irakienne.

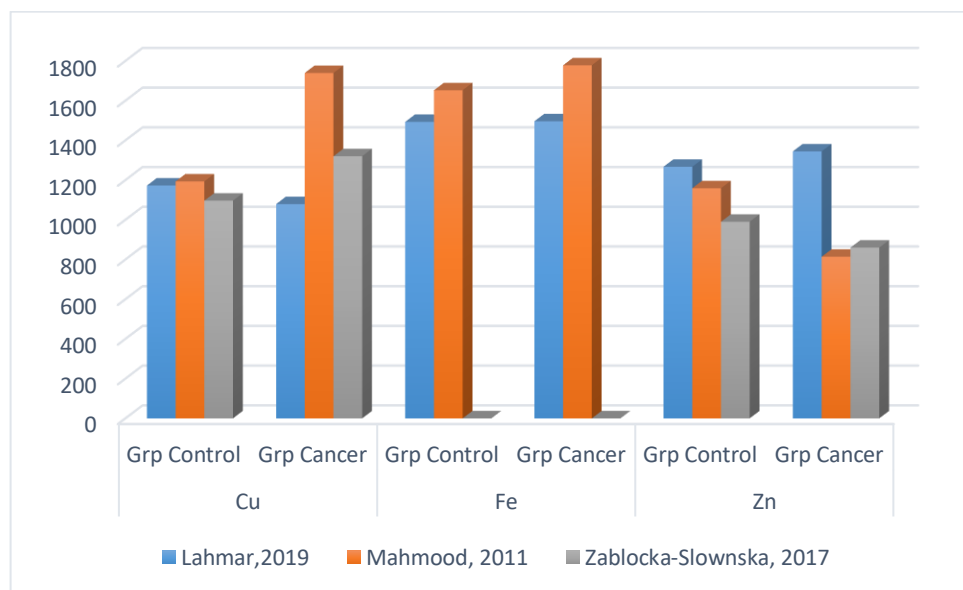


Figure 4.17 : Concentrations moyenne ( $\mu\text{g/l}$ ) du Cu, Zn et Fe dans des CD et sains contrôles, de population polonaise [238] (Zablocka-Slownska, 2017) et irakienne [239] (Mahmood, 2011) avec algérienne (Lahmar, 2019).

On observe une différence des concentrations entre la population algérienne et l'autre population, pour les deux groupes sains et cancéreux ; Car les caractéristiques des populations et leur mode de vie différent.

C'est pourquoi la participation de tous les populations aux efforts scientifiques, enrichissez et aidez à résoudre ce problème mondiale.

Les effets des oligo-éléments sont liés à la concentration et les observations enregistrées vont de l'état de carence, au fonctionnement en tant que composants biologiquement essentiels, à un déséquilibre lorsque l'excès d'un élément interfère avec la fonction d'un autre, et enfin à des concentrations toxiques et mortelles. Ces revues sont considérées les oligo-éléments du point de vue à la fois de leur rôle dans la cancérogenèse et de l'utilisation éventuelle de leur dosage dans les fluides biologiques comme aide diagnostique ou pronostique chez les patients atteints de cancer.

Le tableau 4.8 résume la variation de taux du fer, cuivre et zinc des travaux issus de la littérature.

Tableau 4.8 : la variation de taux sérique des oligo-éléments : fer, cuivre et zinc chez les patients cancéreux des travaux issus de la littérature.

	<b>Population générale</b>		
	<b>Augmentation</b>	<b>Diminution</b>	<b>Pas de signification</b>
<b>Cu</b>	Zowczak (2001)[240] Marco (2001)[241] Emre (2013)[242] Hassan (2017)[243]	Khoshdel (2015)[244] Lahmar (2019)	
<b>Fe</b>	Vanholle (2020)[218] Wen (2014)[216] Wu (2004)[245]		Lahmar (2019) Mahmood (2011)[239]
<b>Zn</b>	Pasha (2008)[246] Emre (2013)[242] Lahmar (2019)	Atakul (2019)[247] Marco (2001)[241] Hassan (2017)[243] Khoshdel (2015)[244]	
<b>Cu/Zn</b>	Zowczak (2001)[240] Atakul (2019)[247] Oyama (1994)[248]	Lahmar (2019) Lin (2002)[228] Piyathilake(2002)[229]	

## Conclusion général

L'étude présente est la première investigation clinique de maladie cancéreuse à Blida, en Algérie. Utilisant la technique de fluorescence X (XRF) au Laboratoire de physique fondamentale et appliquée (FUNDAPL).

L'objectif de cette étude multidisciplinaire est de mettre à disposition des valeurs précises des concentrations d'oligo-éléments dans le sang plasmatique des patients atteints de pathologie cancéreuse dans la population algérienne, par la technique ED-XRF.

Un traitement chimique des échantillons est réalisé, pour digérer totalement la matrice organique plasmatique par une méthode digestive d'acide mix et chauffage conventionnelle, avec un taux de récupération élevé.

Nous avons utilisé du sang animal AIEA-A13 comme matériau de référence. La qualité contrôle et la qualité d'assurance QC/AC de nos analyses a été réalisée par les paramètres du biais relatif, du Z score et du U score. Les résultats de tous les éléments sont satisfaisants par rapport aux valeurs certifiées de la norme.

La procédure QC/QA a montré que la technique XRF peut être utilisée dans le diagnostic médical comme outil préventif.

Une présentation statistique des résultats examine la signification de la différence entre la concentration des deux groupes sains contrôles et patients pour les oligo-éléments (Fe, Cu et Zn). Confirme une diminution de cuivre dans les patients cancéreux et les contrôles (1078 $\mu\text{g/l}$ , 1172 $\mu\text{g/l}$  respectivement), avec une augmentation de taux du zinc pour les patients par rapport aux sains (1344 $\mu\text{g/l}$ , 1266 $\mu\text{g/l}$  resp.) et aucune différence significative de fer par rapport aux deux groupes (1496 $\mu\text{g/l}$ , 1493 $\mu\text{g/l}$  resp.).

De plus, l'effet genre affecte le niveau des concentrations des oligo-éléments étudiés dans le plasma des patients algériens atteints de cancer. Le taux de réduction a montré une diminution de Cu chez les femmes cancéreuse par rapport au saine ( $T=-9.65\%$ ) et avec une augmentation de Zn chez les hommes cancéreux

par rapport au saine ( $T=+9.994\%$ ) peut suggérer une disparité moléculaire entre les deux genres.

De même, les concentrations plasmatiques de Zn, Cu et Fe sont affecté par l'âge dans la maladie cancéreuse. Nous avons établi une équation empirique qui prédit la concentration en oligo-éléments Cu, Zn et Fe en fonction de l'âge des patients atteints de cancer. Donne-nous une approche pour comprendre les interactions entre la cancérogenèse en général et le processus de vieillissement.

Pour l'antioxydant, le Cu/Zn (SOD1), il existe une diminution significative ( $T=-15.85\%$ ,  $p=7,35E-04$ ) dans les patients atteints de pathologie cancéreuse par rapport au sains contrôle dans la population algérienne. Cela prouvé que le taux sérique des antioxydants peut donner une idée préconçue sur l'état de défense du corps des cancéreux contre le stress oxydatif, est défini comme biomarqueurs sur le stade de la maladie.

Il est prouvé avant que le tabac a un risque cancérigène sur l'homme, mais dans notre étude, nous observons les variations de la concentration des oligo-éléments dans la population algérienne dans la maladie cancéreuse par rapport au tabac. Le taux du zinc montre un baisssement significative pour les fumeurs et les patients des cancers du poumon ( $1368\mu\text{g/l}$ ,  $T=-0.14\%$  ;  $1338\mu\text{g/l}$ ,  $T=-0.12\%$  resp.), le zinc un oligo-élément qui a une influence remarquable sur les maladies pulmonaire, qui peut le voir dans le covid-19.

Car la mesure de Cu, Zn et Cu / Zn est très utile pour un examen de santé secondaire et est très utile pour diagnostiquer, suivi et traité la maladie cancéreuse. Nous avons fait une analyse in vitro des taux sérique de ces oligo-éléments, et que les éléments Cu, Zn et Cu/Zn sont stockables et que leurs déterminations sont si simples et peu coûteuses, il est utile de rendre ces mesures analytiques routinières et disponibles dans les évaluations du cancer.



## APPENDICES

### A Liste des abréviations

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**FUNDAPL** : laboratoire physique fondamentale et appliquée, pavillon : 8, Université Blida 1

**ATP** : adénosine triphosphate

**ADP** : adénosine diphosphate

**ERO ou ROS** : espèces réactives de l'oxygène

**SOD** : superoxydes dismutases

**AE** : antioxydants enzymatiques

**XRF** : *X-ray fluorescence*

**EDXRF** : Spectromètre XRF à dispersion d'énergie

**WDXRF** : Spectromètre XRF à dispersion de longueur d'onde

**SDD** : détecteur de dérive de silicium

**LLD** : La limite de détection

**ppm** : partie par million, 1 ppm = 1 mg/kg ou 1 µL/L ou 1 µmol/mol

**IAEA** : Agence internationale de l'énergie atomique

**AQ/ CQ** : Assurance qualité et Contrôle qualité

**RB** : Biais relatif

**SD** : écart-type

**IAEA- A-13** : matériau de référence (sang lyophilisé)

**CD** : la maladie cancéreuse

**LCD** : maladie du cancer du poumon

**B QUESTIONNAIRE**N° de questionnaire 

date de questionnaire : .../.../2015

**Identification**

Nom:.....Prénom:.....

Date de naissance :.....Lieu de Naissance:.....

Sexe: Féminin:  Masculin: 

Adresse :.....

Commune:.....Daïra:.....Wilaya:.....

Localisation géographique : Urbaine:  Rurale: Régime alimentaire: Riche en gras Riche en sucre Régime spécial Fumeur: Oui:  Non:  quantité :.....Teinture des cheveux: Oui:  Non:  combien de fois :.....**Etat de santé :**Sain: 

\*Doit se sentir en bonne santé (pas de : hypertension, anémie, maladie cardio-vasculaire, diabète, pathologie inflammatoire,...)

\*Aucune grande opération chirurgicale ni aucun accouchement au cours des 12 derniers mois.

\* Pas de situation à risque (drogues, nouveaux partenaire sexuels ou multiples...).

\*Pas de prise de certains médicaments (antibiotique, suppléments : minéral ou vitamine,.....)

Malade: 

Service:.....Médecin traitant : .....

Type de cancer : .....Date de diagnostic :.....

Stade : .....l'évolution :.....

Traitement suivi : Chirurgie : Radiothérapie : Chimiothérapie :

## B Glossaire

1. **Antioxydant** : est une molécule qui ralentit ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques à leur contact.
2. **Catalyseur** : une substance capable d'accélérer une réaction chimique, mais ne participe pas à la réaction. Les protéines et en particulier les enzymes sont des catalyseurs.
3. **Chimiothérapie** : Traitement par des substances chimiques.
4. **Composés N-nitroso** : une famille de composés chimiques extrêmement dangereux, composés chimiques azotés et oxydés formés par une réaction de nitrosation entre des nitrites ou des nitrates et des amines ou des amides.
5. **Enzyme** : protéine qui fonctionne comme un catalyseur pour la médiation et la vitesse d'une réaction chimique ou biochimique.
6. **Erreur standard «erreur – type »** : mesure la précision de la moyenne de l'échantillon, pouvant estimer combien les moyennes d'échantillons varieront de l'écart – type de cette distributions d'échantillonnage.  $SE = SD / \sqrt{(taille\ d'ech.)}$  ; SE : est plus utile pour calculer un intervalle de confiance 95% [(Mean – SE\*1.96), (Mean + SE\*1.96)].  
 \*Si nous voulons dire à quel point certaines mesures sont dispersées, nous utilisons l'écart- type.  
 \*Si nous voulons indiquer l'incertitude autour de l'estimation de la mesure moyenne, nous citons erreur type de la moyenne.
7. **Gène HFE** : la protéine de l'hémochromatose humaine codée par le gène HFE situé sur le chromosome 6 humain.
8. **Oligo-éléments** : Le terme oligo-élément, de par son étymologie {la racine grecque, oligo : signifie petit, peu abondant}, désigne tout élément chimique présent dans le corps humain à une concentration inférieure à 0.01%.
9. **Matrice biologique** : Un matériel discret d'origine biologique qui peut être prélevé et traité d'une façon reproductible. Les exemples sont sang, sérum, plasma, urine, résidu salive, crachat et divers tissus discrets

**10. Matière référence certifier :** Matériau accompagnée d'un certificat dont les propriétés, sont certifiées par une procédure validée avec incertitude à un niveau de confiance connu.

**11. Matière référence non certifier :** Matériau ou substance dont certaines propriétés sont suffisamment homogènes et bien définies pour permettre de les utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage ou l'attribution de valeurs aux matériaux.

**12. Métabolisme :** Ensemble des transformations chimiques et biologiques qui s'accomplissent dans l'organisme.

**13. Radicaux libres :** atomes ou molécules instables nées de la décomposition d'une molécule d'eau, sont très réactifs car ayant un électron non apparié. Sous certaines conditions, peuvent être produits en excès s'attaquent aux composés vitaux des cellules (noyau, plasma, membrane) aux protéines ou à l'ADN et les dégâts qu'ils causent sont irréparables. Ils sont impliqués dans le vieillissement de la peau et l'apparition de nombreuses maladies dites "dégénératives".

**14. Résorption :** Passage de l'élément à travers les muqueuses de l'organisme et donc à la quantité réellement présente dans le corps humain.

**15. Stress oxydatif « ou stress oxydant » :** correspond à une agression des cellules par des radicaux libres, aussi appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Il résulte de la rupture de l'homéostasie redox. À l'état physiologique, la balance antioxydants/pro-oxydants (balance redox) est en équilibre. Toutefois un apport exogène des ERO, une surproduction endogène des ERO ou une défaillance des systèmes antioxydants, conduisent au déséquilibre de la balance redox en faveur des pro-oxydants.

**16. Standard déviation «écart – type » :** est une mesure de la variabilité, utilisée comme une estimation de la variabilité de la population à partir de laquelle l'échantillon a été prélevé {valide la variabilité quelle que soit la distribution}. SD utilisé pour calculer les valeurs P dans nombreuse circonstances.

**17. Variance :**  $Var = (SD)^2$  : utiliser pour analyser les facteurs qui influencer la distribution on la diffusion des données.

## **D A-13, Traitement statistique**

**I. Le matériau de référence certifié :** Le rôle du matériau de référence certifié dans la validation de la méthode est essentiel. Ils permettent d'estimer la différence entre la valeur mesurée et la valeur réelle, dans les limites de l'incertitude de la valeur certifiée et de la méthode soumise à validation, sur tous dans les domaines où la matrice de l'échantillon a une grande importance, comme la biologie ou l'environnement. En utilisant un CRM comme échantillon de routine dans un lot de matériaux de test, la valeur certifiée peut confirmer ou réfuter la validation du système de mesure. Dans nos travaux, nous utilisons le matériau de référence IAEA-A-13 (Agence internationale de l'énergie atomique, Vienne, Autriche) pour la mesure des oligo-éléments dans le sang animal lyophilisé.

### **I.1. IAEA-A-13**

L'IAEA-A13 est du sang animal lyophilisé, utilisé comme matériau de référence pour la mesure des oligo-éléments dans le sang. Il peut également être utilisé comme matériau de contrôle qualité pour l'évaluation du travail analytique d'un laboratoire, pour la validation des méthodes analytiques et pour la qualité

### **I.2. Origine et préparation du matériel :**

Un lot de 40 kg de sang de bovin séché (a été lyophilisé à Seibersdorf) et ensuite traité dans un broyeur à boulets. La fraction qui a traversé un tamis en nylon de 300  $\mu\text{m}$  a été encore homogénéisée par mélange dans un tambour en plastique rotatif pendant 70 heures. Le matériel a été distribué dans des bouteilles en plastique en unités de 25 g sans autre traitement. Par la suite, les échantillons ont été irradiés à une dose de  $2,5 \times 10^4$  Gy en utilisant une source de  $^{60}\text{Co}$  pour assurer la stabilité à long terme du matériau en inhibant l'action microbienne. Valeurs recommandées indiquées dans le tableau I.1. (Basé sur le poids sec) :

**Tableau I.1.** Valeurs recommandées ( $\mu\text{g} / \text{g}$ ) et intervalle de confiance :

Elément	valeur recommandée $\mu\text{g/g}$	intervalle de confiance 95% $\mu\text{g/g}$
Br	22	[19 – 24]
Ca	286	[226 – 332]
Cu	4.3	[3.7 – 4.8]
Fe	2400	[2200 – 2500]
K	2500	[2100 – 2700]
Rb	2.3	[1.7 – 3.1]
S	6500	[6000 – 7000]
Se	0.24	[0.15 – 0.31]
Zn	13	[12 – 14]

## II. Traitement statistique

### II.1. t-test Student :

Le t-test est un type de test statistique utilisé pour comparer la moyenne des deux groupes. Il est l'un des hypothèses statistiques le plus utilisée pour les études sévère.

Le t-test est de type méthode paramétrique : technique statistique dans ce qu'on définit la distribution de probabilité de variance et faire une inférence au sujet des paramètres de la distribution le t-test divisé on deux type : t-test indépendant : utilisé pour deux sous-groupes a comparé indépendant l'un de l'autre ; et t-test paire : utilisé lorsque les deux sous-groupes a comparé dépend l'un de l'autre.

#### II.1.1. Distribution t :

Pour définir la distribution de prélèvement (échantillonnage) il faut d'abord définir la variance d'échantillons :  $S^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}$

La distribution dépend de 0 degré de liberté.

#### II.1.2. T-test indépendant :

$$T\text{-statistique} : t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{S_{(1+2)} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

A l'hypothèse nulle :  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ ,  $S_{(1+2)} = \frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2}$ ,  $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{(1+2)} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$

A l'hypothèse alternative :  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ ,  $S_{(1+2)} = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}$ ,  $t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$

### II.1.3. Interprétation du degré de signification :

Elle dit quelle est la probabilité qu'une différence au moins aussi grande que observée apparaisse lorsque l'hypothèse nulle est vraie.

Lorsque le degré de signification est petit ( $p < 0.05$ ), nous pouvons rejeter l'hypothèse nulle et conclure que les deux moyenne ne proviennent pas de la même population.

### II.3. Le test ANOVA :

L'analyse de variance c'est une des méthodes statistiques les plus fréquemment utilisée dans la recherche médicale, est une prolongation de test – T pour l'échantillon indépendants. Le besoin de l'ANOVA provient de l'erreur de l'inflation au niveau alpha, qui augmente la probabilité d'erreur de type 1 (faux positif) et est causée par des comparaisons multiples. ANOVA utilise la statistique F. Le but sera toujours le même : vérifier l'hypothèse nulle que les moyennes des groupes proviennent d'une même population.

Cette méthode permet de comparer les moyennes de trois groupes ou plus, créés par une variable catégoriale.

	Somme des carrée	Liberté	Variance
Intergroupe	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2$	$K - 1$	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 / (K - 1)$
Intragroupe	$\sum_{ij=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$N - K$	$\sum_{ij=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2 / (N - K)$

$$F = \frac{\text{Itergroupe}}{\text{Intragroupe}} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 / (K - 1)}{\sum_{ij=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2 / (N - K)}$$

One-Way ANOVA « ANOVA à 1 facteur » : On utilise Benferroui pour l'hypothèse de variances égales : utilise le test t pour comparer les moyennes des groupes deux à deux et ajuster le degré de signification en divisant 0.05

**Interprétation du degré de signification :**

Le seuil de signification est toujours fixé à  $P < 0.05$



## Référence

1. Widschwendter M, et al. Epigenome-based cancer risk prediction: rationale, opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol.*, 2018. 15(5):292-309.
2. Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. 136(5):E359-86.
3. Ministry of Health Population and Hospital Reform, Bearing Creation, Operation and Organization of the Population Cancer Registry, Issue number 22 (2014).
4. Hernandez-Caraballo E. A. et al., Direct analysis of blood serum by total reflection X-ray fluorescence spectrometry and application of an artificial neural network approach for cancer diagnosis. *Spectrochim. Acta Part. B.* 2003 ; 58, 2205–2213.
5. Joshaghani H. et al., comparison of the Serum Levels of Trace Elements in Areas with High or Low Rate of Esophageal Cancer. *Middle East J. Dig. Dis.*, 2017. 9: 81–85.
6. Cihan Y. B., Do trace element levels have prognostic value in non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy?. *J. BUON*, 2014. 19 : 749-756.
7. R. G. Leitao et al., Elemental concentration analysis in prostate tissues using total reflection X-ray fluorescence. *Radiat. Phys. Chem.*, 2014; 95, 62-64.
8. WHO, cancer as a global problem, *Wkiy. Epidem. Rtc - Relevé epidem. hebdomadaire* 59 :17 (1984), 125.
9. Prohaska JR. Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiol Rev.* 1987. 67(3):858-901.
10. Hjelmeland A., Zhang J., Metabolic, autophagic, and mitophagic activities in cancer initiation and progression. *Biomed. J.* 2016; 39, (2016) 98–106.
11. Huang YL, Sheu JY, Lin TH. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin Biochem.*, 1999. 32(2):131-6.
12. Pincemail J. et al. Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 1999. 4(4) : 13.
13. Stevens R. G., Kalkwarf D. R., Iron, radiation, and cancer. *Environ Health Persp.*, 1990. 87, 291–300.

14. Pan Y., Loo G., Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000. 28: 824-830.
15. Picco S.J., et al., Association between copper deficiency and DNA damage in cattle. *Mutagenesis*. 2004. 19: 453-456.
16. Burke J. P., Fenton M. R., Effect of a Zinc-Deficient Diet on Lipid Peroxidation in Liver and Tumor Subcellular Membranes. *P. Soc. Exp. biol. Med.* 1985; 179, 187-197.
17. Prasad A. S., et al., Zinc in Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*, 2009. 61: 879-887.
18. Griess B. et al., Extracellular Superoxide Dismutase and its Role in Cancer. *Free Radic Biol Med.*, 2017. 112: 464–479.
19. Zelko IN, et al., Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Radical Biology and Medicine*, 2002. 33(3): 337-349.
20. Cemek M. et al., Bio-Element Status in Children With Acute Rheumatic Fever: Before Treatment and After Clinical Improvement. *Pediatr. Cardiol*, 2010. 31 : 1002–1007.
21. Barany E., et al., Trace Elements in Blood and Serum of Swedish Adolescents: Relation to Gender, Age, Residential Area, and Socioeconomic Status. *Sci. Total. Environ.*, 2002. 286, 129-141.
22. Selvaraju R. et al., Trace Element Analysis In Hepatitis B Affected Human Blood Serum By Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES). *Romanian. J. Biophys.*, 2009. 19, 35- 42.
23. Ali N. M. et al., Serum levels of copper, zinc, iron and magnesium in Iraqi's patient with chronic hepatitis C. *Karbala J. Med.*, 2011. 4:1146-1150.
24. Mansouri A., L. et al., Hair-zinc levels determination in Algerian psoriatics using Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA). *Appl. Radiat. Isot.* 2013; 72, 177–181.
25. Sinha T., Tumors: Benign and Malignant. *Canc Therapy & Oncol Int J*, 2018. 10(3): CTOIJ.MS.ID.555790
26. Ferlay J., et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet], International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 2013 Available from : <http://globocan.iarc.fr>.

27. Ministry of Health Population and Hospital Reform, Bearing Creation, Operation and Organization of the Population Cancer Registry, Issue number 22, 2014.
28. OMS, Centre international de recherche sur le cancer, Dernières données mondiales sur le cancer, communiqué de presse N° 263, 2018.
29. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100 : 57-70.
30. Cassidy J. et al., *oxford handbook of oncology*. Oxford university press, Fourth edition, 2015. p.20.
31. Viillard J-F., et al., Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/ Radiothérapie*, 2001. 5(2) : 109-29.
32. Hanahan D. Weinberg R. A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 2011. 144 : 646-674.
33. Witsch E, Sela M and Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*. 2010. 25: 85-101.
34. Malumbres M and Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev Cancer* 2009. 9 : 153-166.
35. McClatchey AI, Yap AS. Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. 24(5):685-94.
36. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007. 35(4):495-516.
37. Greenberg RA. Telomeres, crisis and cancer. *Curr Mol Med.* 2005. 5(2) : 213-8.
38. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6):401-10.
39. Van Zijl F. et al., Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res.*, 2011 Jul. 728(1-2) : 23–34.
40. Berenblum I. and Shubik P., A New, Quantitative, Approach to the Study of the Stages of Chemical Carcinogenesis in the Mouse's Skin. *Br J Cancer.*, 1947. 1(4): 383–391.
41. Tubiana M., Généralités sur la cancérogénèse. *C R Biol.*, 2008. 331(2): 114 25.
42. Béliveau R., Gingras D., Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician*, 2007. 53: 1905-11.
43. Abel E. L. DiGiovanni J., *Environmental Carcinogenesis. The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, 2015. 103-128.e2.

44. Tysnes B.B., Bjerkvig R., Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007. 1775 : 283–297.
45. Klaunig J. E., *Mutagenesis, Carcinogenesis. Reference Module in Biomedical Sciences*, 2014. DOI:10.1016/B978-0-12-801238-3.00207-5.
46. Perez-Losada, J. Balmain A., Stem-Cell Hierarchy In Skin Cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 2003. 3: 434–443.
47. Corvol P., Médecine expérimentale : Angiogenèse et cancer. *Journal des Maladies Vasculaires*, 2004. 29(HS1) : 1S12.
48. Yokota J., Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 2000. 21(3): 497–503
49. Klein C.A., Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. *Nat. Rev. Cancer*, 2020. 20: 681–694.
50. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 1975. 36(6): 2251-70.
51. Fidler I. J. et al., The Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Advances in Cancer Research*. 1987. 28: 149-250.
52. Fidler I J., Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Research*, 1978. 38: 2651-2660.
53. Robert J., Biologie de la métastase. *Bulletin du Cancer*, 2013. 100(4): 333-42.
54. Prashanth L. et al., A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 2015. 4(2): 75-85.
55. Kienlen J. Les carences en oligo-éléments au cours de l'alimentation parentérale « Deficiencies in trace elements during parenteral alimentation ». *Ann Anesthesiol Fr.*, 1977. 18(12):1019-34.
56. Frieden E., The chemical elements of life. *Sci Am.*, 1972. 227(1): 52-60.
57. Wada O., What are Trace Elements? Their deficiency and excess states. *JMAJ*, 2004. 47(8): 351–358.
58. Mertz W. 1981, The Essential Trace Elements. *Science*, 213 : 1332-1338.
59. Bertrand G., On the role of trace substances in agriculture. *Eighth Int. Congr. Appl. Chem.* 191228, 30–40.
60. Coursey J. S., et al., *Atomic Weights and Isotopic Compositions (version 4.1)*. 2015, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.

61. LAURIE S. H., Transport and Storage of Metals. *J. Inher. Metab. Dis.*, 1983. 6 (1): 9-14.
62. Chifman J. et al., A Systems Biology Approach to Iron Metabolism. *Adv Exp Med Biol.*, 2014. 844: 201-225.
63. Ganz T., Nemeth E. Heparin et l'homéostasie du fer. *Biochim Biophys Acta.*, 2012.1823 (9): 1434-1443.
64. Reynolds M.E., Ventre K.M. Iron Overdose, éditeur (s): Lynn C. Garfunkel, Jeffrey M. Kaczorowski, Cynthia Christy, conseillère clinique pédiatrique (deuxième édition), Mosby, 2007. 318-319.
65. Abramson M. B. and King C. V., The Rate of Dissolution of Iron in Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 1939. 61(9) : 2290–2295.
66. Bhattacharya PT., et al., Nutritional Aspects of Essential Trace Elements in Oral Health and Disease: An Extensive Review. Hindawi Publishing Corporation Scientifica Volume 2016, 12 pages, DOI: 10.1155/2016/5464373.
67. Frieden E. The chemical elements of life. *Sci Am.* 1972. 227(1):52-60.
68. Fehr J. et al. , Diagnostic et traitement de la carence en fer sans anémie *Rev Med Suisse*, 2009. 5: 2229-34.
69. McLaren GD, et al., Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1983. 19(3):205-66.
70. Abbaspour N. et al., Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.*, 2014. 19(2): 164–174.
71. Paul BT. et al., Mitochondria and Iron: Current Questions. *Expert Rev Hematol*, 2017. 10(1): 65–79.
72. Calhoun MW, Thomas JW, Gennis RB. The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochem Sci.*, 1994. 19(8):325-30.
73. Hirst J. Energy transduction by respiratory complex I--an evaluation of current knowledge. *Biochem Soc Trans.* 2005. 33(Pt 3):525-9.
74. Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem.*, 2003. 72:77-109.
75. Symeonidis A., Marangos M., Iron and Microbial Growth, In : *Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario*, Roy PK. (Ed.), 2012. 16 : 290-319.
76. SALGADO P. et al., Fenton Reaction Driven By Iron Ligands. *J. Chil. Chem. Soc.*, 2013. 58(4) :2096-2101.

77. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Neon". Encyclopedia Britannica, 17 Jan. 2020, <https://www.britannica.com/science/neon-chemical-element>.
78. William T. Account of researches in thermo-electricity. Proc. R. Soc. Lond., 1856. 749–58.
79. Riffard J., Le cuivre et les ruminants : 1ere partie : métabolisme, rôle, épidémiologie des carences. Le point vétérinaire, 1988-1989, 20, n°118.
80. Reinhart FM. Corrosion of Materials in Hydrospace. US Naval Civil Engineering Laboratory, report R504. 1966.
81. Richardson H.W., Copper compounds-Copper alloys -Copper. In: Seidel A (ed) - Kirk- Othmer Encyclopedia of chemical technology, 4ed. Vol. 7. New York : J Wiley Interscience, 2001. 253-254.
82. Ellingsen D. G., Chapter 35 - Copper, Editor(s): Gunnar F. Nordberg, Bruce A. Fowler, Monica Nordberg, Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition), Academic Press, 2015. 765-786.
83. CORNELIS R. et al., Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine. J. Trace Elements Med. Biol. 1996. 10 :103-127.
84. Versieck J, Barbier F, Cornelis R, Hoste J. Sample contamination as a source of error in trace-element analysis of biological samples. Talanta, 1982. 29(11 Pt 2):973-84.
85. Smith J C, Holbrook J. T., Danford D. E., Analysis and evaluation of zinc and copper in human plasma and serum. Journal of the American College of Nutrition, 1985. 4(6): 627-638.
86. Whittaker JW. Oxygen reactions of the copper oxidases. Essays Biochem., 1999. 34:155-72.
87. James F. Collins, Chapter 24 - Copper, Editor(s): Bernadette P. Marriott, Diane F. Birt, Virginia A. Stallings, Allison A. Yates, Present Knowledge in Nutrition (Eleventh Edition), Academic Press, 2020. 409-427.
88. Percival SS. Copper and immunity. Am J Clin Nutr. 1998. 67(5 Suppl):1064S-1068S.
89. Stabel J.R., Spears J.W. Effect of Copper on Immune Function and Disease Resistance. In: Kies C. (eds) Copper Bioavailability and Metabolism. Springer, Boston, MA. 1989.
90. Deur C. J., et al. Trace metals in hematopoiesis. American Journal of Hematology, 1981. 11(3): 309-331.

91. O'Dell BL. Roles of zinc and copper in the nervous system. *Prog Clin Biol Res.* 1993. 380:147-62.
92. Desai V., Kaler S. G., Role of copper in human neurological disorders. *Am J Clin Nutr*, 2008. 88 (3): 855S–858S.
93. Messerschmidt A., 8.14 - Copper Metalloenzymes, Editor(s): Hung-Wen (Ben) Liu, Lew Mander, *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, 2010. 489-545.
94. Linder M. C., Hazegh-Azam M., Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Gun. Nutr.*, 1996. 63: 797S-811S.
95. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Zinc". *Encyclopedia Britannica*, 14 May. 2020, <https://www.britannica.com/science/zinc>.
96. Moynier F. Zinc Isotopes. In: White W.M. (eds) *Encyclopedia of Geochemistry. Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Springer, Cham. (2018) DOI : 10.1007/978-3-319-39312-4\_215.
97. Kirk-Othmer - *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4 ed. New- York, John Wiley and sons, 1998. 25: 789-853.
98. Jakubovski M - Zinc and Cadmium. *Patty's toxicology*. 5 ed. New York ; 2001. 2 : 253 - 325.
99. Keith A. McCall, Chih-chin Huang, Carol A. Fierke, Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes, *The Journal of Nutrition*, Volume 130, Issue 5, 2000. 130(5):1437S-1446S.
100. Lauwerys R.R., Hoet P., *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 2001.p.180.
101. Kadrabová J, Madaric A, Kováčiková Z, Ginter E. Selenium status, plasma zinc, copper, and magnesium in vegetarians. *Biol Trace Elem Res.* 1995. 50(1):13-24.
102. CORNELIS R. et al., Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine. *J. Trace Elements Med. Biol.* 1996. 10 :103-127.
103. Roohani N. et al., Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci.*, 2013. 18(2):144-57.
104. Olechnowicz J. et al. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J Physiol. Sci.*, 2018. 68 : 19–31.
105. Chimienti F. et al., Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors, *Biochem Pharmacol.* 2001. 1;62(1):51-62.

106. Prasad AS., Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *MOL MED*, 2008. 14(5-6) : 353-357.
107. Gower-Winter SD. Levenson CW., Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior. *Biofactors*, 2012. 38(3) : 186–193.
108. Seve M., A. Favlier, Métabolisme du zinc. *Encycl. Med. Chir.* 2002. 10 : 359-D-10.
109. Silva M.P., et al., Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. *Bmc. Research. Notes.*, 2012. 5 : 194.
110. Stepien M., et al., Circulating copper and zinc levels and risk of hepatobiliary cancers in Europeans. *British Journal of Cancer*, 2017. 116 : 688–696.
111. Franklin RB. Et al., The Important Role of the Apoptotic Effects of Zinc in the Development of Cancers. *J Cell Biochem*, 2009. 106(5): 750–757.
112. Afonso V, et al., Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 2007. 74(4):324-9.
113. Szatrowski TP. et al., Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, 1991. 51(3):794-8.
114. Puscas I., et al., Erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with digest cancer: adjuvant diagnosis test. *Cancer Letters.*, 1999. 143(1) : 95-98.
115. Oberley L., Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 2005. 59 (4) : 143-148.
116. Goudable J., Favier A., Radicaux libres oxygénés et antioxydants Oxidative free radicals and antioxidants. *Nutrition Clinique & Métabolisme*, 1997. 11 (2) : 115-120.
117. Migdal M., Serres M., Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine science*, 2011. 27 (4) : 405-412. ;
118. Mikkelsen RB. Wardman P., Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, 2003. 22(37) : 5734-54.
119. BOTHOREL P, Implication du stress oxydant dans la biologie tumorale & Intérêt d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie. *Université De Limoges*, 2011. 45-50.
120. Greenberg G. Sarcoma after intramuscular iron injection. *Br Med J.* 1976. 1(6024):1508-9.]



121. Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis : cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci.*, 2009. 100(1):9-16.
122. Phaniendra A. et al., Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.*, 2015. 30(1) : 11–26.
123. Marmot M. et al. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. World Cancer Research Fund International, 2007. p.31-46.
124. Lee PL. Beutler E., Regulation of Heparin and Iron-Overload Disease. *Annu. Rev. Pathol.*, 2009. 4: 489–515.
125. Kowdley KV. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004. 127(5Suppl1) : S79-86.
126. Nelson RL. Iron and colorectal cancer risk: human studies. *Nutr Rev.* 2001. 59(5):140-8.
127. Nicholas J. et al., Association Between Hemochromatosis (HFE) Gene Mutation Carrier Status and the Risk of Colon Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2003. 95(2) : 154–159.
128. Osborne NJ. Et al., HFE C282Y Homozygotes Are at Increased Risk of Breast and Colorectal Cancer. *HEPATOLOGY*, 2010. 51(4) :1311-18. ; Lv YF. et al., The risk of new-onset cancer associated with HFE C282Y and H63D mutations: evidence from 87,028 participants. *J. Cell. Mol. Med.*, 2016. XX(X) : 1-15.
129. Arredondo M. et al., Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.*, 2005. 26: 313–327.
130. Yoshida Y. et al. Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1993. 1210: 81–88.
131. Reuter S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free. Radical. Biol. Med.*, 2010. 49: 1603–1616.
132. Karimi G, Shahar S, Homayouni N, Rajikan R, Abu Bakar NF, Othman MS. Association between trace element and heavy metal levels in hair and nail with prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012. 13(9):4249-53. ;
133. Theophanides T, Anastassopoulou J. Copper and carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002. 42(1):57-64.
134. Margalith E. J., Schenker JG., Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer*, 1983. 52, 868-872.

135. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.*, 2000. 130(5S Suppl):1447S-54S.
136. Connell P. et al. Zinc attenuates tumor necrosis factor-mediated activation of transcription factors in endothelial cells. *J Am Coll Nutr*, 1997. 16(5):411-7.
137. Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals*, 2001. 14(3-4):315-30.
138. Provinciali M, Donnini A, Argentati K, Di Stasio G, Bartozzi B, Bernardini G. Reactive oxygen species modulate Zn(2+)-induced apoptosis in cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 2002. 32(5):431-45.
139. Costello LC, Franklin RB. Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer. *Prostate*. 1998. 35(4):285-96.
140. Feng P., et al. Zinc induces mitochondria apoptosis in prostate cells. *Mol. Urol.*, 2000. 4: 31– 36.
141. Uzzo RG, Leavis P, Hatch W, Gabai VL, Dulin N, Zvartau N, Kolenko VM. Zinc inhibits nuclear factor-kappa B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents. *Clin Cancer Res*. 2002. 8(11):3579-83.
142. Ho E. Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99(26):16770-5.
143. Houée-Levin C., Sicard-Roselli C., Bergès J.. *Chimie et Biochimie radicalaires*. Collection : Echelles. Belin, pp.160, 2005.
144. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009. 47(4):344-56.
145. Che M. et al., Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today*, 2016. 21(1): 143–149.
146. Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*. 1979. 39(4):1141-9.
147. Yamanaka N, Deamer D. Superoxide dismutase activity in WI-38 cell cultures: effects of age, trypsinization and SV-40 transformation. *Physiol Chem Phys*. 1974. 6(2):95-106.
148. Anthony Seibert J., *X-Ray Imaging Physics for Nuclear Medicine Technologists*. Part 1: Basic Principles of X-Ray Production. *J Nucl Med Technol*, 2004. 32:139 –147.

149. Bertaud CH., source de rayon X cosmique, *L'astronomie*, 1965, 79:7.
150. Frank E. Zink, The AAPM/RSNA Physics Tutorial for Residents, *radioGraphics* 1997; 17: 12 9- 1268.
151. McCollough C. H., X-ray Production, *RadioGraphics* 1997; 17:967-984][  
Anthony Seibert J., X-Ray Imaging Physics for Nuclear Medicine Technologists.  
Part 1: Basic Principles of X-Ray Production. *J Nucl Med Technol*, 2004. 32:139  
–147.
152. Bushberg J.T., et al. *The Essential Physics of Medical Imaging*. Williams &  
Wilkins, Philadelphia, 1994. 45-49.
153. Berkowitz E. *X-Ray Physics*, 2006.
154. Carlsson C. A. and Carlsson G. A., Basic physics of X-ray imaging. REPORT  
LiH-RAD-R-008, Second Edition, 1996. p. 13.
155. Buzug. T. M., *Computed Tomography, From Photon Statistics to Modern  
Cone-Beam CT*, Germany, Springer 2008. P35 doi: 10.1007/978-3-540-39408-  
2.
156. Carlsson C. A. and Carlsson G. A., Basic physics of X-ray imaging. REPORT  
LiH-RAD-R-008, Second Edition, 1996. p. 13.
157. Nelson G., Reilly D., “Gamma-Ray Interactions with Matter”, in *Passive  
Nondestructive Analysis of Nuclear Materials*, Los Alamos National Laboratory,  
NUREG/CR-5550, LAUR-90-732, 1991, pp. 27–42.
158. Shackley M. S., *X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF) in  
Geoarchaeology*. 2011. Springer-Verlag New York, 1st edition. p.22.
159. Camarillo Ravelo D., Détection et caractérisation par rayons X des éléments  
traces dans les fruits et légumes. *Images & systèmes*, INSA de Lyon –CNDRI.  
2007. p47.
160. Agarwal B. K., *X-Ray Spectroscopy: An Introduction*. Springer-Verlag Berlin  
Heidelberg 1979. p.213.
161. Lécuyer R., et al., Fluorescence quantum yield and lifetime of red  
polydiacetylene chains isolated in their crystalline monomer matrix. *Chemical  
Physics Letters*, 1999. 314 : 255–260.
162. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New  
York, 1983. DOI 10.1007/978-0-387-46312-4.
163. Ellis A.T. Energy-Dispersive X-ray Fluorescence Analysis Using X-ray  
Tube Excitation. In: VAN GRIEKEN R., MARKOWICZ A. Eds. *Handbook*

- of X-Ray Spectrometry. USA : Marcel Dekker, Inc., 2002, pp.199-238. ISBN 0824706005.
164. Schramm R., Heckel J., Molt K., ED(P)XRF: screening analysis and quantitative analysis with polarized x-rays. JCPDS-International Centre for Diffraction Data, 1999.14 : 384-392.
  165. Heckel J., Haschke M., Brumme M., Schindler R., Principles and Applications of Energy dispersive X-ray Fluorescence Analysis With Polarized Radiation J. Anal. Atom. Spectrom., 1992. 7 : 281-186.
  166. Benoit D., et al., Microanalyse par sonde electronique: spectrométrie de rayons x. Association nationale de la recherche technique, PARIS, 1978 p.F1.
  167. Hamawy L., Development of an image reconstruction method based on the detected X-ray fluorescence for sample analysis. Chemical and Process Engineering. Université de Grenoble, 2014. English. p.37.
  168. Cesario, R., X-Ray Fluorescence Spectrometry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ,2012. 39 :595-631.
  169. Henrich A., Non-invasive identification of chemical compounds by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, combined with chemometric methods of data evaluation. Fresenius J Anal Chem, 2000. 368 : 130–138.
  170. Jenkins R., Practical x-ray spectrometry. Springer-Verlag New-York INC., Second Edition, 1969, p.171.
  171. Feather C.E., A Simple method for background and matrix Correction of spectral peaks in trace element Determination by x-ray fluorescence spectrometry. X-Ray Spectrometry, 1976. 5 : 41- 48.
  172. Andermmen G., KEMP J. W., Scattered X-rays as internal standards in X-ray emission spectroscopy. ANALYTICAL CHEMISTRY, 1958. 30(8) :1306-1309.
  173. Solé V.A., et al., A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. Spectrochimica Acta Part B, 2007. 62: 63– 68.
  174. Van Spen P., A Computer analysis of x-ray fluorescence spectra. Nuclear instruments and methods, 1977. 142 : 243-250 ,1977.
  175. Sitko, R., Zawisza B., Quantification in X-Ray Fluorescence Spectrometry, X-Ray Spectroscopy, Dr. Shatendra K Sharma (Ed.), ISBN: 978-953-307-967-7, InTech, 2012. P137-162.

176. Bilbrey D. B., Bogart G. R. and Leyden D. E., Comparison of Fundamental Parameters Programs for Quantitative X-Ray Fluorescence Spectrometry. *X-ray Spectrometry*, 1988. 17 : 63-73.
177. Beckhoff B., et al., *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. p.325.
178. Chao T.T., Sanzolone R.F., Decomposition techniques. *Journal of Geochemical Exploration*, 1992. 44 : 65-106.
179. Matusiewicz H., Sample Preparation for Inorganic Trace Element Analysis. *Physical Sciences Reviews*, 2017.p1-39.
180. Multi-Agency Radiological Laboratory Analytical Protocols Manual (MARLAP), Part II, 2004. p13-13.
181. Mohammed E., Optimization of an acid digestion procedure for the determination of Hg, As, Sb, Pb and Cd in fish muscle tissue, *MethodsX*. 2017, 4 : 513–523.
182. Sulcek Z., et al. Decomposition Procedures in Inorganic Analysis, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1977. 6(3): 255-323.
183. Klitenick M.A., Acid-Vapor Decomposition for Determination of Zinc in Brain Tissue by Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 1983, 55 : 921-923.
184. Tolg G., Tschopel P., Systematic errors in trace analysis, Zeev B. A. (Ed) *Determination of Trace Elements*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1994. p.2-38.
185. Labat L., La préparation des matrices biologiques pour l'analyse des métaux. *Ann Toxicol Anal.*, 2010. 22(2) : 81-88.
186. Branes R.M., et al., A fast microwave-assisted, acid-vapor, steam-cleaning procedure for autosampler cups. *Spectrochimica Acta Part B*, 1998. 53 : 769-771.
187. Attar, T., Harek, Y., Medjati, N., Larabi, L., Determination of copper levels in whole blood of healthy subjects by anodic stripping voltammetry. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. 2 : 160-164.
188. Tripathi R.M., et al., Blood lead and its effect on Cd, Cu, Zn, Fe and hemoglobin levels of children. *The Science of the Total Environment.*, 2001. 277 : 161-168.
189. Anantasinkul N., Chaivanit H., *Guidance for Method Validation in Chemical Analysis*. CIPA-2010.

190. Peris-Vicente J., Validation of micellar LC-based methods applied to analyze foodstuffs. *Bioanalysis*, 2013. 5(4) : 481–494.
191. Funk W. et al. *Quality Assurance in Analytical Chemistry : Applications in Environmental, Food and Materials Analysis, Biotechnology, and Medical Engineering*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, Weinheim, Germany, 2007.
192. NELSON G., REILLY D., “Gamma-Ray Interactions with Matter”, in *Passive Nondestructive Analysis of Nuclear Materials*, Los Alamos National Laboratory, NUREG/CR-5550, LAUR-90-732, 1991, pp. 27–42.
193. Shackley M. S., *X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF) in Geoarchaeology*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2008. P.27-28.
194. Munro G., 19 : ICH Q7 Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients (APIs),: Teasdale A. et al.(Eds) *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*. John Wiley & Sons, Inc., 2018, p.595-534.
195. Menezes M. A. B. C., Jacimovic R., Validation of the k0\_IAEA software using SMELS material at CDTN/CNEN, Brazil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2008. 278(3) : 607–611.
196. Huda W., et al., How Do Radiographic Techniques Affect Image Quality and Patient Doses in CT. *Seminars in Ultrasound, CT, and MRI*, 2002. 23 (5) : 411-422.
197. Huda W., Abrahams R. B., Radiographic Techniques, Contrast, and Noise in X-Ray Imaging. *AJR*, 2015. 204 : W126–W131.
198. Costa M. M. B., Effect of additional filtration on radiation doses and image quality in videofluoroscopic studies. *studies. Radiol Bras*. 2009;42(6):379–387.
199. Huda W., Slone R. M., *Review of Radiologic Physics*. Second edition, Lippincott Williams Wilkins, 2003, p.68-83.
200. Krieger N., Who and What Is a “Population”? Historical Debates, Current Controversies, and Implications for Understanding “Population Health” and Rectifying Health Inequities. *The Milbank quarterly*, 2012. 90 : 634–681.
201. De Coursey W.J., *Statistics and Probability for Engineering Applications*. Newnes is an imprint of Elsevier Science, Eds. 2003, p294.

202. Kim T. K., Understanding one-way ANOVA using conceptual figures. *Korean J Anesthesiol*, 2017. 70 : 22-26.
203. Reid H. J. et al., Investigation of Decomposition Products of Microwave Digestion of Food Samples. *Analyst*, 1995. 120 :1543-1548.
204. Hughes C. et al., Assessing the challenges of Fourier transform infrared spectroscopic analysis of blood serum. *J. Biophotonics*, 2014. 7(3–4) : 180–188.
205. Baker M. J. et al., Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. *Chem. Soc. Rev.*, 2016,45, 1803-1818.
206. Rayman MP., The argument for increasing selenium intake. *Proc. Nutr. Soc.*, 2002. 61 : 203-215.
207. Marreiro D.D. et al. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants*, 2017. 6 (24); doi:10.3390/antiox6020024.
208. Baharvand M, et al. Serum levels of ferritin, copper, and zinc in patients with oral cancer. *Biomed J*. 2014. 37(5):331-6.
209. Nemoto K. et al., Modulation of Telomerase Activity by Zinc in Human Prostatic and Renal Cancer Cells. *Biochemical Pharmacology*, 2000. 59 : 401–405.
210. Chen F. et al., Serum copper and zinc levels and the risk of oral cancer: a new insight based on large-scale case-control study. *Oral Dis*. 2019. 25(1):80-86.
211. Shen F. et al., The Association Between Serum Levels of Selenium, Copper, and Magnesium with Thyroid Cancer: a Meta-analysis. *Biol Trace Elem Res*. 2015. 167(2):225-35.
212. Kubala-Kukus A. et al., Analysis of Copper Concentration in Human Serum by Application of Total Reflection X-ray Fluorescence Method. *Biol Trace Elem Res*. 2014. 158(1):22-8.
213. Coates R. J. et al., Cancer Risk in Relation to Serum Copper Levels. *Cancer Research*, 1989. 49 : 4353-4356.
214. Nasulewicz A. et al., Role of copper in tumour angiogenesis—clinical implications. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2004. 18 : 1–8.
215. Harris ED. Copper homeostasis: the role of cellular transporters. *Nutr Rev.*, 2001. 59(9) : 281-5.

216. Wen C.P. et al., High Serum Iron Is Associated with Increased Cancer Risk. *Cancer Res*, 2014. 74(22) : 6589-6597.
217. Knekt P. et al., BODY IRON STORES AND RISK OF CANCER. *Int. J. Cancer*, 1994. 56 : 379-382.
218. Von Holle A. et al., Association between serum iron biomarkers and breast cancer. *American Association for Cancer Research*, 2020, doi:10.1158/1055-9965.EPI-20-0715.
219. Ghayour-Mobarhan M., et al., Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. *Ann. Clin. Biochem.*, 2005. 42 : 364–375.
220. Evans R. E.C., et al. Gender differences in early detection of cancer. *The Journal of Men's Health & Gender*, 2005. 2 : 209–217.
221. Raftogianis RB, et al., Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in humans: association of common SULT1A1 alleles with TS PST phenotype. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 9;239(1):298-304.
222. Zheng L, et al. Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphism and bladder cancer risk: a case-control study. *Cancer Letters*, 2003. 202(1) : 61-69.
223. Bolufer P. et al., The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *haematologica/the hematology journal*, 2007. 92(03) : 308-314.
224. Alegra-Torres J.A., Baccarelli A., Bollati V., Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics*, 2011. 3 : 267–77.
225. Foster J A., Salinas G D., Mansell D, Williamson JC., Casebeer L., How Does Older Age Influence Oncologists' Cancer Management ?. *The Oncologist*, 2010. 15 : 584 –592.
226. Ershler WB., Longo DL., Aging and Cancer : Issues of Basic and Clinical Science. *Natl. Cancer. Inst.*, 1997. 89 : 1489-1497.
227. Shariat SF. Et al., The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int.*, 2010. 105(3): 300–308.
228. Lin Y., Kikuchi S., Obata Y., Yagyu K., Serum Copper/Zinc Superoxide Dismutase (Cu/Zn SOD) and Gastric Cancer Risk: a Case-Control Study. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2002. 93 : 1071–1075.
229. Piyathilake C.J., et al., The pattern of expression of Mn and Cu-Zn superoxide dismutase varies among squamous cell cancers of the lung, larynx, and oral cavity. *Head & Neck.*, 2002. 24 : 859-867.



230. Oberley, T.D. Oberley, L.W., Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol*, 1997. 12: 525-535.
231. Cobanoglu U. et al., Some Mineral, trace Element and Heavy Metal Concentrations in Lung Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2010. 11 :1383-1388.
232. Zhang Y., Li X., Relationship of serum trace elements to lung cancer. *Trace Elem Health Res*. 2000. 17(3):15–17.
233. Issell BF. et al., Serum Zinc Levels in Lung Cancer Patients. *American Cancer Society, Cancer*, 1981. 47:1845- 1848.
234. Atukorala S. et al., Vitamin A, zinc and lung cancer. *Br. J. Cancer*, 1979. 40 :927-931.
235. O'Keeffe L. M et al., Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2018;8:e021611, . doi:10.1136/bmjopen-2018-021611.
236. Nizamani P. et al., Essential trace elemental levels (zinc, iron and copper) in the biological samples of smoker referent and pulmonary tuberculosis patients. *Toxicology Reports*, 2019. 6 : 1230–1239.
237. Skalny A.V., et al. Zinc and respiratory tract infections : Perspectives for COVID-19 (Review). *International Journal Of Molecular Medicine*, 2020. 46: 17-26.
238. Zablocka-Slowinska K., et al., Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relation to redox status in lung cancer patients. *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, 2018. 45 : 78-84.
239. Mahmood A. A., et al., Influence of some Trace Elements and Biochemical Parameters on Breast Cancer. *J. Edu. & Sci.*, 2012. 25 : 34-43.
240. Zowczak M. et al., Analysis of Serum Copper and Zinc Concentrations in Cancer Patients. *Biological Trace Element Research*, 2001. 82 :1-8.
241. L.M. Marco P., et al., Determination of Zn/Cu ratio and oligoelements in serum samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry for cancer diagnosis. *Spectroc. Acta B*, 2001. 56(11): 2195-2201.
242. Emre O. Et al., Plasma concentrations of some trace element and heavy metals in patients with metastatic colon cancer, *J. Cancer. Ther.*, 2013. 4: 1085-1090.

243. Hassan T. et al., Study of Serum Levels of Trace Elements (Selenium, Copper, Zinc, and Iron) in Breast Cancer Patients. *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*, 2017. 2(4): 82-85.
244. Khoshdel Z., et al., Serum Copper and Zinc Levels Among Iranian Colorectal Cancer Patients. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 2015. 170, 294 -299.
245. Wu T. et al., Serum Iron, Copper and Zinc Concentrations and Risk of Cancer Mortality in US Adults. *Ann Epidemiol* 2004. 14:195–201.
246. Pasha Q., et al., Statistical analysis of trace metals in the plasma of cancer patients versus controls. *J. Hazard. Mater.* 2008; 153, 1215-1212.
247. Atakul T. et al., Serum Copper and Zinc Levels in Patients with Endometrial Cancer. *Biological Trace Element Research*, 2019. DOI: 10.1007/s12011-019-01844-x.
248. Oyama T. et al., Efficiency of Serum Copper/Zinc Ratio for Differential Diagnosis of Patients with and Without Lung Cancer. *Biological Trace Element Research*, 1994. 42:115-127.