

UNIVERSITE OF YAOUNDE I

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE- SANTE ET ENVIRONNEMENT

POST-GRADUATE AND TRAINING
SCHOOL OF LIFE SCIENCES-HEALTH AND

ENVIRONMENT



FACULTE OF SCIENCE

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE SCIENCES DE
LA VIE

POST-GRADUATE AND TRAINING UNIT
OF LIFE SCIENCES-HEALTH

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

**Effets des extraits de *Ficus umbellata* Vahl
(Moraceae) sur des modèles de cancers du
sein et de l'ovaire et élucidation des
mécanismes d'action : étude *in vitro* et *in
vivo***

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat / Ph.D** en **Biochimie**

Par

SILIHÉ KAMGA Kevine

Matricule : 12R1627

Master en Biochimie

Sous la co-direction de:

Pr. ZINGUE Stéphane

Maître de Conférences

Pr. RIWOM Sarah

Maître de Conférences

Et la supervision de:

Pr. NJAMEN Dieudonné

Professeur

Année 2021

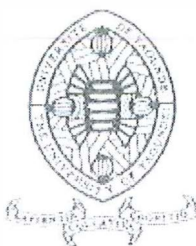


REPUBLIQUE DU CAMEROUN
UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTMENT DE BIOCHIMIE

BP: 812 YAOUNDE



REPUBLIC OF CAMEROON
THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

PO BOX : 812 YAOUNDE

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous, soussignés Pr. **FEKAM BOYOM Fabrice** et Pr. **MOUNDIPA FEWOU Paul** respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie option Pharmacologie, soutenue par Madame **SILIHE KAMGA Kevine** (Matricule 12R1627) le 14 Mai 2021 à 10 heures dans la Salle R101 du Nouveau Bloc Pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : "**Effets des extraits de *Ficus umbellata* Vahl (Moraceae) sur des modèles de cancers du sein et de l'ovaire et élucidation des mécanismes d'action : étude *in vitro* et *in vivo***", attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi, la présente attestation lui est établie pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **25 MAI 2021**


Examineur

Fabrice F. Boyom, S.T.
Professor of Biochemistry



Président du jury

Paul Moundipa Fewou
D3C.D. Etat
Professor
Enzymology Toxicology

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 03 Mars 2020

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste

14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste

9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFUET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
----	-------------------------------	-----------	----------

45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHO Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ ,Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UD</i> s

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
23	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beaugard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA née NDOIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
35	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOUMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFACK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UIYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service Programme & Diplomes</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste

17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUNBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (31)

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>C Info/ Inspecteur MINESUP</i>
---	---------------------	------------	---------------------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste

20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
28	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
29	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
30	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
31	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
---	-------------------------	------------	----------

2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
----	-------------	-----------------	----------

29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste

20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	39 (18)
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	46 (14)
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (1)	10 (02)	12 (02)	03 (0)	35 (5)
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	35(7)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	25 (2)
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	06 (02)	31 (3)
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	40 (5)
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	43(7)
Total	69 (4)	100 (28)	130 (33)	46 (10)	345 (75)
Soit un total de		345 (75) dont :			
-	Professeurs	68 (4)			
-	Maîtres de Conférences	101 (28)			
-	Chargés de Cours	130 (33)			
-	Assistants	46 (10)			
() = Nombre de Femmes		75			

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

EMMANUEL : DIEU avec moi ;

et à

Mes parents KAMGA Paul et KAMGA Thérèse

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail n'a été possible que grâce au soutien indéfectible de nombreuses personnes que j'ai l'honneur de remercier. Je pense notamment :

Au Pr. NJAMEN Dieudonné ; superviseur de mes travaux de thèse. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour ses conseils, ses compétences scientifiques, son encadrement qui ont été fondamentaux dans l'aboutissement de ce travail ;

Au Pr. ZINGUE Stéphane ; co-directeur de ce travail de thèse, pour ses conseils, orientations, directives, motivations, compétences scientifiques, encouragement et surtout pour l'encadrement tout au long de ces travaux de recherche ;

Au Pr. RIWOM ESSAMA ; co-directrice de ces travaux de recherche, pour sa patience, ses encouragements et compétences scientifiques tout long de ce travail de thèse ;

Au Pr. MOUNDIPA Paul ; Chef de Département de Biochimie et à travers lui, tous les enseignants dudit Département de l'Université de Yaoundé I pour leurs enseignements ;

Au Pr. DJIOQUE Séfirin et au Dr. ATEBA Sylvain, membres de l'équipe de recherche du Pr. NJAMEN Dieudonné pour leur soutien moral, leur encadrement et leurs interventions critiques qui ont permis d'améliorer ces travaux de recherche ;

Au Pr. KALEAB Ares ; ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire de Pharmacognosie et de Sciences Pharmaceutiques de l'Université d'Addis Ababa pour leur soutien et leur contribution dans la réalisation de la partie phytochimique de ce travail ;

Au Dr. KÖESTER Frank ; ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire de Gynécologie de l'université de Lübeck pour leur contribution dans la réalisation des tests anticancéreux *in vitro* ;

Aux Drs. Thomas Michel et AUBERON Florence de l'Université de Nice pour leur contribution dans l'élucidation des structures des composés isolés ;

Aux programmes de mobilité AGNES (African-German Network of Excellence in Science) et DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) qui ont financés mes travaux de recherche et mes séjours respectifs dans les laboratoires en Ethiopie et en Allemagne ;

A tous les membres de l'équipe du laboratoire du Pr. Njamen notamment : Dr. AWOUNFACK Charline, Dr. ZEMO Franklin, M. SIMO Valdès, Mme. BAKAM Berlise, Mlle. MOTOUN Florette, M. DJIKEM Rudig, Mlle. NDJENGUE Elisabeth, Mlle. MAPTOUOM Laure, M. NANBO Télesphore, M. QUEMNANG Steve, M. SIPPING Marius, M. DJOUSSI Sosthène, M. RIEPOUO Oumarou, pour leur assistance multiforme dans la réalisation des différentes expérimentations de ces travaux de recherche ;

A tous mes promotionnaires et particulièrement : M. DJOVA Steve, M. TCHAMI Dimitri, M. KEGNE Landry, Mlle. DIBACTO Ruth, pour leur collaboration et assistance multiforme ;

A mes frères et sœurs : KEOU Rodrigue, KENMOE Bertin, MEKEMBOU Stéphanie, WOUdje Christelle, NJIKE Arnaud, et MOMO Giovannie, pour leur soutien moral, spirituel et financier ;

A mon beau-frère Fopessi Camille pour avoir mis à ma disposition un cadre favorable pour mon bien être, et mon épanouissement social ;

A ma famille spirituelle notamment : maman ALLADHOU Annette, maman EYONG Julienne, maman EYONG Michelle, Mme BIKOKO Mireille, Mlle. NOAH Cyntiche, M. Djemna Elvis, Mlle. BELA Elodie et M. NYANGONO Emil, pour leurs prières et leur soutien moral ;

A M. TAKALA Jean Pierre pour son aide apportée lors des techniques histologiques ;

A toute ma famille pour l'affection et l'amour dont elle me porte ;

A tous ceux dont les noms n'ont pas été mentionnés et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, qu'ils reçoivent ici ma profonde reconnaissance.

SOMMAIRE

DEDICACE	xiv
REMERCIEMENTS	xv
SOMMAIRE	xvii
LISTE DES FIGURES	xxiii
LISTE DES TABLEAUX	xxvi
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	xxvii
RESUME	xxxix
ABSTRACT	xxxiii
INTRODUCTION	1
REVUE DE LA LITTERATURE	5
I.1. Le cancer	6
I.1.1. Définition	6
I.1.2. Epidémiologie du cancer	6
I.1.3. Cancérogenèse.....	6
I.1.3.1. Etapes de la cancérogenèse	9
I.1.3.2. Exemple du rôle du Malondialdéhyde (MDA) dans le processus de cancérogenèse....	10
I.1.4. Voies de signalisation impliquées dans le développement des cancers	10
I.1.4.1. La voie Ras/MAPK	10
I.1.4.2. La voie PI3K/Akt	11
I.1.4.3. La voie <i>STAT</i>	11
I.1.5. Typologie des cancers	11
I.2. Cancers œstrogène-dépendants	12
I.2.1. Les œstrogènes	12
I.2.2. Biosynthèse des œstrogènes	12
I.2.3. Récepteurs aux œstrogènes	14
I.2.4. Activité agoniste et antagoniste des œstrogènes	15
I.2.5. Implication des œstrogènes dans la cancérogenèse.....	16
I.2.5.1. Stimulation de la croissance cellulaire par l'action des œstrogènes	16
I.2.5.2. Métabolisme oxydatif génotoxique des œstrogènes.....	18
I.2.5.3. Action génotoxique des métabolites d'œstrogènes	19
I.3. Cancer du sein	20
I.3.1. Le sein	20
I.3.2. Epidémiologie du cancer du sein	21
I.3.3. Typologie des cancers du sein.....	21

I.3.3.1. Cancer " <i>in situ</i> "	22
I.3.3.2. Carcinomes infiltrants	22
I.3.4. Sous-types de cancer du sein.....	22
I.3.5. Symptômes du cancer du sein	23
I.3.6. Techniques médicales permettant le diagnostic du cancer du sein	23
I.4. Cancer de l’ovaire.....	24
I.4.1. L’ovaire	24
I.4.2. Epidémiologie du cancer de l’ovaire.....	25
I.4.3. Types de cancer de l’ovaire.....	25
I.4.3.1. Les tumeurs stromales.....	25
I.4.3.2. Les tumeurs germinales.....	25
I.4.3.3. Les tumeurs épithéliales	25
I.4.4. Sous types du cancer de l’ovaire	26
I.4.5. Symptômes du cancer de l’ovaire	26
I.4.6. Techniques médicales permettant le diagnostic du cancer de l’ovaire	27
I.5. Marqueurs tumoraux du cancer du sein et de l’ovaire	27
I.6. Etiologie des cancers.....	28
I.6.1. L’âge.....	28
I.6.2. L’hérédité	28
I.6.3. Imprégnation hormonale endogène et exogène.....	28
I.6.4. Obésité et facteurs environnementaux	29
I.7. Traitement des cancers.....	29
I.7.1. La chirurgie	29
I.7.2. La radiothérapie.....	29
I.7.3. La chimiothérapie.....	30
I.7.4. L’hormonothérapie.....	30
I.7.4.1. Les antiœstrogènes	31
I.7.4.2. Les inhibiteurs de l’aromatase.....	31
I.7.4.3. Les analogues de la LH-RH	31
I.7.5. Thérapies ciblées	31
I.7.6. Cas du Malondialdéhyde comme paramètre de suivi de l’efficacité thérapeutique.....	32
I.8. Phytothérapie anticancéreuse.....	33
I.8.1. Historique	33
I.8.2. Médicaments anticancéreux issus des plantes médicinales.....	33
I.8.3 Chimio-prévention des cancers	33
I.8.4. <i>Ficus umbellata</i> Vahl.....	36

I.8.4.1. Taxonomie de <i>Ficus umbellata</i>	36
I.8.4.2. Caractéristiques botaniques	36
I.8.4.3. Utilisation traditionnelle	36
I.8.4.4. Travaux antérieurs	37
I.9. Généralités sur les méthodes d'évaluation de l'activité antitumorale des extraits de plantes.....	39
I.9.1. Méthodes <i>in vitro</i>	39
I.9.1.2. Principales méthodes utilisées.....	40
I.9.1.2.1. Méthodes colorimétriques	40
I.9.1.2.2. Les méthodes fluororimétriques.....	40
I.9.2. Méthodes <i>in vivo</i> : Modèles d'induction des tumeurs	41
I.9.2.1. Modèle d'induction par le DMBA (7, 12-dimethylbenz(a)anthracène).....	42
I.9.2.2. Modèle d'induction par le NMU (N-méthyl-N-nitrosourea)	42
I.9.2.3. Modèle d'induction par la PHIP (2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine)	42
I.10. Etat de l'art sur le cancer.....	43
MATERIEL ET METHODES.....	44
II. 1. Matériel	45
II.1.1. Matériel biologique	45
II.1.1.1. Lignées cellulaires	45
II.1.1.2. Matériel animal	45
II.1.1.3. Matériel végétal	45
II.1.2. Milieux de culture	45
II.1.3. Substances chimiques et réactifs.....	46
II.1.4. Kits et équipements.....	46
II.2- Méthodes.....	47
II.2.1- Organigramme méthodologique	47
II.2.2. Préparation des extraits de <i>Ficus umbellata</i>	49
II.2.3. Dosage quantitatif de quelques classes de métabolites secondaires.....	50
II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin Ciocalteu	50
II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	50
II.2.3.3. Dosage des flavonols	51
II.2.3.4. Dosage des alcaloïdes	51
II.2.4. Evaluation des effets cytotoxiques	51
II.2.4.1. Culture cellulaire.....	52
II.2.4.2. Comptage des cellules.....	52

II.2.4.3. Méthode de réduction de la resazurine ("AlamarBlue").....	52
II.2.4.4. Méthode de réduction du sel de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium].....	53
II.2.5. Evaluation du potentiel chimiopréventif des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur un modèle de cancer œstrogéno-dépendant	54
II.2.5.1. Protocole expérimental	54
II.2.5.2. Préparation des solutions	56
II.2.5.3. Préparation du sérum et des homogénats d'organes.....	56
II.2.5.4. Détermination des paramètres tumoraux	56
II.2.5.5. Dosage de quelques marqueurs du système antioxydant	57
II.2.5.5.1. Dosage du malonedialdéhyde	57
II.2.5.5.2. Dosage du glutathion réduit	58
II.2.5.6. Dosage des paramètres biochimiques.....	58
II.2.5.6.1. Dosage des transaminases ALAT (Alanine aminotransférase) et ASAT (Aspartate aminotransférase).....	58
II.2.5.6.2. Dosage de la créatinine	59
II.2.5.6.3. Dosage des marqueurs du profil lipidique	59
II.2.5.6.4. Dosage des protéines totales	60
II.2.5.7. Analyse hématologique	61
II.2.5.8. Techniques d'histologie	61
II.2.5.8.1. Fixation et « trimming »	61
II.2.5.8.2. Déshydratation ou circulation	61
II.2.5.8.3. Inclusion et coupe	62
II.2.5.8.4. Coloration	62
II.2.5.8.5. Montage	62
II.2.5.8.6. Analyse microscopique des organes	63
II.2.6. Evaluation du mécanisme anticancéreux de l'extrait de <i>Ficus umbellata</i>	63
II.2.6.1. Détermination de l'effet de l'extrait sur le cycle cellulaire par cytométrie de flux	63
II.2.6.2. Détermination de l'effet de l'extrait sur le type de mort cellulaire.....	64
II.2.6.2.1. Identification qualitative de la mort cellulaire	64
II.2.6.2.2. Identification quantitative de la mort cellulaire par cytométrie de flux.....	65
II.2.6.3. Détermination de l'effet de <i>F. umbellata</i> sur la migration cellulaire	66
II.2.6.4. Détermination de l'effet de <i>F. umbellata</i> sur l'invasion cellulaire	67
II.2.7. Identification des constituants actifs et élucidation de leurs mécanismes d'action ...	68
II.2.7.1. Fractionnement bio-guidé et identification des constituants actifs.....	68
II.2.7.1.2. Chromatographie sur colonne de la fraction à l'acétate d'éthyle	68
II.2.7.1.3. Chromatographie sur couche mince.....	69

II.2.7.1.4. Purification des sous-fractions	69
II.2.7.1.5. Elucidation structurale des composés purs isolés	70
II.2.7.2. Elucidation des mécanismes d'action moléculaire du composé le plus actif	70
II.2.7.2.1. PCR quantitative à temps réel	70
II.2.7.2.1.1. Extraction de l'ARN	71
II.2.7.2.1.2. Quantification de l'ARN.....	71
II.2.7.2.1.3. Transcription inverse	71
II.2.7.2.4. Reaction de polymérisation en chaine quantitative (qPCR)	72
II.2.7.3. Elucidation du mécanisme d'action sur le plan fonctionnel du composé le plus actif	73
II.2.7.3.1. Western Blot	73
II.2.7.3.1.1. Isolement de protéines	73
II.2.7.3.1.2. Dosage du taux de protéines	74
II.2.7.3.1.3. Electrophorèse sur gel de SDS-Polyacrylamide (SDS-PAGE)	74
II.2.8. Analyse statistique.....	76
RESULTATS ET DISCUSSION	77
III.1. RESULTATS	78
III.1.1. Rendements d'extraction des extraits bruts.....	78
III.1.2. Dosage quantitatif de quelques classes de métabolites secondaires.....	78
III.1.3. Potentiel cytotoxique des extraits de <i>Ficus umbellata</i>	78
III.1.4. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur un modèle de cancer œstrogène-dépendant	80
III.1.4.1. Effets protecteurs des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur le cancer du sein et de l'ovaire.....	80
III.1.4.1.1. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur l'évolution pondérale des animaux.....	80
III.1.4.1.2. Effets protecteurs des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur l'incidence des décès	80
III.1.4.1.3 Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur les paramètres tumoraux.....	81
III.1.4.1.4 Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur la morphologie des tumeurs	82
III.1.4.1.5. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur la microarchitecture des glandes mammaires et des ovaires.....	84
III.1.4.1.6. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur quelques paramètres du stress oxydatif	86
III.1.4.1.7. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur quelques paramètres toxicologiques.....	88
III.1.4.1.7.1. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur la lipidémie, les transaminases et la créatinine	88
III.1.4.1.7.2. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur quelques paramètres hématologiques	89
III.1.4.1.7.3. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur le poids relatif des organes après 20 semaines de traitement.....	90

III.1.4.1.7.4. Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur les organes de métastase et de toxicité	91
III.1.5. Mécanisme d'action anticancéreux de l'extrait au méthanol de <i>Ficus umbellata</i>	93
III.1.5.1. Effets de l'extrait de <i>Ficus umbellata</i> sur le cycle cellulaire	93
III.1.5.2. Effets de l'extrait au méthanol de <i>Ficus umbellata</i> sur le type de mort cellulaire	96
III.1.5.3. Effets de l'extrait de <i>Ficus umbellata</i> sur la migration cellulaire	99
III .1.5.4. Effets de l'extrait de <i>Ficus umbellata</i> sur l'invasion cellulaire.....	100
III.1.6. Identification des constituants actifs et élucidation de leur mécanisme d'action ...	101
III .1.6.1. Potentiel cytotoxique des fractions.....	101
III.1.6.1.2. Sous-fractions obtenues après chromatographie sous colonne.....	103
III.1.6.1.3. Effet cytotoxique des sous-fractions et composés.....	103
III.1.6.1.4. Identification des composés.....	105
III.1.6.1.5. Potentiel cytotoxique des composés purs	105
III.1.6.2. Elucidation du mécanisme d'action du composé le plus actif	106
III.1.6.2.1. Expression des gènes apoptotiques.....	107
III.1.6.2.2. Expression des gènes d'un facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse ...	107
III.1.6.2.3. Expression des protéines apoptotiques	108
III.1.6.2.4. Expression des protéines impliquées dans les voies de signalisation.....	109
III.2. DISCUSSION.....	111
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
ANNEXE	A

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma récapitulatif des différents événements conduisant à la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse.	8
Figure 2: Etapes de la cancérogénèse.....	9
Figure 3: Structure des œstrogènes	12
Figure 4: Biosynthèse des œstrogènes	14
Figure 5: Structure tridimensionnelle du domaine de liaison du ligand lié à un agoniste (œstradiol) et à un antagoniste (tamoxifène et raloxifène).....	16
Figure 6: Différentes voies de signalisation cellulaire du récepteur ER et de l'œstradiol.	17
Figure 7: Voies métaboliques de l'œstradiol.	18
Figure 8. Modèle impliquant les œstrogènes dans la tumorigénèse.....	20
Figure 9: Principales composantes du lobule glandulaire du sein humain (A), de la coupe de l'acinus (B) et des cellules des alvéoles mammaires (C)	21
Figure 10: Cancer du sein canalaire infiltrant et "in situ".	22
Figure 11 : Structure histologique de l'ovaire.....	25
Figure 12: Représentation schématique de quelques molécules chimiopréventives d'origine naturelle et de leur source.....	35
Figure 13: Photos de <i>Ficus umbellata</i>	36
Figure 14: Organigramme des différentes activités de recherche réalisées.	48
Figure 15: Protocole d'extraction des écorces de <i>F. umbellata</i> à l'eau et au méthanol	49
Figure 16: Protocole expérimental d'évaluation des effets préventifs de <i>Ficus umbellata</i> sur un modèle de cancer œstrogène –dépendant.....	55
Figure 17 : Illustration des phases du cycle cellulaire lors d'une cytométrie de flux	63
Figure 18 : Création d'une plaie sur une monocouche de cellules confluentes.	66
Figure 19: Partitionnement de l'extrait au méthanol de <i>Ficus umbellata</i>	68
Figure 20: Récapitulatif du procédé d'isolement et de purification des composés de la F-AcOEt de <i>Ficus umbellata</i>	70
Figure 21 : Représentation du système de transfert lors du Western Blot	75
Figure 22: Courbes doses-réponses des extraits de <i>F. umbellata</i>	79
Figure 23: Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur l'évolution pondérale des rates après 20 semaines de traitement.	80
Figure 24: Courbe de survie de Kaplan Meir après 20 semaines de traitement.....	81
Figure 25: Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur la morphologie des tumeurs.....	83

Figure 26: Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur les microphotographies (H&E 100X) des glandes mammaires après 150 jours de traitement.....	85
Figure 27: Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur les microphotographies (H&E 100X) des ovaires après 150 jours de traitement.....	86
Figure 28 : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur les microphotographies (H&E 400X) du foie après 150 jours de traitement.....	92
Figure 29 : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur les microphotographies (H&E 100X) du cerveau après 150 jours de traitement.....	93
Figure 30 : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur le cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 après 12h, 24h et 48h de traitement.....	95
Figure 31 : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur le cycle cellulaire des cellules PA-1 après 12 h, 24 h et 48 h de traitement.....	95
Figure 32: Effets des extraits de <i>F. umbellata</i> sur le type de mort cellulaire induite chez les cellules MDA-MB-231.....	97
Figure 33: Effets des extraits de <i>F. umbellata</i> sur le type de mort des cellules cancéreuses PA-1.....	99
Figure 34: Effets de l'extrait au méthanol de <i>F. umbellata</i> sur la migration cellulaire.....	100
Figure 35: Effets de l'extrait au méthanol de <i>F. umbellata</i> sur l'invasion cellulaire.....	101
Figure 36 : Courbes doses-réponses des fractions de <i>F. umbellata</i> sur les cellules MDA-MB-231(A) et PA-1(B).....	102
Figure 37. Courbes doses-réponses des sous-fractions de <i>F. umbellata</i> sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1.....	104
Figure 38 : Structures des composés isolés.....	105
Figure 39: Courbes doses-réponses des composés purs isolés de la fraction à l'acétate d'éthyle de <i>F. umbellata</i> sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1.....	106
Figure 40: Représentation graphique de l'expression de l'ARNm de Bcl-2 sur les cellules MDA-MB-231(A) et sur les cellules PA-1 (B). Représentation graphique de l'expression de l'ARNm de Bax sur les cellules MDA-MB-231 (C) et sur les cellules PA-1 (D).....	107
Figure 41: Expression de VEGF sur les cellules MDA-MB-231(A) et sur les cellules PA-1 (B).....	108
Figure 42: Expression du rapport PARP clivé /PARP chez les cellules MDA-MB-231(A) et chez les cellules PA-1(B) et images illustratives du Western Blot après hybridation des anticorps primaires chez les cellules MDA-MB-231 (C) et PA-1 (D) après traitement avec C1.....	109

Figure 43: Expression du rapport pERK/ERK chez les cellules MDA-MB-231(A) et chez les cellules PA-1(B). Images illustratives du Western Blot après hybridation des anticorps primaires chez les cellules MDA-MB-231 (C) et PA-1 (D) après traitement avec C1..... 110

Figure 44: Expression du rapport pAkt/Akt chez les cellules MDA-MB-231(A) et les cellules PA-1(B). Images illustratives des Western Blot après hybridation des anticorps primaires sur les cellules MDA-MB-231 (C) et PA-1 (D) après traitement avec C1..... 111

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Récapitulatif de quelques composés isolés du genre <i>Ficus</i>	38
Tableau II : Liste des amorces utilisées pour la RT qPCR.	72
Tableau III : Composition du milieu réactionnel pour la RT qPCR.	72
Tableau IV : Différentes étapes de la RT PCR.....	73
Tableau V : Liste des anticorps utilisés pour le Western Blot.....	75
Tableau VI : Rendements d'extraction des extraits de <i>Ficus umbellata</i>	78
Tableau VII : Quantification de quelques classes de métabolites secondaires.....	78
Tableau VIII : Effets cytotoxiques des extraits de <i>Ficus umbellata</i>	79
Tableau IX : Indices de sélectivité des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur les cellules cancéreuses.....	79
Tableau X : Activité chimiopréventive des extraits de <i>Ficus umbellata</i> après 150 jours de traitement sur le cancer de l'ovaire.....	82
Tableau XI : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur quelques paramètres du stress oxydatif dans l'homogénat des ovaires après 150 jours de traitement	87
Tableau XII : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur quelques paramètres du stress oxydatif dans l'homogénat des glandes mammaires après 150 jours de traitement	87
Tableau XIII : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur les transaminases, la lipidémie et le taux de créatinine après 20 semaines de traitement.....	82
Tableau XIV : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur quelques paramètres hématologiques après 20 semaines de traitement.....	90
Tableau XV : Effets des extraits de <i>Ficus umbellata</i> sur le poids relatif des organes après 20 semaines de traitement.....	91
Tableau XVI : Effet cytotoxique des fractions de <i>F. umbellata</i>	102
Tableau XVII : Indice de sélectivité de la fraction AcOEt.....	103
Tableau XVIII : Sous fractions obtenues après chromatographie sous colonne	103
Tableau XIX : Effet cytotoxique des sous-fractions sur les lignées cellulaires.....	104
Tableau XX : Indice de sélectivité des sous-fractions.....	105
Tableau XXI : Effets cytotoxiques des composés isolés	106
Tableau XXII : Indice de sélectivité des composés isolés.....	106

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

AcM :	Anticorps Monoclonaux
AcOEt :	Acétate d'éthyle
ACTH :	Corticotrophine
Akt :	Protein kinase B
AMPC :	Adenosine MonoPhosphate cyclique
ANOVA:	"ANalysis Of Variance"
APG :	"Angiosperms Phylogeny Group"
AO	Acridine Orange
ATCC:	" American Type Culture Collection"
ATP:	Adénosine Triphosphate
BRCA:	"BReast Cancer Antigen"
BRIP:	"BRCA1 Interacting Protein"
BSA :	"Bovine Serum Albumine"
CA125 :	"Cancer Antigen 125"
CC ₅₀	Concentration Cytotoxique 50
CCIS :	Carcinome Canalaire <i>in situ</i>
CCM :	Chromatographie sous Couche Mince
CIRC :	Comité international de recherche sur le cancer
CYP 450 :	Cytochrome P450
DCM :	Dichlorométhane
DMBA	7, 12-DimethylBenz(a)Anthracène
DMEM :	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DTNB :	Acide 5,5'-Dithio-bis-(2-NitroBenzoïque)
EB:	"Ethidium Bromide"
EDTA :	"EthyleneDiamineTetraacetic Acid"
EGFR	"Epidermal Growth Factor Receptor"
ER :	"Estrogen Receptor"
ERE :	"Estrogen Response Element"

ERK	"Extracellular Regulated Kinase"
FSH	"Follicle Stimulating Hormone"
GMPc :	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GnRH	"Gonadotropin Releasing Hormone"
Grb2 :	"Growth factor Receptor-bound protein 2"
GSH:	Glutathion réduit
HAP :	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HER2 :	Récepteur humain du facteur de croissance épidermique de type 2
hMLH1 :	"MutL homolog 1"
hMSH2	"MutS homolog 2"
HNC :	Herbier National du Cameroun
MDA :	Malondialdéhyde
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IS :	Indice de sélectivité
OSE :	Surface épithéliale de l'ovaire
pAkt	"Phosphorylated protein kinase B"
pERK :	"Phosphorylated extracellular regulated kinase"
PI3K :	"Phosphatidylinositol 3-kinase"
PIP2 :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3 :	Phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate
PR :	Progestérone
TNBC :	"Triple Negative Breast Cancer"
i.p :	Intra péritonéale
IP :	Iodure de Propidium
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
LDL :	"Low density lipoprotein"
LH :	"Lutenizing Hormone"
MAPKs :	"Mitogen activated protein kinases"
MC :	3-methylcholanthrène
MDA :	Malondialdéhyde

MSRO :	Modulateur spécifique des récepteurs aux œstrogènes
NF-kB :	"Nuclear Factor Kappa B"
NMU :	N-methyl-n-nitrosourea
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PARP :	Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PHIP :	2-amino- 1-methyl-6 phenylimidazo [4,5-b] pyridine
PVDF :	"Polyvinylidene difluoride"
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI :	"Roswell Park Memorial Institute"
RT qPCR	"Real time quantitative Polymerase chain reaction"
SERM :	"Selective Estrogen Receptor Modulator"
SERD :	"Selective Estrogen Receptor Degradation"
SH2 :	"Src Homology 2 domain"
SOS	"Son of Sevenless"
STAT :	"Signal Transducer and Activator of Transcription"
TRE :	"TPA (12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate) Response Element"
VEGF :	"Vascular Epithelial Growth Factor"

RESUME

RESUME

Ficus umbellata Vahl (Moraceae) est une plante utilisée en pharmacopée Camerounaise dans le traitement de quelques troubles physiologiques liés à la ménopause. Les travaux antérieurs ont montré que les extraits aqueux et au méthanol des écorces de *Ficus umbellata* possèdent des effets antiœstrogéniques/œstrogéniques *in vitro* et *in vivo*. Le présent travail avait donc pour but d'évaluer les effets de *Ficus umbellata* sur quelques modèles de cancers du sein et de l'ovaire. Pour cela, le potentiel cytotoxique des extraits de *Ficus umbellata* ainsi que leur potentiel chimiopréventif sur un modèle de cancers œstrogène-dépendants ont été évalués. Par la suite, la quantification de quelques métabolites secondaires présents dans les extraits aqueux et au méthanol a été menée. La deuxième partie de ce travail a consisté à élucider les mécanismes d'action par lesquels l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* passerait pour induire son activité anticancéreuse et dans la troisième partie, les constituants bioactifs de l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* ont été identifiés et leur mécanisme d'action a été élucidé. Comme résultats, l'extrait au méthanol a montré une grande teneur en phénols totaux, flavonoïdes en comparaison à l'extrait aqueux. L'étude *in vitro* réalisée a montré que l'extrait au méthanol a induit une cytotoxicité avec des CC₅₀ comprises entre 100 et 250 µg/mL en comparaison à l'extrait aqueux qui n'a point induit une cytotoxicité jusqu'à 300 µg/mL sur la majorité des cellules utilisées. L'étude *in vivo* a montré que les extraits aqueux (200 mg/kg) et au méthanol (50 mg/kg) de *F. umbellata* ont réduit l'incidence des tumeurs ovariennes (10 %), la charge tumorale totale (58 % et 46 %) respectivement, le poids moyen de la charge (57,8% et 45,6%) respectivement ; réduit le taux de MDA et augmenté le taux de glutathion réduit chez tous les groupes testés. L'élucidation du mécanisme d'action de l'extrait au méthanol a montré que ce dernier n'induit aucun effet sur le cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 et PA-1 après 12 h, 24 h et 48 h ; induit significativement ($p < 0,001$) l'apoptose sur lesdites cellules. L'extrait au méthanol a significativement inhibé la migration ($p < 0,001$) et l'invasion ($p < 0,01$) cellulaire sur les cellules MDA-MB-231 à 180 µg/mL. A partir du fractionnement bio-guidé, trois composés ont été isolés dont un triterpène, une coumarine et un acide. Le triterpène a montré une meilleure activité cytotoxique sur toutes les cellules testées avec des CC₅₀ de 8,8 et 13,18 µg/mL respectivement sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1. L'élucidation du mécanisme d'action du triterpène a montré que ce dernier induit l'apoptose, inhibe la prolifération, l'invasion, la migration et l'angiogénèse des cellules cancéreuses mammaires et ovariennes. L'ensemble de ces résultats suggère que *Ficus umbellata* possède une activité cytotoxique et le triterpène isolé serait le principe actif responsable, au moins en partie, des effets antitumoraux et cytotoxiques observés avec cet extrait.

Mots clés : *Ficus umbellata*, cancer du sein, cancer de l'ovaire, cytotoxicité, fractionnement bio-guidé, triterpène.

ABSTRACT

ABSTRACT

Ficus umbellata Vahl (Moraceae) is a plant used in Cameroonian pharmacopoeia in the treatment of some physiological disorders related to menopause. Previous works carried out have shown that the aqueous and methanol extracts of *Ficus umbellata* barks have antiestrogenic/estrogenic effects *in vitro* and *in vivo*. The aim of the present work was therefore to evaluate the effects of *Ficus umbellata* on some breast and ovarian cancer models. For this purpose, the cytotoxic potential of *Ficus umbellata* extracts as well as their chemopreventive potential on an estrogen-dependent cancer model were evaluated. Subsequently, the quantification of some secondary metabolites present in the aqueous and methanol extracts was carried out. The second part consisted in elucidating the mechanisms of action through which the methanol extract of *Ficus umbellata* pass to induce its anticancer activity and in the third part, the bioactive constituents of the methanol extract of *Ficus umbellata* were identified and their mechanism of action was elucidated. As results, the methanol extract showed a high content of total phenols, flavonoids in comparison with the aqueous extract. The *in vitro* study showed that the methanol extract induced cytotoxicity with CC₅₀ comprise between 100 and 250 µg/mL compared to the aqueous extract which did not induce cytotoxicity up to 300 µg/mL on most of the tested cells. The *in vivo* study showed that aqueous (200 mg/kg) and methanol (50 mg/kg) extracts of *F. umbellata* reduced ovarian tumor incidence (10%), total tumor burden (58% and 46%) respectively, mean burden weight (57.8% and 45.6%) respectively; reduced MDA level and increased glutathione level in all tested groups. Elucidation of the mechanism of action of the methanol extract showed that it did not induce any effect on the cell cycle of MDA-MB-231 and PA-1 cells after 12 h, 24 h and 48 h; significantly ($p < 0.001$) induced apoptosis on said cells. Methanol extract significantly inhibited cell migration ($p < 0.001$) and invasion ($p < 0.01$) on MDA-MB-231 cells at 180 µg/mL. From the bio-guided fractionation, three compounds were isolated including a triterpene, a coumarin and an acid. The triterpene showed better cytotoxic potential on all cells tested with CC₅₀ of 8.8 and 13.18 µg/mL on MDA-MB-231 and PA-1 cells respectively. Elucidation of the mechanism of action of triterpene showed that it induces apoptosis, inhibits proliferation, invasion, migration and angiogenesis of breast and ovarian cancer cells. All these results suggest that *Ficus umbellata* has a cytotoxic potential and the isolated triterpene is the active constituent responsible, at least in part, for the antitumor and cytotoxic effects observed with this extract.

Key words: *Ficus umbellata*, breast cancer, ovarian cancer, cytotoxicity, bio-guided fractionation, triterpene.

INTRODUCTION

Les cancers définis comme un ensemble hétérogène de maladies invasives et caractérisés par une prolifération incontrôlée de cellules anormales, représentent un problème de santé publique dans le monde entier (Le *et al.*, 2018). Ils constituent la deuxième cause de mortalité dans le monde, responsable de plus de 8,2 millions de décès sur 14 millions de cas recensés (Siegel *et al.*, 2018). En 2015, les cas de cancer dans leur globalité étaient estimés à 15,2 millions avec 8,9 millions de décès (Tessmer et Anderson, 2016) et en 2018, les personnes atteintes étaient estimées à 18,1 millions avec 9,6 millions de décès (CIRC, 2018). Il est estimé que d'ici 2020, le nombre de nouveaux cas de cancer dans le monde entier atteindra 15 millions chaque année avec 70 % des cas retrouvés dans les pays en développement (Vorobiof et Abratt, 2007) si rien n'est fait.

Parmi les cancers, l'on distingue les cancers hormono-dépendants qui se définissent comme étant des cancers sensibles aux hormones sexuelles et dont l'incidence augmente avec l'imprégnation hormonale. Dans cette catégorie se trouvent le cancer du sein, de l'ovaire, de l'endomètre et de la prostate. Le cancer du sein et de l'ovaire constituent les principales causes de morbidité et de mortalité chez les femmes des pays de développement où ils représentent 19 % chez celles-ci (Sankaranarayanan and Ferlay, 2006). De nos jours, 75 % des cancers du sein et de l'ovaire nouvellement diagnostiqués sont œstrogéno-dépendants (Elgene *et al.*, 2016) et selon une récente étude de l'OMS, l'incidence des cancers œstrogéno-dépendants augmentera à l'avenir et 70 % de nouveaux cas seront diagnostiqués dans les pays en développement (Cancer Report Worldwide, 2014). En effet, les œstrogènes via la fixation à leurs récepteurs, stimulent la prolifération des cellules via la modulation de l'expression et de l'activité de régulateurs clés du cycle cellulaire tels que les kinases cycline-dépendantes, cycline D1, c-Myc et augmenteraient l'apparition de mutations somatiques lors de la réplication de l'ADN (Casimiro *et al.* 2013 ; Caizzi *et al.*, 2014). Lorsque ces mutations ont lieu dans des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou l'angiogenèse, elles apportent un avantage sélectif aux cellules et déclenchent ainsi le processus tumoral (Jehanno, 2017). De plus, les métabolites des œstrogènes (catéchols, quinones, semiquinones) pourraient également avoir un effet génotoxique (Germain, 2011 ; Coumoul et Barouki, 2015).

Le cancer du sein est le premier cancer le plus diagnostiqué (Hyuna *et al.*, 2021). En 2018, le fardeau mondial du cancer du sein s'élevait à 2,1 millions de nouveaux cas ; soit 6,3 millions de femmes vivant avec un cancer du sein diagnostiqué au cours des cinq années précédentes (Globocan, 2018). Au Cameroun, le cancer du sein est le premier cancer de la femme représentant 20 % des cancers chez celle-ci parmi lesquels environ 70% des cas sont dépistés tardivement et 57,9% des patientes atteintes ont moins de 50 ans (Ferlay *et al.*, 2012 ; Sando *et al.*, 2015). Le cancer de l'ovaire quant à lui est le cancer le plus létal parmi les tumeurs malignes gynécologiques et sa faible fréquence

rend difficile les tests de dépistage pour sa prévention primaire (Ting *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2019). Son incidence augmente d'environ 10 fois chez les femmes pendant la période péri ou post-ménopausique, comparativement aux femmes préménopausées (Vanderhyden, 2005) ; il représente 4,1 % des cancers chez la femme Camerounaise (Globocan, 2018). L'étiologie de ces cancers est multifactorielle et plusieurs facteurs de risques contribuent à leur développement, notamment : l'âge, l'obésité, l'imprégnation hormonale exogène (contraceptifs oraux et traitement hormonal substitutif de la ménopause) et endogène (puberté précoce, ménopause tardive, primiparité tardive), l'exposition aux polluants environnementaux (hydrocarbures aromatiques polycycliques) ainsi que les facteurs génétiques (Campeau *et al.*, 2008 ; Sagiv *et al.*, 2009).

Pour traiter les cancers, quatre interventions médicales sont couramment employées, parfois seules ou en combinaison ; il s'agit de: la chirurgie qui consiste à enlever la tumeur; la radiothérapie qui consiste à détruire de façon précise via les rayonnements ionisants la tumeur ; la chimiothérapie, qui consiste en l'administration des médicaments anticancéreux visant à détruire les cellules cancéreuses disséminées dans l'organisme et l'hormonothérapie, qui consiste à empêcher l'action stimulante des hormones sur les cellules cancéreuses. Tous ces traitements ont des effets secondaires néfastes, à court ou à long terme sur l'état du patient pouvant aller d'un état de fatigue chronique à un risque de développer un autre cancer. A titre d'exemple, l'utilisation du tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes, a été associée à une augmentation du risque de développer un cancer de l'endomètre et des maladies cardiovasculaires (Rossouw *et al.*, 2002 ; Herrington *et Klein*, 2003). A ceci s'ajoute le coût élevé surtout pour les pays en développement où 70% de décès de suite de cancers sont enregistrés (Falodun *et al.*, 2010). En outre, la non sélectivité des médicaments couramment utilisés et l'apparition des cas de résistance rendent bon nombre des médicaments anticancéreux inefficaces (Borowski *et al.*, 2005 ; Baliga et Dsouza, 2011).

Ces limites de traitements existant ont généré un intérêt croissant vis-à-vis des alternatives naturelles plus efficaces et moins nocives. Ces dernières décennies, un nombre élevé de patients préfèrent l'utilisation de substances naturelles pour leurs problèmes de santé. En effet, la chimioprévention est une méthode de prophylaxie qui consiste à utiliser des substances d'origine naturelle pour prévenir certaines maladies dont les cancers. Cette convergence croissante pour les substances naturelles est liée à leur accessibilité, leur disponibilité, aux croyances traditionnelles, et aux effets secondaires minimes. Ces dernières sont capables d'agir sur la modulation des signaux mitogènes, de survie cellulaire, d'apoptose, de régulation du cycle cellulaire, d'angiogenèse ou encore sur des processus intervenant dans le développement de métastases (Gaascht, 2013). Ces différentes activités seraient attribuées entre autres aux composés de nature antioxydante, cytotoxique et antioestrogénique naturels. En effet, les phytoestrogènes sont définis comme étant des substances

d'origine végétale qui par leurs analogies structurales avec le 17 β -œstradiol peuvent moduler l'activité des récepteurs aux œstrogènes (actions œstrogéniques ou anti- œstrogéniques), bénéfique dans la prise en charge des cancers oestrogène-dépendants (Paramita et Cameila, 2018). Pour contribuer à la recherche en cours de nouvelles alternatives naturelles pour traiter le cancer du sein et de l'ovaire, nous nous sommes intéressés à *Ficus umbellata* Vahl, qui est un figuier ; les figuiers étant conventionnellement utilisés pour le traitement des cancers (Guarrera, 2005 ; Rubnov *et al.*, 2001).

F. umbellata Vahl (Moraceae), est une plante répandue dans les régions tropicales et retrouvée au Cameroun. Ses écorces sont utilisées en pharmacopée camerounaise dans la prise en charge de certains troubles physiologiques liés à la ménopause (Arbonnier, 2009). Les études antérieures réalisées avec les extraits de *F. umbellata* ont montré qu'ils possèdent des effets antiœstrogéniques/oestrogéniques *in vitro* sur les cellules exprimant les récepteurs aux œstrogènes (ER) et *in vivo* sur les cibles primaires des œstrogènes (Zingué *et al.*, 2016). Par ailleurs, ces extraits ont également présenté un potentiel cytotoxique sur les cellules cancéreuses mammaires. S'appuyant sur le fait que le potentiel antiœstrogénique des plantes ait été démontré comme important dans le traitement des cancers œstrogène-dépendants (Macgregor *et al.*, 1998 ; Robert, 2015) et d'autre part qu'aucune étude n'ait déjà été rapportée dans la littérature sur le potentiel antitumoral de *Ficus umbellata*, les hypothèses suivantes ont été émises.

Hypothèses de recherche :

Hypothèse 1 : Les extraits de *F. umbellata* doués d'activité antiœstrogénique possèdent une activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses mammaires et ovariennes ;

Hypothèse 2 : Les extraits de *F. umbellata* inhibent la croissance des tumeurs en agissant sur le cycle, la migration, l'invasion cellulaire et en induisant une mort cellulaire ;

Hypothèse 3 : Les extraits de *F. umbellata* possèdent des constituants bioactifs qui inhibent la prolifération cancéreuse en agissant sur l'expression de certains gènes et protéines.

Objectifs du travail

Ce travail vise à contribuer à la valorisation de *Ficus umbellata* dans la lutte contre les modèles de cancers du sein et de l'ovaire. Spécifiquement, il s'agissait :

- ❖ D'évaluer les effets cytotoxique et chimiopréventif des extraits de *Ficus umbellata* sur un modèle de cancer œstrd sein et de l'ovaire ;
- ❖ D'élucider les mécanismes d'action anticancéreux des extraits de *Ficus umbellata* ;
- ❖ D'identifier les constituants actifs présents dans l'extrait et d'élucider leurs mécanismes d'action.

REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Le cancer

I.1.1. Définition

Le mot cancer vient du grec "carcinomo" qui désigne "un crabe dévorant les tissus" (Burnet *et al.*, 1995). Il est défini comme une prolifération dérégulée de cellules anormales qui envahissent et détruisent les tissus environnants pour ensuite se déplacer et aller causer des dommages dans d'autres systèmes (Tagne *et al.*, 2014).

I.1.2. Epidémiologie des cancers

Les cancers représentent un enjeu majeur de la santé publique à l'échelle planétaire tant dans les pays développés que ceux en développement. Il est la deuxième cause de mortalité dans le monde après les maladies cardiovasculaires, responsable de plus de 9,6 millions de décès par an (soit 13% de tous les décès mondiaux) (Cancer Report Worldwide, 2018). Environ 19,3 millions de nouveaux cas de cancers et 10 millions de décès ont été enregistré en 2020 (Hyuna *et al.*, 2021). Selon l'OMS, si rien n'est fait, d'ici 2030 les chiffres de mortalité dus aux cancers pourraient s'accroître de 50% pour atteindre 15 millions. A cette date, près de 70% des nouveaux cas se produiront dans les pays en développement.

En Afrique, les études épidémiologiques prévoient 1,2 million de nouveaux cas de cancers d'ici 2030 avec plus de 970.000 morts si des mesures adéquates de prévention ne sont pas prises rapidement (Ferlay *et al.*, 2012).

Au Cameroun plus de 14.000 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués et plus de 8.000 personnes décèdent chaque année de cette maladie (Congrès Euro-Africain de Cancérologie, 2016).

I.1.3. Cancérogénèse

La cancérogénèse ou oncogénèse désigne littéralement le processus conduisant à la formation des cancers. C'est un processus multi-étapes résultant d'une part de l'activation des proto-oncogènes en oncogènes, de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et de l'inactivation des gènes assurant la stabilité du génome (Hanahan et Weinberg, 2011). En effet, les cellules saines, éléments de base des tissus, naissent, se divisent puis se renouvellent de façon ordonnée en suivant un programme précis défini par leur patrimoine génétique. Lors de cette répllication, l'ADN néo-synthétisé peut contenir des « erreurs de recopiage », modifiant la séquence des gènes et donc la fonction même de la cellule. Pour y faire face, des voies de détection et de réparation des anomalies répllicatives assurent à la cellule fille un patrimoine génétique strictement identique à l'original (Ayse, 2018). Néanmoins, l'ADN est soumis de façon constante à des agressions d'origine endogènes ou exogènes. Ces facteurs peuvent agir directement au niveau de l'ADN et provoquer des altérations

pouvant modifier la séquence et aboutir à l'apparition des mutations. Plusieurs de ces mutations pourraient passer inaperçues car elles sont corrigées par des mécanismes de réparation. Par contre, l'impact peut être importante si elle survient sur une des trois classes de gènes importants comme les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN (Ayse, 2018).

- Les oncogènes encore appelés proto-oncogènes à l'état normal et oncogènes lorsqu'ils sont mutés, sont les régulateurs positifs de la prolifération cellulaire. Sous leur forme oncogénique, ils deviennent hyperactifs et leur modification est dominante. Ils appartiennent majoritairement à la famille Ras, le gène MYC. Parmi ces derniers, on peut citer les gènes HER-2 "Human Epidermal Receptor", EGFR "Epidermal Growth Factor Receptor", N-myc, L-myc et PTEN "Phosphatase and tensin homolog" (INESS, 2016).
- Les gènes suppresseurs de tumeurs quant à eux sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Dans cette catégorie, on distingue le *TP53* "Tumor Protein 53", dont les mutations sont impliquées dans plus de la moitié des cancers, les gènes Rb (rétinoblastome), Bim, BRCA 1 "Breast cancer antigen1" et BRCA 2. Ces gènes, une fois mutés, acquièrent un pouvoir oncogénique (INESS, 2016).
- Les gènes des multiples systèmes de réparation qui sont capables de détecter et de réparer les lésions à l'ADN. Parmi les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN on peut citer : hMSH2 (mutS homolog 2), hMLH1 (mutL homolog 1), BARD1 (BRCA associated ring domain), BRIP "BRCA interacting protein" (INESS, 2016).

Dans ces trois cas, la cellule peut acquérir un avantage sélectif lié à la persistance d'une mutation non réparée, qui lui permettra de donner naissance à un premier clone de cellules anormales. À partir de là, les cellules seront clonées et capable à tout moment d'évoluer vers la sélection d'une deuxième population, plus remaniée que la première, sur le plan génétique. C'est ce processus dynamique de l'accumulation de mutations successives qui conduit à la formation de cellules cancéreuses à forte capacité de prolifération (Ayse, 2018). Et pour chaque type de cancer on a pu mettre en évidence une certaine spécificité des gènes altérés et une chronologie dans le développement des événements. Cette chronologie d'évènements leur conférant un avantage, est représentée sur la Figure 1 ci-dessous.

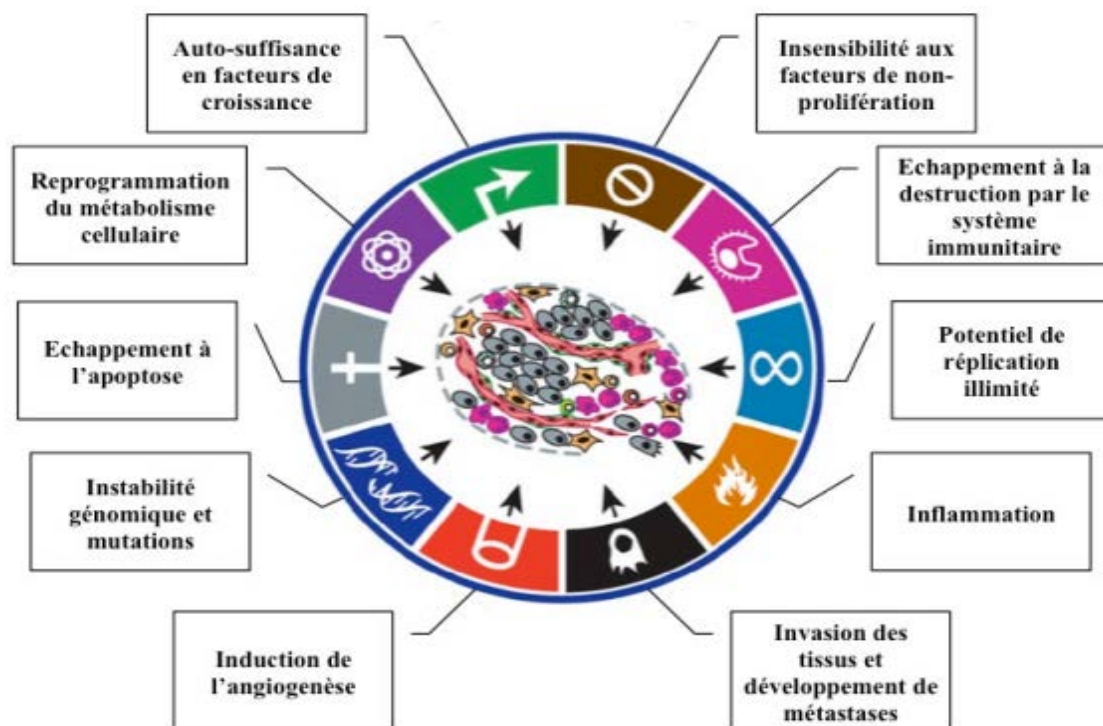


Figure 1: Schéma récapitulatif des différents événements conduisant à la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse (Hanahan et Weinberg, 2011).

Tout commence par une indépendance vis à vis des signaux stimulant la prolifération rendant ainsi les cellules capables de proliférer même en l'absence des facteurs de croissance. Ces dernières échappent ensuite aux signaux inhibiteurs tels que les gènes suppresseurs de tumeurs et développent une résistance à la destruction immuno-dépendante. Puis, les cellules tumorales acquièrent une capacité proliférative illimitée ; les cellules du système immunitaire envahissant le tissu tumoral peuvent excréter des molécules et notamment des espèces réactives de l'oxygène (ROS), hautement mutagènes, stimulant l'instabilité génétique des cellules tumorales. Les cellules acquièrent ensuite un pouvoir invasif ; qui leur confèrent la capacité de traverser les matrices extracellulaires et d'infiltrer les vaisseaux sanguins proches afin d'être transportées jusqu'à d'autres organes pour y former un foyer secondaire appelé métastase. Elles acquièrent également une capacité d'induction de l'angiogenèse. Ce dernier est défini comme un processus dynamique grâce auquel de nouveaux capillaires sanguins sont formés par excroissance ou bourgeonnement de vaisseaux préexistants. La tumeur ayant un besoin important en oxygène pour se développer, les cellules tumorales peuvent acquérir la capacité d'induire la formation de vaisseaux sanguins en grande quantité au sein même de la tumeur pour répondre à cette demande. Au cours de la prolifération des cellules cancéreuses, l'apparition de nouvelles mutations leur permet d'acquérir un avantage sélectif par rapport aux cellules normales. Ces cellules cancéreuses peuvent développer une capacité de prolifération par inactivation des voies impliquées dans la mort cellulaire, une reprogrammation du métabolisme

énergétique rendant ainsi les cellules capables de détourner l'intégralité de leur métabolisme énergétique vers la glycolyse au détriment du métabolisme oxydatif mitochondrial.

I.1.3.1. Etapes de la cancérogenèse

Elle se déroule en trois grandes étapes à savoir : l'initiation, la promotion et la progression représentées par la Figure 2 ci-dessous.

L'initiation : elle correspond à une atteinte génotoxique, plus précisément à une lésion de l'ADN par des agents carcinogènes dit "initiateurs". On peut citer entre autres les radiations ionisantes et ultra-violetes, les virus (virus de l'herpès, *papilloma virus*), les carcinogènes chimiques et/ou environnementaux [tabac, métaux, DMBA (7, 12-dimethylbenz(a)anthracene)]. Tous conduisent d'une manière ou d'une autre à une activation d'oncogènes et une inactivation d'anti-oncogènes dans des cellules souches ; ce qui aboutit à la formation d'une cellule initiée qui échappe au contrôle normal de la division cellulaire (Sagiv *et al.*, 2009 ; Baillet *et al.*, 2015).

La promotion : la cellule initiée réussit à échapper au système de défense de l'organisme et prolifère sous l'action des promoteurs tels que les facteurs de croissance, les cytokines et les hormones (œstrogènes, androgènes). Cette prolifération cellulaire conduit en une masse de cellules semblables au tissu d'origine ou il est logé (Reece *et al.*, 2012).

La progression : suite aux modifications géniques et cellulaires, les cellules cancéreuses sécrètent entre autres des protéases qui vont rompre la membrane basale et digérer les fibres du tissu conjonctif (collagène, fibronectine, laminine) leur permettant de migrer. En outre, ces cellules sécrètent des facteurs angiogéniques pour détourner la circulation sanguine ; permettant leur nutrition et leur propagation dans d'autres organes (métastases). Ces métastases se forment parce qu'en s'entourant de substances qui les masquent et les protègent, les cellules cancéreuses deviennent en même temps plus résistantes à l'attaque des globules blancs (Baillet *et al.*, 2015).

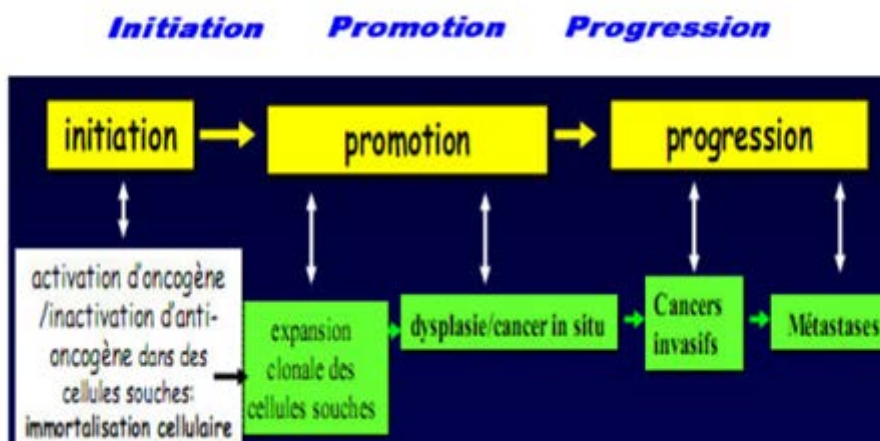


Figure 2: Etapes de la cancérogenèse (Crévoisier, 2010).

I.1.3.2. Exemple du rôle du Malondialdéhyde (MDA) dans le processus de cancérogénèse

Un déséquilibre entre les différentes espèces réactives oxygénées accompagné d'un déclin de la défense antioxydante, est connu sous le nom de stress oxydatif (Halimi *et al.*, 2012). Ces radicaux peuvent endommager d'importantes biomolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines ; jouant ainsi un rôle important dans l'initiation et la progression des cancers (Jeziarska-Drutel *et al.*, 2013). En effet, la peroxydation de ces biomolécules génère divers facteurs mutagènes et cancérogènes parmi lesquels le MDA (Sener *et al.*, 2007 ; Scheeba *et al.*, 2010).

Le malondialdéhyde, produit naturel issu de la peroxydation lipidique est capable d'interagir avec l'ADN pour former différents adduits, dont le malondialdéhyde-1-désoxyguanosine (M1dG). Ce dernier (malondialdéhyde-1-désoxyguanosine) est mutagène et déclenche la carcinogénèse (Sahu *et al.*, 2013). Également, des études ont montré qu'une peroxydation lipidique accrue augmentera le taux de malondialdéhyde (MDA), qui déclencheront la formation de cellules cancéreuses en plus d'augmenter les niveaux de MDA en tant que marqueur du développement des cellules cancéreuses (Hauck et Bernlohr, 2016 ; Yerizel *et al.*, 2019).

I.1.4. Voies de signalisation impliquées dans le développement des cancers

Plusieurs voies de signalisation peuvent être activées lors du développement d'un cancer après initiation d'une cellule saine et promotion par un facteur de croissance épidermique. Parmi ces voies, nous pouvons citer la voie Ras/MAPK "Mitogen activated protein kinases" ; la voie PI3K/Akt "Phosphatidylinositol 3-kinase/Protéine kinase B" et la voie STAT "Signal transducer and activator of transcription", résultant en l'activation de plusieurs processus biologiques tels que : la survie cellulaire (Yamaguchi *et al.*, 2001), l'invasion (Brader *et al.*, 2004), la prolifération ou la migration cellulaire (Boulay *et al.*, 2008).

I.1.4.1. La voie Ras/MAPK

Une fois le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) activé, les résidus tyrosines phosphorylés des domaines cytoplasmiques du récepteur servent de site de liaison pour une série de protéines adaptatrices permettant l'activation de la GTPase *Ras*. Pour ce faire, la protéine Grb2 "Growth factor receptor-bound protein 2" se lie aux résidus tyrosines phosphorylés via son domaine SH2 "Src Homology 2 domain". Les domaines SH3 de cette protéine adaptatrice permettent ensuite la liaison aux motifs riches en proline de SOS "Son of Sevenless", un facteur d'échange de nucléotide catalysant l'activation de la GTPase *Ras* (Guibellino *et al.*, 2008). Une fois la GTPase activée, celle-ci initie une cascade de phosphorylation de protéines constituant les MAP kinases, en débutant par la protéine kinase *Raf*. Une fois activée, *Raf* phosphoryle ensuite les résidus sérines et thréonines des protéines kinases MEK1/2 "Mitogen-activated protein kinase kinase". Ces dernières

phosphorylent à leur tour les résidus thréonines et tyrosines de ERK1/2 "extracellular signal-regulated kinase", un groupe de protéines qui, une fois activées, transloquent au noyau afin d'y phosphoryler plusieurs facteurs de transcription. Parmi les protéines activées par ERK1/2, on retrouve *Jun*, une protéine composant le facteur de transcription AP-1, et des protéines de la famille des facteurs de transcription *Ets* (E26 transformation-specific) (Hollenhorst *et al.*, 2012). Ces facteurs de transcriptions activent la transcription de gènes précoces codant pour la production d'autres facteurs de transcription, incluant *Myc*, *Fos*, et *Jun*, qui activent à leur tour la transcription d'une famille de gènes qui contrôlent l'entrée en phase S (Johnson *et al.*, 1993).

I.1.4.2. La voie PI3K/Akt

L'activation de l'EGFR conduit également à l'activation de la phosphoinositol 3- kinase (PI3K). Celle-ci peut être activée de plusieurs manières, soit par sa liaison directe aux résidus tyrosines phosphorylés du récepteur, via l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles qu'IRS-1 "Insulin Receptor Substrate" (Metz *et al.*, 2011), ou via d'autres protéines telle que la GTPase *Ras* activée (Castellano *et al.*, 2010). Une fois activée, la PI3K migre dans la paroi interne de la membrane plasmique et catalyse l'addition d'un groupement phosphate sur le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2), un des lipides membranaires constituant la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Le PIP2 est alors converti en phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate (PIP3). Le PIP3 recrute ensuite des protéines kinases à la surface interne de la membrane plasmique conduisant à l'activation de la sérine-thréonine kinase *Akt*. En phosphorylant plusieurs protéines clés, telles que GSK3 "Glycogen synthase kinase 3", *mTOR*, et des facteurs de transcription de la famille "Forkhead". *Akt* permet la suppression de l'apoptose et inhibe l'arrêt du cycle cellulaire (Toker *et al.*, 2006). L'effet de la voie de signalisation PI3K est donc de promouvoir la survie cellulaire et la prolifération.

I.1.4.3. La voie STAT

Les protéines *STAT* "Signal transducer and activator of transcription" ont la capacité d'être activés par leur liaison aux résidus tyrosines phosphorylés de l'EGFR activé via leur domaine SH2. Une fois activés, les STAT dimérisent et transloquent au noyau où ils se lient à des gènes ou des facteurs de transcription tels que *Fos* et *Jun*, permettant ainsi la prolifération cellulaire (Quesnelle *et al.*, 2007).

I.1.5. Typologie des cancers

De nos jours, on dénombre plus de 200 types de cancer ayant des causes, des symptômes et des traitements différents. Se basant sur le type de cellule initialement affectée, on distingue selon Ozbay et Nahta (2011) :

- ❖ **Les carcinomes** : c'est le cas des cellules cancéreuses apparaissant dans un épithélium (un tissu recouvrant les surfaces internes des organes ou externes à l'instar des épidermes). Dans cet ensemble, on distingue les adénocarcinomes qui se développent à partir de l'épithélium d'une glande telle que le sein et la prostate.
- ❖ **Les sarcomes** : c'est un cancer apparaissant dans un tissu de support comme les os, les graisses ou les muscles.
- ❖ **Les cancers hématopoïétiques** : ces cancers affectent les cellules sanguines ou celles des organes lymphoïdes. Exemple ; les leucémies et des lymphomes (Institut National du Cancer, 2014).

I.2. Cancers œstrogène-dépendants

Les cancers œstrogène-dépendants, sont définis comme des cancers sensibles aux hormones sexuelles (œstrogènes, progestérone, androgènes) et dont l'incidence augmente avec l'imprégnation hormonale. Parmi ces cancers, nous pouvons citer : le cancer du sein, de l'ovaire, de l'endomètre et de la prostate. Ces tumeurs se forment principalement dans des tissus dont le fonctionnement est normalement régulé par les stéroïdes sexuels.

I.2.1. Les œstrogènes

Les œstrogènes constituent un groupe de stéroïdes à 18 atomes de carbones jouant le rôle d'hormone sexuelle femelle primaire (Barha *et al.*, 2009). Ils dérivent du cholestérol et on en dénombre quatre principaux types chez l'Homme : l'œstrone (E1), l'œstradiol (E2) qui est le principal œstrogène, l'œstriol (E3) et l'œstétrol produit pendant la grossesse (Orczyk *et al.*, 1974).

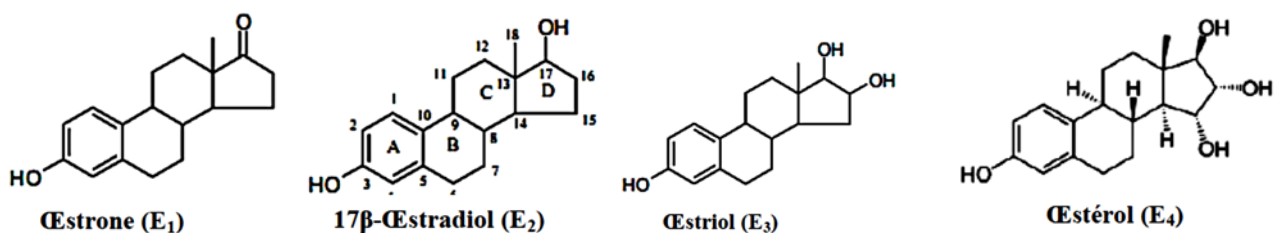


Figure 3: Structure des œstrogènes (Handgraaf, 2013).

I.2.2. Biosynthèse des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes synthétisées principalement au niveau des ovaires, des glandes surrénales et, dans une moindre mesure, dans les tissus périphériques. Les étapes successives de cette synthèse font intervenir plusieurs enzymes. Orchestrée par un cycle ovarien, la production d'œstrogènes chez la femme est en constante modulation. Le cycle hormonal débute par la sécrétion de la "Gonadotropin Releasing Hormon"(GnRH) au niveau de l'hypothalamus. Ce dernier

stimule la libération de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH) par l'adénohypophyse. Après internalisation par les cellules endocrines de l'ovaire, grâce aux récepteurs de LDL ("Low Density Lipoprotein"), le cholestérol est récupéré par les cellules stéroïdogéniques, stocké et transporté vers la membrane interne des mitochondries à courtes crêtes (site de synthèse des stéroïdes). Le cholestérol sera d'abord transformé en prégnenolone sous l'action d'une enzyme P450 (enzyme utilisant comme coenzyme le cytochrome P450) à savoir, la "cholesterolside-chain cleavage enzyme P450_{scc}". Cette étape critique est sous le contrôle hormonal de l'ACTH (corticotrophine) dans les surrénales et de la LH dans les gonades. La prégnenolone sera ensuite transformée en progestérone ou en 17 α hydroxyprégnenolone respectivement sous l'action de la 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid Dehydrogenase) ou de la 17 α -hydroxylase. La 17 α hydroxyprégnenolone et la 17 α hydroxyprogestérone seront converties en androgènes sous l'action de la 17,20-lyase. Alors que la formation des androgènes dans les glandes surrénales est limitée à la DHEA (dehydroepiandrosterone) et à l'androstènedione, dans les gonades, la présence des 3 β -HSD dans les cellules de Leydig et dans les cellules de la thèque des follicules ovariens, assure, sous le contrôle de la LH, la formation de la testostérone (principale hormone mâle) et de la 4-androstènedione. La formation d'œstrogènes requiert une autre enzyme P450 ; le complexe aromatase (P450_{arom}) localisé dans le réticulum endoplasmique lisse (Griffin et Ojeda, 1988). Le substrat est soit l'androstènedione (pour l'œstrone) ou la testostérone (pour l'œstradiol). Œstrone et œstradiol sont interconvertibles grâce à l'action des 17 β -HSD (17 β -hydroxysteroid Dehydrogenase) (Olson *et al.*, 2007).

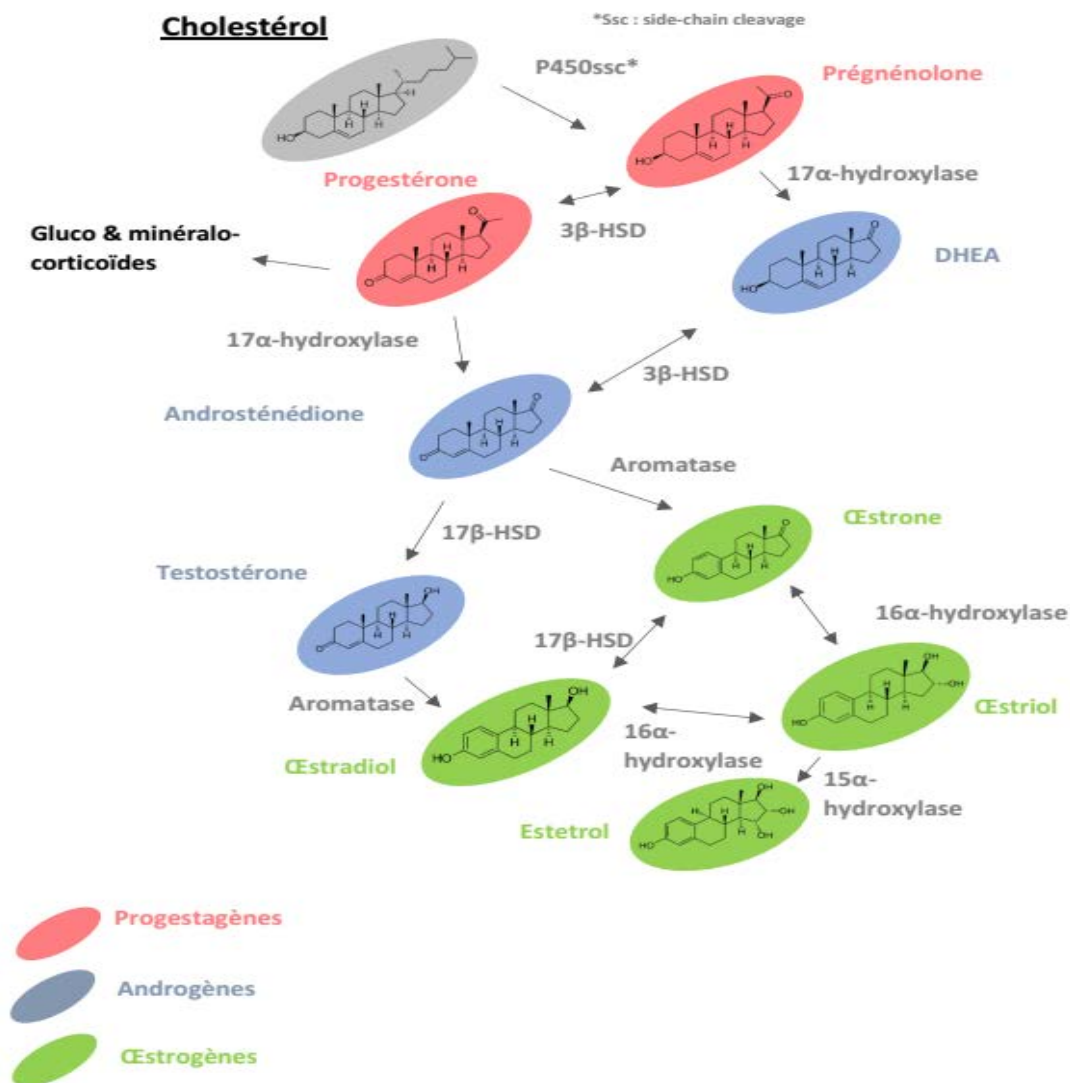


Figure 4: Biosynthèse des œstrogènes (adaptée de Thibault et Levasseur, 2001).

I.2.3. Récepteurs aux œstrogènes

Le récepteur aux œstrogènes (ER) est un membre de la famille des récepteurs nucléaires dont la fonction, médiée par l'œstradiol, est l'activation de la transcription de gènes impliqués notamment dans la croissance, la différenciation cellulaire et les fonctions reproductrices. Il existe trois formes de récepteurs aux œstrogènes : ER α , ER β et ER γ (ou ER β a). Les isotypes α et β sont retrouvés chez toutes les espèces alors que l'isotype γ n'a été identifié que chez certaines espèces de poissons (Hawkins *et al.*, 2000 ; Menuet *et al.*, 2002). La cartographie des récepteurs aux œstrogènes montre que le ER α est principalement retrouvé dans l'ovaire, l'utérus, l'hypophyse, les testicules, le rein et la glande mammaire et dans plusieurs régions du cerveau tandis que le ER β se retrouve

principalement dans la prostate, l'ovaire, l'utérus, le poumon, la rate le tissu osseux et, tout comme l'ER α , dans plusieurs régions du cerveau (Laflamme *et al.*, 1998 ; Kuiper *et al.*, 1997).

I.2.4. Activité agoniste et antagoniste des œstrogènes

L'interaction ligand-récepteur peut soit activer, soit inhiber l'activité de la protéine en question. Dépendamment de la nature du ligand agissant comme agoniste ou antagoniste, la réponse sera différente. Une activité agoniste signifie que l'interaction du ligand avec le récepteur induit une transcription hormono-dépendante, se traduisant par une augmentation de la prolifération cellulaire. À l'opposé, certains composés peuvent lier cette même protéine et engendrer une activité antagoniste en bloquant l'action des œstrogènes. Cette différence liée au processus de transcription des ligands s'explique principalement par la structure tridimensionnelle du récepteur. De nombreuses études cristallographiques menées jusqu'à présent ont permis de mieux comprendre le mode de liaison du ligand sur le récepteur (Guo *et al.*, 2002 ; Anstead *et al.*, 1997). Le domaine de liaison du ligand, partie intégrante de la région AF2 de la protéine, forme une cavité dans laquelle se loge l'œstradiol ou tout autre composé ayant une affinité pour le récepteur aux œstrogènes. Une fois dans le récepteur, les ligands peuvent induire des changements de conformation importants de la protéine. Ainsi, la fixation d'un agoniste entraîne un basculement de l'hélice H12 (Ruff *et al.*, 2000 ; Pike *et al.*, 1999) (Figure 5). Ce réarrangement s'accompagne d'une compaction générale du domaine de liaison du ligand, entraînant la stabilisation du dimère, une dissociation des co-répresseurs et la création de nouvelles surfaces d'interaction pour des co-activateurs. Comme le démontre la Figure 5, en se refermant, l'hélice H12 (en vert) rend accessibles des sites de liaison pour différents co-activateurs (SRC1) (co-activateur 1 du récepteur stéroïdien). Le récepteur activé peut alors se lier sur les ERE (éléments de réponse aux œstrogènes) et déclencher la transcription de gènes spécifiques. D'une manière similaire, l'activité antagoniste d'une molécule s'explique aussi par le positionnement de cette hélice H12. La fixation d'un antagoniste a pour effet de déplacer l'hélice H12 (en bleu) dans une position masquant les sites d'interaction des co-activateurs.

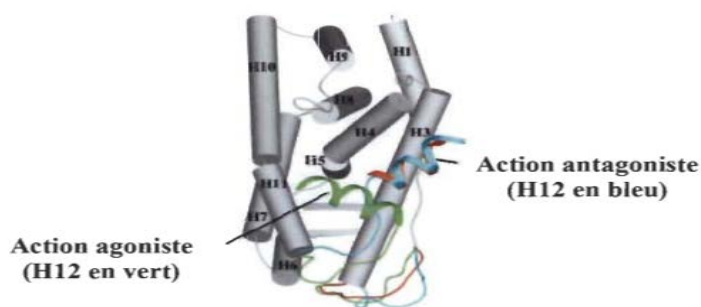


Figure 5: Structure tridimensionnelle du domaine de liaison du ligand lié à un agoniste (œstradiol) et à un antagoniste (tamoxifène et raloxifène). (Tirée et adaptée de Rufi *et al.*, 2000).

L'emplacement de l'hélice H12 est donc à l'origine des effets agonistes ou antagonistes des œstrogènes (Germain *et al.*, 2006). De ce fait, l'activité d'une molécule (agoniste) n'est pas corrélée avec son affinité pour le récepteur aux œstrogènes. Il semblerait plutôt qu'elle dépende de la faculté qu'a le produit en question de placer l'hélice H12 dans la même configuration que le fait l'œstradiol (Pujol et Maudelonde 2001).

I.2.5. Implication des œstrogènes dans la cancérogenèse

L'exposition prolongée aux œstrogènes est un facteur qui favorise le développement de certains cancers, en particulier les cancers du sein et de l'ovaire (Coumoul et Robert, 2015). Ceux-ci exercent leur activité tumorigénique par plusieurs mécanismes parmi lesquels : la stimulation de la croissance cellulaire par l'activation chronique des récepteurs des œstrogènes ; la synthèse des métabolites génotoxiques dérivés des œstrogènes, dont la synthèse dépend de l'expression et de l'activité de nombreuses enzymes (Coumoul et Robert, 2015).

I.2.5.1. Stimulation de la croissance cellulaire par l'action des œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes peuvent agir selon deux mécanismes différents. Le premier permet de réguler la transcription des gènes cibles par le biais de la fixation du récepteur intracellulaire à son élément de réponse aux œstrogènes (ERE) au sein du promoteur de gènes cibles ou par des interactions protéine-protéine. Ce mécanisme est communément appelé mécanisme génomique. Il existe trois voies de signalisation génomique (Figure 6) : la voie classique ou ERE dépendante (voie 1), La voie ERE-indépendante (voies 2 et 3) et la voie ligand-indépendante (voie 4). Comme présenté par la figure ci-dessous, pour la signalisation classique (voie 1), le récepteur ER lié à l'œstradiol (E2) se dimérise à une séquence spécifique dite ERE. Dès lors, des co-activateurs sont recrutés ainsi que la machine transcriptionnelle et le tout aboutit à l'activation de la transcription du gène cible. Concernant les voies ERE- indépendantes (voies 2 et 3), le complexe ER-E2 peut induire la transcription des gènes cibles en se liant directement à des protéines spécifiques Sp1

"specific protein" ou AP-1 "activator protein-1" (formé des protéines c-Fos et c-Jun) liées respectivement à des domaines nucléotidiques riches en glutamine ou TRE [TPA (12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate) Response Element] (Krishnan *et al.*, 1994). La troisième voie de signalisation génomique est ligand-indépendant (voie 4). Cette activation est produite principalement par des facteurs de croissance comme l'EGF "Epidermal Growth Factor" et l'IGF-1 "Insulin-like Growth Factor". Ceux-ci phosphorylent le récepteur des œstrogènes au résidu de sérine 118 par l'intermédiaire de la MAP kinase. Le récepteur interagit avec le co-activateur p68 RNA hélicase et active la transcription du gène en interagissant avec l'ERE (Moore et Faller 2013 ; Koterba et Rowan 2006 ; Kallen *et al.*, 2004).

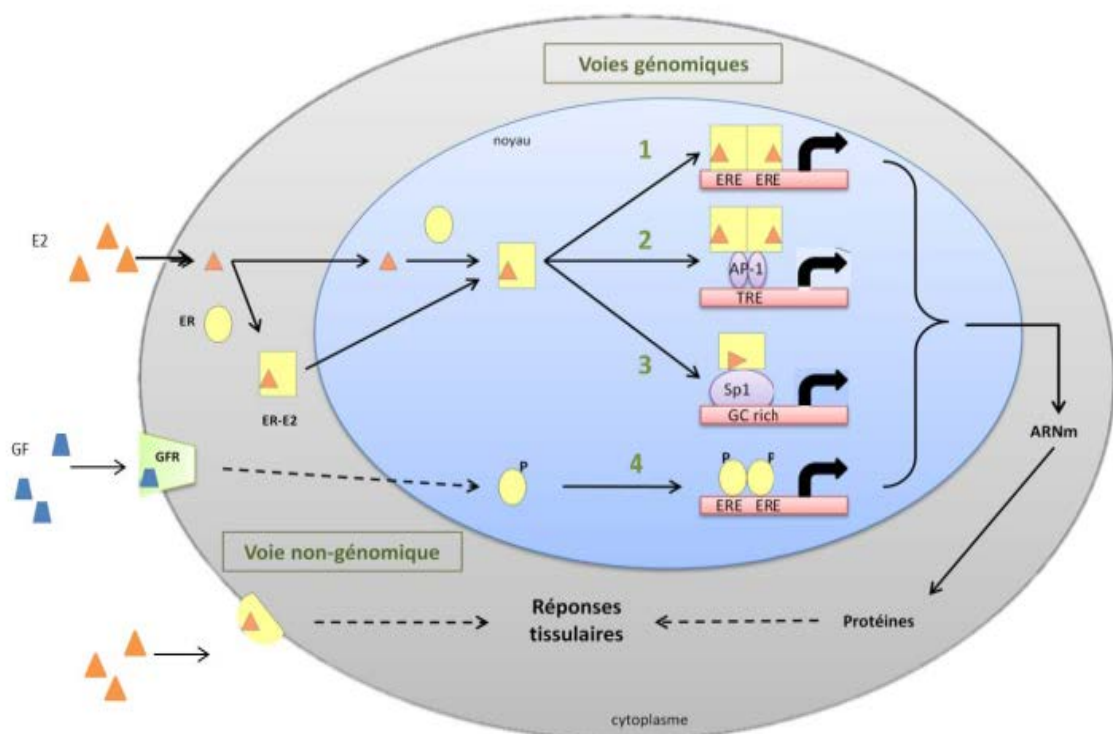


Figure 6: Différentes voies de signalisation cellulaire du récepteur ER et de l'œstradiol. (Le Grand, 2009).

Au-delà de la voie de signalisation classique passant par l'activité nucléaire du récepteur, les œstrogènes provoquent également des effets moins classiques par l'intermédiaire de certaines voies de signalisation membranaires. Les effets rapides observés avec les œstrogènes s'expliquent par l'existence de récepteurs membranaires. La liaison des œstrogènes à ces récepteurs déclenche des systèmes de signalisation cellulaire particuliers ayant lieu dans le cytoplasme de la cellule (Le Grand, 2009). Ceux-ci sont responsables de la production de seconds messagers intracellulaires (Ca^{2+} , Adénosine monophosphate cyclique (AMPc), Guanosine monophosphate cyclique (GMPc), lesquels occasionnent des conséquences biologiques sur de nombreux tissus en particulier au niveau du tissu nerveux, des cellules du sein, de l'endothélium vasculaire, du tissu osseux et de l'ovaire. Bien que la

voie non génomique ne constitue pas le mode d'action classique des œstrogènes, le récepteur membranaire des œstrogènes et les voies de signalisation qui en découlent représentent des cibles thérapeutiques intéressantes qui font l'objet de plusieurs études.

I.2.5.2. Métabolisme oxydatif génotoxique des œstrogènes

Différentes voies métaboliques peuvent conduire à la synthèse de composés génotoxiques. La voie principale conduit à la synthèse de dérivés hydroxylés de l'E2, les catéchols (Figure 7). Il s'agit du 2CE (ou 2OH-E2 pour "2OH-catechol estrogen") principal catéchol détecté à la fois dans le sang et dans l'urine, et du 4CE (ou 4OH-E2 pour "4OH-catechol estrogen" produit de façon majoritaire dans certains tissus dont les tissus mammaire, ovarien, et l'endomètre. Ces composés sont synthétisés majoritairement par des cytochromes P450 (CYP) extra hépatiques ou hépatiques, mais aussi par d'autres enzymes comme l'aromatase ou certaines peroxydases (Martucci et Fishman, 1993 ; Ozawa, 1993). Ainsi, l'œstradiol est converti en 2CE par les CYP1A dans les tissus extra hépatiques et par les CYP3A dans le foie. Ces enzymes ont aussi une activité 4-hydroxylase non spécifique permettant la synthèse en faible quantité (15 % environ) du 4CE (Weisz *et al.*, 1992). Dans un second temps, les catéchols, de par la position de leurs hydroxyles, peuvent conduire à la synthèse de semi-quinones puis, selon un mécanisme de réaction en chaîne, à celle des quinones (Figure 7).

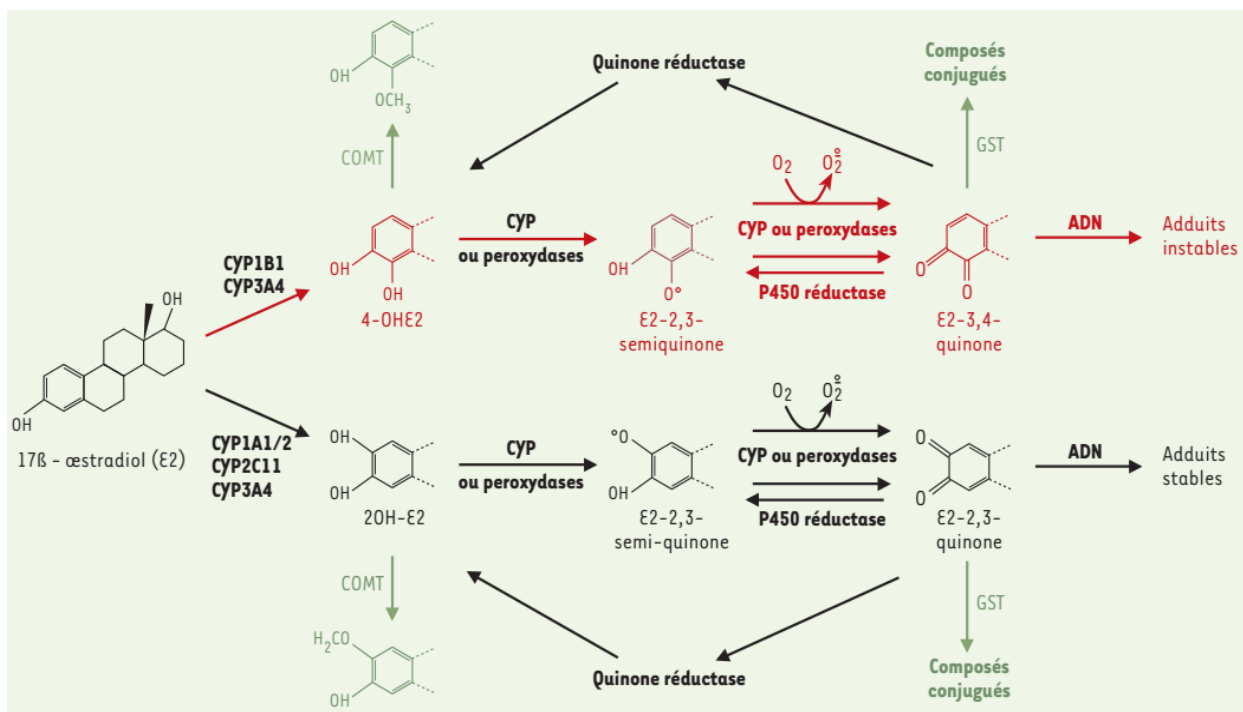


Figure 7: Voies métaboliques de l'œstradiol. (Adaptée de Jefcoate *et al.*, 2000).

La formation des semi-quinones est un processus enzymatique impliquant des CYP ou des peroxydases. En revanche, celle des quinones peut se faire par plusieurs mécanismes, enzymatiques

(peroxydases ou CYP) ou non enzymatique impliquant dans ce cas l'oxygène moléculaire (O_2) et conduisant à la formation d'ion superoxyde, O_2^- . Comme dans de nombreuses réactions, les différents composés toxiques dérivant de l'E2 sont eux-mêmes métabolisés par d'autres enzymes.

I.2.5.3. Action génotoxique des métabolites d'œstrogènes

Les dérivés oxydés (catéchols) des œstrogènes stimulent la croissance des tumeurs mammaires *in vitro* et *in vivo* et peuvent se lier à l'ADN et aux protéines (génotoxicité des quinones) (Yager *et al.*, 1996). Lorsque la synthèse de catéchols devient excessive, les systèmes de détoxification (sulfotransférases, UDP-glucuronosyltransférases (Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase) sont dépassés et les dérivés, semiquinones et quinones, sont produits. Quand les réserves en glutathion s'épuisent, les quinones peuvent exercer leur génotoxicité. Elles sont en effet hautement réactives et capables d'une part de former des adduits d'ADN et des sites apuriniques, et d'autre part, d'oxyder les lipides cellulaires et certains ions métalliques (fer et cuivre) (Wang *et al.*, 1994). La formation des quinones à partir des semiquinones peut également conduire à la formation de dérivés réactifs de l'oxygène comme l'ion superoxyde O_2^- ainsi qu'à des cycles " futiles " d'oxydo-réduction (même en présence de faibles quantités de semi-quinones et de quinones) (Roy *et al.*, 1991). La production excessive de ces dérivés réactifs peut avoir des conséquences délétères pour les cellules car ces molécules endommagent l'ADN, les lipides et les protéines. Le 4CE aurait un rôle génotoxique du fait qu'une seule injection intrapéritonéale à des rongeurs de 4CE et de l'E2 a la capacité de provoquer le développement de tumeurs (Li *et al.*, 1987 ; Liehr *et al.*, 1986). L'apparition de ces tumeurs a été attribuée à la formation d'adduits d'ADN (4OH-E2-1 α , β - N7-guanine et 4OH-E2-1(α , β)-N3- adénosine) qui sont détectés aussi bien *in vivo*, qu'après traitement de lignées cellulaires *in vitro* (Cavalieri *et al.*, 1997). Or, ces tissus sont sensibles à la cancérogenèse induite par les œstrogènes. En outre, dans le tissu mammaire ou ovarien tumoral, une activité 4- hydroxylase plus élevée que dans le tissu normal est détectée (Liehr *et al.*, 1995 ; Liehr *et al.*, 1996), et cette activité semble principalement être due au CYP1B1, qui constitue la voie principale de synthèse du 4CE. Le rapport 4CE/2CE semble en effet augmenter dans les extraits ou les microsomes de cellules tumorales mammaires (Liehr *et al.*, 1996). Comme la concentration de ces deux catéchols est étroitement liée à l'expression des enzymes impliquées dans leur synthèse ou dans leur métabolisme, tout facteur susceptible de modifier leur expression pourrait potentiellement jouer un rôle dans les mécanismes génotoxiques. Ainsi, l'E2 lui-même, est capable de multiplier par six le rapport 4CE/2CE dans le rein du hamster doré (Weisz *et al.*, 1992).

Enfin, ce mécanisme génotoxique n'exclut en rien le rôle des œstrogènes dans la croissance tumorale (Figure 8), et ces deux mécanismes pourraient agir de concert pour stimuler à la fois la prolifération et l'accumulation de mutations (Coumoul et Robert, 2015).

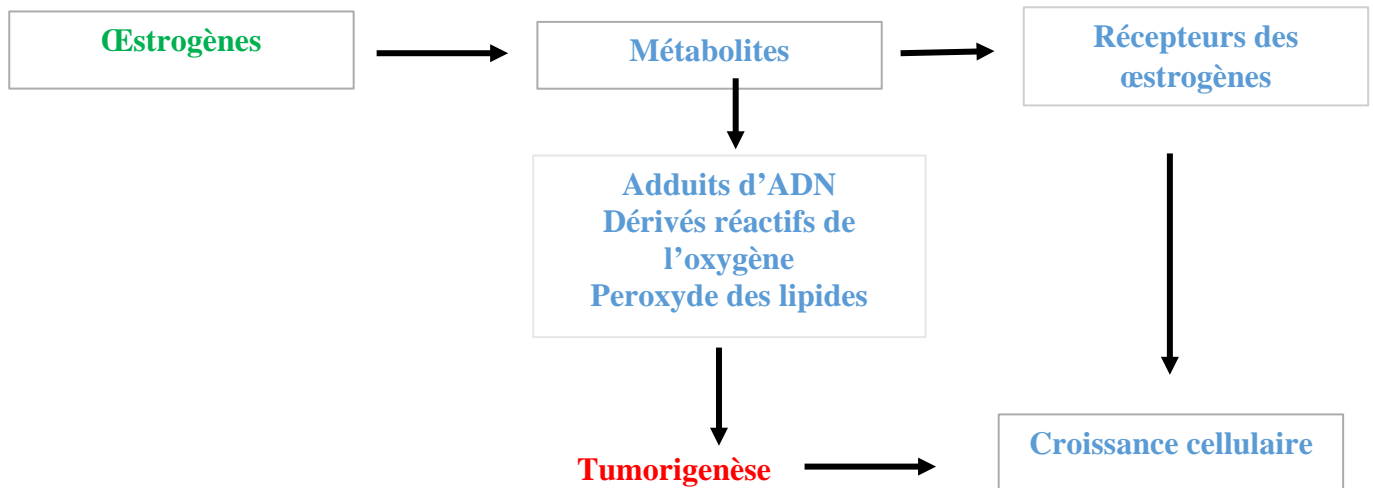


Figure 8. Modèle impliquant les œstrogènes dans la tumorigénèse

I.3. Cancer du sein

Le cancer du sein peut être défini comme une pathologie caractérisée par une multiplication anarchique, excessive et incontrôlée des cellules de la glande mammaire pouvant donner naissance à une tumeur maligne (Institut National du Cancer, 2016). Il s'agit d'un cancer qui se développe généralement dans les canaux galactophores et dans les lobules mammaires.

I.3.1. Le sein

Le sein est un organe pair et globuleux situé dans la partie antéropostérieure du thorax. Il se développe à la puberté et occupe une place particulière dans le profil féminin, car il lui confère sa féminité. Il joue de ce fait un rôle important dans la sexualité et la maternité de la femme (Marieb et Hoehn, 2010). Le sein a pour fonction biologique principale la production du lait, et sa structure s'organise autour de cette production. Chaque sein contient des glandes mammaires constituées de lobules, dont la fonction est la production de lait en période d'allaitement, et de canaux, dont la fonction est d'acheminer le lait produit dans les lobules vers le mamelon (His, 2016). Sur chaque sein (Figure 9) on peut distinguer les éléments suivants : les lobules mammaires qui se composent des glandes mammaires, elles-mêmes composées de quinze à vingt compartiments séparés par du tissu graisseux. L'acinus mammaire est l'unité sécrétrice du lait. Il est formé d'une seule rangée de cellules épithéliales sécrétrices, dites cellules lactifères, entourée par des cellules myoépithéliales, dont la contraction est responsable de l'éjection du lait ; le tissu de soutien constitué de vaisseaux, de fibres et de graisse ; les canaux galactophores qui conduisent le lait jusqu'au mamelon.

Chez les mammifères, le développement et le fonctionnement des glandes mammaires sont sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérones) fabriquées majoritairement par les ovaires. Les œstrogènes permettent le développement des seins au moment de la puberté et jouent un rôle important tout au long de la grossesse (Institut National du Cancer, 2016).

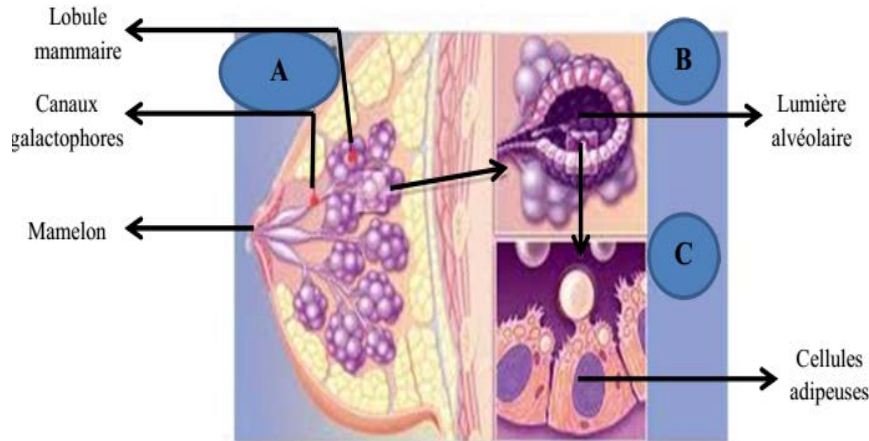


Figure 9: Principales composantes du lobule glandulaire du sein humain (A), de la coupe de l'acinus (B) et des cellules des alvéoles mammaires (C) (Beaudry *et al.*, 2006).

I.3.2. Épidémiologie du cancer du sein

Dans le monde, le cancer du sein représente le cancer le plus couramment diagnostiqué avec 2,3 millions de nouveaux cas (Hyuna *et al.*, 2021). En Afrique, c'est le quatrième cancer le plus fréquent dans la population générale après les cancers du foie, de la peau et du col de l'utérus avec 168.690 nouveaux cas, 74 072 décès et une prévalence de 370 015 cas sur une période de 5 ans (Andersen *et al.*, 2006 ; ALIAM, 2017 ; Globocan, 2018). Au Cameroun, l'incidence annuelle du cancer du sein serait de 3 273 nouveaux cas contre 1.780 décès et la prévalence est estimée à 6 010 malades. Plus de 80 % des cas sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie et la plupart décède dans les 12 mois qui suivent le diagnostic (Enow *et al.*, 2012, Globocan, 2018). Il représente 20,8 % des cancers chez la femme Camerounaise ; et la survie globale à 5 ans est estimée au Cameroun à 43,3% (Zingué, 2016).

I.3.3. Typologie des cancers du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène. Cependant, 95% des cancers du sein se développent à partir de cellules épithéliales de la glande mammaire (Institut National du Cancer, 2016). Ces cellules épithéliales recouvrent les canaux et les lobules mammaires, et sont séparées des tissus voisins par une couche appelée lame basale (Figure 10). Se basant sur la localisation de la tumeur, on distingue le cancer du sein *in situ* et invasif. Lorsque la prolifération des cellules cancéreuses se limite au canal ou au lobule, il s'agit d'un cancer du sein *in situ*. Par contre, lorsque

les cellules cancéreuses traversent la lame basale pour envahir d'autres tissus, on parle d'un cancer du sein invasif.

I.3.3.1. Cancer "in situ"

Le cancer canalaire "in situ" ou carcinome canalaire in situ (CCIS) est le cancer du sein le plus fréquent : huit à neuf cancers sur dix sont des cancers canaux "in situ" (INCA, 2018). En clinique, les carcinomes "in situ" sont en général de meilleurs pronostics que les carcinomes infiltrants puisque le risque de formation de métastases est faible.

I.3.3.2. Carcinomes infiltrants

Lorsque les cellules cancéreuses ont infiltré le tissu qui entoure les canaux et les lobules, on parle de carcinome infiltrant (INCA, 2018). On les appelle aussi les cancers invasifs. Ce sont ces cancers-là qui entraînent la formation de métastases en se propageant vers les ganglions lymphatiques sous-axillaires.

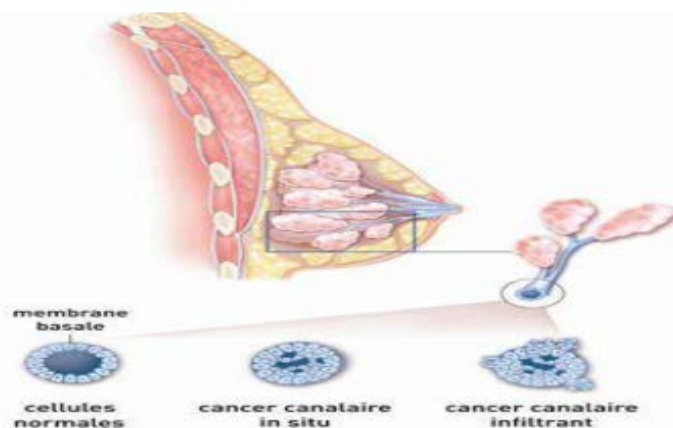


Figure 10: Cancer du sein canalaire infiltrant et "in situ" (d'après Institut National du Cancer, 2016).

I.3.4. Sous-types de cancer du sein

Le cancer du sein peut être divisé en au moins cinq sous-types basés sur un profil d'expression de 500 gènes, soit le luminal de type A, luminal de type B, basal, HER2, et Claudin-Low (Chanrion *et al.*, 2007 ; Guiu *et al.*, 2012). Ceux-ci sont associés à des pronostics particuliers et à des potentiels de survie distincts (Prat et Perou, 2011). Les sous-types moléculaires sont généralement caractérisés par leur niveau d'expression protéique du récepteur à l'œstrogène (ER), à la progestérone (PR), ainsi qu'au récepteur humain du facteur de croissance épidermique de type 2 (HER2).

Les tumeurs de type luminal expriment toutes des marqueurs de cellules épithéliales tels que GATA3 "Trans-acting T-cell-specific transcription factor", ER α et PR dans de fortes proportions pour le sous-type A et dans des proportions plus faibles pour le sous-type B. De plus les tumeurs classées

luminales B possèdent un index prolifératif beaucoup plus fort et sont moins sensibles à l'hormonothérapie qui représente un traitement de choix (Jehanno, 2017).

Les tumeurs HER2, quant à elles, sont généralement négatives pour les ER et caractérisées par une surexpression de HER2 (Chanrion *et al.*, 2007).

Les tumeurs de type basal dérivent de la couche basale de l'épithélium et sont des cancers généralement beaucoup plus agressifs que les cancers liminaux, ayant une plus forte prévalence chez les femmes jeunes (Toft and Cryns 2011). Les cancers de type basal-like regroupent une sous-catégorie de cancers dit triples négatifs (TNBC) "triple negative breast cancer" car ils n'expriment ni ER α , ni ER β , ni HER2. De plus, ils surexpriment souvent le récepteur du facteur de croissance épidermique (Burness *et al.*, 2010). Parmi tous les cancers du sein nouvellement diagnostiqués, environ 15-20% sont dits triples négatifs (Bauer *et al.*, 2007). Les cancers du sein triple négatifs sont associés à un mauvais pronostic, notamment en raison du manque de thérapies ciblées (Carey, 2011 ; Kim *et al.*, 2012).

Le cancer de type Claudin-Low a été la dernière catégorie de cancers du sein à avoir été identifiée. Ces tumeurs sont suspectées de dériver de cellules souches mammaires car elles expriment des marqueurs tels que CD44 (Cluster de différenciation 44), ALDH1 "Aldéhyde Déshydrogénase 1" et PROCR "Protein C Receptor" en forte quantité (Charafe-Jauffret *et al.* 2009). Elles expriment également des marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine ou le facteur de transcription TWIST, ce qui pose la question de la proximité de l'état souche et de l'état mesenchymateux (Taube *et al.* 2010).

I.3.5. Symptômes du cancer du sein

Le cancer du sein se manifeste souvent comme une anomalie mammographique, mais aussi comme une masse ou un épaississement asymétrique, un écoulement du mamelon (clair ou sanglant), des altérations de la peau (peau d'orange) ou du mamelon. Il se manifeste aussi par des douleurs mammaires fréquentes surtout comme symptôme prémenstruel avant la ménopause (Goldman et Schafer, 2013), des changements au niveau de la forme et de la taille du sein avec l'apparition des signes inflammatoires comme une rougeur, chaleur, œdème au niveau du sein, la présence de ganglions axillaires (au niveau de l'aisselle) ou alors sous le bras. Ce dernier représente le signe même d'une propagation des cellules cancéreuses (INCA, 2018).

I.3.6. Techniques médicales permettant le diagnostic du cancer du sein

La démarche diagnostique est généralement déclenchée par la mise en évidence d'une image suspecte à une mammographie de dépistage ou par la palpation d'une anomalie dans le sein par la patiente elle-même ou un professionnel de santé. Que les lésions soient cliniquement occultes ou

apparentes, l'histopathologie est obligatoire pour une confirmation du diagnostic. Aujourd'hui, la cytoponction (aspiration à l'aiguille fine) et la biopsie au trocart ont remplacé les prélèvements par incision ou excision comme mesures diagnostiques habituelles. Lorsque les lésions suspectes sont palpables, la cytoponction et la biopsie au trocart peuvent être effectuées, mais si la lésion est non palpable, la biopsie doit être guidée par mammographie, échographie ou IRM (Goldman et Schafer, 2013).

I.4. Cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire se définit comme une tumeur maligne se développant généralement à partir du revêtement de la surface des ovaires. La forme la plus fréquente est celle d'un carcinome épithélial de l'ovaire. C'est une pathologie parfois sévère, de mauvais pronostic car ses symptômes sont difficiles à déceler et le diagnostic n'est souvent posé qu'à un stade avancé de la maladie (75% des cas).

I.4.1. L'ovaire

L'ovaire est la gonade paire de la femme. C'est une glande à la fois exocrine qui produit les ovules d'une part et endocrine qui sécrète des hormones sexuelles d'autre part. L'ovaire se situe dans la grande cavité péritonéale de la paroi pelvienne et a la forme d'une amande, légèrement aplatie, qui présente un grand axe presque vertical légèrement oblique en bas et en dedans. De couleur blanche rosé, qui tranche nettement avec les formations de voisinage, sa consistance est ferme, mais très friable. Sa surface est lisse chez l'enfant, irrégulière chez la femme en période d'activité génitale (les saillies correspondant aux follicules sous-jacents et les dépressions figurant les cicatrices post-ovulatoires), et à la ménopause, il prend un aspect scléreux (Pierrekamina *et al.*, 2003).

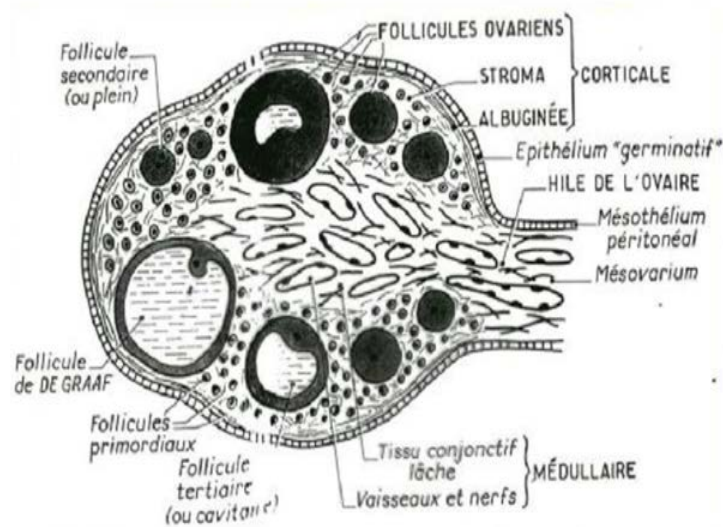


Figure 11 : Structure histologique de l'ovaire (Gougeon, 2000)

I.4.2. Epidémiologie du cancer de l'ovaire

Aux États-Unis, on estime que 22 440 femmes ont développé un cancer de l'ovaire en 2017. Il représente 1,3% de tous les nouveaux cas de cancer. En moyenne, le nombre de nouveaux cas de cancer de l'ovaire est de 11,7 pour 100 000 femmes par an (Oncolink Team, 2019). Au Cameroun selon les estimations de Globocan (2018), 4,1 % de femmes sont atteintes du cancer de l'ovaire.

I.4.3. Types de cancer de l'ovaire

Dépendant de l'origine des cellules/tissus affectés, le cancer de l'ovaire peut être classé en 3 grandes types : les tumeurs stromales, germinales et épithéliales.

I.4.3.1. Les tumeurs stromales

Il s'agit des cancers ayant pour origine des cellules stromales dont la plupart dérive de la granulosa. Ce sont les cancers de l'ovaire les plus rares et représentent 5-10% de toutes les tumeurs malignes de l'ovaire avec généralement un bon pronostic à long terme (Chen *et al.*, 2003).

I.4.3.2. Les tumeurs germinales

Il s'agit des cancers dérivés des cellules productrices d'ovocytes, et affectant plus particulièrement les enfants et les jeunes adultes (Chen *et al.*, 2003). Les tumeurs des cellules germinales représentent quant à elles 10-15% des cancers ovariens (Chen *et al.*, 2003).

I.4.3.3. Les tumeurs épithéliales

Ce cancer a pour origine la surface épithéliale de l'ovaire, dérivée de l'épithélium cœlomique. La surface épithéliale de l'ovaire est histologiquement similaire au mésothélium, un épithélium tapissant l'intérieur des cavités au niveau du pelvis et de l'abdomen, également dérivé de l'épithélium

cœlomique primitif. Les tumeurs épithéliales sont les tumeurs ovariennes les plus fréquentes, représentant 80% de tous les cas (Chen *et al.*, 2003).

I.4.4. Sous types du cancer de l’ovaire

Il existe une variété de sous-types histologiques des tumeurs ovariennes selon le tissu auquel les tumeurs s’apparentent le plus. Plus spécifiquement, pour le cancer épithélial de l’ovaire, on distingue : les sous-types séreux, endométrioïde, mucineux, à cellules claires, à cellules transitionnelles (ou de Brenner), mixtes, et indifférenciées.

- **Les tumeurs séreuses**

Le sous-type séreux est le plus fréquent et représente plus de 50% des tumeurs épithéliales de l’ovaire, ce qui correspond à plus de 80% de tous les cas de cancers ovariens. Les cellules cancéreuses de type séreux ressemblent à celles qui tapissent la paroi interne des trompes de Fallope (Chen *et al.*, 2003).

- **Les tumeurs endométrioïdes**

Les tumeurs de sous-type endométrioïdes possèdent des cellules qui s’apparentent à l’endomètre (paroi intérieure de l’utérus). Elles représentent environ 10 -25% de tous les cancers ovariens. Elles se présentent surtout sous forme maligne et unilatérale, et sont associées à un meilleur pronostic que les tumeurs malignes de sous-type séreux ou mucineux (Chen *et al.*, 2003).

- **Les tumeurs mucineuses**

Les tumeurs ovariennes de sous-type mucineux se composent de cellules qui ont l’aspect de cellules de l’épithélium intestinal ou de l’épithélium endocervical et représentent environ 5-10% de tous les cas de cancers de l’ovaire (Chen *et al.*, 2003).

- **Les tumeurs à cellules claires**

Les tumeurs à cellules claires, quant à elles, représentent environ 45% de tous les carcinomes de l’ovaire (Chen *et al.*, 2003). La plupart de ces tumeurs sont associées à un taux de survie assez faible. Elles sont caractérisées par des cellules en forme polygonale possédant un cytoplasme riche en glycogènes et lipides (Kaku *et al.*, 2003).

I.4.5. Symptômes du cancer de l’ovaire

Parmi les symptômes indicatifs du cancer de l’ovaire, nous pouvons citer : La fatigue constante, prise ou perte de poids, ballonnements et flatulences, troubles de menstruations ou saignements vaginaux en dehors des règles, douleurs abdominales, pelviennes ou sensation de pesanteur au niveau de l’abdomen, compression vésicale ou rectale entraînant des troubles urinaires, et digestifs tels que la constipation, la diarrhée, et des nausées. Les troubles du cycle menstruel : oligoménorrhée, aménorrhée secondaire associée de façon inhabituelle à une glaire abondante ou à

des ménorrhagies (Ellouze *et al.*, 2006). Ces problèmes cliniques sus-mentionnés sont non spécifiques et souvent associés et confondus à tort à d'autres maladies, et pathologies plus courantes.

I.4.6. Techniques médicales permettant le diagnostic du cancer de l'ovaire

Les circonstances de la découverte d'un cancer de l'ovaire sont variées et la plupart des détections cliniques de cette maladie se font de façon fortuite lors d'un examen médical souvent pour une autre pathologie. Un examen gynécologique de routine incluant le toucher vaginal et pelvien, une échographie pelvienne et abdominale ou une échographie endovaginale pourraient aider à déceler la maladie, ou du moins, à rechercher des caractéristiques qui pourraient orienter le clinicien vers la présence d'un cancer.

I.5. Marqueurs tumoraux du cancer du sein et de l'ovaire

Deux principaux marqueurs sont déterminés et peuvent être des indicateurs de la présence d'un cancer de l'ovaire ou du sein. Il s'agit du CA 125 "Cancer Antigen 125" et CA 15-3. Le dosage de marqueurs tumoraux, notamment le CA125, à partir du plasma sanguin pourrait donner une indication quant à la présence du cancer du sein et de l'ovaire. En fait, le CA125 sérique constitue l'unique marqueur actuellement utilisé en clinique pour la surveillance médicale du cancer de l'ovaire. Le CA125 est une glycoprotéine de haut poids moléculaire, qui est présente à la surface des cellules et est dérivée de l'épithélium cœlomique (Bast *et al.*, 2005 ; Jacobs *et al.*, 1985). C'est donc aussi un marqueur de différenciation épithéliale. Le CA 125 n'est pas généralement exprimé à la surface épithéliale de l'ovaire, mais les cellules cancéreuses de la surface épithéliale de l'ovaire peuvent acquérir des caractéristiques épithéliales suite à une différenciation de type pathologique, et ainsi sécréter du CA 125 en grandes quantités (Auesperg *et al.*, 2001). Toutefois, les cancers ovariens au stade précoce, de même que certains des cancers ovariens plus avancés, peuvent être associés à un taux de CA 125 normal (< 35 U/mL). Le CA125 est élevé (> 35 U/mL) dans environ 50% des patientes atteintes de cancers ovariens de type séreux au stade I et dans environ 90% des patientes aux stades plus avancés de la maladie (Meden *et al.*, 1998). Le CA125 varie énormément selon le cycle ovarien et autres facteurs physiologiques lors de conditions bénignes ou d'évènements biologiques tels que menstruation et grossesse (Meden *et al.*, 1998). Il existe également d'autres sources de variabilité du niveau de CA125, comme la variabilité biologique individuelle chez différentes femmes ou la variabilité dans différentes méthodes du dosage, contribuant ainsi à un large éventail possible de faux positifs et de faux négatifs lors de l'interprétation du taux de CA125. L'analyse sanguine du CA 125 n'est donc généralement pas très fiable, et ne peut servir qu'à titre indicatif, seulement lorsqu'elle est accompagnée d'autres examens pour le dépistage et le diagnostic du carcinome ovarien chez des femmes présentant des symptômes persistants.

Le CA 15-3 "Cancer Antigen 15-3" quant à lui, est une protéine produite par une multitude de cellules, et en particulier par les cellules cancéreuses du sein. Elle représente le marqueur sérique le plus utilisé dans les cancers du sein. Le dosage du CA 15-3 cependant n'est pas utilisé pour diagnostiquer un cancer du sein, ni pour en faire un dépistage précoce. En revanche, il est efficace pour vérifier la réaction du patient suite à un traitement de cancer du sein : le dosage permet de donner des indications quant à l'efficacité du traitement, ou à la survenue d'une récurrence. Une hausse du taux du CA 15-3 peut indiquer des affections cancéreuses tels que : cancer de l'ovaire, du poumon, de l'estomac, du pancréas, du foie. Néanmoins, Une hausse de taux de CA 15-3 peut aussi signifier la présence d'affections non cancéreuses tels que : une maladie bénigne du sein ou de l'ovaire, une maladie inflammatoire pelvienne, une maladie du foie (cirrhose, hépatite), une endométriose ou simplement une grossesse (le niveau de CA 15-3 peut augmenter au dernier trimestre) ou un allaitement en cours (Passeport santé, 2015).

I.6. Etiologie des cancers

De nombreux facteurs de risque des cancers du sein et de l'ovaire ont été incriminés ; il s'agit de :

I.6.1. L'âge

Certaines études ont montré que seulement 20% des femmes de moins de 50 ans sont touchées par le cancer du sein alors que le risque de développer cette maladie est multiplié par 4 chez les femmes de plus de 50 ans. Ce chiffre est seulement de 10% quand la femme est âgée de moins de 35 ans. Ainsi, plus une femme prend de l'âge, plus le risque d'apparition du cancer du sein augmente. Ceci s'explique par le fait que plus on prend de l'âge, plus il y aura une accumulation des mutations aléatoires au niveau de l'ADN qui expliquent la survenue des cancers. (INCA, 2018).

I.6.2. L'hérédité

Seulement 5% des cancers sont héréditaires, ceci explique le fait que certaines personnes aient une prédisposition génétique à développer un cancer. En effet, il s'agit, ici, de la transmission d'une mutation génétique essentiellement au niveau des gènes BRCA1 et BRCA2 responsable du développement des cancers du sein et de l'ovaire d'une génération à une autre (Vanstaeval, 2016 ; INCA, 2018).

I.6.3. Imprégnation hormonale endogène et exogène

Il a été démontré que la ménarche précoce (avant 12 ans) ou alors la ménopause tardive (après 55 ans) peuvent augmenter le risque de développer un cancer du sein et de l'ovaire car ces femmes ont été exposées plus longtemps à la sécrétion d'œstrogène (Société canadienne du cancer, 2018 ; Reed *et al.*, 2014). D'autre part, des études réalisées par les chercheurs américains ont montré

clairement que l'usage de la pilule contraceptive entre 20 et 49 ans pendant plus de 5 ans, augmente le risque de développer un cancer du sein (Société canadienne du cancer, 2018 ; INCA, 2018).

I.6.4. Obésité et facteurs environnementaux

Plusieurs études américaines ont montré que l'obésité accroît le risque de développer un cancer du sein chez des femmes âgées (> 50 ans). D'autres facteurs tels que l'inactivité physique, la consommation importante de viandes rouges peuvent également augmenter le risque d'apparition d'un cancer ou alors accélérer son développement (Société canadienne du cancer, 2018).

L'alcool accroît la synthèse d'œstrogène. Ainsi, même une consommation faible augmente le risque d'apparition de cancer (Société canadienne du cancer, 2018).

Actuellement, plusieurs études ont démontré que le risque de cancer peut être augmenté d'environ 2 % par l'usage des savons, lessives, pesticides, cosmétiques qui contiennent la plupart du temps des conservateurs du type benzène qui accélèrent la production d'œstrogènes. (Ayse, 2018).

I.7. Traitement des cancers

Les traitements du cancer et la probabilité de guérison d'une patiente dépendent du stade auquel le cancer a été diagnostiqué. Bien vrai que la plupart des cancers soient détectés à un stade avancé, les moyens de traitements sont organisés en 4 grands axes : la chirurgie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et la radiothérapie.

I.7.1. La chirurgie

Il s'agit d'une prise en charge classique qui consiste à enlever la tumeur par voie chirurgicale. La chirurgie reste la technique la plus décisive dans la prise en charge des cancers puisqu'elle permet à la fois d'enlever la tumeur et de limiter le risque de récurrence. Elle peut être conservatrice ou totale ; le choix de la chirurgie va dépendre de plusieurs facteurs : la taille, l'emplacement, le stade de la tumeur mais aussi de l'état de santé de la patiente.

I.7.2. La radiothérapie

Il s'agit d'un traitement ciblé souvent utilisé à la suite d'une chirurgie. Elle permet de détruire les cellules cancéreuses restantes une fois que la tumeur a été enlevée et permet donc de réduire considérablement le risque de récurrence surtout lorsque la chirurgie est conservatrice. Elle consiste en l'utilisation des rayonnements ionisants pour détruire la prolifération des cellules cancéreuses. L'objectif principal étant d'irradier la zone où se trouve la tumeur tout en conservant les zones saines. Il existe deux types de radiothérapie :

- **La radiothérapie externe** qui consiste à envoyer des rayonnements sur une zone à traiter à partir d'une source externe ;
- **La curiethérapie** qui consiste à introduire des tuyaux directement à l'intérieur de la tumeur ou au niveau de la zone où se trouve la tumeur. C'est donc une technique qui permet d'irradier de façon très précise la zone concernée (Ayse, 2018).

I.7.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie permet globalement d'empêcher la multiplication des cellules cancéreuses. C'est en effet ; un ensemble de médicaments formés de plusieurs familles et qui agissent au niveau de la division cellulaire. La chimiothérapie est dite cytotoxique car elle a pour but de tuer les cellules cancéreuses, d'empêcher la formation des métastases et d'améliorer la qualité de vie de la patiente. Dans ce groupe, on retrouve :

- **Les médicaments agissant au niveau de l'ADN**

Ce sont des médicaments qui ont une grande réactivité chimique qui, en établissant des liaisons covalentes avec l'ADN, inhibent la synthèse des protéines et donc perturbent la division cellulaire. Comme exemple nous pouvons citer : les antracyclines et les platines.

- **Les antimétabolites**

Il s'agit des molécules qui vont inhiber la synthèse de l'ADN en inhibant la synthèse des acides nucléiques. Exemples des antifoliques, antipirimidine et les antipuriques.

- **Les anticancéreux agissant au niveau du fuseau mitotique**

Ce sont des molécules qui vont inhiber la polymérisation des tubulines en microtubule mais qui vont également dépolymériser des microtubules. Ainsi, la mitose est bloquée en phase de métaphase.

- **Les inhibiteurs du protéasome**

En effet, celui-ci est un complexe qui joue un rôle dans le renouvellement des protéines. L'inhibition du protéasome empêche ce renouvellement et perturbe l'homéostasie en provoquant la mort de la cellule cancéreuse.

I.7.4. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie n'est active que sur des cancers sensibles aux hormones. Le but de ce type de traitement est d'empêcher l'action stimulante des œstrogènes et des progestérones dans le développement des cancers œstrogène-dépendants. L'hormonothérapie systémique consiste à utiliser des médicaments qui prendront la place des hormones au niveau des récepteurs sur lesquels se fixent celles-ci. Le but est d'empêcher l'hormone de se lier au récepteur soit en modifiant le récepteur (antagoniste compétitif) soit en se fixant dessus (antagoniste nul). Ainsi, la tumeur ne pourra pas proliférer. Le choix des médicaments se fait en fonction de la situation clinique et de l'âge des

patientes. Chez la femme non ménopausée, les anti-œstrogènes sont le plus souvent proposés comme premier traitement pour une durée de 5 ans, les agonistes de la LH-RH sont envisageables au cas par cas, sur une durée de 3 à 5 ans » (INCA, 2018).

I.7.4.1. Les antiœstrogènes

Cette classe de médicament agit en se fixant au niveau du récepteur aux œstrogènes se trouvant sur la tumeur et donc empêchent l'interaction récepteur- œstrogène. D'après l'INCA, il existe deux grands types d'anti-œstrogènes :

- Les SERM ou "Selective Estrogen Receptor Modulators"
- Les SERD ou "Selective Estrogen Receptor Degradation"

Parmi les SERM, le tamoxifène est le plus connu, il s'agit d'un médicament de référence utilisé dans le cas de cancer hormono-sensible chez la femme. Il agit en bloquant le récepteur aux œstrogènes. Son mode d'action consiste à se fixer au niveau du récepteur aux œstrogènes de la tumeur empêchant la fixation de cette hormone. Ainsi, il n'y aura pas de transcription de l'ADN dans ces cellules cancéreuses qui commenceront à « mourir », la tumeur devrait donc régresser.

I.7.4.2. Les inhibiteurs de l'aromatase

Les inhibiteurs d'aromatase ont pour rôle d'inhiber la synthèse de l'aromatase qui ne transforme plus les androgènes en œstrogènes. Ainsi, il y a moins d'œstrogènes dans le sang qui pourront se lier aux récepteurs aux œstrogènes. La croissance des cellules cancéreuses sera donc stoppée. Les inhibiteurs de l'aromatase les plus fréquemment utilisés sont l'anastrozole, le létrozole et l'émémestane.

I.7.4.3. Les analogues de la LH-RH

En effet, l'action de ces analogues ont lieu au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus sécrète de façon pulsatile la GnRH qui va agir au niveau de l'hypophyse qui, à son tour secrétera la LH. Cette dernière stimule les ovaires qui synthétisent des œstrogènes. Les analogues de la LH-RH ont pour rôle d'hyper stimuler l'hypophyse qui au bout d'un moment arrêtera de sécréter la LH. Il n'y aura donc plus de stimulation des ovaires et de synthèse des œstrogènes

I.7.5. Thérapies ciblées

Selon les particularités associées aux différents sous-types de cancer des traitements ciblés peuvent être envisagés. Ces thérapies agissent au niveau d'une cible précise de la cellule cancéreuse (récepteur, protéine) et évitera donc de détruire les cellules saines. Dans le cas des patients triple négatifs par exemple, le manque de cibles thérapeutiques a poussé la recherche vers le développement de thérapies ciblant des molécules surexprimées dans les cellules tumorales. Parmi les molécules

ciblées, on retrouve par exemples le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, certaines protéines impliquées dans les mécanismes de réparations, le facteur de croissance épidermique, certaines protéines de la voie de signalisation (Brouckaert *et al.*, 2012). Examinons quelques cas :

❖ Cas du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) joue un rôle majeur sur l'apport en oxygène aux tissus corporels, une étape essentielle à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Une forte expression du VEGF est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Liang *et al.*, 2006). Les inhibiteurs de l'angiogenèse forment donc une stratégie thérapeutique intéressante pour contrer la progression tumorale. Le bevacizumab, par exemple, est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF.

❖ Cas du Poly (ADP-ribose) polymérase

La poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) est une protéine nucléaire abondante appartenant à une famille d'enzymes permettant la poly (ADP-ribosylation) de protéines liant l'ADN. De par son rôle clé dans la réparation de l'ADN, la famille des PARPs constitue une bonne cible thérapeutique contre le cancer. Utilisé en monothérapie, ils auraient le potentiel d'induire l'apoptose dans certains cancers en raison d'une forte accumulation de dommages de l'ADN (Liu et Silver, 2010).

I.7.6. Cas du Malondialdéhyde comme paramètre de suivi de l'efficacité thérapeutique

Une augmentation significative du taux de MDA ainsi qu'une diminution du système d'antioxydants indiquent un niveau élevé de stress oxydatif et de niveaux plus faibles de défenses antioxydantes. Cet événement joue un rôle important dans le développement de la tumeur et la pathogenèse qui résulte de mutations géniques causées par des niveaux accrus de MDA (Bhattacharjee *et al.*, 2018). Un effet opposé pourrait contribuer à un équilibre pro-oxydant et antioxydant, rétablissant l'homéostasie et optimisant ainsi l'état du patient. C'est ainsi que les études réalisées par Mustafa *et al* (2019) ont étudié la relation entre le taux de MDA (marqueur de la peroxydation lipidique) après administration du paclitaxel chez des souris ayant développés des tumeurs. De même, à l'issu des travaux de Yerizel *et al* (2019) il ressort que le MDA devrait être utilisée comme indicateur du cancer du sein chez les femmes souvent exposées à des substances cancérigènes afin de détecter et de prévenir le cancer du sein chez ces dernières.

I.8. Phytothérapie anticancéreuse

I.8.1. Historique

L'utilisation des plantes médicinales dans les traitements anticancéreux a suscité l'intérêt des cancérologues depuis la naissance de la chimiothérapie anticancéreuse. Cet intérêt est né en 1934 par l'observation de l'effet antimitotique de la colchicine sur le sarcome greffé de type crocker de la souris (Mathe et Kenis, 1975). Un plus grand intérêt des substances extraites de plantes fut connu après la découverte de l'effet leucopeniant des alcaloïdes de la pervenche en 1957 (Sevenet, 1991). Cela a conduit à l'idée que la plante recelait des substances responsables de cette action, et que ces substances pouvaient agir sur des leucoses, leucémies et d'autres types de cancers. Ainsi entre 1956 et 1974, dans différents laboratoires spécialisés du monde, une moyenne de 5000 extraits de plante a été soumise tous les ans à différents tests dans le but de chercher une activité anticancéreuse. C'est ainsi qu'en 1976, sur les 67500 extraits de plantes, représentant 20525 espèces, qui ont fait l'objet des mêmes recherches, 2787 ont montré une activité antitumorale dans des laboratoires (Taafrout, 1986 ; Schraub et Surowka, 1991).

La recherche sur les plantes médicinales peut à la fois aider les pays en voie de développement à sélectionner des traitements efficaces en évaluant les indications traditionnelles des plantes médicinales mais aussi contribuer à enrichir l'arsenal thérapeutique en permettant la découverte de nouveaux médicaments à base d'extraits végétaux (Quetin-Leclerq, 1990).

I.8.2. Médicaments anticancéreux issus des plantes médicinales

- La podophylline extraite des espèces de *Podophyllum* dont deux dérivés semisynthétiques, le teniposide ou VM26 et l'étoposide ou VP16, sont actuellement parmi les médicaments les plus utilisés en leucémies aiguës et cancer de la vessie (Mathe et Kenis, 1975) ;
- La pervenche de Madagascar a permis l'extraction de deux alcaloïdes, la vinblastine et la vincristine qui sont commercialisées sous les noms de Vélbé R et d'Oncovin R. Ces alcaloïdes sont devenus un atout majeur en chimiothérapie anticancéreuse, notamment contre les leucémies et la maladie de Hodgkin (Schraub et Surowka, 1991 ; Sevenet, 1991) ;
- Parmi les Ellipticines tout d'abord isolées de plantes du genre *Ochrosia*, puis obtenues par hémisynthèse ou synthèse totale, une seule est actuellement utilisée en thérapeutique : l'acétate d'elliptinum (Celpitium R), qui a une activité préférentielle sur les cancers du sein œstrogène-dépendants (Sevenet, 1991).

I.9. Chimioprévention des cancers

La chimioprévention est une méthode de prophylaxie qui consiste à utiliser des molécules d'origine synthétique ou naturelle ne présentant pas d'effet létal mais qui permettent d'empêcher,

voire de bloquer l'apparition et le développement de certaines maladies dont les cancers. Plusieurs études scientifiques ont confirmé les bienfaits des plantes médicinales dans la guérison ou le soulagement de plusieurs cancers. En effet, un nombre important d'études *in vitro* ont montré que les extraits bruts, aqueux ou hydroalcooliques, de quelques plantes médicinales exercent un effet cytotoxique sur différentes lignées de cellules cancéreuses (Rakhi *et al.*, 2011, Zingué *et al.*, 2016). Bon nombre de ces substances naturelles sont des métabolites secondaires, capables d'interagir sur la modulation des signaux mitogènes, de survie cellulaire, d'apoptose, de régulation du cycle cellulaire, d'angiogenèse ou encore sur des processus intervenant dans le développement des métastases, se retrouvent naturellement au sein même de notre alimentation, notamment dans les fruits et les légumes (Gaascht, 2013). Parmi ces agents naturels, on peut citer les flavonoïdes (carottes), les isothiocyanates (choux), les lycopènes (tomates), les indoles, et les organosulfures (ail) (Figure 12). Les isothiocyanates, trouvés dans les légumes de la famille des Brassicacées (choux, brocolis, navets), peuvent stimuler l'activité d'enzymes impliquées dans la détoxification des produits carcinogènes. La vitamine C, présente en grande quantité dans les agrumes (oranges, citrons et pamplemousses), est capable de protéger la membrane et l'ADN de la cellule contre les dommages oxydatifs mais également de stimuler l'activité d'enzymes de détoxification. L'azadirachtine, un terpénoïde isolé à partir des graines de Neem (*Azadirachta indica*) est capable d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF-kB "Nuclear Factor Kappa B", impliqué dans les processus inflammatoires et d'induire la mort des cellules cancéreuses leucémiques (K562) (Schumacher *et al.*, 2010).

déterminant dans la prévention des cancers du sein, du colon et de la prostate (Messina, 1994 ; Barnes, 1995).

I.9.1. *Ficus umbellata* Vahl.

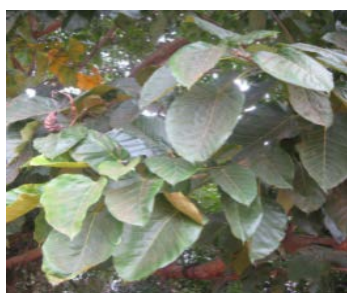
I.9.1.1. Taxonomie de *Ficus umbellata*

Selon le système de classification APG III ("Angiosperms Phylogeny Group"), on a :

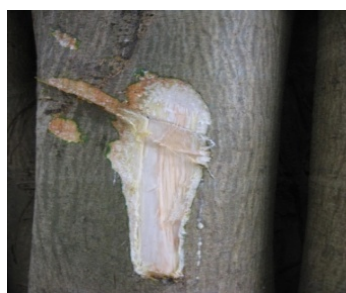
Règne.....	Végétal
Sous règne.....	Trachéobiontes (plantes vasculaires)
Embranchement.....	Angiospermes (plantes à fleurs)
Division.....	Magnoliophyla (plantes à graines)
Classe.....	Magnoliopsida (dicotylédones)
Ordre.....	Rosales
Famille.....	Moraceae
Espèce.....	<i>Ficus umbellata</i>

I.9.1.2. Caractéristiques botaniques

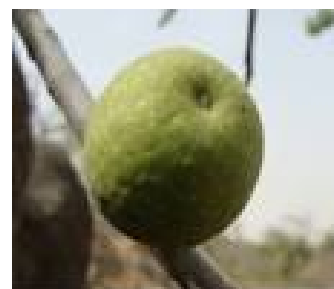
Ficus umbellata Vahl de son nom vernaculaire "tol'1" (en ewondo) ou "mewed" (en giziga), est un arbre de la famille des Moraceae, qui mesure de 6-10 m de haut et possède environ 15 cm de diamètre. Il possède un tronc divergent, lisse, gris avec des écorces à tranche jaunâtre exsudant du latex blanc devenant brunâtre en séchant. Ses feuilles sont alternes, glabres sur les deux faces, disposées en spirale et ovales. C'est une plante des régions tropicales, ces fruits sont consommés et très appréciés (Arbonnier, 2009).



Feuilles



Tronc



Fruit

Figure 13: Photos de *Ficus umbellata* prise par M. Tchatchou Jules a Yaoundé

I.9.1.3. Utilisation traditionnelle

En raison de ses nombreux fruits d'aspect ventru et de leur sécrétion laiteuse, les figiers représentent universellement la fécondité et l'abondance. L'utilisation qu'en font les "Peuls" comme galactogène pour les femmes ou bien comme "multiplicateur" de leur troupeau est largement

répandue dans ces ethnies (Dury, 1991). De plus, les écorces de *F. umbellata* sont utilisées pour soigner l'aménorrhée et bien d'autres troubles liés à la ménopause (Arbonier, 2009).

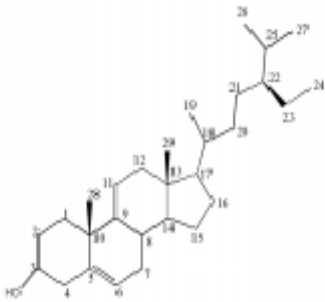
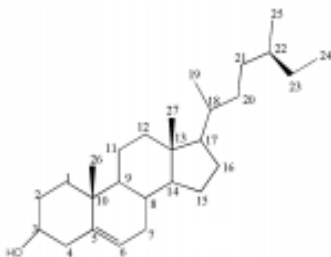
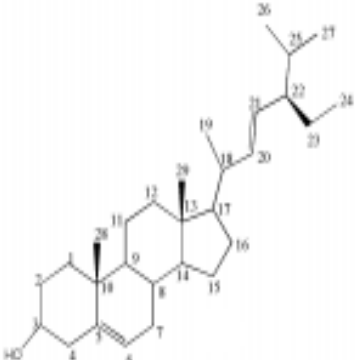
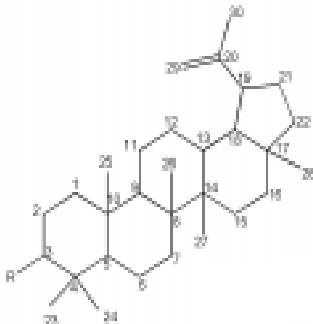
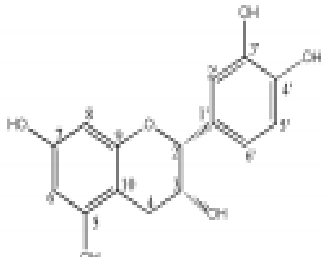
I.9.1.4. Travaux antérieurs

❖ Etudes phytochimiques antérieures et activités biologiques du genre Ficus

Les travaux réalisés sur plusieurs espèces du genre *Ficus* montrent qu'elles sont riches en métabolites secondaires dotées d'activités antioxydantes (Sirisha, 2010 ; Ahoua *et al.*, 2012 ; Oladipo *et al.*, 2017). L'évaluation phytochimique et pharmacologique de plusieurs espèces ont également été évaluée parmi lesquelles : *F. carica* (Gilani *et al.*, 2008), *F. racemosa* (Chandrashekhar *et al.*, 2008), *F. religiosa* (Pandit *et al.*, 2010), *F. microcarpa* (Ao *et al.*, 2008). A titre d'exemple, l'activité cytotoxique des extraits de *Ficus religiosa* et *Ficus benghalensis* réalisée sur les cellules MCF-7 ont montré qu'elle possède un potentiel cytotoxique respectivement avec des CC₅₀ de 101,55 et 72,06 µg/mL (Tulasi *et al.*, 2018). Une autre étude réalisée avec les extraits de *F. carica* a montré un potentiel cytotoxique de ces derniers sur les cellules HeLa (Ghadam *et al.*, 2010).

L'investigation phytochimique de plusieurs espèces du genre *Ficus* a révélé la présence de composés phénoliques, flavonoïdes, alcaloïdes, coumarines, stérols et triterpénoïdes (Chang *et al.*, 2005 ; Lansky et Paavilainen, 2011). L'étude phytochimique réalisée sur *Ficus burtt-davyi*, *Ficus sur Forssk* et *Ficus sycamorous* a révélé que les écorces de *F. burtt-davyi* sont riches en triterpénoïdes pentacyclique (lupéol et acétate de lupéol), en flavonoïdes (catéchine) et les feuilles riches en stérols (β -sitostérol, campestérol et stigmastérol). Les feuilles de même que les fruits contiennent la phaeocophytin A, la lutéine et la α -amyrine (Olumuyiwa, 2017).

Tableau I : Récapitulatif de quelques composés isolés du genre *Ficus*

Molécules	Référence
 <p style="text-align: center;">Sitostérol</p>	Chaturveda et Prakask, 2012
 <p style="text-align: center;">Campestérol</p>	Choi <i>et al.</i> , 2007
 <p style="text-align: center;">Stigmastérol</p>	Chaturvedula et Prakash, 2012
 <p style="text-align: center;">Lupeol</p>	Mohato et Kundu, 1994
 <p style="text-align: center;">Epicatechin</p>	Awolola <i>et al.</i> , 2014

❖ Etudes antérieures et activités biologiques de *Ficus umbellata*

Les travaux réalisés *in vitro* avec les extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* ont modulé de façon significative l'activité des ER α et ER β *in vitro* et *in vivo*. Le test utéroprolifératif réalisé avec ces derniers a montré une activité œstrogénique par augmentation significative de la taille de l'épithélium utérin et vaginal, une diminution significative de l'incidence des bouffées de chaleur chez les rates ovariectomisées (Zingue *et al.*, 2016). La DL₅₀ de *F. umbellata* a été estimée supérieure à 2000 mg/kg. L'extrait aqueux ainsi que le composé majoritaire (7-méthoxycoumarine) isolé de *F. umbellata* ont montré une activité neuroprotectrice chez la rate ovariectomisée (Zingue *et al.*, 2018).

I.10. Généralités sur les méthodes d'évaluation de l'activité antitumorale des extraits de plantes

Plusieurs méthodes sont couramment employées dans le but de déterminer l'activité cytotoxique et antitumorale des extraits de plantes ; lesdites méthodes peuvent être regroupées en méthodes *in vitro* et les méthodes *in vivo*.

I.10.1. Méthodes *in vitro*

La cytotoxicité représente l'un des indicateurs les plus importants pour l'évaluation biologique dans les études *in vitro*. Ces tests de viabilité cellulaire et de cytotoxicité sont basés sur diverses fonctions cellulaires telles que la perméabilité de la membrane cellulaire, l'activité enzymatique, l'adhérence cellulaire, la production d'ATP, la production de co-enzymes et l'activité d'absorption de nucléotides (Ishiyama *et al.*, 1996). Ces tests peuvent être classés en : (i) essais d'exclusion de colorant, (ii) essais colorimétriques ; (iii) essais fluorométriques ; et (iv) dosages luminométriques. Le choix du test utilisé étant important dans l'évaluation du type d'interaction ayant lieu (Slwiska *et al.*, 2016). Les substances testées quant à elles peuvent entraîner une toxicité sur les cellules via différents mécanismes, tels que la destruction des membranes cellulaires, l'inhibition de la synthèse des protéines, la liaison irréversible aux récepteurs, l'inhibition de l'élongation des désoxynucléotides et les réactions enzymatiques (Ishiyama *et al.*, 1996).

Toute évaluation de la cytotoxicité d'une molécule/substances doit suivre un plan bien établi et prendre en compte plusieurs facteurs parmi lesquels :

- Le type cellulaire utilisé pour l'expérimentation : les cellules testées doivent être les plus proches des cellules ou tissus ciblés *in vivo* ;
- Le nombre de cellules à tester afin d'obtenir une réponse physiologiquement recevable et reproductible ;
- La durée de l'exposition à la drogue et les concentrations à tester ;
- Le système de mesure qui permettra de quantifier l'effet sur la culture.

I.10.1.2. Principales méthodes utilisées

On distingue les méthodes colorimétriques et les méthodes fluorométriques.

I.10.1.2.1. Méthodes colorimétriques

Le test d'exclusion de colorant est une méthode qui permet de déterminer l'intégrité de la membrane. Les cellules viables excluent les colorants mais les cellules mortes ne les excluent pas. Parmi les colorants utilisés, on peut citer : l'éosine, le rouge Congo, l'érythrosine B et le bleu trypan (Bhuyan *et al.*, 1976 ; Krause *et al.*, 1984).

Les tests colorimétriques sont basés sur la mesure d'un marqueur biochimique dans le but d'évaluer l'activité métabolique des cellules. Les réactifs utilisés développent une couleur en réponse à la viabilité des cellules, permettant ainsi une mesure colorimétrique de la viabilité cellulaire par spectrophotométrie (Präbst *et al.*, 2017). Les plus utilisés étant les tests de MTT et de MTS pour les tests de cytotoxicité.

❖ Le MTT

Le test au MTT (bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2-5-diphényltétrazolium) est l'un des tests colorimétriques le plus couramment utilisé pour évaluer la cytotoxicité ou la viabilité cellulaire (Mosmann, 1983). Ceci au travers de la détermination de la fonction mitochondriale des cellules au travers de l'activité d'enzymes mitochondriales telles que la succinate déshydrogénase (Stone *et al.*, 2009). Dans ce test, le MTT est réduit au violet de formazan par le NADH ; produit pouvant être quantifié par absorbance de la lumière à une longueur d'onde spécifique (Stone *et al.*, 2009 ; Aslantürk *et al.*, 2017).

❖ Le MTS

Le test au MTS (5- (3-carboxyméthoxyphényl) -2- (4,5-diméthyl-thiazole) -3- (4-sulfophényl) tétrazolium), est un test colorimétrique basé sur la conversion d'un sel de tétrazolium en formazan par l'activité mitochondriale de cellules vivantes. La quantité de formazan produit est dépendante du nombre de cellules viables en culture et peut être mesurée avec un spectrophotomètre (Özlem, 2017).

I.10.1.2.2. Les méthodes fluorométriques

Les tests fluorométriques de viabilité cellulaire et de cytotoxicité sont faciles à réaliser avec l'utilisation d'un microscope à fluorescence, d'un fluoromètre, d'un lecteur de microplaque à fluorescence ou d'un cytomètre à flux. Ils offrent de nombreux avantages par rapport aux tests colorimétriques. Le test fluorométrique le plus utilisé est celui d'"AlamarBlue".

❖ Le test d'"alarBlue"

Le test d'alarBlue est également connu sous le nom de réduction de la résazurine. Il est basé sur la conversion du colorant bleu non fluorescent résazurine, en rose fluorescent, resorufine par les enzymes mitochondriales et d'autres enzymes telles que les diaphorases (O'Brien *et al.*, 2000) ; la quantité de resorufine produite est dépendante du nombre de cellules viables. Le ratio de cellules viables pouvant être quantifié à l'aide d'un fluorimètre équipé d'un lecteur de microplaques avec un ensemble filtre à excitation à 560 nm/émission à 590 nm. Le test d'"alarBlue" est relativement peu coûteux et plus sensible que les tests colorimétriques (O'Brien *et al.*, 2000 ; Riss *et al.*, 2004). En outre, il peut être multiplexé avec d'autres méthodes telles que la mesure de l'activité de la caspase afin de recueillir davantage d'informations sur le mécanisme de cytotoxicité (Özlem, 2017).

I.10.2. Méthodes *in vivo* : Modèles d'induction des tumeurs

Les composés cancérigènes peuvent être regroupés en trois grandes catégories : Les composés métalliques (arsenic, plomb et cadmium), les composés hormonaux et les composés chimiques.

Les métaux comme le plomb développent différentes tumeurs en passant par différents processus tels que : endommagent l'ADN, prévention des systèmes de synthèse et réparation, formation de radicaux libres, augmentation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de facteurs suppresseurs de tumeurs tels que P53 (Silbergeld *et al.*, 2000 ; Antila *et al.*, 1996).

L'augmentation des niveaux d'hormones d'autres part, entraîne des effets tumorigènes (Morgentaler *et al.*, 2006) au niveau des tissus sensibles aux hormones, tels que la prostate sensible à la testostérone (Dickson *et al.*, 1986) le sein et les ovaires sensibles aux œstrogènes. Les récepteurs d'œstrogènes (α et β) présent au sein des cellules agissent différemment selon les niveaux d'œstrogènes. Le récepteur aux œstrogènes β inhibe les effets induits par les œstrogènes en induisant un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2, tandis que le récepteur des œstrogènes α induit le développement des tumeurs au travers d'une stimulation accrue du taux de l'épiderme de facteurs de croissance (EGF) et de radicaux libres (Paruthiyil *et al.*, 2004). Mense et ses collaborateurs (2008) ont utilisé une dose de 3 mg/kg d'œstradiol (17 β - œstradiol) par administration sous-cutanée pour induire le cancer du sein, permettant ainsi d'observer des lobules hyperplasiques après 7 jours et le développement de tumeurs après 120 jours.

Les Composés chimiques quant à eux utilisés pour induire des tumeurs nécessitent des caractéristiques telles qu'une forte tumorigénicité, un tissu cible spécifique, une longue demi-vie, disponibilité et capacité de bioprocédés (Akbakari *et al.*, 2018). Plusieurs modèles sont utilisés *in vivo* pour l'induction des cancers mammaires et ovariens par l'administration des produits chimiques. Parmi ceux-ci, se distingue le DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracène), le NMU (n-méthyl-n-

nitrosourea), PHIP (2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine) et le MC (3-méthylcholanthrène).

I.9.2.1. Modèle d'induction par le DMBA (7, 12-diméthylbenz(a)anthracène)

Ce composé appartient à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), qui est utilisée comme promutagène, procarcinogène, et tératogène (Digiovanni *et al.*, 1980). Son métabolisme hépatique dépend de systèmes mono-oxygénase liés au cytochrome P450, au travers duquel ses métabolites sont transférés sur les tissus cibles. Les principaux métabolites produits par ce carcinogène sont le 7-hydroxy méthyle, 7-OHM-12-MBA et 7,12-diOHMBA capable de former des dérivés d'époxyde. Ce composé perturbe la réparation de l'ADN au travers de dépurination, induisant ainsi la mort de la cellule et le développement tumoral des tissus du sein (Gao *et al.*, 2008). Selon plusieurs travaux, la dose oncogénique de ce composé est comprise entre 50 à 80 mg/kg généralement administré par gavage, par voie intrapéritonéale, sous-cutanée et intraveineuse en dose unique (Akbakari *et al.*, 2018).

Le développement d'une tumorigénese ovarienne quant à elle se fait par l'imprégnation d'une suture de DMBA au niveau de l'ovaire. Dans une étude réalisée en 1984, une suture imprégnée de DMBA a été utilisée pour induire une tumorigénese ovarienne à l'issue duquel seulement une souris sur trente a développé un carcinome épithélial (Jacobs *et al.*, 1984). Nishida *et al.* (1998) a répliqué cette expérience en appliquant directement une suture imprégnée de DMBA sur l'ovaire de rat ; près de 50% des rats ont développé des tumeurs ovariennes en 36 semaines, dont la plupart étaient des carcinomes. Plusieurs travaux de recherche utilisent ce modèle d'induction pour le développement de carcinome ovariens (Keith *et al.*, 2005 ; Made *et al.*, 2019).

I.9.2.2. Modèle d'induction par le NMU (N-méthyl-N-nitrosourea)

Ce composé provoque directement une alkylation de l'ADN et perturbe sa synthèse et/ou sa réparation. Il possède un potentiel tumorigène, tératogène et mutagène en fonction de l'âge, de la dose, de la fréquence et du mode d'administration. Plusieurs études ont montré que la dose oncogénique de ce composé allait de 50 à 70 mg/kg sous forme de doses uniques ou doubles par gavage, par voie intrapéritonéale, sous-cutanée et intraveineuse (Akbakari *et al.*, 2018).

I.9.2.3. Modèle d'induction par la PHIP (2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine)

Ce composé se trouve dans les aliments frits, en particulier viandes et poissons, et dans la fumée de cigarette en tant que substances cancérigènes affectant les tissus mammaires, du côlon et de la prostate (Nakatsugi *et al.*, 2000 ; Suzui *et al.*, 1977). C'est une amine hétérocyclique, également connu comme un mutagène et composé cancérigène qui affecte directement l'ADN. La dose

expérimentale est de 80 à 100 mg/kg, administrée par gavage, généralement 4 fois par semaine pendant 2 semaines. Cependant, cette dose a été utilisée différemment dans différentes études en termes de fréquence d'administration (Suzui *et al.*, 1977 ; Ghoshal *et al.*, 1994).

I.10. Etat de l'art sur le cancer

Malgré les progrès considérables de la recherche, vis-à-vis de la détection, le diagnostic et la thérapie / traitement du cancer (chimiothérapie, chirurgie, radiothérapie, médecine de précision ou thérapie ciblée chez certains patients), le cancer métastasé avancé reste incurable. Dans le même ordre, le cancer en général et principalement celui du sein et de l'ovaire constituent des défis majeurs et continuent à faire des ravages sur la population mondiale (Ghate *et al.*, 2014). La récurrence de la maladie, la résistance aux médicaments, le coût élevé du traitement, la variabilité de l'efficacité et les effets secondaires graves des traitements actuellement disponibles constituent les principaux problèmes cliniques non résolus. Le manque de médicaments anti-tumoraux efficaces capables de surmonter la résistance et la diminution des effets secondaires associés au traitement sont les défis les plus importants dans le domaine (Ateba *et al.*, 2018). L'augmentation de la morbidité et de la mortalité dues au cancer du sein humain ces dernières années a conduit à un nombre accru d'études sur les chimiothérapies et l'identification de nouveaux agents anticancéreux visant à obtenir des médicaments plus efficaces. Les nouveaux cas de cancer du sein et les décès estimés dans le monde étaient respectivement de 18,1 millions et 9,6 millions en 2018 (CIRC, 2018) et un fardeau de plus en plus lourd est attendu au cours des prochaines décennies, à moins que de nouvelles stratégies plus efficaces ne soient développées. En conséquence, la recherche sur de nouveaux agents anticancéreux naturels est un axe important pour l'amélioration de la thérapie anticancéreuse.

MATERIEL ET METHODES

II. 1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Lignées cellulaires

Les cellules utilisées dans cette étude ont été achetées à ATCC "American Type Culture Collection" et la banque des cellules de Rio de Janeiro ; il s'agit de :

- Deux lignées cellulaires cancéreuses mammaires à l'instar de MCF-7 (adénocarcinome mammaire, ER-positif) et MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire, ER-négatif).
- Trois lignées cellulaires cancéreuses ovariennes : PA-1 (tératocarcinome ovarien, ER et PR positifs), OAW-42 (carcinome ovarien, ER positif), Hey (carcinome ovarien, ER positif).
- Une lignée cellulaire non-tumorale NIH-3T3 (fibroblastes murins).

II.1.1.2. Matériel animal

Les animaux utilisés dans cette étude étaient des rats femelles de souche Wistar, âgées de 30 à 35 jours et pesant entre 60 à 75 g. Ces rattes ont été élevées dans des cages en plastique à l'animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I. Elles ont été maintenues à température ambiante sous aération suffisante et un cycle lumineux naturel (diurne/ nocturne). Elles ont eu un libre accès à de l'eau potable et à un régime alimentaire standard de laboratoire dépourvu de soja (Ssniff R10) dont la composition était la suivante : maïs (42%), farine d'os (3%), blé (22%), farine de poisson (19%), tourteau de palmiste broyé (4%), chlorure de sodium (0,75%), cacahuètes (9%) et complexe multivitaminé (Olivitazol® 0,25%).

Les rats femelles ont été traitées conformément aux directives et procédures en matière de bioéthique animale du Comité d'Ethique National Institutionnel du Cameroun, qui a adopté toutes les procédures recommandées par l'Union européenne en matière de protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (CEE Council 86/609).

II.1.1.3. Matériel végétal

Le matériel végétal était constitué des écorces de *F. umbellata* récoltées à Yaoundé (Centre, Cameroun). L'identification et l'authentification de l'échantillon botanique ont eu lieu à l'Herbier National du Cameroun (HNC) en comparaison au spécimen de référence N^o 99 / HNC.

II.1.2. Milieux de culture

Trois milieux de culture ont été utilisés :

- ❖ Le milieu DMEM "Dulbecco's Modified Eagle Medium" supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau ou "fœtal bovine serum" (FBS), 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine pour la culture des cellules ;

- ❖ Le milieu RPMI-1640 "Roswell Park Memorial Institute" supplémenté avec 10% de FBS, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, pour la culture des cellules ;
- ❖ Le milieu RPMI-1640 supplémenté de 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine ; pour la révélation.

II.1.3. Substances chimiques et réactifs

Le FBS, la trypsine et les antibiotiques (pénicilline, streptomycine) ont été achetés chez GIBCO (Grand Island, USA). Le 17β- œstradiol benzoate [(Estr-1,3,5 (10) -trien-3,16α, 17β-triol) a été obtenu de Sigma-Aldrich (Hambourg, Allemagne). L'acide 2- [4- (2-hydroxyéthyl) pipérazin-1-yl] éthanesulfonique (HEPES) a été acheté chez Ludwig Biotechnologia Ltda (Alvorada, Brésil). Le DMBA (7, 12-dimethylbenzanthracène) a été acheté chez Sigma-Aldrich (Stanford, Allemagne). Le bleu de trypan (0,4%), le sel de resazurine, l'acridine orange, le bromure d'éthidium et les milieux de culture cellulaire (DMEM et RPMI) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Le diazépam et la kétamine ont été obtenus de Rotex Medica, (Tritau, Allemagne). Le citrate de tamoxifène (Mylan®) a été acheté chez MYLAN SAS (Saint-Priest, France). Les puits de culture cellulaire spéciaux munis d'une membrane Millicell® 8,0 µm ont été achetés auprès de Merck Millipore LTD (Tullagreen Carrigtwohill, Irlande). Les anticorps primaires spécifiques (PARP, PARP clivé, Akt, pAkt, ERK, pERK et β-actin) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Hamburg, Allemagne) et Cell Signaling Technology Inc (Santa Cruz, Allemagne).

II.1.4. Kits et équipements

▪ Kits

Le kit de Chronolab a été utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques, le kit RNeasy® Plus Mini kit (Qiagen®, Germany) pour l'extraction de l'ARN, le kit SuperScript™ II Reverse transcriptase (Life technology, Allemagne) pour la synthèse de l'ADNc, le kit de détection de l'apoptose ApopNexin™ FITC (Millipore, USA).

▪ Equipements

Un évaporateur rotatif (*Büchi rotavapor R-114*), un lyophilisateur, une colonne de gel de silice (Merck, Darmstadt, Allemagne), une ampoule à décanter, un appareil UV (*GeNei™, UVITEC, Cambridge*), ; un spectrophotomètre, un lecteur de lames (Bio-rad Laboratories Inc, USA) , un incubateur à 5% CO₂ (Schnakenberg GmbH, Lubeck, Allemagne), un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS55 (Becton Dickinson, San José, CA) une hotte à flux laminaire (Biohazard, SPIE; Building technology & service solutions, Hamburg, Allemagne), une centrifugeuse (Hettich Lab technology, Tuttlingen, Allemagne), un microscope inversé (Zeiss, Axiovert 135M, Allemagne), un lecteur de microplaques (BioTeK; Instruments, Inc, USA), une PCR à cycle thermique (Biometra®, Göttingen,

Allemagne), un transblot (Bio- Rad, USA), un thermomixeur compact (Werner Hassa GmbH, Allemagne), et un engin ADN OPTICON 2 (Bio-Rad laboratories GmbH, München, Allemagne).

II.2- Méthodes

II.2.1- Organigramme méthodologique

La Figure 13 ci-dessous est un résumé schématique de l'organigramme de la méthodologie expérimentale permettant une compréhension de l'ensemble du travail. Le travail a débuté par une quantification phytochimique de quelques classes de métabolites secondaire présent dans nos différents extraits suivis de l'évaluation du potentiel cytotoxique des extraits de *F. umbellata* sur les lignées cellulaires. Puis une étude *in vivo* qui a permis d'évaluer les effets protecteurs des extraits chez les rates de souches Wistar dans un modèle de cancer. Ensuite, l'élucidation du mécanisme d'action anticancéreux de l'extrait au méthanol a été évalué et enfin, un fractionnement bio-guidé a été réalisé suivi de l'élucidation du mécanisme d'action du composé le plus actif.

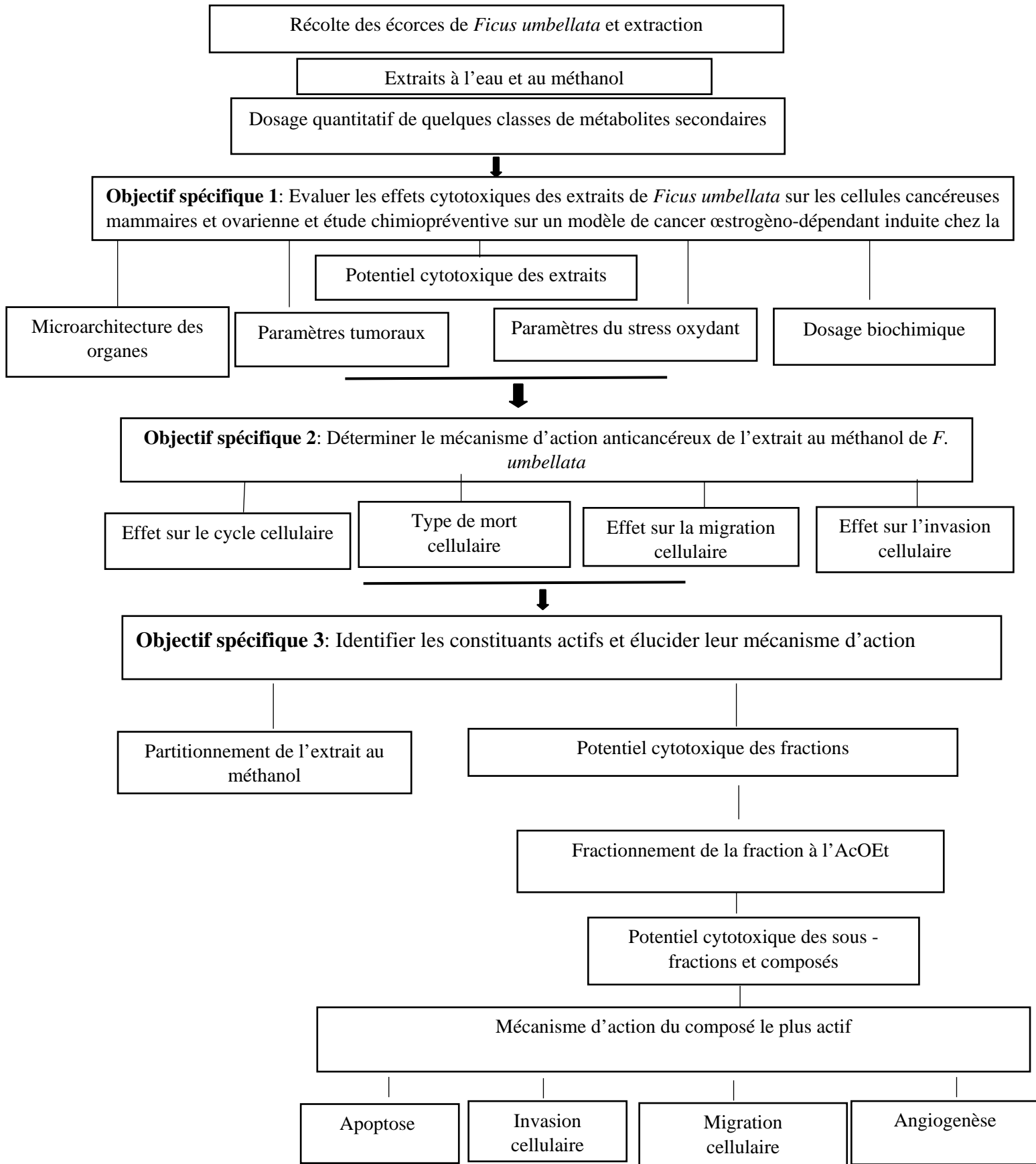


Figure 14: Organigramme des différentes activités de recherche réalisées.

II.2.2. Préparation des extraits de *Ficus umbellata*

Les écorces du tronc de *F. umbellata* ont été séchées à température ambiante (25⁰C) puis découpées, et broyées à l'aide d'un broyeur à hélice. Deux types d'extraction par macération ont été réalisées à partir de la poudre des écorces de *Ficus umbellata* : une extraction aqueuse et une extraction au méthanol (Figure 14).

- ❖ L'extraction aqueuse a consisté à tremper la poudre de *F. umbellata* dans de l'eau distillée (2 kg de poudre dans 10 L d'eau). Le mélange a été macéré pendant 24 h à température ambiante à l'issue duquel l'ensemble a été filtré à l'aide du papier Whatman N⁰4. Le surnageant obtenu a été lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur
- ❖ L'extraction au méthanol a consisté à tremper la poudre de *F. umbellata* dans du méthanol 99% (2,7 kg de poudre dans 10 L de solvant) pendant 72 h. Après macération à température ambiante, le mélange a été filtré à l'aide du papier filtre Whatman n^o4. Le filtrat obtenu a été concentré à l'évaporateur rotatif à 40 °C, sous une pression de 337 mbar puis séché à l'air libre, à température ambiante jusqu'à évaporation complète du solvant.

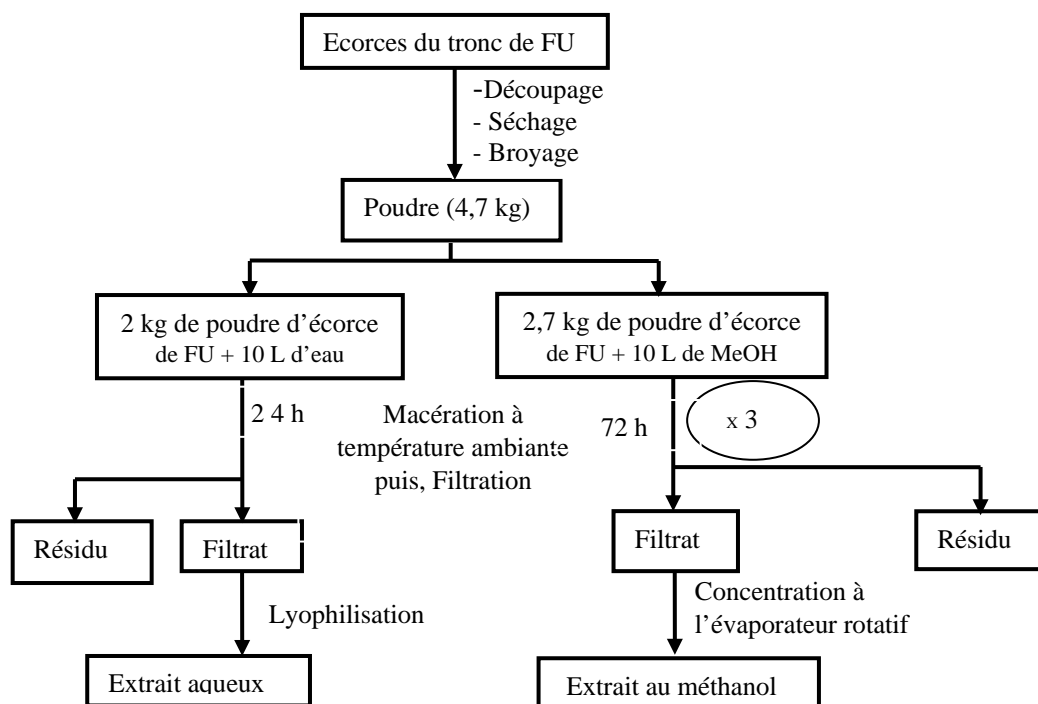


Figure 15: Protocole d'extraction des écorces de *F. umbellata* à l'eau et au méthanol

Les rendements d'extraction ont été calculés d'après la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu (g)}}{\text{Masse de la poudre initiale (g)}} \times 100$$

II.2.3. Dosage quantitatif de quelques classes de métabolites secondaires

II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin Ciocalteu

▪ Principe

Les polyphénols en milieu alcalin réduisent les acides phosphotungstiques et phosphomolybdique du réactif de Folin-Ciocalteu en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène qui absorbent la lumière à 765 nm (Zhishen *et al.*, 1999).

▪ Mode opératoire

Au mélange réactionnel contenant 200 µL d'extrait à la concentration de (1 mg/mL), 800 µL du réactif dilué de Folin Ciocalteu fraîchement préparé et 2 mL de 7,5 % du carbonate de sodium ont été ajoutés. Le mélange final a été dilué avec 7 mL d'eau déionisée et gardé à l'obscurité à température ambiante pendant 2 h. L'absorbance a été lue à 765 nm.

▪ Expression des résultats

La teneur en phénols totaux a été calculée à partir de l'équation issue de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en mg d'équivalents de quercétine par g d'extrait sec (mg eq quercétine /g d'extrait sec).

II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

▪ Principe

Le chlorure d'aluminium forme avec les groupements C-4 et C-3 ou C-5 hydroxy des flavones et flavonols des complexes acides stables. Il forme également des complexes acides labiles, avec les groupes orthodihydroxy dans le cycle benzénique A- ou B- des flavonoïdes (Zhishen *et al.*, 1999).

▪ Mode opératoire

Dans un tube à essai, 0,1 mL d'extrait à 100 µg/mL a été ajouté à 0,3 mL d'eau distillée suivi de 0,03 mL de NaNO₂ (5%). Après 5 min d'incubation, 30 µL d'AlCl₃ (10%) ont été ajoutés et le mélange incubé à nouveau pendant 5 min. Le mélange réactionnel a été traité avec 0,2 mL de NaOH 1 mM et le volume de chaque tube a été complété avec 1 mL d'eau distillée et l'absorbance a été mesurée à 510 nm.

▪ Expression des résultats

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir de l'équation issue de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en mg d'équivalents de quercétine par g d'extrait sec (mg eq quercétine /g d'extrait sec).

II.2.3.3. Dosage des flavonols

- **Principe**

Les flavonols réagissent avec l' AlCl_3 pour donner un chromophore mesurable à 430 nm (Kumaran et Karunakaran, 2007)

- **Mode opératoire :**

Dans un tube à essai contenant 2 mL d'extrait de concentration 0,1 mg/mL, 2 mL d' AlCl_3 2% et 3 mL de solution d'acétate de sodium (50 g/L) ont été ajoutés et le mélange incubé pendant 2 h 30 min à 20⁰ C. L'absorption a été lue à 430 nm.

- **Expression des résultats**

La concentration en flavonols a été calculée à partir de l'équation issue de la gamme d'étalonnage établie avec la quecertine et est exprimée en mg d'équivalents de quecertine par g d'extrait sec (mg eq quecertine /g d'extrait sec).

II.2.3.4. Dosage des alcaloïdes

- **Principe**

Les alcaloïdes contenus dans l'échantillon réagissent avec le chlorure de fer (FeCl_3), chlorure d'hydrogène (HCl) et le 1,10-Phenanthroline pour former une solution de couleur rouge qui absorbe à 510 nm, l'intensité de la coloration étant proportionnelle à la quantité d'alcaloïdes présents dans le milieu (Hazra, 2008).

- **Mode opératoire**

Dans un tube à essai, 1 mL de la solution d'extrait (1 mg/mL), 0,1 mL de FeCl_3 (2,5 mM FeCl_3 dans 0,5 M de HCl) a été introduit, suivi de l'ajout de 0,1 mL du 1,10-phenanthroline. Après incubation pendant 30 minutes à 70°C, l'absorbance a été mesurée à 500 nm.

- **Expression des résultats**

La teneur en alcaloïdes contenus dans l'extrait a été déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage de la berbérine et est exprimée en mg eq berbérine/g d'extrait sec.

II.2.4. Evaluation des effets cytotoxiques

Le potentiel cytotoxique des extraits, fractions, sous-fractions et composés purs de *Ficus umbellata* a été évalué sur deux lignées de cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-231 et MCF-7), trois lignées de cellules cancéreuses ovariennes (OAW-42, PA-1 et Hey) et sur une lignée de cellules de fibroblaste murin (NIH-3T3). La méthode de réduction de la resazurine (O'Brien *et al.*, 2000) a été utilisée pour le test cytotoxique des extraits et la réduction du sel de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)

(Barltrop *et al.*, 1991) a été utilisée pour évaluer le potentiel cytotoxique des fractions, sous-fractions et composés purs. Le paclitaxel a été utilisé comme témoin positif.

II.2.4.1. Culture cellulaire

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau (FBS), 100 U/mL de pénicilline, 100 U/mL de streptomycine. Les cellules MCF-7, PA-1, Hey, OAW-42 et NIH - 3T3 ont été cultivées dans un milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec 10% de FBS, 100 U/mL de pénicilline, 100 U/mL de streptomycine. Ces cultures cellulaires ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère humidifiée (80% d'humidité) à 5% de CO₂ et à pH 7,4. Les cellules d'une culture sub-confluente ont été récoltées en utilisant la trypsine-EDTA puis elles ont été centrifugées à 1500 × g pendant 5 minutes et ensuite resuspendues dans le milieu de culture.

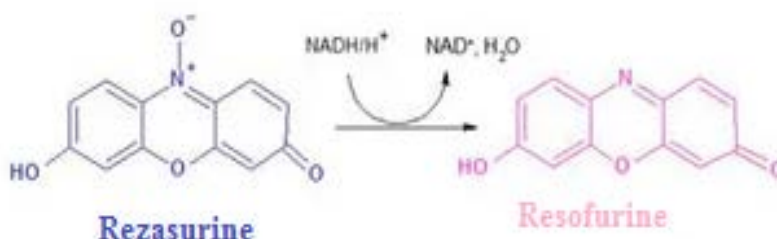
II.2.4.2. Comptage des cellules

Avant d'ensemencer les cellules dans les microplaques, le nombre de cellules viables a été compté en utilisant la méthode du bleu de trypan. Une suspension contenant les cellules et le bleu de trypan au proportion 1 :1 a été mélangé et le comptage a été effectué dans une chambre de Neubauer à l'aide d'un compteur automatique de cellules (Bio-Rad TM 20, Singapore).

II.2.4.3. Méthode de réduction de la resazurine ("AlamarBlue")

- **Principe :**

La résazurine, le constituant actif du réactif "AlamarBlue", est un composé non toxique, qui traverse les membranes cellulaires, de couleur bleue et non fluorescent. Les cellules vivantes, réduisent la résazurine en résorufine de couleur rouge très fluorescent sous l'action des enzymes oxido-réductrices ; caractérisant ainsi qualitativement et quantitativement la viabilité cellulaire (O'Brien *et al.*, 2000).



▪ **Mode opératoire :**

Une suspension cellulaire de densité de 1×10^4 cellules / puits dans 100 μ L de milieu de culture a étéensemencée dans une microplaque de 96 puits et laissée adhérer toute la nuit. Au bout de 24 h, les cellules ont été exposées aux extraits aqueux et méthanolique à des concentrations de : 50 ; 100 ; 200 et 300 μ g / mL et le paclitaxel aux concentrations de : 0,15 ; 0,31 ; 0,63 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 et 40 nM : les microplaques ont ensuite été incubées pendant 24 h. Au bout de 24 h, le milieu de culture contenant les substances a été enlevé puis 100 μ L d'un milieu de culture contenant 10 % "AlamarBlue" a été introduit dans chaque puits. Les microplaques ont ensuite été incubées pendant 2 h et l'intensité de fluorescence a été déterminée par un spectrofluorimètre (Becton Dickinson, CA) avec une excitation à 530 nm et une émission à 590 nm. Le test a été effectué en triplicat et répété 3 fois.

▪ **Expression des résultats**

A partir des densités optiques obtenues à chaque concentration, les pourcentages d'inhibition ont été calculés en utilisant la formule : $\% inhibition = \frac{D.O(témoin) - D.O(test)}{D.O(témoin)}$.

Puis, les courbes doses-reponse representant les pourcentages de viabilité cellulaire en fonction des logarithmes de concentrations ont été tracées. Ensuite, à partir du logiciel GraphPad Prism, les valeurs de concentrations cytotoxiques médianes (CC_{50}) ont été calculées et correspondent aux concentrations des échantillons réduisant de 50 % la viabilité des cellules.

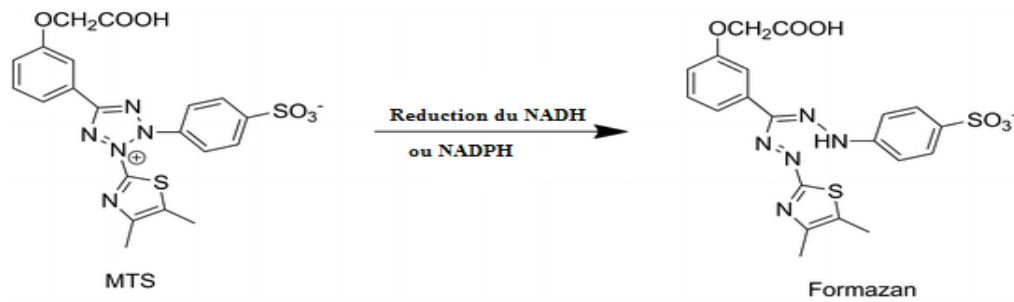
A partir des CC_{50} obtenues avec la lignée non cancéreuse (NIH3T3) et les CC_{50} obtenues avec les différentes lignées cancéreuses, les valeurs des indices de sélectivité (IS) sur les cellules ont été calculées en utilisant la formule suivante :

$$IS = CC_{50}(\text{Cellule non-tumorale}) / CC_{50}(\text{Cellule tumorale})$$

II.2.4.4. Méthode de réduction du sel de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

▪ **Principe**

Les enzymes déshydrogénases NAD(P)H-dépendantes présentes dans les cellules métaboliquement actives entraînent la réduction du composé tétrazolium MTS de couleur jaune en formazan, produit de couleur rosée soluble dans les milieux de culture (Barltrop *et al.*, 1991 ; Promega, 1996).



▪ Mode opératoire

Les cellules ont été ensemencées dans des microplaques de 96 puits à une densité de 3×10^3 cellules/100 μL pour les cellules MCF-7, MDA-MB-231, OAW-42, Hey et NIH-3T3 et 1×10^4 cellules/100 μL pour les cellules PA-1 et laissées incubées pendant 24 h. Après 24 h, ce milieu de culture a été remplacé par le milieu RPMI + 1% FBS supplémenté de 100 U/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomycine pendant 12 à 16 h de temps, au bout duquel les cellules ont été exposées aux fractions, sous-fractions et composés de *Ficus umbellata* pendant 72 h aux concentrations de : 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 75 ; 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$ et l'éthanol (0,005%). Après 72 h, la viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du MTS (CellTiter 96R) : 20 μl de MTS ont été ajoutés aux microplaques contenant 100 μL dans chaque puits. Les microplaques ont ensuite été incubées pendant 3 h à 37°C. L'absorbance a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioTeK, USA). Le test a été effectué en triplicat et répété 3 fois.

II.2.5. Evaluation du potentiel chimiopréventif des extraits de *Ficus umbellata* sur un modèle de cancer œstrogéno-dépendant

II.2.5.1. Protocole expérimental

Dans le but d'évaluer les effets préventifs des extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* sur un modèle de cancer œstrogéno-dépendant, 70 rats femelles de souche Wistar âgées de 30 à 35 jours et pesant entre 60 et 75 g ont été acclimatées pendant dix jours (Figure 15). Elles ont ensuite été réparties en 7 lots de 10 animaux chacun et traitées pendant 7 jours comme suit : un groupe témoin normal (NOR) et un groupe témoin négatif (DMBA) qui ont reçu le solvant de dissolution des extraits (éthanol 2%) tout au long de l'expérimentation. Un groupe témoin positif (Tamoxifène+DMBA) qui a reçu le tamoxifène (à la dose de 3,3 mg/kg PC). Quatre groupes tests (EA 50 + DMBA ; EA 200 + DMBA, MeOH 50 + DMBA, MeOH 200 + DMBA) qui ont reçu respectivement les extraits aqueux (EA) et au méthanol (MeOH) aux doses de 50 et 200 mg/kg PC. Tous les traitements ont été effectués de façon journalière par voie orale pendant 150 jours. Au 8^{ème} jour de l'expérimentation, les tumeurs ont été induites à tous les groupes à l'exception du groupe normal (NOR) à l'aide de l'administration

d'une dose unique de DMBA (50 mg/kg PC) par voie intragastrique suivi d'une administration sous-cutanée de l'œstradiol benzoate à la dose de 5 mg/kg PC pendant 10 jours. Les animaux ont été pesés de façon hebdomadaire et palpés deux fois par semaine en vue de détecter les éventuelles tumeurs. A la fin des 150 jours de l'expérimentation, tous les animaux ayant survécu ont été mis à jeûne non hydrique pendant 12 h puis sacrifiés sous anesthésie avec la combinaison diazépam/kétamine aux doses respectives de 50 et 10 mg/kg PC, *i.p.* Les animaux ont été disséqués et les échantillons de sang artéroveineux ont été recueillis d'une part dans des tubes EDTA et d'autre part dans des tubes secs. Ce dernier a été centrifugé à 3000 trs/mn dans le but d'obtenir le sérum. Le sérum (surnageant) a ensuite été collecté, échantillonné puis conservé dans des tubes Eppendorf à -20°C. Les tumeurs mammaires et ovariennes ont toutes été prélevées, comptées et pesées. La glande mammaire et les ovaires ont été prélevés, puis pesés ensuite broyés à l'aide du potterteflon en verre sur un bac de glace dans du tampon phosphate sodium (0,1 M ; pH 7,5) de manière à obtenir un homogénat final à 10%. Les homogénats des différents organes obtenus ont été conservés à -20°C. La taille des tumeurs a ensuite été mesurée en utilisant un pied à coulisse électronique (IGAGING®). Les glandes mammaires, les ovaires, le foie, le cerveau, les reins, la rate, l'utérus, les poumons, le fémur, les glandes surrénales ont été prélevées, pesés et aussitôt fixés dans du formol à 10% pour analyse histologique.

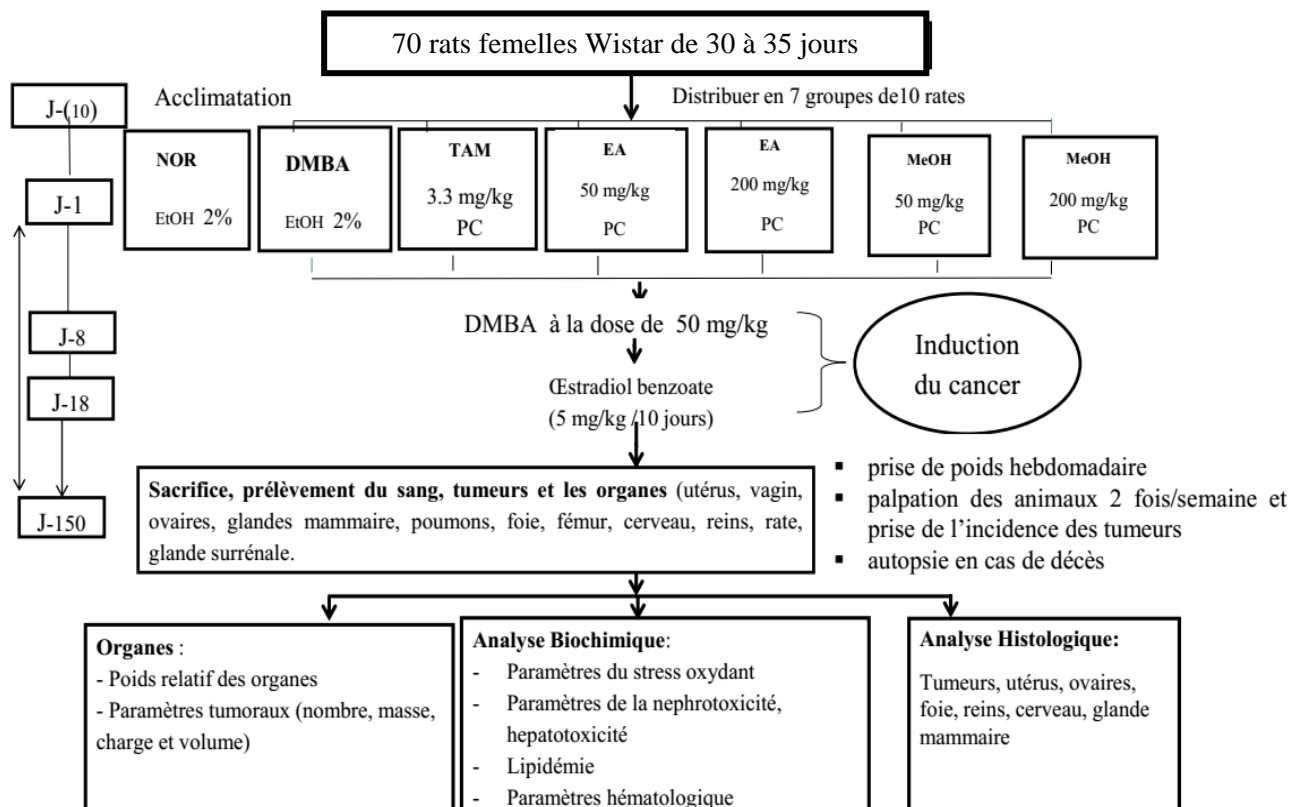


Figure 16: Protocole expérimental d'évaluation des effets préventifs de *Ficus umbellata* sur un modèle de cancer œstrogène –dépendant.

II.2.5.2. Préparation des solutions

▪ Solution de DMBA

La solution de DMBA a été utilisée pour induire les tumeurs mammaires chez les rattes prépubères (47/52 jours d'âge) à la dose de 50 mg/kg PC. Pour des animaux de poids moyen de 60 g, 3 mg de DMBA ont été dissout dans 0,6 mL d'huile d'olive. L'ultrason a été utilisé pour l'obtention d'une solution homogène.

▪ Solution de tamoxifène

Le tamoxifène, substance de référence a été administré à la dose de 3,3 mg/kg PC. Pour un animal de poids moyen de 60 g, 0,198 mg de poudre de tamoxifène ont été dissout dans 0,6 mL de véhicule (éthanol 2%) et la solution homogénéisée à l'aide de l'ultrason.

▪ Solution d'œstradiol benzoate

L'œstradiol benzoate a été utilisé comme promoteur et a été administré à la dose de 5 mg/kg. Pour un animal de 60

g, 0,3 mg d'œstradiol ont été pesé et dissout dans 0,6 mL d'huile de maïs.

II.2.5.3. Préparation du sérum et des homogénats d'organes

▪ Préparation du sérum

Le sang a été collecté dans des tubes secs puis centrifugé pendant 15 min à 3000 g à température ambiante. Le sérum (surnageant) a été collecté, échantillonné puis conservé dans des tubes Eppendorf à -20°C pour les dosages biochimiques.

▪ Préparation des homogénats d'ovaires et de la glande mammaire

La glande mammaire et les ovaires ont été prélevés, et pesés puis broyés à l'aide du potterteflon en verre sur un bac de glace dans du tampon phosphate sodium (0,1 M ; pH 7,5) de manière à obtenir un homogénat final de 10%. Les homogénats des différents organes obtenus ont été conservés à -20°C pour le dosage des paramètres biochimiques d'intérêt.

Sérum et homogénats ont servi ultérieurement pour les dosages biochimiques des paramètres biochimiques et des marqueurs du stress oxydant.

II.2.5.4. Détermination des paramètres tumoraux

❖ L'incidence tumorale :

$$\text{Incidence des tumeurs}\% = \frac{\text{Nombre d'animaux atteints}}{\text{Nombre total des animaux}} \times 100$$

❖ Charge moyenne des tumeurs :

$$\text{Charge moyenne des tumeurs (g)} = \frac{\text{Masse de la tumeur (g)}}{\text{Poids corporel de l'animal(kg)}} \times 10^{-6}$$

❖ **Charge tumorale**

$$\text{Charge tumorale (g)} = \Sigma \text{ poids des tumeurs (g)}$$

❖ **Pourcentage d'inhibition liés au poids des tumeurs**

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Masse relative des tumeurs (DMBA)} - \text{masse relative (groupe test)}}{\text{Masse relative (DMBA)}}$$

❖ **Pourcentage d'inhibition liés à la charge tumorale**

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Charge tumorale (DMBA)} - \text{charge tumorale (groupe test)}}{\text{Charge tumorale (DMBA)}}$$

❖ **Volume des tumeurs (cm³) = longueur × largeur × épaisseur × π/6 (Faustina *et al.*, 2013)**

❖ **Poids relatif d'un organe**

$$\text{Poids relatif (mg/kg)} = \frac{\text{Poids de l'organe (mg)}}{\text{Poids corporel de l'animal (kg)}}$$

II.2.5.5. Dosage de quelques marqueurs du système antioxydant

II.2.5.5.1. Dosage du malonedialdéhyde

▪ **Principe**

Les composés carbonylés à l'instar du malonedialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à une longueur d'onde de 532 nm (Yagi, 1976).

▪ **Mode opératoire**

Cent microlitres d'homogénat ont été pipetés dans des tubes à essai en verre auxquels ont été ajoutés 1000 µL de réactif TBA puis fermés hermétiquement. Le mélange a été chauffé au bain marie à 100 °C pendant 15 min puis refroidi dans un bain d'eau froide pendant 30 min en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction. Ils ont ensuite été centrifugés à 3000 tours/min pendant 5 min à 25 °C. L'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm.

▪ **Expression des résultats**

La concentration du MDA a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ M}^{-1}$) suivant la formule :

$$\text{Concentration MDA } (\mu\text{mol/L}) = \text{DO} / \epsilon \cdot L$$

II.2.5.5.2. Dosage du glutathion réduit

▪ Principe

Le groupement SH réduit le DTNB (acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)) en TNB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque), coloré en jaune, possédant une absorbance importante entre 412-415 nm (Ellman, 1959).

▪ Mode opératoire

A 20 mL d'homogénat ont été ajoutés 3 mL du réactif d'Ellman ; l'ensemble a été homogénéisé et l'absorbance a été lue à 412 nm.

▪ Expression des résultats

La concentration en glutathion réduit est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 13600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

$$\text{Concentration Glutathion } (\mu\text{mol/L}) = \text{DO} \times 10^6 / \epsilon \text{ L}$$

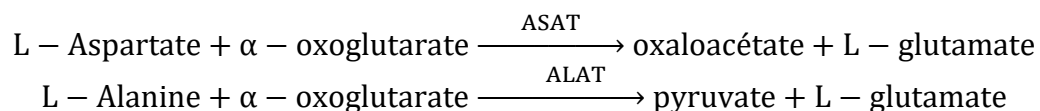
II.2.5.6. Dosage des paramètres biochimiques

II.2.5.6.1. Dosage des transaminases ALAT (Alanine aminotransférase) et ASAT (Aspartate aminotransférase)

La méthode utilisée pour la détermination de l'activité de ces enzymes est celle de Reitman et Frankel (1957).

▪ Principe

L'ASAT et L'ALAT catalysent les réactions suivantes :



Le pyruvate et l'oxaloacétate formés ont été dosés sous forme de leurs dérivés 2,4 - dinitrophénylhydrazone, qui présentent un maximum d'absorption à 340 nm.

▪ Mode opératoire

Dans des tubes à essai, 1 mL de réactif de travail a été introduit auquel ont été ajouté 100 μL de sérum. L'incubation s'est faite pendant 1 min puis l'absorbance a été lue à chaque minute pendant 3 min.

▪ Expression des résultats

Le calcul de la moyenne de l'augmentation d'absorbance par minute a été $\Delta A/\text{min}$.

$$\text{U/L de AST} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

$$\text{U/L de ALT} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

II.2.5.6.2. Dosage de la créatinine

- **Principe**

En milieu alcalin, la créatinine forme un complexe jaune orange avec l'acide picrique. L'intensité de la coloration étant fonction de la concentration de la créatinine dans le milieu (Bartels *et al.*, 1972).

- **Mode opératoire :**

Dans un tube à essai, 100 µL de sérum ont été ajoutés à 1 mL de la solution de travail. Après agitation, l'absorbance à 520 nm a été lue à 30 et à 90 secondes après stabilisation du mélange.

- **Expression des résultats**

La concentration en créatinine a été calculée en utilisant la formule suivante :

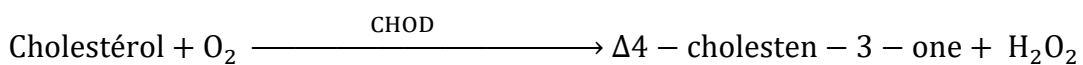
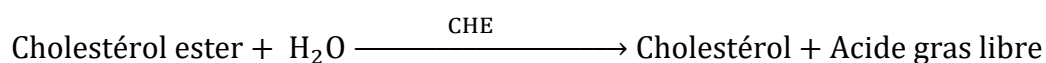
$$\text{Concentration creatinine (mg/dL)} = \frac{\text{DO (échantillon)}}{\text{DO (standard)}} \times \text{conc du standard (mg/dL)}$$

II.2.5.6.3. Dosage des marqueurs du profil lipidique

- **Dosage du cholestérol total**

- **Principe**

La cholestérol estérase (CHE) catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre est alors oxydé en 4-cholesten-3-one et peroxyde d'hydrogène par la cholestérol oxydase (CHOD). Le phénol et le 4-aminoantipyrine se combinent alors avec le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase (POD) pour donner la quinoneine qui est un produit coloré rouge. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de cholestérol total dans l'échantillon (Thomas *et al.*, 1984).



- **Mode opératoire**

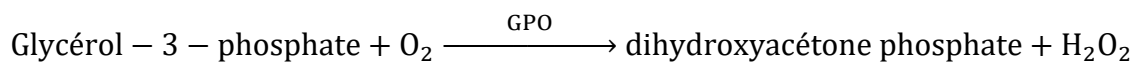
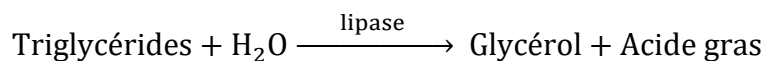
Dix (10) µL de sérum et 1000 µL de réactif de travail ont été introduits dans un tube à essai puis mélangés et incubés pendant 10 min à 25°C. Les absorbances du standard et de l'échantillon ont été lues à 505 nm après incubation pendant 60 min.

- **Expression des résultats**

$$\text{Concentration en cholestérol total (mg/dL)} = \frac{\text{DO (échantillon)}}{\text{DO (standard)}} \times 200 \text{ (mg/dL)}$$

- **Dosage des triglycérides**
- **Principe**

Le glycérol produit par hydrolyse enzymatique des triglycérides est phosphorylé par l'ATP pour produire le glycérol-3-phosphate et l'ADP à travers une réaction catalysée par l'enzyme glycérol kinase (GK). L'enzyme glycérol-3-phosphate oxydase (GPO) catalyse l'oxydation du glycérol-3-phosphate pour produire le dihydroxyacétone-3-phosphate et H₂O₂. La peroxydase (POD) catalyse par la suite la formation de la quinonéimine à partir de H₂O₂, 4-aminoantipyrine et 4-chlorophénol. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glycérol dans le mélange réactionnel et aussi au taux de triglycérides dans l'échantillon (Fossati, 1982).



- **Mode opératoire**

Dix (10) µL de sérum ou de standard et 1000 µL de réactif ont été introduits dans un tube à essai, mélangés et incubés pendant 10 min à 25 °C. Les absorbances du standard et de l'échantillon ont été lues à 505 nm, 60 min à la fin de l'incubation.

- **Expression des résultats**

$$\text{Concentration en Triglycérides (mg/dL)} = \frac{\text{DO (échantillon)}}{\text{DO (standard)}} \times 200 \text{ (mg/dL)}$$

II.2.5.6.4. Dosage des protéines totales

- **Principe**

En milieu basique, le tartrate de sodium et de potassium forment avec les ions cuivriques un complexe soluble. L'addition d'une protéine déplace le cuivre complexé avec le tartrate pour former un complexe cuivro-protéique de couleur violette qui présente un maximum d'absorption à 540 nm ; l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu (Gornall *et al.*, 1949).

- **Mode opératoire :**

Un millilitre du réactif de Biuret a été introduit dans un tube à essai contenant 25 µL de sérum. Le mélange a été incubé à 25 °C pendant 10 min. L'absorbance a été lue à 540 nm.

- **Expression des résultats**

$$\text{Concentration en protéine (g/dL)} = \frac{\text{DO (échantillon)}}{\text{DO (étalon)}} \times 7 \text{ concentration étalon (g/L)}$$

II.2.5.7. Analyse hématologique

Les paramètres hématologiques suivants ont été déterminés : le taux de globules blancs (lymphocytes, monocytes, granulocytes) ; le taux de globules rouges, le taux de plaquettes sanguines, le taux d'hématocrite (Htc), le taux d'hémoglobine (Hgb), le volume globulaire moyen (VGM), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) au moyen d'un analyseur Humancount 30^{TS} qui est un compteur automatique des cellules sanguines à partir d'un échantillon de sang contenu dans un tube à EDTA.

II.2.5.8. Techniques d'histologie

L'histologie permet la préparation des tissus/organes en vue de leur observation au microscope. Les techniques utilisées sont celles décrites par Cannet (2004, 2006). Brièvement, elles ont consisté successivement en : la fixation, la macroscopie (trimming), la déshydratation, l'inclusion, la coupe, la coloration et le montage.

II.2.5.8.1. Fixation et « trimming »

La fixation est la première étape et la base de la préparation des tissus en vue de leur observation au microscope. Le but de la fixation est de préserver les cellules et les constituants tissulaires dans un état aussi proche que possible de celui du vivant et de permettre au tissu de passer par les étapes de la technique histologique sans changement ni déformation. Le fixateur utilisé dans cette étude a été du formol à 10 %.

Le « trimming » s'est déroulé comme suit : Les différents organes fixés ont été sectionnés suivant un plan bien défini (transversal ou longitudinal) et disposés dans des cassettes histologiques étiquetées.

II.2.5.8.2. Déshydratation ou circulation

Elle comporte trois étapes à savoir : la déshydratation, l'éclaircissement et l'imprégnation.

- **La déshydratation** consiste à débarrasser les tissus fixés de toute trace d'eau avant son inclusion dans la paraffine (en effet l'eau n'est pas miscible avec ce milieu d'inclusion). Pour ce procédé, 8 bacs d'alcool, à raison de 2 heures dans chaque bac, ont été utilisés successivement dans l'ordre ci-après : 1 bac d'éthanol à 80 % (1 × 2 h), 4 bacs d'éthanol à 95 % (4 × 2 h) et 3 bacs d'éthanol à 100 % (3 × 2 h).

- **L'éclaircissement** consiste à remplacer la solution de déshydratation par un solvant miscible dans le milieu d'inclusion. C'est une étape de transition réalisée par des hydrocarbures benzéniques à l'instar du xylène ou du toluène. Ainsi, après déshydratation, deux bains dans du xylène (2 × 2 h) ont suffi pour réaliser cette opération.

- **L'imprégnation** consiste au remplacement de l'eau des cellules et des tissus par la paraffine qui durcit les prélèvements. En effet, l'obtention des coupes fines passe par la nécessité d'incorporer

dans les tissus une substance neutre (la paraffine) qui durcit les fragments. Les cassettes contenant les fragments d'organes ont séjourné 4 h (2 x 2 h) dans de la paraffine en fusion (60° C).

II.2.5.8.3. Inclusion et coupe

L'inclusion fournit un support externe aux tissus. Ce qui permet la réalisation des coupes au microtome. Les tissus sont placés dans des moules en inox remplis de paraffine en fusion (60° C) qui est mise à solidifier sur une surface froide après orientation appropriée du tissu dans le bloc. Les blocs obtenus ont été coupés sur un microtome à volant de marque LEICA RM 2125 RT. Des rubans de coupe de 5 µm d'épaisseur obtenus ont été étalés dans un bain-marie contenant de l'eau gélifiée. Au moyen de lames porte-objet propres et étiquetées, les coupes ont été recueillies et séchées à l'étuve à 45° C pendant 24 h.

II.2.5.8.4. Coloration

La coloration permet de visualiser les constituants d'une cellule et d'un tissu en leur faisant capter et fixer des colorants de façon sélective. La coloration utilisée dans ce travail est la coloration à l'hématoxyline-éosine. L'hématoxyline colore les constituants acides du noyau en bleu-violet et l'éosine colore les constituants basiques du cytoplasme en rose-rouge. La coloration s'est déroulée en deux étapes : le déparaffinage et la réhydratation d'une part et la coloration proprement dite d'autre part.

- Les coupes ont été débarrassées de la paraffine (**déparaffinage**) dans des bains de xylène et réhydratées (**réhydratation**) dans des bains d'alcool à concentration décroissante jusqu'à l'eau distillée ; chaque bain ayant une durée de 5 min. Les coupes ont de ce fait séjourné dans les bains suivants : xylène (3 × 5 min), éthanol à 100 % (3 × 5 min), éthanol à 95% (1 × 5 min), éthanol à 80 % (1 × 5 min) et eau distillée (1 × 5 min).

- **La coloration proprement dite** a été réalisée en plaçant les coupes d'organes déparaffinées successivement dans les bains suivants : Hématoxyline de Harris (2 × 5 min), eau de robinet (2 × 5 min), éthanol 70 % (1 × 5 min), éthanol 95 % (1 × 5 min), éosine alcoolique à 0,5 % (1 × 5 min) et eau de robinet (1 × 5 min).

II.2.5.8.5. Montage

Une fine lamelle de verre a été utilisée pour protéger et conserver les coupes. Les coupes déshydratées ont été montées en utilisant comme milieu de montage la résine synthétique qui est non miscible à l'eau. Le montage s'est fait en deux étapes : la déshydratation dans trois bains d'alcool absolu (3 × 5 min) et l'éclaircissement dans trois bains de xylène (3 × 5 min).

II.2.5.8.6. Analyse microscopique des organes

L'analyse microscopique des coupes histologiques a été effectuée au moyen d'un équipement complet consistant en un microscope AxiosKop 40 connecté à une caméra et relié à un ordinateur où les images sont transférées et analysées avec les logiciels MRGrab 1.0 et AxioVision 3.1.

II.2.6. Evaluation du mécanisme anticancéreux de l'extrait de *Ficus umbellata*

L'évaluation du mécanisme d'action des extraits de *Ficus umbellata* a consisté à évaluer l'effet de l'extrait le plus cytotoxique (extrait au méthanol) sur la progression du cycle cellulaire, le type de mort cellulaire induite, et l'effet sur la migration et l'invasion cellulaire d'une lignée cellulaire mammaire (MDA-MB-231) et ovarienne (PA-1).

II.2.6.1. Détermination de l'effet de l'extrait sur le cycle cellulaire par cytométrie de flux

- **Principe :**

Le cytomètre de flux est un appareil qui permet de compter de façon précise le nombre de cellules présentes dans un échantillon tout en mesurant, pour chaque cellule, un ou plusieurs paramètres caractérisé(s) par un marqueur fluorescent. L'analyse de l'état de réplication d'une population cellulaire (profil du cycle cellulaire) est facilement réalisée avec le colorant fluorescent iodure de propidium (IP), qui se lie stoechiométriquement aux acides nucléiques entraînant une émission de fluorescence proportionnelle à la teneur en ADN de la cellule. Le principe derrière l'approche est le suivant : les cellules quiescentes et en G1 ont deux copies chromosomiques, tandis que les cellules subissant une mitose (G2/M) ont le double de la quantité d'ADN et auront donc le double de l'intensité de fluorescence des cellules en G1 (Figure : 16). Les cellules en phase S auront un signal fluorescent entre G1 et G2/M, car ces cellules synthétisent l'ADN sur leur chemin vers G2/M (Bagwell,1993 ; Ross, 1996).

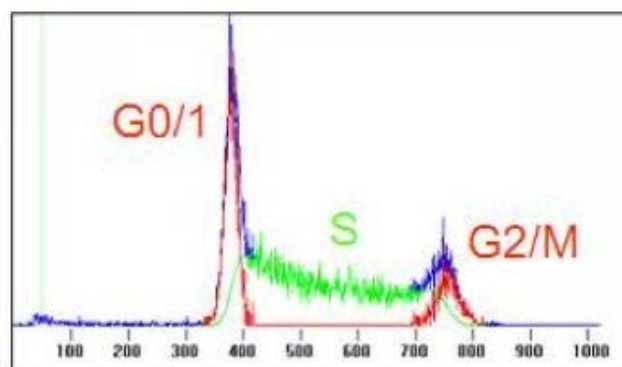


Figure 17 : Illustration des phases du cycle cellulaire lors d'une cytométrie de flux

▪ **Mode opératoire**

Les cellules MDA-MB-231 et PA-1 ($3,5 \times 10^5$ cellules/mL) ont été incubées dans les microplaques à 12 puits avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux concentrations de 45, 90 et 180 µg/mL pour les cellules MDA-MB-231 et 25, 50 et 100 µg/mL pour les cellules PA-1. Les cellules témoins ont reçu le (DMSO ; 0,01%). Ensuite, le contenu de chaque puits a été trypsinisé et mis dans des microtubes. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 10 min à 300 g puis lavées avec du PBS et centrifugées à nouveau. Le surnageant a ensuite été enlevé et 200 µL d'éthanol 70% glacé ont été ajoutés dans le but de fixer les cellules. Elles ont ensuite été incubées pendant 30 min à -4° C et 1 mL de PBS +2 % BSA ont été ajoutés dans le but de détruire toute liaison non spécifique à IP. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 10 min à 300 g puis le surnageant a été retiré. Trois cent microlitres d'ARNase 100 µg/mL + 0,1% de Triton-X dans du PBS ont été ajoutés puis homogénéisés et passés dans des tubes de cytométrie en boîte de glace pour empêcher toute dégradation du matériel. L'iodure de propidium (20 µg/mL) a ensuite été ajouté pour colorer les cellules au moment de la lecture placée à l'obscurité. La teneur en acide désoxyribonucléique (ADN) cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire a été déterminée par cytométrie de flux.

▪ **Expression des résultats**

Les cellules ont été comptées à chaque phase du cycle par le cytomètre de flux puis analysées à l'aide du logiciel WinMDI 2.9 et les résultats exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard (ES) de trois expériences indépendantes du nombre de cellules dans les différentes phases (G0, G0/G1, S et G2/M).

II.2.6.2. Détermination de l'effet de l'extrait sur le type de mort cellulaire

II.2.6.2.1. Identification qualitative de la mort cellulaire

▪ **Principe**

L'apoptose est caractérisée par de nombreuses altérations morphologiques, membranaires, mitochondriales et nucléaires. La fragmentation de l'ADN intranucléosomale étant une caractéristique majeure de l'apoptose. Les modifications nucléaires telles que la condensation chromatiniennne sont analysables après incorporation d'Acridine orange (AO) ou de bromure d'éthidium (EB); cette coloration à l'Acridine Orange (3,6-diméthylaminoacridine), métachromatique sélective aux acides nucléiques et le bromure d'éthidium (bromure de 3,8-diamino-5-éthyl-6-phénylphénanthridinium) émettent une fluorescence caractéristique qualitative du mécanisme de la mort cellulaire (Cohen, 1993 ; Coligan, 1995).

▪ **Mode opératoire**

Les cellules MDA-MB-231 et PA-1 ($3,5 \times 10^5$ cellules / mL) ont étéensemencées dans une microplaque de 12 puits et traitées avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux concentrations respectivement de 45, 90 et 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les cellules MDA-MB-231 et 25, 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les cellules PA-1, un solvant témoin (DMSO 0,01%) pendant 24 h. Après incubation, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et un mélange de colorant (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AO et 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EB) a été ajouté dans chaque puits. Les cellules ont été immédiatement visualisées en utilisant un microscope inversé Nikon eclipse TS100 à un grossissement de 400 X avec un filtre d'excitation à 480/30 nm ; miroir dichromatique découpé sur 505 nm et filtre barrière 535/40 nm. Les photos ont été prises grâce à une caméra Nikon COLPIX connectéé à un ordinateur et analysées par un logiciel d'édition d'images (ImageJ®).

▪ **Expression des résultats**

Les cellules apoptotiques émettent une fluorescence verte à chromatine condensée caractéristique de la fixation de l'acridine orange. Les cellules nécrosées émettent une fluorescence rouge caractéristique de la fixation du bromure d'éthidium et les cellules normales émettent une fluorescence verte caractéristique de l'acridine orange à matrice intracellulaire intactes.

II.2.6.2.2. Identification quantitative de la mort cellulaire par cytométrie de flux

▪ **Principe**

L'exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane de la cellule apoptotique peut être révélée par la fixation d'annexine-V. L'iodure de propidium (IP), utilisé conjointement avec l'annexine V, permet de différencier les cellules apoptotiques (positives à l'annexine V), des cellules nécrotiques (positives à l'annexine V et à IP). Ainsi, elle est basée sur la capacité des cellules en apoptose à fixer l'Annexine V et de celles en nécrose de fixer l'Annexine V et l'iodure de Propidium, toutes émettant une fluorescence caractéristique de la phase dans laquelle elle se trouve (Boersma, 1996 ; Vermes, 1995).

▪ **Mode opératoire**

Les cellules PA-1 et MDA-MB-231 ($3,5 \times 10^5$ cellules / mL) ont étéensemencées dans une microplaque de 12 puits et traitées avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* respectivement aux concentrations de 25, 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les cellules PA-1 et 45, 90 et 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les cellules MDA-MB-231 ou avec le solvant de dilution de l'extrait (DMSO, 0,01%) pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été transférées dans des tubes de cytométrie puis lavées deux fois avec du PBS froid. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans du tampon de liaison puis marquées avec du fluorochrome conjugué à l'annexine FITC et à l'iodure de propidium (IP) (1 : 500). L'ensemble a été mélangé puis

incubé pendant 15 min à température ambiante dans l'obscurité et sur de la glace. Puis, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid (500 mL/puits) et remises en suspension dans le tampon de liaison. Les cellules ont été colorées avec la solution de sonde fluorescente (50 mg/mL IP, 1 mg/mL d'annexine, 250 ml de PBS) sur de la glace et à l'obscurité pendant 15 min. Les cellules ont ensuite été analysées par le cytomètre en flux BD DACS Verse.

▪ Expression des résultats

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel WinMDI 2.9 et présentées sous forme de moyenne de trois expériences indépendantes de cellules vivantes, en apoptose, nécrose et apoptose tardive.

II.2.6.3. Détermination de l'effet de *F. umbellata* sur la migration cellulaire

▪ Principe

Elle est basée sur la capacité des cellules individuelles, en colonies ou en grappes à se déplacer d'un endroit à un autre (Hulkower et Herber, 2011).

▪ Mode opératoire

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées dans des plaques de 12 puits à une densité de 3×10^5 cellules/mL dans le milieu DMEM supplémenté de 10 % de FBS, 100 U/mL pénicilline et 100 U/mL streptomycine. Dès que les cellules ont atteint un état de confluence, une strie ou plaie a été créée à différentes positions dans la monocouche de cellules, à l'aide d'un embout de pipette stérile de 200 mL (Figure 17). La monocouche de cellules adhérentes a ensuite été lavée avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes et les débris cellulaires générés. Les cellules ont ensuite été maintenues dans du DMEM pendant 48 h avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux concentrations de 45, 90 et 180 $\mu\text{g} / \text{mL}$ et le solvant témoin (DMSO ; 0,01%). La même strie a été observée au cours du temps et des photos ont été prises à différents instants (0 h, 24 h et 48 h), à un grossissement de 4X. Ces expériences ont été répétées trois fois en utilisant trois puits. La surface de chaque puits a été enregistrée en utilisant un microscope optique Nikon Eclipse TS100 (Melville, NY, USA), photographiée à ces différents instants et la zone de cicatrisation de la plaie a été évaluée par un logiciel d'édition d'image (ImageJ ®).

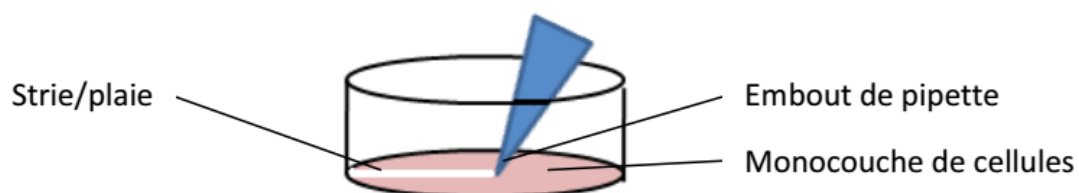


Figure 18 : Création d'une plaie sur une monocouche de cellules confluentes.

- **Expression des résultats**

Ayant considéré l'écart au temps $t = 0$ h comme étant de 100%, à différents intervalles de temps, l'écart a été calculé puis soustrait de l'écart à $t = 0$ h. A l'aide de la "règle de trois", le pourcentage de migration a été obtenu à différents instants. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de migration cellulaire.

II.2.6.4. Détermination de l'effet de *F. umbellata* sur l'invasion cellulaire

- **Principe**

Ce test évalue la capacité qu'ont les cellules présentes dans un milieu à sécréter des enzymes qui dégradent certains composants de la matrice extracellulaire et à migrer vers un environnement riche en chimioattractant ou à établir une colonie pour leur croissance (Friedl et Wolf, 2003).

- **Mode opératoire**

Pour ce faire, des puits de culture cellulaires spéciaux munis d'une membrane Millicell (pores de 8,0 μm , diamètre de 10 mm) ont été utilisés. Ils ont été lavés deux fois avec du DMEM et après réhydratation pendant 30 min dans du DMEM avant l'expérience. Ensuite, 50 μL de matrigel dilué au 1 :10 dans du DMEM sans sérum) ont été ajoutés dans les inserts contenus dans des plaques à 24 puits. L'insert avec du matrigel a été maintenu à 37° C pendant 1 h afin de polymériser. Une suspension de 50 000 cellules de MDA-MB-231 dans 200 μL de DMEM sans sérum a été ajoutée de manière homogène dans la chambre supérieure et la chambre inférieure a été remplie avec du DMEM contenant 10% de FBS. Les cellules ont été incubées pendant 48 heures à 37° C, 5% de CO₂ avec du DMSO (0,01%) et en présence d'extrait au méthanol de *F. umbellata* à 90 et 180 $\mu\text{g/mL}$. Les cellules n'ayant pas migré ont été éliminées à l'aide d'un coton-tige, tandis que les cellules ayant migré ou envahies ont été fixées avec du glutaraldéhyde à 5% et colorées avec une solution à 0,1% de violet de crystal pendant 10 min. Les puits ont ensuite été rincés pendant 3- 4 secondes avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant puis égouttés immédiatement à l'aide d'un coton-tige. Les puits ont ensuite été séchés. Les photos ont été prises à l'aide d'une caméra Nikon COLPIX connectée à un microscope et un minimum de cinq champs ont été comptés à l'aide d'un logiciel d'édition d'image (ImageJ ®). Chaque expérience a été réalisée deux fois et la moyenne des cellules par champ a été calculée.

- **Expression des résultats**

Les cellules ayant traversées la membrane ont été comptées sous un microscope à différents angles puis exprimées sous forme de pourcentage d'invasion.

II.2.7. Identification des constituants actifs et élucidation de leurs mécanismes d'action

Il a été question d'effectuer un fractionnement bio-guidé de l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* dans le but d'identifier le composé bioactif et ensuite, d'élucider les mécanismes par lesquels ce dernier exercerait son activité, ceci au travers de l'expression de certains gènes et protéines caractéristiques de l'apoptose, de l'invasion, de la migration, de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse.

II.2.7.1. Fractionnement bio-guidé et identification des constituants actifs

Afin de séparer les constituants de l'extrait au méthanol de *F. umbellata*, par ordre de polarité, 15 g de l'extrait au méthanol ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée puis introduits dans une ampoule à décanter dans laquelle 500 mL de solvant de dichlorométhane (DCM) ont été ajoutés ; l'ensemble a été homogénéisé puis laisser reposer (Figure 18). La phase supérieure a été collectée puis le processus a été répété avec l'acétate d'éthyle (AcOEt) en utilisant des quantités de 2×500 mL pour chaque solvant. Les différentes fractions (DCM et AcOEt) ont été concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis pesés. La fraction aqueuse (Aq) a été séchée dans un lyophilisateur.

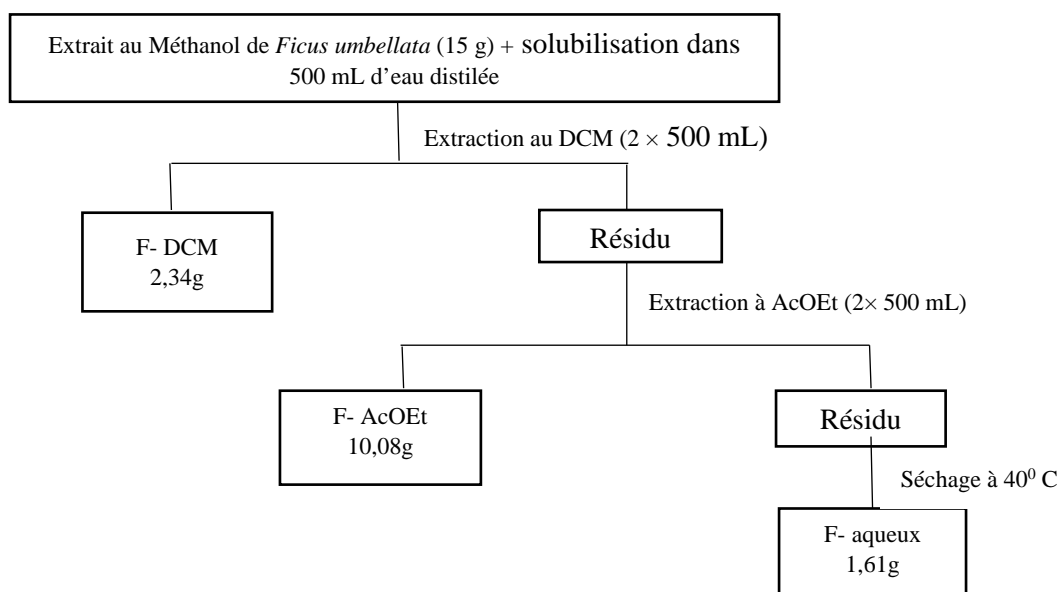


Figure 19: Partitionnement de l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata*

II.2.7.1.2. Chromatographie sur colonne de la fraction à l'acétate d'éthyle

La fraction à l'acétate d'éthyle ayant montré le meilleur potentiel cytotoxique tel qu'ont montré les différentes CC_{50} obtenues sur toutes les cellules testées, elle a été utilisée pour l'identification des composés bioactifs. Pour cela, la fraction à l'AcOEt a été fractionnée à nouveau par chromatographie sur colonne de gel de silice Merck 60 F₂₅₄ [(0,2 -0,5 mm) et (0,2 - 0,063 mm)] 70 – 230 mesh et 230 - 400 mesh en utilisant un gradient de solvant suivant : CHCl₃ : AcOEt (100 : 0, 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 30 : 70, 20 : 80, 10 : 90, 0 : 100) et AcOEt : MeOH

(80 : 20, 50 : 50, 0 : 100). Par élution, les différentes sous-fractions ont été recueillies dans 40 béchers (Annexe 4). Au travers de la visualisation sous UV à 234 et 260 nm et au travers de leur profil CCM (chromatographie sous couche mince) elles ont été regroupées en 7 sous-fractions.

II.2.7.1.3. Chromatographie sur couche mince

▪ Principe de la CCM

Il est basé sur la séparation des constituants du mélange en fonction de leur affinité pour la phase mobile et la vitesse de déplacement est déterminée par leur coefficient de distribution (Kd) entre les deux phases.

▪ Mode opératoire

Un volume de 10 µL des sous-fractions a été appliqué sur des plaques CCM pré-recouvertes de gel de silice 60 F₂₅₄, en utilisant des tubes capillaires et le développement a eu lieu dans une chambre chromatographique en utilisant la phase mobile appropriée. Pour saturer la chambre en vapeur de l'éluant, 100 mL de phase mobile y ont été introduites 30 minutes avant le développement des plaques CCM.

II.2.7.1.3.1. Préparation de la phase mobile

Différentes phases mobiles ont été utilisées pour le "screening" préliminaire à la suite de laquelle les solvants ayant permis une bonne séparation des constituants ont été retenus pour la suite. A cet effet la phase mobile a été préparée en mélangeant les proportions des solvants dans des béchers et en secouant manuellement pendant environ 5 minutes. Les différentes phases mobiles retenues ont été :

Phase mobile N° 1 : Chloroforme : acétate d'éthyle : 9 : 1

Phase mobile N° 2 : Chloroforme : acétate d'éthyle : 3 : 6

II.2.7.1.4. Purification des sous-fractions

Les sous-fractions F1 et F3 ayant montré de meilleur CC₅₀ sur les différentes cellules testées, elles ont été retenues pour purification.

La technique utilisée pour la purification des sous fractions a été celle décrite par Macek (1972). La sous-fraction 1 (F1) soumise à une CCM a présenté une tache après observation sous lumière UV à 254 et 364 nm, cette dernière a donc été considérée comme un composé pur. La sous-fraction 3 (F3) soumise à une CCM a présenté deux taches dont une était commune à celle de la fraction 2. Cette dernière a donc été purifiée sur gel de silice par CCM préparative.

▪ Mode opératoire :

Dans un bécher, a été mélangé le gel de silice et de l'eau distillée à la proportion 1 : 2. Ensuite, des plaques chromatographiques en verre (20 × 20 cm), ont été recouvertes de gel de silice en utilisant

une règle d'épaisseur de 0,5 mm. Les plaques ont ensuite été activées dans une étuve à 110°C pendant 2 h. Après refroidissement des plaques, et à l'aide des pipettes Pasteur, la sous-fraction a été appliquée sur les plaques de silice et le développement a eu lieu dans une chambre chromatographique contenant le système de solvant 2. Une fois le développement terminé, les plaques ont été raclées en faisant attention de ne point mélanger les sous fractions puis le mélange recueilli a été dissous dans un mélange de méthanol et d'acétate d'éthyle. Par la suite, ce dernier a été filtré à l'aide d'un papier whatman N° 4 et le filtrat obtenu a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif.

II.2.7.1.5. Elucidation structurale des composés purs isolés

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) des différents composés isolés ont été enregistrés avec un spectromètre agilent à des fréquences de 300 MHz et 400 MHz pour le proton (1 H) et de 75 MHz et 100 MHz pour le carbone (13 C). Les valeurs des déplacements chimiques ont été indiquées en parties par million (ppm) par rapport au signal de tetremethylsilane (TMS) utilisé ici comme référence interne. L'acétone et le méthanol ont été utilisés comme solvant pour les expériences RMN. L'interprétation des différents spectres (RMN, COSY, HMBC et HMQC) a été effectuée grâce à nos collaborateurs de l'Institut de Chimie de Nice (Université Coté d'Azur, Nice, France). Les procédures d'isolement et de purification peuvent être regroupées par la figure ci-dessous.

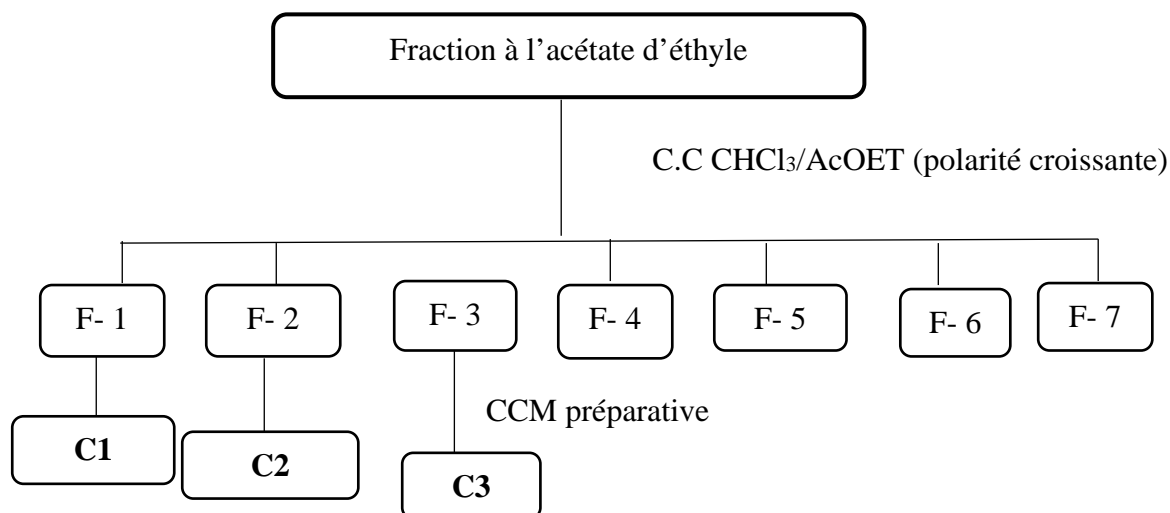


Figure 20: Récapitulatif du procédé d'isolement et de purification des composés de la F-AcOEt de *Ficus umbellata*

II.2.7.2. Elucidation des mécanismes d'action moléculaire du composé le plus actif

II.2.7.2.1. PCR quantitative à temps réel

Principe :

Cette technique est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (Higuchi *et al.*, 1992).

II.2.7.2.1.1. Extraction de l'ARN

Les cellules MDA-MB-231 ($2,5 \times 10^4$ cellules/mL) et PA-1 (3×10^4 cellules/mL) ont été cultivées dans une plaque à 6 puits avec le milieu RPMI contenant 10% de FBS, 100 U/mL de pénicilline, 100 U/mL de streptomycine. Au bout de 24 h, le milieu de culture a été remplacé par RPMI supplémenté de 1% de FBS. Le composé C1 a été ajouté à une concentration de 8,8 µg/mL pour les cellules MDA-MB-231 et 13,18 µg/mL pour les cellules PA-1 (valeurs des différentes CC₅₀) ainsi que l'éthanol (0,005%) (solvant de dilution des substances) pendant 6 h. A l'issue des 6 h, les plaques ont été vidées puis rincées deux fois avec du PBS glacé. Les ARN totaux des cellules ont été extraits par la méthode décrite par le kit "RNeasy-minikit" (Qiagen, Hilden) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ont été lysées et homogénéisées au vortex dans un tampon hautement dénaturant contenant de la guanidine-thiocyanate permettant l'inactivation des RNases. De l'éthanol a ensuite été additionné afin de créer un environnement optimal pour la liaison des ARNs sur la couche de silice après transfert sur la colonne d'extraction. Les ARNs ont été lavés et purifiés par plusieurs centrifugations successives puis élués dans 30 µL d'eau ultra pure RNase-Free (Invitrogen). Les ARN extraits ont été conservés à - 20 °C.

II.2.7.2.1.2. Quantification de l'ARNs

Les ARNs obtenus ont ensuite été quantifiés par lecture de l'absorbance à 260 nm au Nanodrop 1000 (Thermo Fischer Scientific) ; Le rapport d'absorbance 260/280 nm a permis de connaître la pureté des ARNs, qui doit être compris entre 1,9 et 2,1 ; garantissant ainsi une absence de contamination par les protéines.

II.2.7.2.1.3. Transcription inverse

La transcription reverse des ARNm nous a permis de synthétiser les ADNc correspondant. Un microgramme (1 µg) d'ARN total de chaque échantillon a été soumis à une transcription reverse en ADNc en utilisant la transcriptase reverse SuperScript® II (Life technologies, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Pour une réaction de 20 µL, 1 µL d'oligo (dT), 1 µL de dNTP (deoxynucléotide triphosphate) (10 mM), 1 µL d'ARN et un volume d'eau complétée à 12 µL a été ajouté. L'ensemble a été incubé à 65 °C pendant 5 min puis refroidit rapidement sur de la glace. Ensuite, 4 µL du 5 × tampon premier brin ; 2 µL du DTT (0.1M) ont été ajoutés puis incubés à 42 °C pendant 2 min. 1 µL SuperScript™ RT a été ajouté et la réaction a été complétée par ajout de l'eau distillée stérile puis homogénéisé et ensuite incubé à 42 °C pendant 50 min. Un témoin RT-négatif a

été réalisé en utilisant de l'eau sans RNase au lieu de la transcriptase reverse. L'ADNc a été dilué à 1 : 5 et conservé à -20 ° C jusqu'à utilisation ultérieure.

II.2.7.2.4. Reaction de polymérisation en chaine quantitative (qPCR)

La qPCR a été utilisée pour évaluer l'expression de l'ARNm sur les cellules traitées. Toutes les amorces ont été définies à l'aide du logiciel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) et sont décrits dans le tableau II ci-dessous. Ces amorces ont été reçues en suspension dans de l'eau à une concentration de 100 µM et conservées à -20 °C. Elles ont ensuite été échantillonnées et utilisées à une concentration finale de 10 µM pour la PCR quantitative.

Tableau II : Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR

Amorces	Sequence sens 5' 3'	Sequence antisens 5' 3'
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
Bcl-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	ACAGTTCCACAAAGGCATCC
Bax	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
VEGF	ATGTGTGTCCGTCTACAGATGT	GGAAGTGTGATTGGCAAAACTGA

Le milieu réactionnel de chaque échantillon dans un puit était constitué tel que présenté dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III : Composition du milieu réactionnel pour la RT qPCR

Réactifs	Concentration finale	Volume
Tampon PCR 10X	1x	5,0 µL
MgCl ₂ (50mM)	2,5	1,5 µL
Mix des 4 dNTPs (10 mM)	0,2mM	1,0 µL
Amorce sens (10 µM)	0,2mM	1,0 µL
Amorce antisens (10 µM)	0,2mM	1,0 µL
Taq polymerase	1 unité	0,40 µL
ADNc		2,0 µL
Eau ultra pure		Compléter à 50 µL

Les réactions de PCR quantitatives ont été effectuées en utilisant l'Opticon-2 (Biorad, Munich) selon le protocole décrit dans le tableau IV ci-dessous.

Tableau IV : Différentes étapes de la RT qPCR

Etapes	Temps	Température	
Activation de la polymérase	2 min	50 °C	
Pré-dénaturation de l'ADN	2 min	95 °C	} 40 cycles
Dénaturation de l'ADN	15 sec	95 °C	
Hybridation des amorces	30 sec	60 °C	
Elongation	30 sec	70 °C	
Elongation finale	1 min	70 °C	
Courbe de fusion	5 sec pour 1°C	55 à 99°C	

Expression des résultats

Etape 1 : Normalisation par rapport au gène de référence pour chaque échantillon :

$$\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence}$$

Etape 2 : Variance entre 2 échantillons :

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ contrôle}$$

Etape 3 : Détermination de la variation du nombre de copie du gène d'intérêt entre les échantillons comparés = $2^{-\Delta \Delta Ct}$

II.2.7.3. Elucidation du mécanisme d'action sur le plan fonctionnel du composé le plus actif**II.2.7.3.1. Western Blot****Principe :**

Le Western Blot (immunotransfert) est une technique rapide et sensible qui permet de détecter et quantifier les protéines d'un mélange en fonction de leur taille par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

II.2.7.3.1.1. Isolement de protéines

Les cellules MDA-MB-231 ($2,5 \times 10^4$ cellules/mL) et PA-1 (3×10^4 cellules/mL) ont été traitées pendant 24 h avec le composé 1 (triterpène) aux concentrations de 8,8 et 13,18 $\mu\text{g/mL}$ respectivement et à l'éthanol (0,005%). Puis, ce milieu de culture a été enlevé et les plaques ont été rincées avec le PBS. Une fois la solution de PBS enlevée, la microplaque de 6 puits a été posée sur de la glace et 150 μL d'une solution contenant 1000 μL de RIPA, 10 μL d'inhibiteur de protéinase et 10 μL d'inhibiteur de phosphatase a été introduit dans chaque puits. L'ensemble a été homogénéisé puis transféré dans des microtubes et mélangé à l'aide d'un vortex. Les microtubes ont ensuite été laissés sur la glace pendant 1 h puis centrifugés à $13\,500 \times g$ pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant obtenu a été transféré dans un nouveau tube puis conservé à -20 °C.

II.2.7.3.1.2. Dosage du taux de protéines

Le taux en protéines a été déterminé à l'aide du kit de dosage des protéines Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific, USA). Suivant les recommandations du fournisseur, un volume final de 200 µL contenant le réactif-A et le réactif-B à la proportion (1 : 50) a été introduit dans une microplaque de 96 puits auquel était préalablement introduit 10 µL de nos échantillons dilués au 1 : 10. Une solution standard de BSA à différentes concentrations comprises entre (2000 mg/mL à 25 µg/mL) a servi d'étalon. La microplaque a ensuite été incubée à 37° C pendant 30 minutes, puis la Densité optique a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 562 nm. La courbe d'étalonnage générée a été utilisée pour déterminer les concentrations de protéines dans chaque échantillon.

II.2.7.3.1.3. Electrophorèse sur gel de SDS-Polyacrylamide (SDS-PAGE)

Pour ce faire, 20 µg de chaque échantillon ont été utilisés. Cela a été calculé en considérant un volume total fixe puis en ajoutant une solution de Blue Lamnli, 4 fois dilué puis complété avec de l'eau distillée. Les protéines ont ensuite été dénaturées à l'aide d'un thermomixer (Werner Hassa, Lubeck) pendant 15 min suivi d'un refroidissement sur glace.

Les protéines ont été séparées sur gel de Polyacrylamide 12%. En plus des échantillons protéiques, un marqueur de taille "precision Plus Protein" (Biorad, Allemagne) a également été déposé sur gel, ce qui permettait de déterminer la taille des protéines à visualiser mais également de suivre l'avancée de la migration et de vérifier la qualité du transfert. Ensuite, 7 µL de standard et 15 µL d'échantillon protéique ont été déposés sur le gel de polyacrylamide et la migration a été réalisée pendant environ 30 min à 200 V dans un tampon de migration (0,025 M Tris, 0,192 M glycine ; 0,1% SDS ; pH 8,3). Une fois la migration achevée, les protéines du gel ont été transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene difluoride) à l'aide du Trans blot (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) dont le principe est rappelé sur la Figure 19 ci- dessous pendant 15 min à 20 A. Le transfert a consisté à mettre le gel en Sandwich entre 2 papiers filtre et une membrane PVDF, (les membranes ayant été préalablement activées dans du méthanol puis rincées avec une solution de tampon de transfert). La membrane PVDF contenant les protéines est ensuite saturée pendant 1h sous agitation dans une solution PBS-Tween 20 à 0,1% + lait à 5% pour inhiber la fixation de l'anticorps primaire sur des sites non spécifiques. La membrane a ensuite été hybridée avec l'anticorps primaire dans une solution de PBS-Tween 20 à 0,1% + lait à 5% durant une nuit à 4 °C sous agitation. Les membranes ont ensuite été rincées 3 × 5 min dans une solution saline tamponnée au Tris avec du Tween 20 (TBS-T). Après lavage, la membrane a été hybridée pendant 1 h à température ambiante, sous agitation avec l'anticorps secondaire (anti-peroxydase d'IgG de souris ou de rat) diluée au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 20 à 0,1% - lait 5% puis 3 lavages de 15 min avec du PBS -Tween 0,1%. La membrane a ensuite été incubée pendant 5 min avec un substrat de peroxydase et un substrat réactif de Luminol

HRP (Immobilon™ Western ; *Chemiluminiscent HRP Substrate*) (Millipore Corporation, USA) à la proportion 1 :1. La révélation s'est faite à l'aide d'un ChemiDoc™ Imaging system (Bio-Rad, München) qui détecte par une caméra haute résolution, la lumière émise par chimiluminescence. Les anticorps utilisés sont résumés dans le Tableau V ci-dessous.

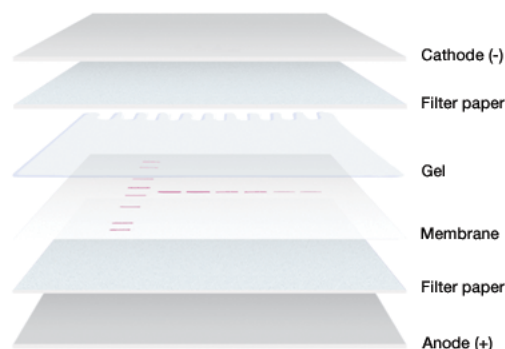


Figure 21 : Représentation du système de transfert lors du Western Blot

Tableau V : Liste des anticorps utilisés pour le Western Blot

Anticorps	Masse moléculaire (kDa)	Espèces	Dilution primaire	Dilution secondaire	Reference	Fournisseur
β- actin	45	Lapin	1 :5000	1:1000	A2066	Sigma-Aldrich
Akt	62	Lapin	1 :1000	1 :4000	7985-R	Cell Signaling Technology
pAkt1	60	Lapin	1 :1000	1 :4000	4691	Cell Signaling Technology
ERK1/2	42	Lapin	1 :2000	1 :4000	4695S	Cell Signaling Technology
pERK1/2	44/42	Lapin	1 :2000	1 :4000	4370S	Cell Signaling Technology
PARP	116	Lapin	1 :1000	1 :4000	9542L	Cell Signaling Technology
PARP clivé	89	Lapin	1 :1000	1 :4000	9541S	Cell Signaling Technology

▪ Expression des résultats

Les protéines ont été quantifiées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images Bio-Rad (Image Lab 6.0) et la β-actine a été utilisée pour assurer un chargement égal des protéines et pour normaliser les expressions.

II.2.8. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (ESM). L'analyse des résultats *in vivo* a été effectuée à l'aide du test d'ANOVA (test d'analyse des variances) suivi du post test de Dunnet (pour comparer les différents groupes au groupe témoin négatif DMBA) et du test t de student (unpaired t-test) (pour comparer le groupe témoin normal NOR au groupe témoin négatif DMBA).

Pour les tests *in vitro*, les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne de trois expériences indépendantes. L'analyse des résultats *in vitro* a été effectuée à l'aide du test t de student (unpaired t-test) pour comparer le groupe témoin aux groupes tests.

L'ensemble de ces analyses a été fait à l'aide du logiciel Graphpad Prism (version 5.0). Les valeurs de probabilité $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Rendements d'extraction des extraits bruts

Dans le tableau VI ci-dessous sont présentés les différents rendements d'extraction obtenus avec l'extrait aqueux et au méthanol des écorces de *Ficus umbellata*. Il ressort que l'extraction aqueuse a un rendement de 11,5% et celle au méthanol un rendement de 6%.

Tableau VI : Rendement d'extraction des extraits bruts de *Ficus umbellata*

Extraits	Masse de la poudre (g)	Masse de l'extrait (g)	Rendement (%)
Aqueux	2000	229,8	11,5
Méthanol	2700	162,2	6

III.1.2. Dosage quantitatif de quelques classes de métabolites secondaires

Le dosage quantitatif des classes de métabolites secondaires réalisé avec les extraits de *F. umbellata* a montré des teneurs variantes en phénols totaux, flavonoïdes, flavonols et alcaloïdes. Le tableau VII ci-dessous résume les teneurs de ces classes de composés dans les extraits de *F. umbellata*. On note que les phénols totaux sont les métabolites secondaires les plus abondants avec respectivement une teneur de $540,21 \pm 04,42$ et $651,31 \pm 12,03$ mg équivalente (eq) de quercétine/g d'extrait sec dans l'extrait aqueux et au méthanol tandis que les alcaloïdes sont les moins abondants avec respectivement une teneur de $60,21 \pm 14,38$ et $120,21 \pm 6,04$ mg eq berberine/g d'extrait sec dans l'extrait aqueux et au méthanol.

Tableau VII : Quantification de quelques classes de métabolites secondaires

Classe phytochimique		Teneur dans les extraits de <i>F. umbellata</i>	
		Aqueux (EA)	Methanol (MeOH)
1	Phenols totaux	$540,21 \pm 04,42$	$651,31 \pm 12,03$
2	Flavonoïdes	$268,25 \pm 35,55$	$545,33 \pm 9939$
3	Flavonols	$78,22 \pm 6,11$	$180,15 \pm 10,74$
4	Alcaloïdes	$60,21 \pm 14,38$	$120,21 \pm 6,04$

Les taux de phénols totaux, flavonoïdes, flavonols sont exprimés en mg eq quercetin/g d'extrait sec, le taux d'alcaloïdes est exprimé en mg eq berberin/g d'extrait sec. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm ESM de tests réalisés en triplicata

III.1.3. Potentiel cytotoxique des extraits de *Ficus umbellata*

Le tableau VIII ci-dessous résume le potentiel cytotoxique des extraits aqueux (EA) et au méthanol (MeOH) de *F. umbellata* sur les cellules cancéreuses mammaires (MCF-7, MDA-MB-231), ovariennes (PA-1, Hey et OAW-42) et sur une lignée cellulaire non tumorale (NIH-3T3). On observe que EA n'a pas induit de cytotoxicité significative jusqu'à 300 $\mu\text{g/mL}$ sur les cellules mammaires

après 24 h d'incubation. L'extrait au MeOH présente une cytotoxicité après 24 h d'incubation comprise entre 100 et 250 µg/mL avec un effet plus prononcé sur les cellules mammaires MDA-MB-231 (CC₅₀ = 180 µg/mL) et ovariennes PA-1 (CC₅₀ = 100 µg/mL). Le paclitaxel présente des CC₅₀ comprise entre 0,6 et 3,32 nM sur lesdites cellules. Les indices de sélectivité (Tableau IX) varient entre 1,19 et 2,97 avec l'extrait au méthanol.

Tableau VIII : Effets cytotoxiques des extraits de *Ficus umbellata*

	CC ₅₀					
	MCF-7	MDA-MB-231	PA-1	Hey	OAW-42	NIH-3T3
MeOH (µg/mL)	250	180	100	130	213	297
EA (µg/mL)	> 300	> 300	> 300	148	> 300	> 300
Paclitaxel (nM)	2,27	3,32	0,6	2,31	1,51	> 300

CC₅₀, concentration d'extraits de *F. umbellata* entraînant une viabilité cellulaire de 50%. Les cellules MCF-7 ; MDA-MB-231 ; PA-1, Hey, OAW-42 et NIH-3T3 ont été exposées aux extraits aqueux et méthanol de *F. umbellata* pendant 24 h.

Tableau IX : Indices de sélectivité des extraits de *Ficus umbellata* sur les cellules cancéreuses.

	Indice de sélectivité				
	NIH-3T3/ MCF-7	NIH-3T3/ MDA-MB-231	NIH-3T3/ PA-1	NIH-3T3/ Hey	NIH-3T3/ OAW-42
MeOH	1,19	1,65	2,97	2,28	1,39

L'indice de sélectivité est égal au rapport des CC₅₀ obtenues sur la lignée cellulaire non tumorale (NIH-3T3) sur la CC₅₀ des lignées cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-231, OAW-42, Hey et PA-1).

Les courbes doses-réponses (Figure 21) permettent de calculer le pourcentage de viabilité des cellules en fonction des concentrations.

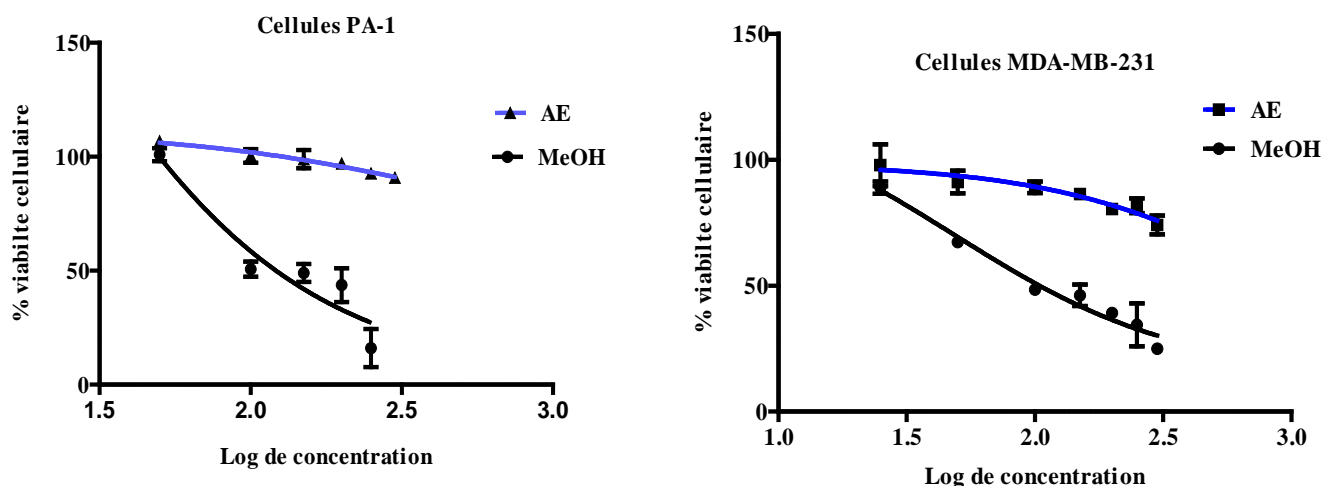


Figure 22: Courbes doses-réponses des extraits de *F. umbellata*

II.1.4. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur des modèles de cancers du sein et de l’ovaire

III.1.4.1. Effets protecteurs des extraits de *Ficus umbellata* sur le cancer du sein et de l’ovaire

III.1.4.1.1. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur l’évolution pondérale des animaux

L’évolution pondérale des animaux au cours des 150 jours d’expérimentation est représentée par la Figure 22 ci-après. Aucun changement significatif n’a été observé entre les animaux du groupe DMBA en comparaison à ceux du groupe normal. Entre les animaux des groupes traités aux extraits de *F. umbellata* et ceux du groupe DMBA, aucune différence significative n’a également été observée. Cependant les animaux traités avec le tamoxifène ont présenté un poids corporel significativement inférieur ($p < 0,01$) à ceux du groupe DMBA.

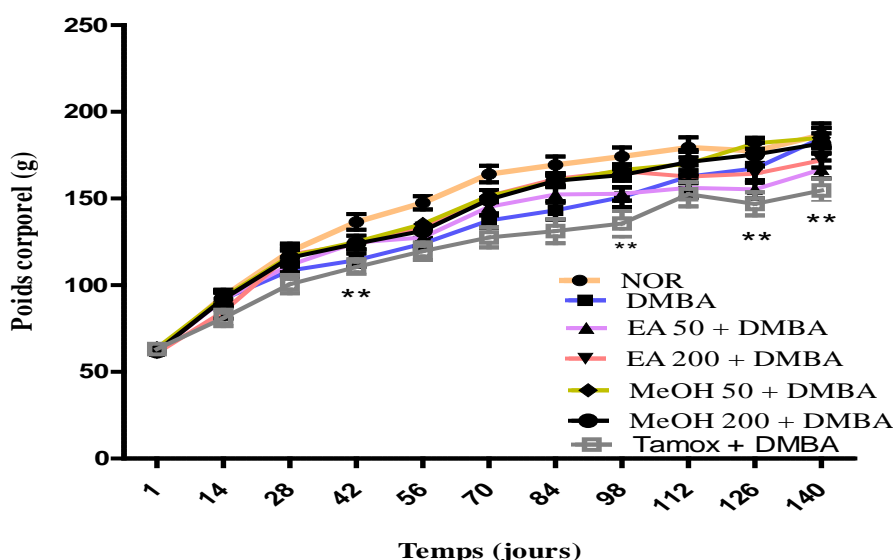


Figure 23: Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur l’évolution pondérale des rats après 20 semaines de traitement.

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant le véhicule 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant le véhicule 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l’extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l’extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l’exception du groupe normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l’œstradiol benzoate (5 mg/kg). Les points représentent les moyennes \pm ESM (n = 10). ** $p < 0,01$ comparés au groupe DMBA.

III.1.4.1.2. Effets protecteurs des extraits de *Ficus umbellata* sur l’incidence des décès

La courbe montrant le taux de survie selon la méthode de Kaplan Meir (Figure 23) ci-dessous, indique qu’il n’a été noté aucun décès durant toute l’expérience chez les animaux du groupe normal. Cependant, la plus grande mortalité a été enregistrée chez le groupe DMBA (40%) ; suivie par les

animaux traités au tamoxifène (20%) et ceux traités à l'extrait aqueux de *F. umbellata* à la dose de 50 mg/kg (20%), les animaux ayant reçu l'extrait au MeOH de *F. umbellata* à la dose de 50 mg/kg présente 10% de décès après 20 semaines de traitement.

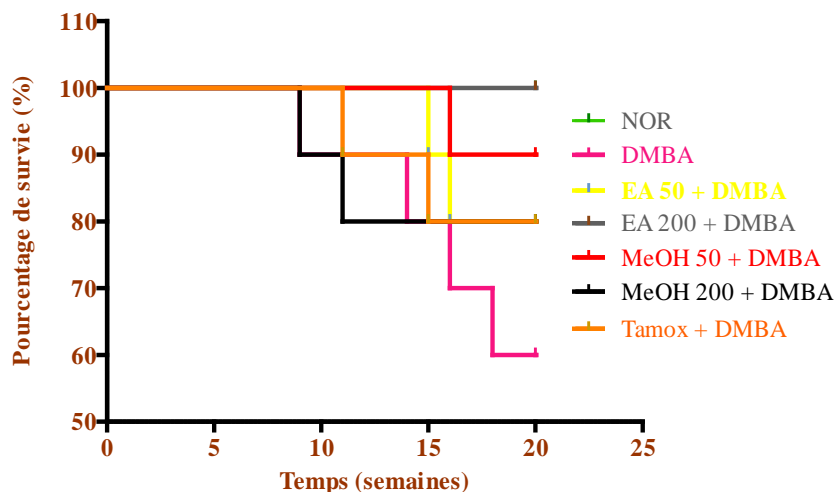


Figure 24: Courbe de survie de Kaplan Meir après 20 semaines de traitement.

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration sous-cutanée de l'oestradiol benzoate (5 mg/kg).

III.1.4.1.3 Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur l'incidence, la charge, la masse tumorale

Les résultats consignés dans le tableau X ci-dessous récapitulent les effets de *F. umbellata* sur les différents paramètres tumoraux. Aucune tumeur n'a été détectée chez les animaux du groupe normal ; les animaux ayant reçu le DMBA (50 mg/kg), promue par l'œstradiol benzoate (5 mg/kg) pendant 10 jours ont développé des tumeurs ovariennes au bout de 150 jours comparés aux animaux du groupe normal avec une incidence tumorale de 60%. Le traitement au tamoxifène a diminué la charge tumorale ainsi que l'incidence tumorale (40%) comparativement au groupe DMBA. Par ailleurs, on note une diminution de l'incidence tumorale variant entre 10 et 40 % chez les animaux traités aux extraits aqueux (50 et 200 mg/kg) et méthanolique (50 et 200 mg/kg) comparés au groupe DMBA (60%). On observe également une diminution significative ($p < 0,05$) de la masse moyenne des tumeurs chez le groupe EA 200 mg/kg comparé au groupe DMBA. Le pourcentage d'inhibition lié à la charge tumorale était compris entre 46 et 58 % chez les animaux traités aux extraits de *Ficus umbellata* et de 52% chez ceux recevant le tamoxifène comparé au groupe DMBA (Tableau X)

Tableau X : Activité chimiopréventive des extraits de *F. umbellata* après 150 jours de traitement sur le cancer de l’ovaire.

Paramètres	NOR	DMBA	EA 50 +DMBA	EA 200 +DMBA	MeOH50 + DMBA	MeOH200 + DMBA	Tamox +DMBA
Nombre de rats avec tumeurs/rats total	0/10	6/10	4/10	1/10	1/10	2/10	4/10
Incidence tumeurs (%)	0	60	40	10	10	20	40
Masse moyenne des tumeurs	-	1,73 ± 0,51	1,60 ± 0,95	0,73 ± 0,18*	0,94 ± 0,27	0,844 ± 0,12	0.83 ± 0,19
% Inhibition liée au poids des tumeurs	-	-	7,5	57,8	45,6	51,2	52
Charge tumorale totale (g)	0	17,32	9,26	7,30	9,39	8,44	8,28
% Inhibition liée à la charge tumorale	-	-	46,54	58	46	51,27	52

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l’extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l’extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l’exception du groupe normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l’oestradiol benzoate (5 mg/kg). Les valeurs représentent les moyennes ± ESM (n = 10). *p < 0,05 comparé au groupe DMBA.

III.1.4.1.4 Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur la morphologie des tumeurs

Les résultats de la figure 24 A ci-dessous nous indiquent que les animaux du groupe normal n’ont développé aucune tumeur tout au long de l’expérience et que les plus grosses tumeurs ont été observées chez les animaux du groupe DMBA. Des figures 24 B et 24 C, on observe chez les animaux du groupe DMBA une masse relative des ovaires et un volume des tumeurs, significativement ($p < 0,01$) supérieurs à ceux des animaux traités aux extraits de *F. umbellata*. Le tamoxifène a protégé les animaux contre l’incidence des tumeurs avec un volume des tumeurs significativement ($p < 0,01$) inférieur à ceux du groupe DMBA. Par ailleurs, les animaux traités avec les extraits aqueux (50 et 200 mg/kg) et au méthanol (50 mg/kg) ont également été protégés notamment à travers une diminution significative ($p < 0,05$) du volume des tumeurs et une diminution significative ($p < 0,01$) chez les animaux du groupe MeOH 200 mg/kg. On observe également une diminution significative ($p < 0,05$) de la masse relative des ovaires chez les animaux du groupe EA 200 mg/kg en comparaison à ceux du groupe DMBA.

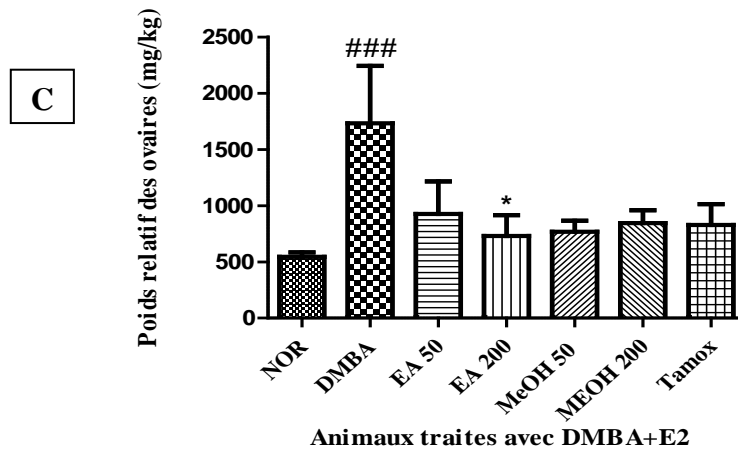
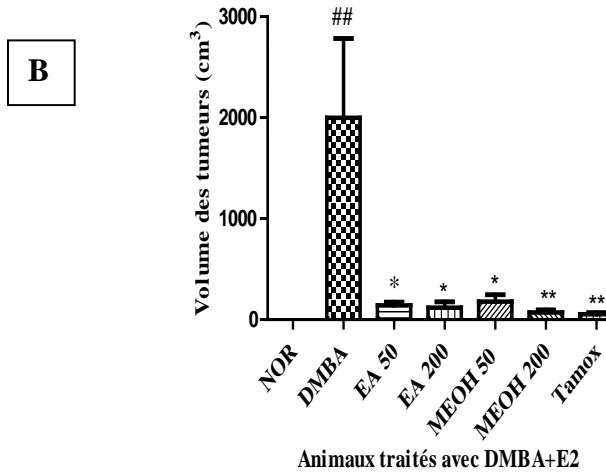
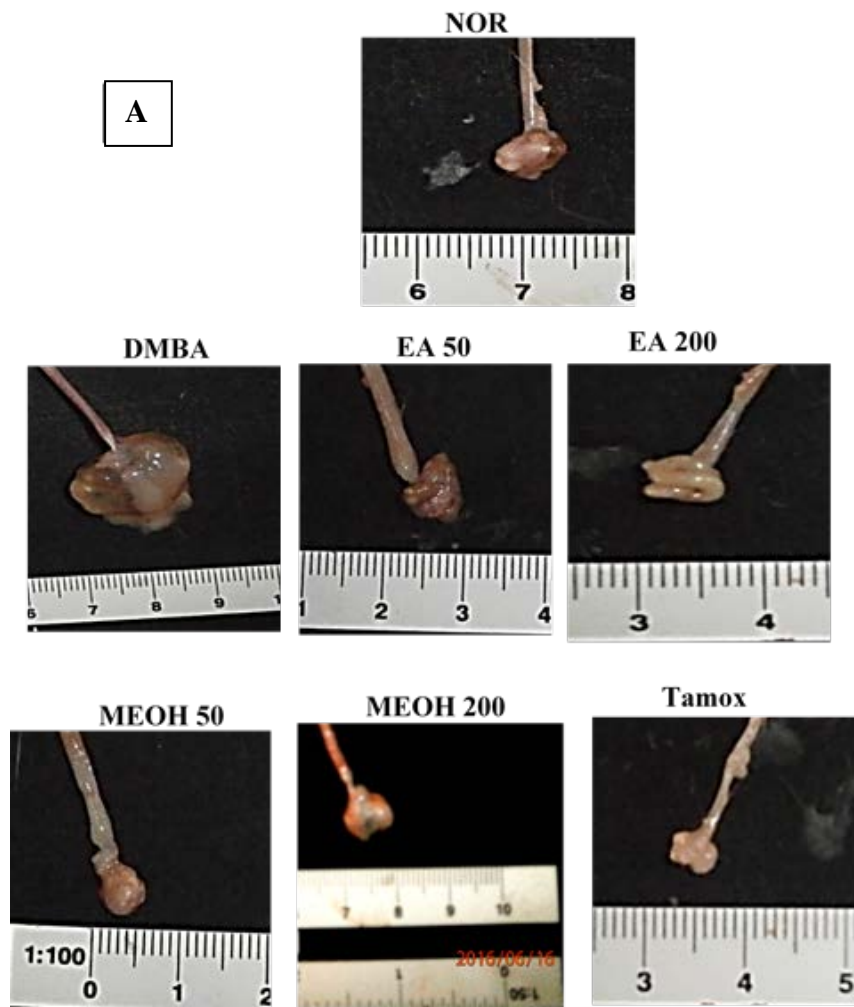


Figure 25: Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur la morphologie des tumeurs

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant le véhicule 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'œstradiol benzoate (5 mg/kg). Les valeurs représentent les moyennes ± ESM (n = 10). ^{###}p < 0,001 comparé au groupe NOR ; ^{*}p < 0,05 et ^{**}p < 0,01 comparés au groupe DMBA

III.1.4.1.5. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur la microarchitecture des glandes mammaires et des ovaires

L'analyse de la microarchitecture des glandes mammaires a permis d'observer dans les tissus mammaires des rates du groupe DMBA une hyperplasie atypique, un allongement de la structure du canal, la présence des cellules infiltrées à l'intérieur des acini et une désorganisation du parenchyme de la microarchitecture de la glande mammaire comparés avec ceux du groupe normal qui ont présenté un parenchyme normal et des lobules constitués des acini de tailles normales et des cellules acinaires (Figure 25). L'administration du tamoxifène a protégé les animaux contre l'hyperplasie atypique des glandes mammaires induite par le DMBA démontré ici par la présence de lobules normaux avec des acini de lumière normale et un parenchyme quasi conservé. Des structures atypiques de la glande mammaire ont également été trouvées chez des animaux traités avec EA 50 mg/kg de *F. umbellata*. Les extraits aqueux (200 mg / kg) et au méthanol (50 et 200 mg / kg) de *F. umbellata* ont protégé les animaux contre l'hyperplasie des glandes mammaires induite par le DMBA démontré ici par la présence de lobules normaux avec des acini de lumière normale et un parenchyme quasi conservé (Figure 25).

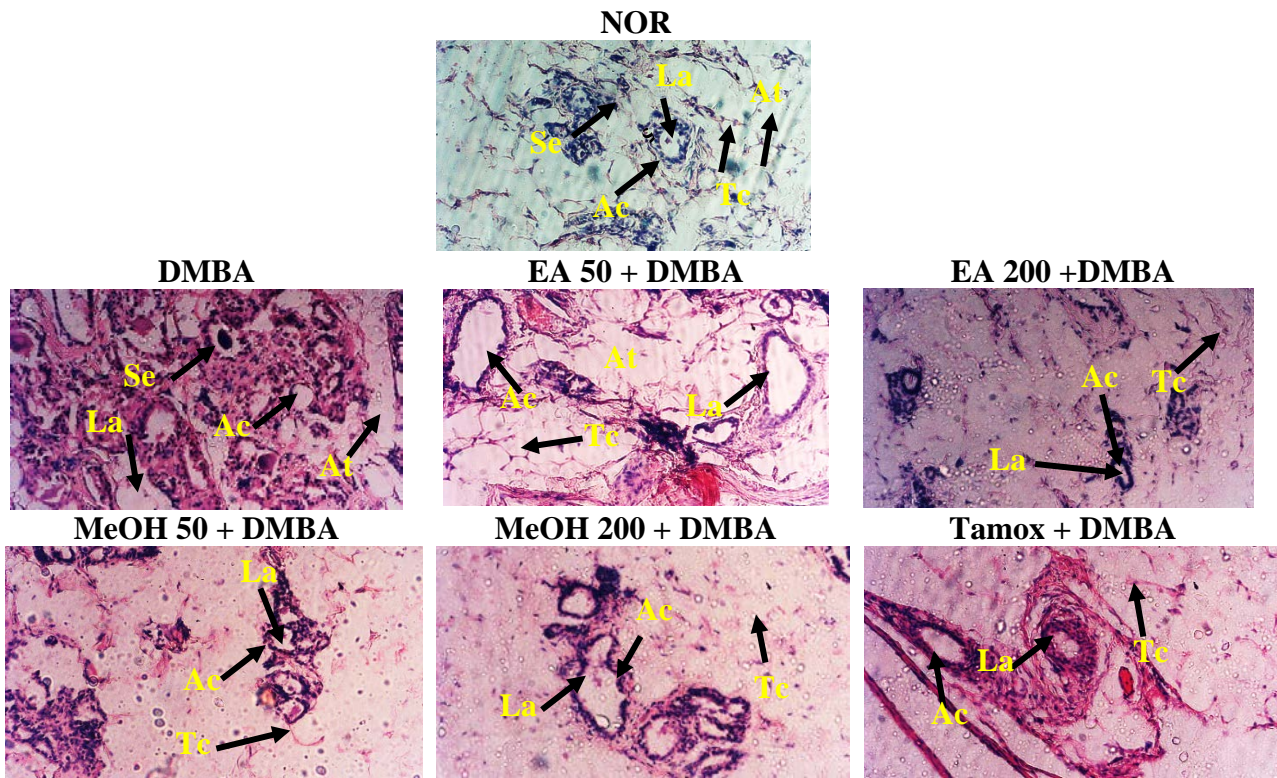


Figure 26: Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur les microphotographies (H&E 100X) des glandes mammaires après 150 jours de traitement.

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'oestradiol benzoate (5 mg/kg). **At** : tissu adipeux, **Se** : sécrétion éosinophile, **Ac** : acini, **Tc** : tissu conjonctif, **La** : lumière acinaire

L'analyse histomorphologique des coupes ovariennes a montré chez le groupe normal un parenchyme normal des ovaires avec la présence des follicules de Degraft en pleine folliculogénèse. Chez le groupe DMBA (témoin négatif) on observe un carcinome ovarien caractérisé par une hyperplasie atypique du parenchyme ovarien avec infiltration des cellules anormales. Le traitement à l'extrait aqueux à la dose de 50 mg/kg tout comme le traitement au tamoxifène n'ont pas pu inverser ce carcinome ovarien in situ observé. Chez les animaux traités à EA à la dose de 200 mg/kg et MeOH aux doses de 50 et 200 mg/kg, on observe la présence d'un parenchyme ovarien quasi normal, ces traitements ayant protégé contre l'hyperplasie atypique de l'ovaire (Figure 26)

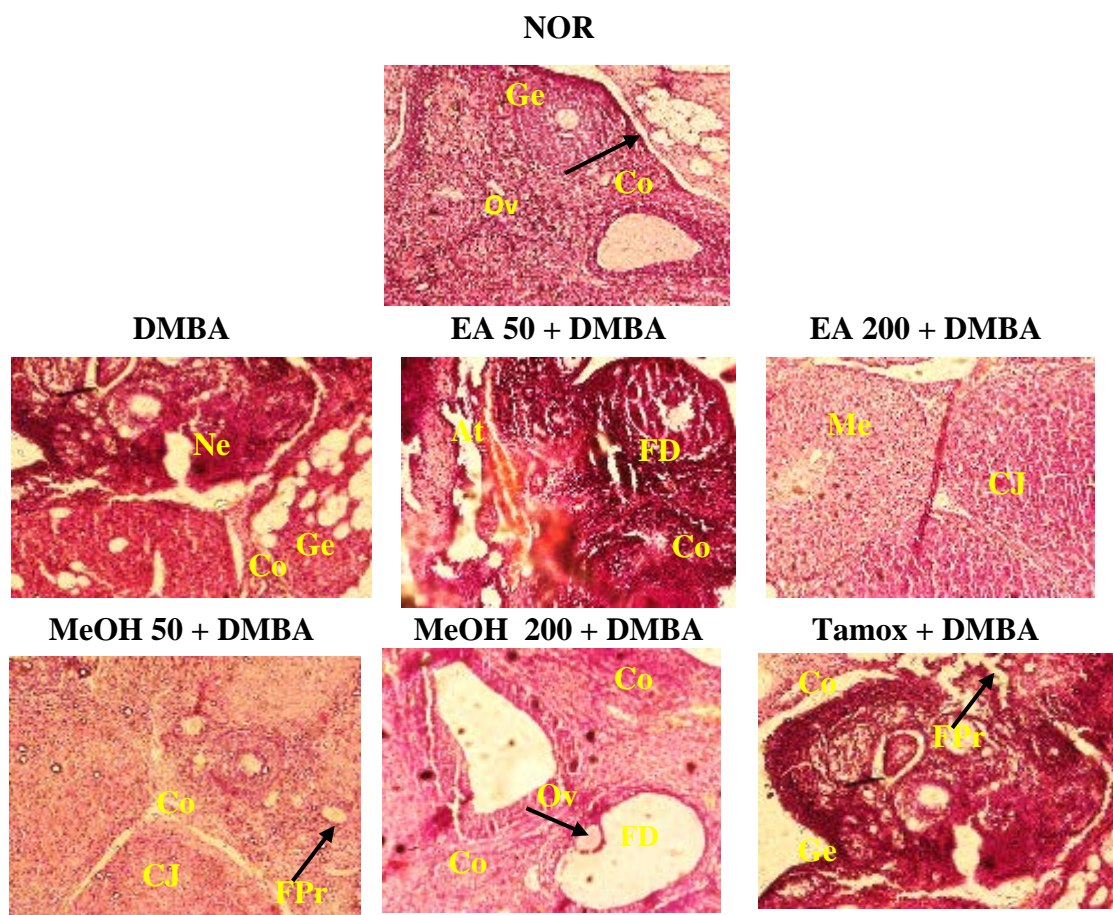


Figure 27: Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur les microphotographies (H&E 100X) des ovaires après 150 jours de traitement.

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'oestradiol benzoate (5 mg/kg). **Ge** : épithélium germinale, **Ne** : cellules nécrotiques, **FPr** : follicule primaire, **Ov** : ovocyte, **FD** : follicule de Degraff, **CJ** : Corps jaune, **Ge** : cellules germinales,

III.1.4.1.6. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur quelques paramètres du stress oxydatif

Les résultats obtenus sur l'effet des extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* sur quelques marqueurs du stress oxydant dans les homogénats des ovaires après 150 jours de traitement sont représentés dans le tableau XI ci-dessous. Il a été observé une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de MDA chez le groupe tamoxifène ainsi que chez les animaux traités aux extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg respectivement comparativement aux animaux du groupe DMBA. On observe également une diminution non significative du taux de glutathion réduit (GSH) chez les animaux du groupe DMBA en comparaison à ceux du groupe normal. Une diminution non significative de GSH a également été observée chez tous les animaux traités aux extraits de *F. umbellata* en comparaison au groupe DMBA.

Tableau XI : Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur quelques paramètres du stress oxydatif dans l'homogénat des ovaires après 150 jours de traitement.

Paramètres	NOR	DMBA	EA 50 +DMBA	EA 200 +DMBA	MeOH 50 +DMBA	MeOH 200 + DMBA	Tamox +DMBA
MDA (µMol/L)	9,89E-07 ± 1,1E-07	1,48E-06 ± 2,6E-07	7,2E-07 ± 2,2E-07*	8,39E-07 ± 1,1E-07	1,02E-06 ± 1,7E-07	7,78E-07 ± 3,0E-08*	7,02E-07 ± 1,3E-07*
GSH (µMol/L)	2,59E-05 ± 2,7E-06	1,80E-05 ± 4,4E-06	2,31E-05 ± 3,3E-06	2,77E-05 ± 2,8E-06	2,05E-05 ± 3,5E-06	1,81E-05 ± 3,6E-06	1,96E-05 ± 3,5E-06

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'œstradiol benzoate (5 mg/kg). Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n = 10). *p < 0,05 sont comparés au groupe DMBA.

S'agissant de l'homogénat des glandes mammaires, les résultats obtenus sur l'effet des extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* sur quelques marqueurs du stress oxydatif après 150 jours de traitement sont représentés dans le tableau XII ci-dessous. Il a été observé une augmentation bien que non significative du taux de MDA chez les animaux du groupe DMBA comparativement à ceux du groupe témoin normal. Une diminution du taux de MDA a été observée chez tous les animaux traités comparativement au groupe DMBA. Une diminution significative (p < 0,05) étant notée chez les animaux du groupe MeOH 200 mg/kg. Une augmentation non significative du taux de glutathion réduit a également été observée chez tous les animaux traités en comparaison au groupe DMBA.

Tableau XII : Effets des extraits de *F. umbellata* sur quelques paramètres du stress oxydatif dans l'homogénat de la glande mammaire après 150 jours de traitement.

Paramètres	NOR	DMBA	EA 50 +DMBA	EA 200 +DMBA	MeOH50 +DMBA	MeOH200 +DMBA	Tamox +DMBA
MDA (µMol/L)	1,69E-06 ± 1,11E-07	1,82E-06 ± 1,72E-07	1,79E-06 ± 2,7E-07	1,37E-06 ± 3,6E-07	1,18E-06 ± 2,4E-07	7,1E-07 ± 1,7E-07*	1,23E-06 ± 2,7E-07
GSH (µMol/L)	2,38E-05 ± 3,5E-06	2,19E-05 ± 4,7E-05	2,74E-05 ± 3,1E-06	2,66E-05 ± 2,6E-06	2,74E-05 ± 2,9E-06	2,54E-05 ± 4,0E-06	2,38E-05 ± 2,5E-06

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'œstradiol benzoate (5 mg/kg). Les valeurs représentent les moyennes ± ESM (n = 10). *p < 0,05 comparés au groupe DMBA.

III.1.4.1.7. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur quelques paramètres toxicologiques

III.1.4.1.7.1. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur la lipidémie, les transaminases et la créatinine

Les résultats consignés dans le tableau XIII ci-dessous montrent une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'activité des transaminases (ALAT et ASAT) chez les animaux du groupe DMBA en comparaison à ceux du groupe NOR. Une diminution non significative de l'activité des transaminases a été observée chez tous les groupes traités en comparaison au groupe DMBA.

Concernant la lipidémie, il a été observé une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de cholestérol total et de triglycérides chez les animaux traités à l'extrait aqueux aux doses de 200 et 50 mg/kg respectivement en comparaison aux animaux du groupe DMBA.

Le taux de créatinine a augmenté de manière significative ($p < 0,05$) chez les animaux du groupe DMBA en comparaison à ceux du groupe normal. On observe également une augmentation significative ($p < 0,01$) du taux de créatinine chez les animaux traités au tamoxifène en comparaison à ceux du groupe DMBA (tableau XIII).

Concernant le taux de protéines totales, aucune différence significative n'a été observée entre les animaux du groupe normal et ceux du groupe DMBA. De même, aucune différence significative n'a été observée entre les animaux du groupe tamoxifène et ceux traités avec les extraits de *F. umbellata* à l'exception du groupe EA 50 mg/kg où l'on observe une diminution significative ($p < 0,05$) en comparaison au groupe DMBA.

Tableau XIII : Effets des extraits de *F. umbellata* sur les transaminases, la lipidémie et le taux de créatinine après 20 semaines de traitement

Paramètres	NOR	DMBA	EA 50 +DMBA	EA 200 + DMBA	MeOH50 + DMBA	MeOH200 + DMBA	Tamox +DMBA
ALAT (U/I)	0,026 ± 0,004	0,52 ± 0,05##	0,055 ± 0,003	0,035 ± 0,038	0,126 ± 0,015	0,139 ± 0,04	0,13 ± 0,034
ASAT (U/I)	0,117 ± 0,02	0,406 ± 0,03##	0,148 ± 0,03	0,132 ± 0,02	0,123 ± 0,08	0,110 ± 0,05	0,098 ± 0,03
Cholestérol total (g/L)	40,30 ± 2,39	40,49 ± 1,00	32,00 ± 4,57	27,31 ± 2,79*	21,20 ± 2,73	44,64 ± 1,97	46,41 ± 2,67
Triglycerides (mg/dL)	72,98 ± 4,05	76,26 ± 8,86	51,84 ± 2,35*	52,67 ± 4,11	71,11 ± 7,03	63,42 ± 3,87	94,23 ± 4,12
Créatinine (g/L)	0,15 ± 0,01	0,36 ± 0,06*	0,33 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,36 ± 0,09	0,36 ± 0,07	0,62 ± 0,07**
Protéines totales (g/dL)	5,92 ± 0,26	6,04 ± 0,24	4,74 ± 0,18*	6,40 ± 0,46	6,46 ± 0,3	6,29 ± 0,4	5,75 ± 0,09

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'œstradiol benzoate (5 mg/kg). Les valeurs représentent les moyennes ± ESM (n = 10). ##p < 0,01 comparé au groupe NOR *p < 0,05 et **p < 0,01 comparés au groupe DMBA.

III.1.4.1.7.2. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur quelques paramètres hématologiques

En rapport avec l'effet de l'extrait sur quelques paramètres hématologiques, les résultats sont présentés dans le tableau XIV ci-dessous. On note une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre de globules rouges chez les animaux du groupe DMBA en comparaison à ceux du groupe normal. Une baisse significative ($p < 0,05$), du nombre d'hémoglobine corpusculaire moyen (MCH) et une diminution significative ($p < 0,01$) de la concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (CCMH) ont été observées chez les animaux du groupe tamoxifène en comparaison à ceux du groupe DMBA. Fait intéressant, nous avons observé une protection des animaux traités avec les différents extraits de *F. umbellata* à toutes les doses contre une baisse du taux de globules rouges observée chez les animaux du groupe DMBA.

Tableau XIV : Effets des extraits de *F. umbellata* sur quelques paramètres hématologiques après 20 semaines de traitement

Paramètres	NOR	DMBA	EA 50 +DMBA	EA 200 +DMBA	MeOH50 + DMBA	MeOH200 + DMBA	Tamox + DMBA
GB ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	1,91 $\pm 0,34$	2,51 $\pm 0,40$	3,9 $\pm 0,86$	3,21 $\pm 0,67$	2,3 $\pm 0,32$	2,45 $\pm 0,46$	2,15 $\pm 0,22$
Lymphocytes (%)	61,21 $\pm 4,88$	59,48 $\pm 3,83$	58,23 $\pm 3,62$	62,15 $\pm 2,91$	62,08 $\pm 3,04$	65,28 $\pm 2,65$	58,55 $\pm 2,35$
Monocytes (%)	6,65 $\pm 0,42$	7,33 $\pm 0,60$	6,61 $\pm 0,42$	6,91 $\pm 0,81$	7,28 $\pm 0,74$	9,2 $\pm 0,31$	6,75 $\pm 0,52$
Granulocytes (%)	32,13 $\pm 4,56$	33,18 $\pm 3,68$	35,15 $\pm 3,28$	30,93 $\pm 2,28$	30,63 $\pm 2,35$	28,78 $\pm 2,25$	34,7 $\pm 1,86$
GR ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	7,22 $\pm 0,48$	6,96 $\pm 0,40\#$	7,52 $\pm 0,23$	7,60 $\pm 0,17$	7,74 $\pm 0,18$	7,53 $\pm 0,04$	7,28 $\pm 0,24$
Hématocrite (%)	43,12 $\pm 3,43$	42,16 $\pm 2,59$	44,61 $\pm 1,39$	45,1 $\pm 0,98$	47,11 $\pm 1,17$	45,23 $\pm 0,60$	43,73 $\pm 1,26$
VCM (fL)	59,85 $\pm 1,12$	60,51 $\pm 0,29$	59,35 $\pm 0,54$	59,38 $\pm 0,7$	60,91 $\pm 0,39$	60,15 $\pm 0,68$	60,16 $\pm 0,35$
Plaquettes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	378,2 $\pm 41,73$	408,5 $\pm 18,75$	422,83 $\pm 20,45$	425,66 $\pm 32,12$	455 $\pm 38,09$	360,16 $\pm 42,6$	478,16 $\pm 15,03$
HCM (pg)	18,68 $\pm 0,32$	19,3 $\pm 0,25$	18,65 $\pm 0,23$	18,73 $\pm 0,20$	18,96 $\pm 0,16$	18,75 $\pm 0,23$	18,3 $\pm 0,15^*$
Hémoglobine (g/dL)	13,58 $\pm 1,08$	13,51 $\pm 0,90$	14,08 $\pm 0,52$	14,28 $\pm 0,32$	14,75 $\pm 0,42$	14,15 $\pm 0,21$	13,41 $\pm 0,44$
CCMH (g/dL)	31,31 \pm 0,22	31,96 $\pm 0,28$	31,48 $\pm 0,27$	31,61 $\pm 0,43$	31,23 $\pm 0,16$	31,25 $\pm 0,15$	30,6 $\pm 0,22^{**}$

NOR = Animaux servant de contrôle normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de contrôle négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de contrôle positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'oestradiol benzoate (5 mg/kg). Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (n = 10). #p < 0,05 comparé au NOR ; *p < 0,05 et **p < 0,01 comparés au groupe DMBA. **GB** : Globules blancs ; **GR** : Globules rouges ; **VCM** : Volume corpusculaire moyen ; **HCM** : Hémoglobine corpusculaire moyen ; **CCMH** : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.

III.1.4.1.7.3. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur le poids relatif des organes après 20 semaines de traitement

Les résultats obtenus sur le poids relatif des organes (Tableau XV), donnent de constater une baisse significative (p < 0,05) du poids relatif de l'utérus, du foie, et une augmentation significative

($p < 0,001$) du poids relatif du cerveau chez les animaux du groupe tamoxifène en comparaison à ceux du groupe DMBA. Chez les animaux traités, nous observons une diminution significative ($p < 0,01$) du poids relatif du foie chez les animaux du groupe MeOH 50 mg/kg et une augmentation du poids relatif ($p < 0,05$) des surrénales chez les animaux traités à l'extrait aqueux et au méthanol aux doses de 200 mg/kg ainsi qu'une augmentation du poids relatif de la rate chez les animaux traités à l'extrait aqueux à la dose de 200 mg/kg en comparaison au groupe DMBA.

Tableau XV : Effets des extraits de *F. umbellata* sur le poids relatif des organes après 20 semaines de traitement

Organes	NOR	DMBA	EA 50 + DMBA	EA 200 + DMBA	MeOH 50 + DMBA	MeOH 200 + DMBA	Tamox + DMBA
Utérus	2703,87 ± 494,85	1887,56 ± 212,11	1618,97 ± 73,79	2158,32 ± 305,66	2566,01 ± 418,52	2100,68 ± 227,9	643,38 ± 25,45*
Foie	33978,23 ± 608,21	36983,76 ± 496,00	35057,02 ± 1189,18	33073,22 ± 1330,93	31154,28 ± 535,92**	34120,78 ± 1298,01	32068,64 ± 1801,93*
Poumons	7152,24 ± 548,77	6374,34 ± 263,17	6710,31 ± 540,57	7295,43 ± 488,55	6547,02 ± 426,91	7517,33 ± 605,2	6332,43 ± 347,95
Rate	2115,80 ± 113,88	2021,21 ± 100,23	1964,29 ± 70,05	2841,28 ± 204,94**	1903,22 ± 50,42	2218,36 ± 103,3	2389,72 ± 139,20
Surrénale	256,92 ± 21,38	260,86 ± 19,99	297,01 ± 30,53	379,80 ± 36,63*	348,27 ± 36,42	368,56 ± 22,67*	344,08 ± 20,18
Reins	4993,25 ± 103,85	5500,42 ± 82,00	4952,97 ± 501,31	5709,14 ± 114,13	5208,32 ± 113,03	6010,17 ± 355,15	5753,71 ± 236,31
Femur	2734,37 ± 95,99	2990,48 ± 106,61	3019,59 ± 120,11	3013,05 ± 132,31	3262,95 ± 114,77	3344,09 ± 64,41	3163,50 ± 283,44
Cerveau	8426,09 ± 189,21	8580,18 ± 171,83	9045,49 ± 247,90	8900,86 ± 210,99	8309,45 ± 147,89	8963,10 ± 343,32	10456,47 ± 376,26***

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'œstradiol benzoate (5 mg/kg). Les valeurs représentent les moyennes ± ESM (n = 10). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparés au groupe DMBA.

III.1.4.1.7.4. Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur les organes de métastase et de toxicité

Les coupes histomorphologiques du foie ont montré une microarchitecture normale chez les animaux du groupe normal. Aucun changement sur la microarchitecture des différents organes n'a été observé chez les animaux des différents groupes traités (Figure 27).

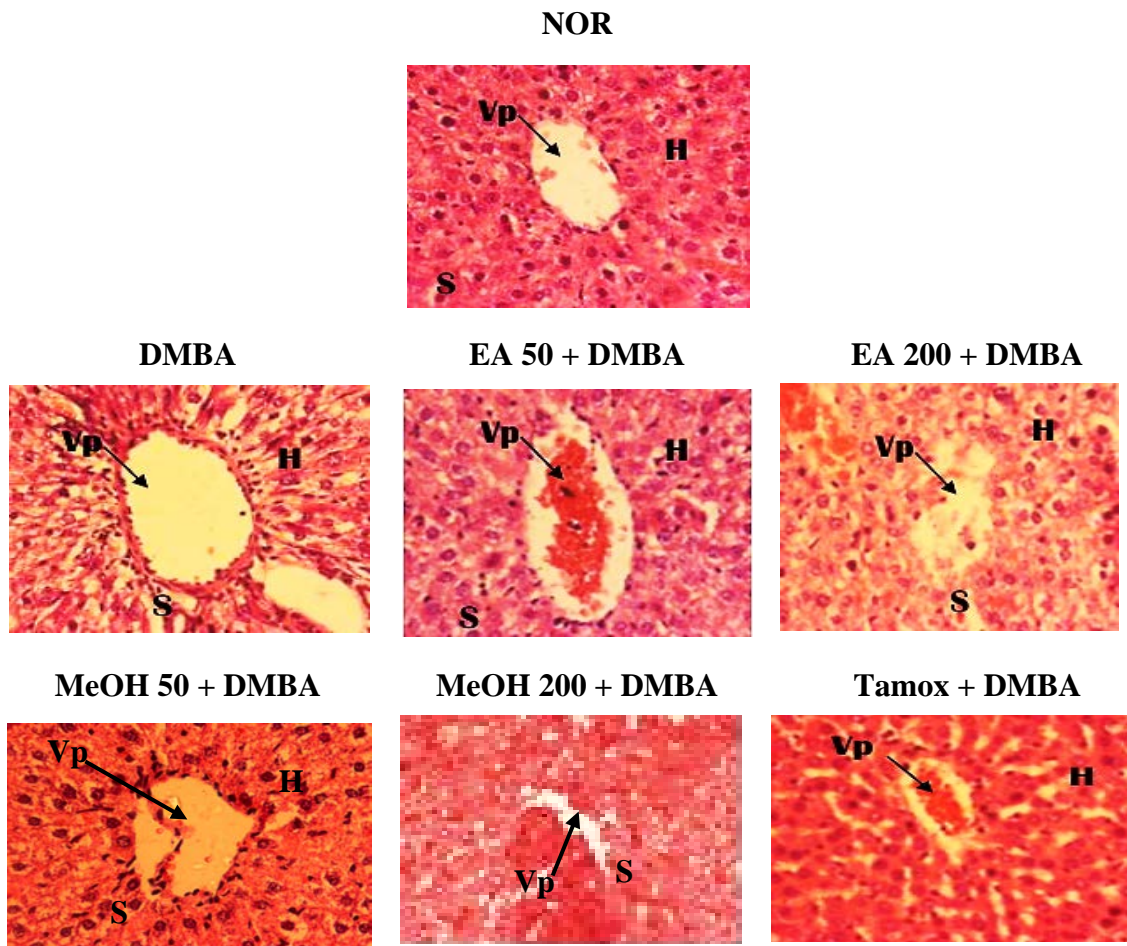


Figure 28 : Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur les microphotographies (H&E 400X) du foie après 150 jours de traitement.

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'oestradiol benzoate (5 mg/kg). **Vp** : veine porte hépatique, **H** : hépatocyte, **S** : sinusoides

L'analyse des coupes histomorphologiques du cerveau a montré une microarchitecture normale chez les animaux du groupe témoin normal. Aucun changement sur la microarchitecture du cerveau n'a été observé chez les animaux des différents groupes traités (Figure 28).

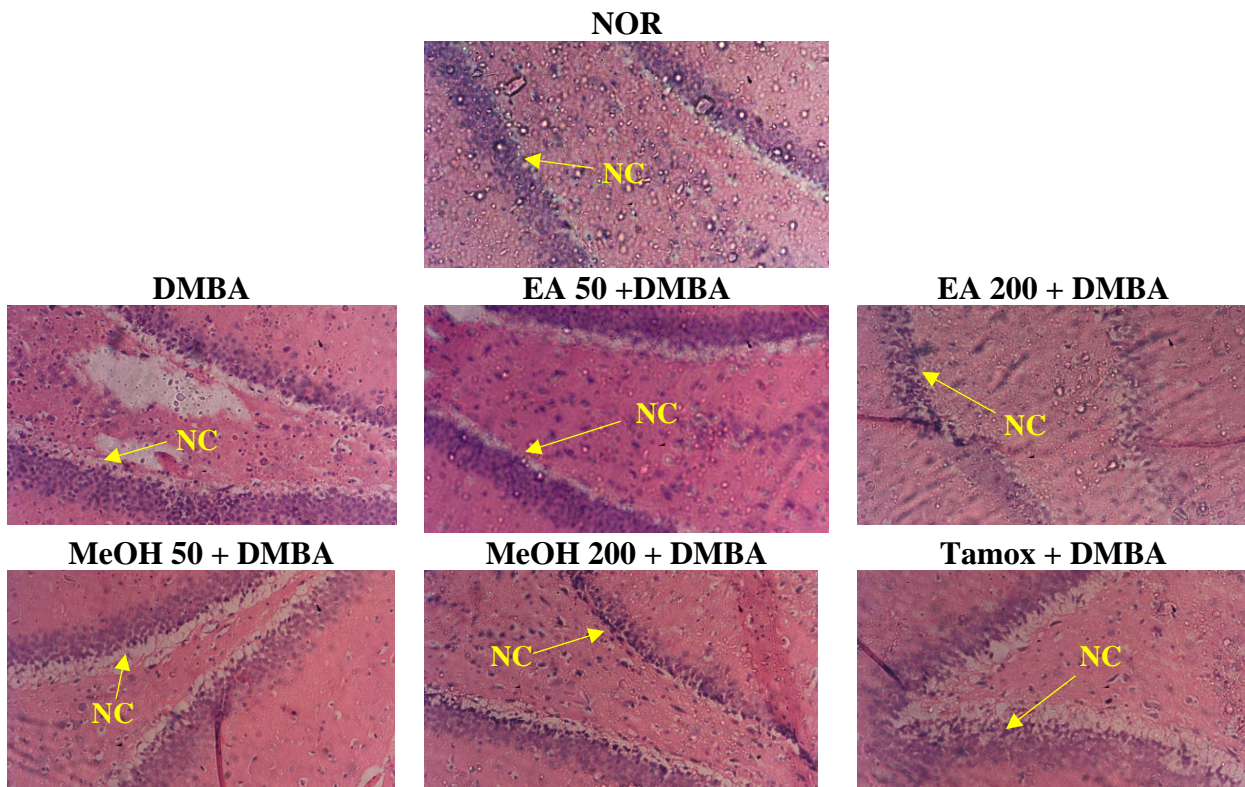


Figure 29 : Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur les microphotographies (H&E 100X) du cerveau après 150 jours de traitement.

NOR = Animaux servant de témoin normal recevant 2% éthanol ; DMBA = Animaux servant de témoin négatif recevant 2% éthanol ; EA+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; MEOH+DMBA= Animaux recevant l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* aux doses de 50 et 200 mg/kg ; Tamox + DMBA = Animaux servant de témoin positif, recevant du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. Tous les groupes à l'exception du groupe Normal (NOR) ont reçu une dose intragastrique de DMBA suivi par une administration subcutanée de l'œstradiol benzoate (5 mg/kg). NC : Noyau cellulaire

III.1.5. Mécanisme d'action anticancéreux de l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata*

III.1.5.1. Effets de l'extrait de *Ficus umbellata* sur le cycle cellulaire

Les résultats obtenus sur l'analyse du cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 par cytométrie de flux (Figure 29), montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes phases du cycle cellulaire des cellules du groupe témoin ayant été traités avec le DMSO (0,01%) et celles traitées avec l'extrait au méthanol aux concentrations de 45, 90 et 180 µg/mL après 12 h, 24 h et 48 h.

Concernant les cellules PA-1, aucune différence significative n'a été observée aux différentes phases du cycle cellulaire entre les cellules du groupe témoin et celles traitées avec l'extrait au

méthanol de *F. umbellata* aux concentrations de 25, 50 et 100 µg/mL après 12 h, 24 h et 48 h (Figure 30)

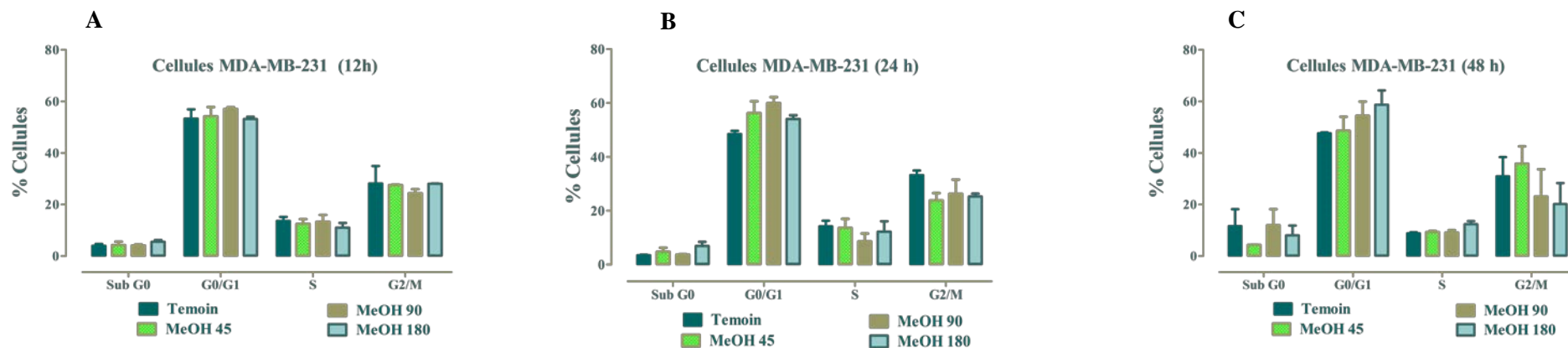


Figure 30 : Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur le cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 après 12h, 24h et 48h de traitement. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* à des concentrations de 45 ; 90 et 180 µg/mL. Témoin = cellules ayant été traitées au DMSO (0,01%), MeOH = cellules traitées à l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux différentes concentrations.

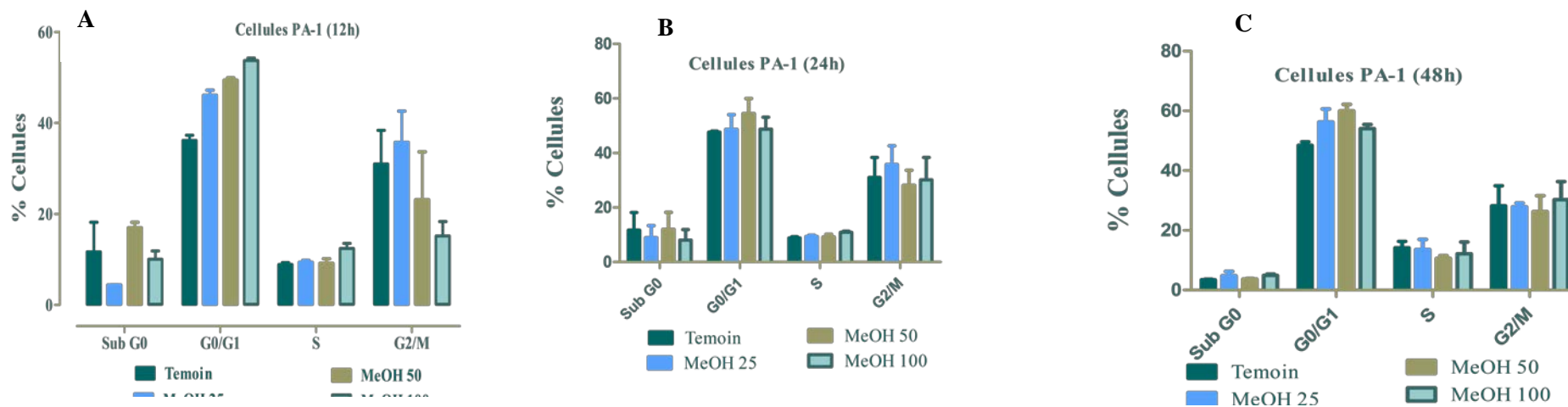


Figure 31 : Effets des extraits de *Ficus umbellata* sur le cycle cellulaire des cellules PA-1 après 12 h, 24 h et 48 h de traitement.

Les cellules PA-1 ont été traitées avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux concentrations de 25 ; 50 et 100 µg/mL. Témoin = cellules ayant été traitées au DMSO (0,01%), MeOH = cellules traitées à l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux différentes concentrations.

III.1.5.2. Effets de l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* sur le type de mort cellulaire

Les résultats présentés sur la figure 31A ci-dessous montrent trois types de cellules en fonction de l'émission de fluorescence et de l'aspect morphologique de la condensation de la chromatine dans les noyaux colorés. Les cellules vivantes (Va) présentent des noyaux vert-clairs uniformes avec une structure organisée, les cellules apoptotiques (Ap) possèdent un noyau vert avec une chromatine condensée ou fragmentée et les cellules nécrotiques (Ne) ont un noyau uniformément orange à rouge avec une structure organisée. On observe que les cellules MDA-MB-231 traitées avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux concentrations de 45, 90 et 180 µg/mL présentent une abondance de cellules apoptotiques (Ap) possédant un noyau vert avec une chromatine condensée comparativement aux cellules du groupe témoin qui présentent une abondance de cellules à noyaux vert clair uniformes avec une structure organisée.

De plus, le mécanisme de mort cellulaire induit par l'extrait au MeOH de *F. umbellata* représenté par les diagrammes ci-dessous (Figure 31 B et C) montre une diminution significative et concentration dépendante du taux de cellules MDA-MB-231 vivantes traitées respectivement à l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux concentrations de 45 , 90 et 180 µg/mL en comparaison à celles du groupe témoin d'une part ; et d'autre part , on observe une augmentation significative ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) et ($p < 0,001$) des cellules MDA-MB-231 en apoptose après traitement avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux concentrations de 45 , 90 et 180 µg/mL respectivement.

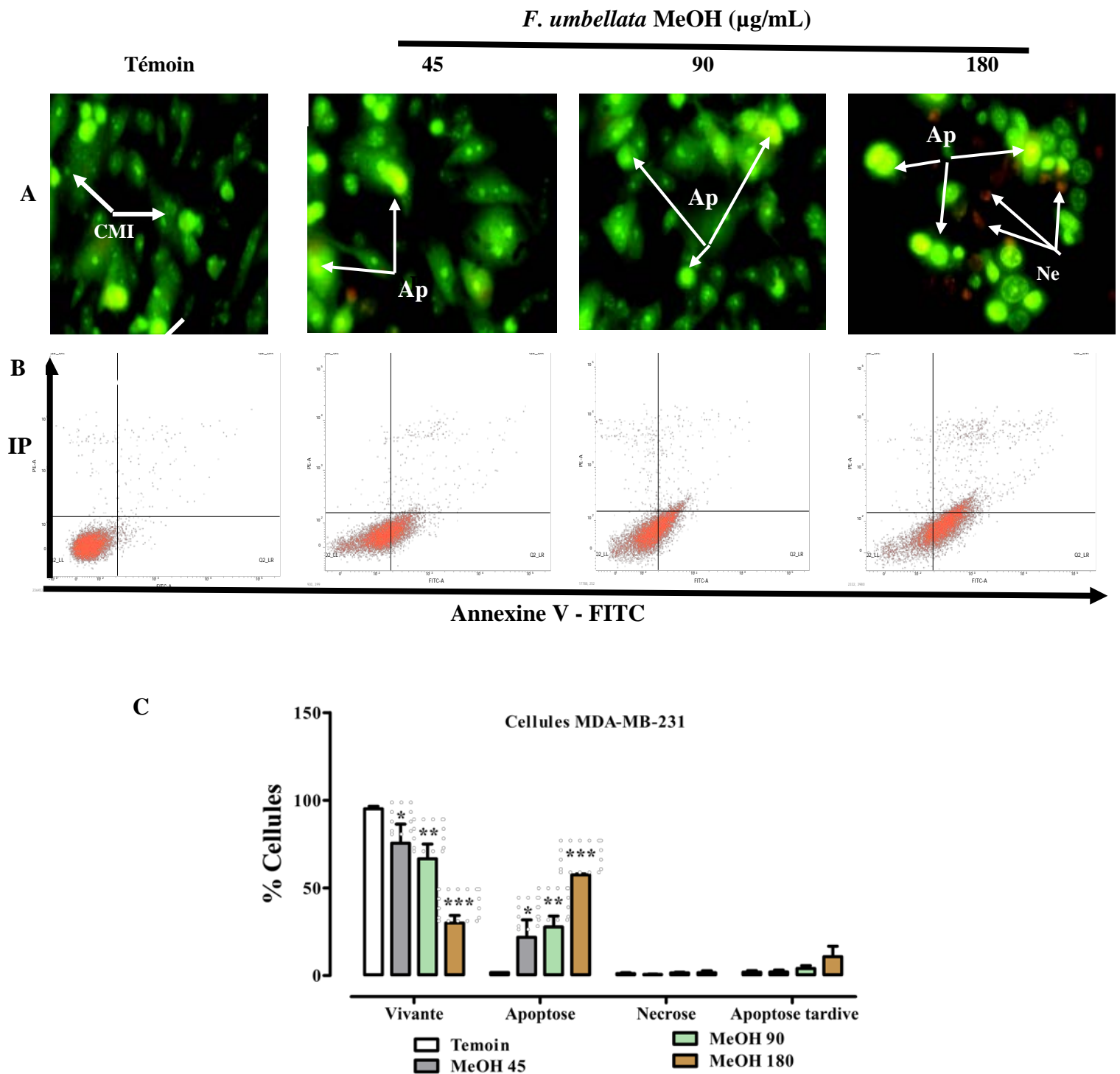
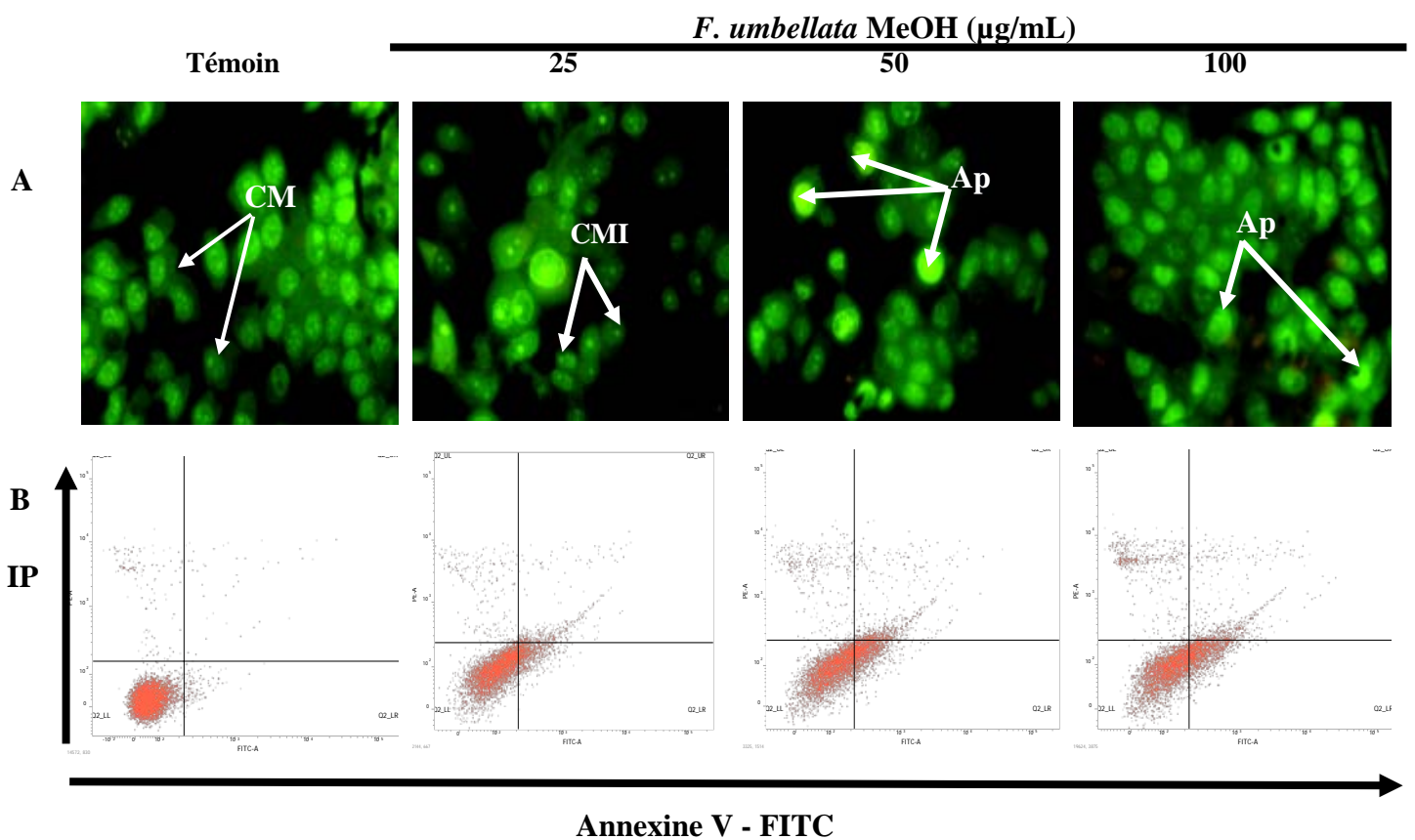


Figure 32: Effets des extraits de *F. umbellata* sur le type de mort cellulaire induite chez les cellules MDA-MB-231.

Images microscopique (400 ×) à fluorescence représentative des cellules MDA-MB-231(A) doublement colorées à l'acridine orange (0,3 mg / mL) et au bromure d'éthidium (1 mg/mL) ; et représentation de la mesure de l'apoptose par Annexine-V-FITC / Coloration IP des cellules MDA-MB-231(B). Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 h aux extraits de *F. umbellata* à des concentrations de 45, 90 et 180 µg / mL. Représentation graphique montrant la moyenne ± ESM de trois expériences indépendantes. * p < 0,05, ** p < 0,01 et *** p < 0,001 par rapport au témoin. **CMI** : cellule de la membrane intacte ; **Ap** : cellules apoptotiques ; **Ne** : cellules nécrotiques.

D'autre part, les cellules PA-1 traitées avec l'extrait au méthanol aux concentrations de 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$ ont également présenté une abondance des cellules à chromatine condensée caractéristique de l'apoptose comparativement aux cellules du groupe témoin ayant reçu le DMSO (0,01%) qui présentent une abondance de cellules avec des noyaux vert-clairs uniformes et une structure organisée (Figure 32A).

S'agissant des cellules PA-1, on observe une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre de cellules vivantes après traitement avec l'extrait au méthanol à la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ en comparaison aux cellules du groupe témoin. D'autre part, on note une augmentation significative ($p < 0,05$) et ($p < 0,01$) des cellules en apoptose après traitement aux doses de 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$ avec l'extrait au méthanol (Figure 32B).



C

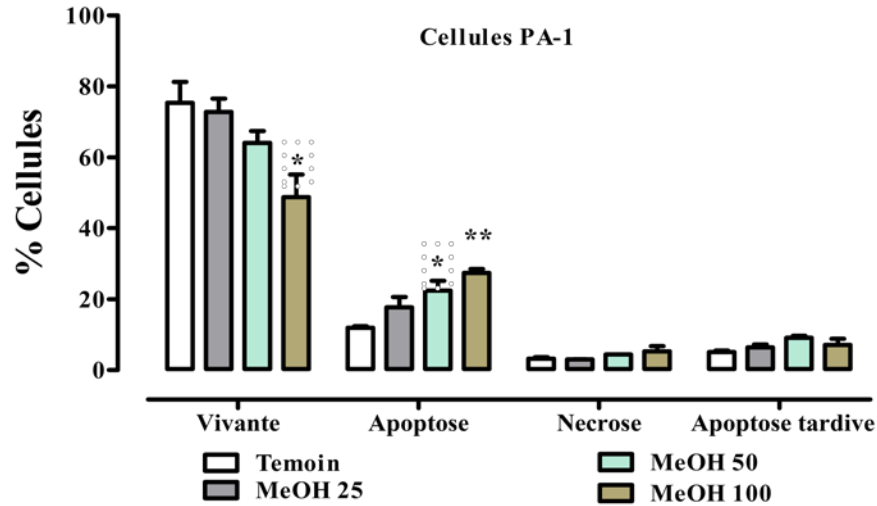


Figure 33: Effets des extraits de *F. umbellata* sur le type de mort des cellules cancéreuses PA-1.

Images microscopique (400 ×) à fluorescence représentative des cellules PA-1 (A) doublement colorées à l'acridine orange (0,3 mg / mL) et au bromure d'éthidium (1 mg /mL) ; et représentation de la mesure de l'apoptose par Annexine-V-FITC / Coloration IP des cellules PA-1(B). Les cellules PA-1 ont été traités aux concentrations de 25 ;50 et 100 µg/mL. Représentation graphique montrant la moyenne ± ESM de trois expériences indépendantes. * p <0,05, ** p <0,01 par rapport au témoin. **CMI** : cellule de la membrane intacte ; **Ap** : cellules apoptotiques ; **Ne** : cellules nécrotiques.

III.1.5.3. Effets de l'extrait de *Ficus umbellata* sur la migration cellulaire

Les images illustratives du test de migration cellulaire réalisé avec les cellules MDA-MB-231 après traitement à 0, 24 et 48 h avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* sont représentées par la figure 33A ci-dessous. La représentation graphique (Figure 33B) de la migration cellulaire de trois tests indépendants montre une diminution significative (p < 0,01) du pourcentage des cellules migrantes après 24 h et 48h (p < 0,001) aux concentrations respectives de 90 et 180 µg/mL de l'extrait au méthanol en comparaison à celles du groupe témoin.

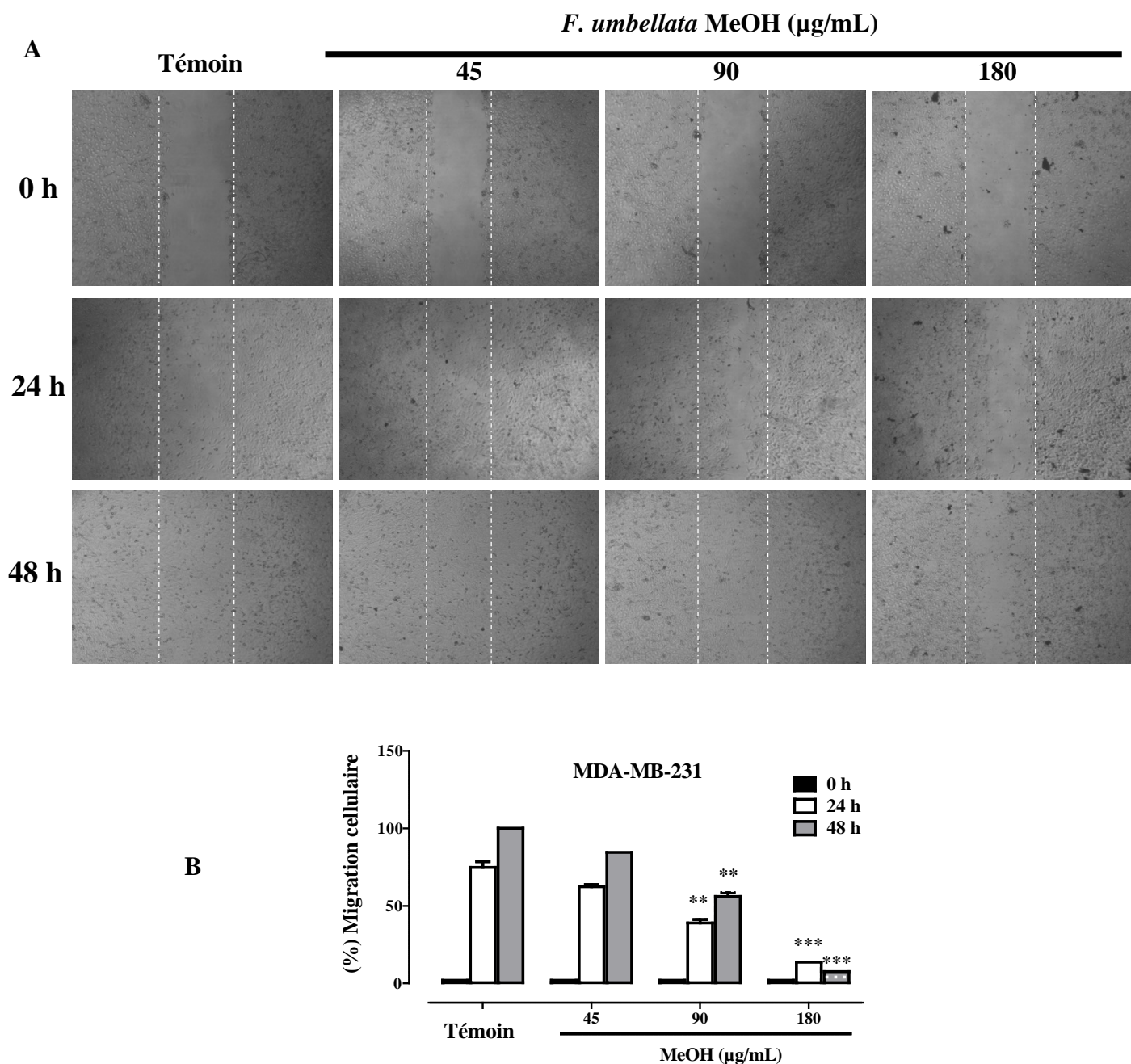


Figure 34: Effets de l'extrait au méthanol de *F. umbellata* sur la migration cellulaire. Microphotographies d'une expérimentation (A) et représentation graphique de trois expérimentations de migration cellulaire indépendantes (B) sur les cellules MDA-MB-231 après 0, 24 et 48 h de traitement. Témoin = cellules MDA-MB-231 traitées au DMSO (0,01%). Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec l'extrait au méthanol de *F. umbellata* aux concentrations de 45 ; 90 et 180 $\mu\text{g/mL}$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparé au témoin

III .1.5.4. Effets de l'extrait de *Ficus umbellata* sur l'invasion cellulaire

L'effet de l'extrait de *F. umbellata* sur l'invasion des cellules MDA-MB-231 après un traitement de 48 h aux concentrations de 90 et 180 $\mu\text{g/mL}$ est représenté par la Figure 34 ci-dessous. On observe que peu de cellules traitées à l'extrait au MeOH de *F. umbellata* sont présentes dans le milieu riche en sérum comparativement aux cellules du groupe témoin (figure 34A). Cette inhibition de l'invasion des cellules est matérialisée sur la figure 34B par une diminution de

l'invasion des cellules MDA-MB-231 respectivement traitées à l'extrait au méthanol à 90 et 180 µg/mL ; une diminution significative ($p < 0,01$) est observée à 180 µg/mL en comparaison au groupe témoin (Figure 34B).

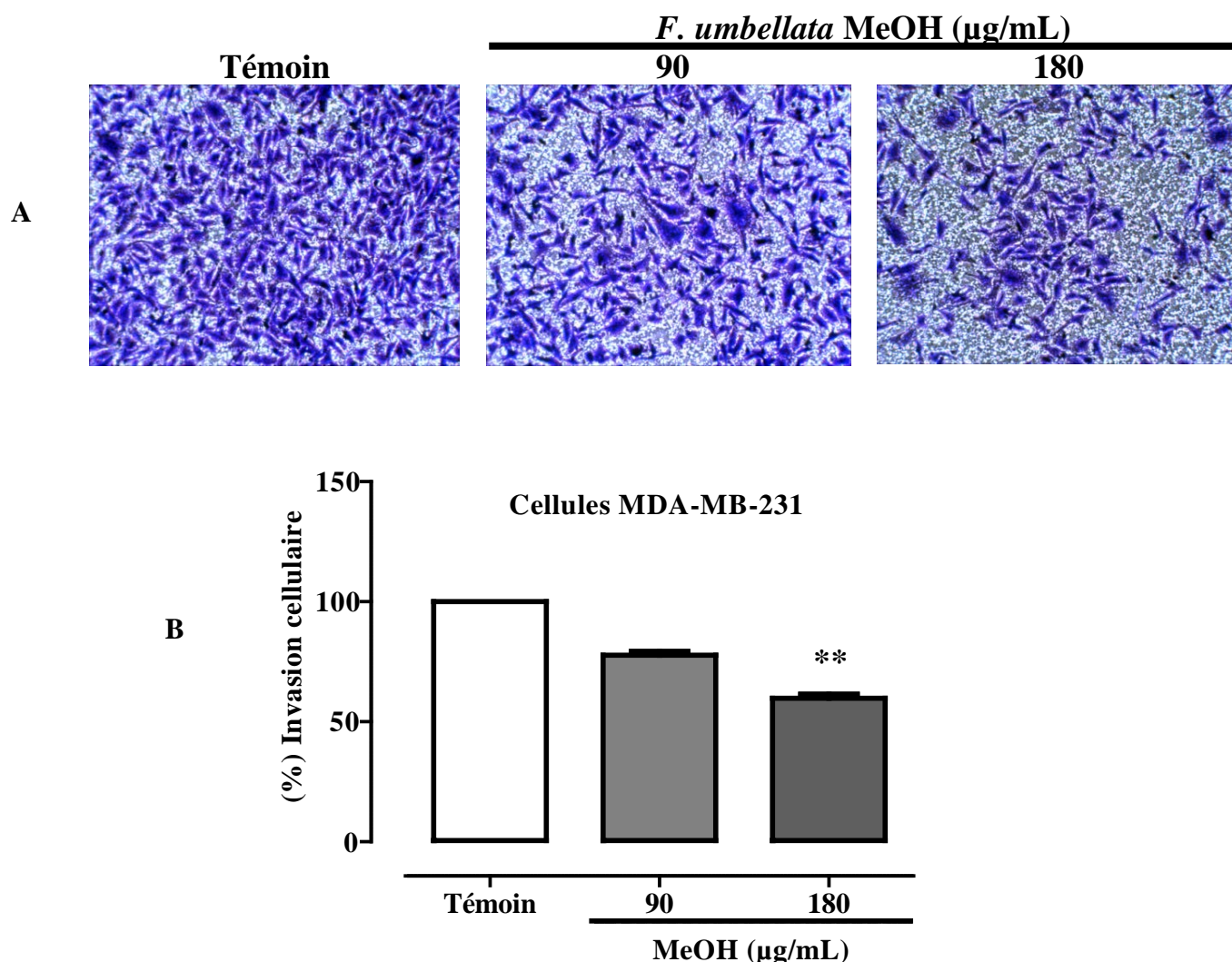


Figure 35: Effets de l'extrait au méthanol de *F. umbellata* sur l'invasion cellulaire

Microphotographies (100 ×) de la coloration au cristal violet des cellules MDA-MB-231 dans un insert de transwell après 48 h de traitement (A) et représentation graphique de trois expériences indépendantes (B). ** $p < 0,01$ par rapport au témoin.

III.1.6. Identification des constituants actifs et élucidation de leur mécanisme d'action

III .1.6.1. Potentiel cytotoxique des fractions

Les CC_{50} des différentes fractions (DCM, AcOEt, Aq) testées sur les cellules cancéreuses mammaires (MCF-7, MDA-MB-231), les cellules cancéreuses ovariennes (PA-1 ; Hey, OAW-42) et sur les cellules de fibroblaste murin (NIH-3T3) sont résumées dans le Tableau XVI ci-dessous. Il ressort que la fraction à l'acétate d'éthyle a présentée de meilleures CC_{50} sur toutes les souches testées, avec des CC_{50} respectivement de 16,7 et 18,42 µg/mL sur les cellules MDA-MB-231 et

PA-1. Les courbes doses - réponses représentées ci-dessous permettent d'observer l'effet des différentes fractions sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1 en suivant une gamme de concentrations décroissantes (Figure 35).

Tableau XVI : Effets cytotoxiques des fractions de *F. umbellata*

	CC ₅₀ (µg/mL)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PA-1	Hey	OAW-42	NIH-3T3
F-DCM	34,7	31	26,04	20,19	140	>200
F- EtOAc	32,8	16,7	18,42	18,86	64,68	125
F- Aq	33,36	39,6	53,8	18,36	68,9	>200
MeOH	250	180	100	130	213	297

CC₅₀, concentration des fractions de *F. umbellata* entraînant une viabilité cellulaire à 50%.

Les cellules ont été traitées pendant 72 h avec les différentes fractions à des concentrations comprises entre 2,5 et 200 µg/mL **F-DCM** : fraction au dichlorométhane ; **F-AcOEt** : fraction à l'acétate d'éthyle ; **F-aq** : fraction aqueuse, **MeOH** : extrait au méthanol de *Ficus umbellata*.

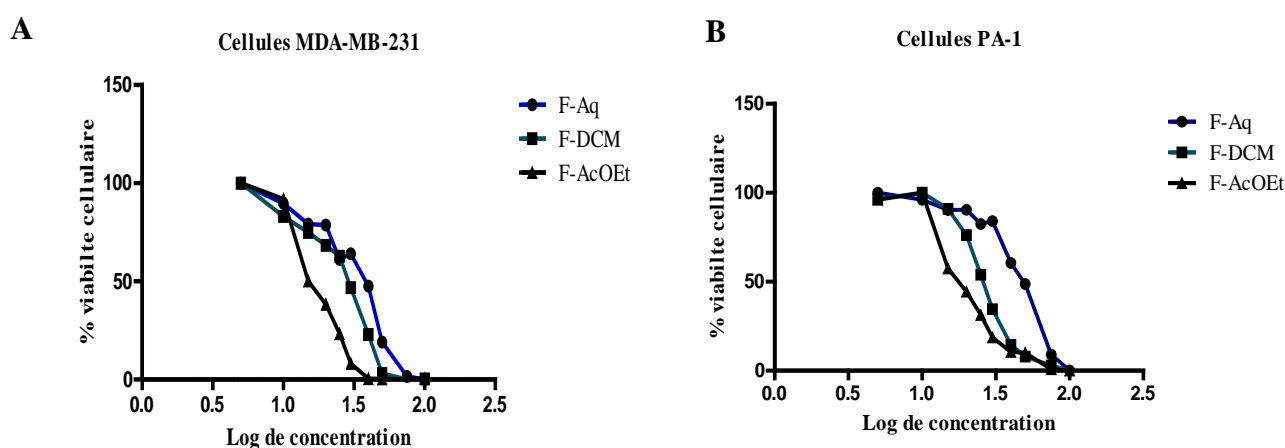


Figure 36 : Courbes doses-réponses des fractions de *F. umbellata* sur les cellules MDA-MB-231(A) et PA-1(B).

Les cellules ont été traitées pendant 72 h avec les différentes fractions à des concentrations de 2,5, 5 ; 10 ; 20, 40, 50, 75, 100 et 200 µg/mL. **F-DCM** : Fraction au dichlorométhane ; **F-AcOEt** : Fraction à l'acétate d'éthyle ; **F-Aq** : Fraction aqueuse, MeOH : extrait au méthanol de *F. umbellata*

Le calcul des indices de sélectivité ci-dessous montre des valeurs qui varient entre 0,89 et 7,51 avec la fraction AcOEt et entre 1,19 et 2,97 avec l'extrait au MeOH (Tableau XVII).

Tableau XVII : Indice de sélectivité de la fraction AcOEt

Indice de sélectivité					
	NIH-3T3/ MCF-7	NIH-3T3/ MDA-MB-231	NIH-3T3/ PA-1	NIH-3T3/ Hey	NIH-3T3/ OAW-42
F-AcOEt	3,81	7,51	6,81	6,21	0,89
MeOH	1,19	1,65	2,97	2,28	1,39

L'indice de sélectivité est égal au rapport des CC_{50} de la lignée cellulaire non tumorale (NIH / 3T3) sur celle des lignées cancéreuses des fractions de *F. umbellata*.

III.1.6.1.2. Sous-fractions obtenues après chromatographie sous colonne

Après observation des éluents obtenus par chromatographie sur colonne de la fraction à l'acétate d'éthyle sous UV à 256 et 234 nm ; ils ont été regroupés en 7 sous fractions comme présentés par le tableau ci-dessous (tableau XVIII).

Tableau XIII : Sous-fractions obtenues après chromatographie sur colonne de la F-AcOEt

Fractions	Sous - fractions	Observation en CCM
2	F1	1 tache
3	F2	1 tache
4-10	F3	2 taches
11-18	F4	Mélange complexe
19-22	F5	2 taches
23-31	F6	2 taches
32-40	F7	Mélange complexe

III.1.6.1.3. Effet cytotoxique des sous-fractions et composés

Les CC_{50} des différentes sous-fractions obtenues après chromatographie sur colonne de la fraction à l'acétate d'éthyle sur les cellules cancéreuses mammaires (MCF-7 et MDA-MB-231), ovariennes (PA-1 ; Hey et OAW-42) et de fibroblaste murin (NIH-3T3) sont représentées dans le tableau XIX ci-après. Les meilleures CC_{50} ont été observées avec les sous-fractions F1 et F3. Avec F1, on observe respectivement des CC_{50} de 8,8 et 13,18 $\mu\text{g/mL}$ sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1 et avec la F3 des CC_{50} de 11,48 et 24,11 $\mu\text{g/mL}$ sur lesdites cellules.

Tableau XIX : Effet cytotoxique des sous-fractions sur les lignées cellulaires

	CC ₅₀ (µg/mL)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PA-1	Hey	OAW-42	NIH-3T3
F1	14,5	8,8	13,18	15,61	31,98	189
F2	56,01	45,8	52,34	38,42	54,85	
F3	25,8	11,48	24,11	16,8	26,15	181
F4	>200	>200	>200	>200	>200	
F5	47,5	32,55	32,6	22,34	>200	
F6	>200	>200	>200	>200	>200	
F7	>200	>200	>200	>200	>200	
F-AcOEt	32,8	16,7	18,42	18,86	64,68	

CC₅₀, concentration des sous-fractions obtenues de la fraction à l'acétate d'éthyle de *F. umbellata* entraînant une réduction de la viabilité cellulaire de 50%. Les cellules ont été traitées pendant 72 h avec les différentes sous-fractions à des concentrations comprises entre 2,5 et 200 µg/mL.

Les courbes doses-réponses ci-dessous représentent l'effet des différentes sous-fractions à concentrations croissantes.

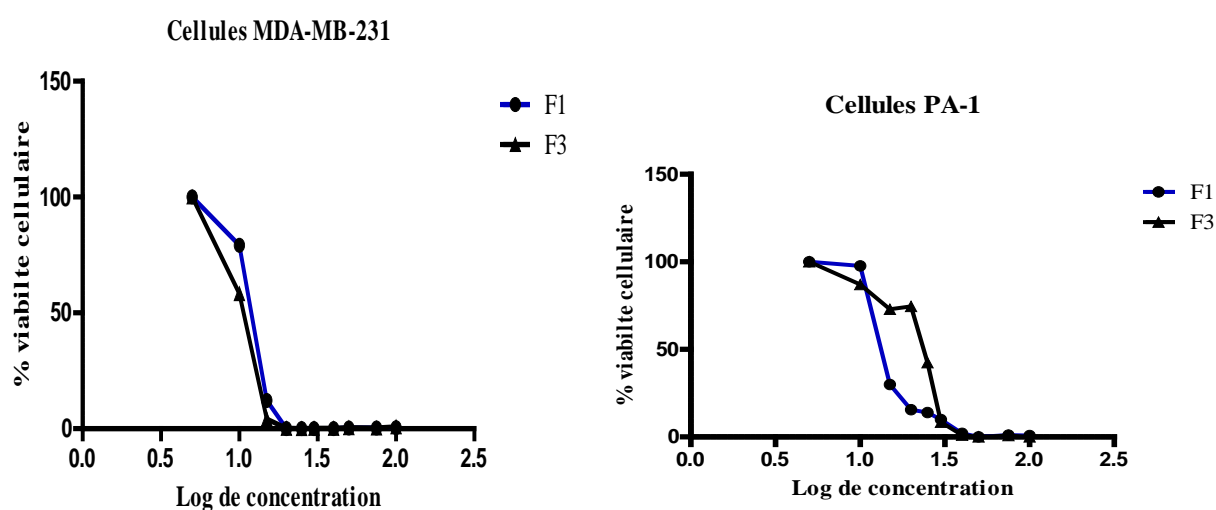


Figure 37. Courbes doses-réponses des sous-fractions de *F. umbellata* sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1

Le tableau XX présente des indices de sélectivité comprises entre 5,91 et 21,47 avec F1 tandis qu'elles sont comprises entre 6,92 et 15,76 avec F3.

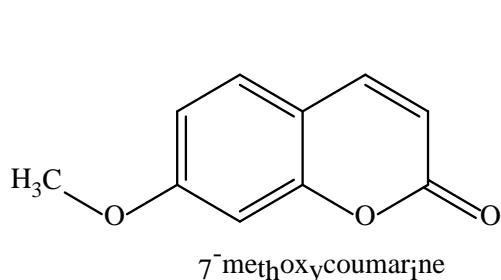
Tableau XX : Indices de sélectivité des sous-fractions 1 et 3

Indice de sélectivité					
	NIH-3T3/ MCF-7	NIH-3T3/ MDA-MB-231	NIH-3T3/ PA-1	NIH-3T3/ Hey	NIH-3T3/ OAW-42
F1	13,03	21,47	14,33	12,10	5,91
F3	7,01	15,76	7,50	9,62	6,92
F-AcOEt	3,82	7,51	6,81	6,21	0,89

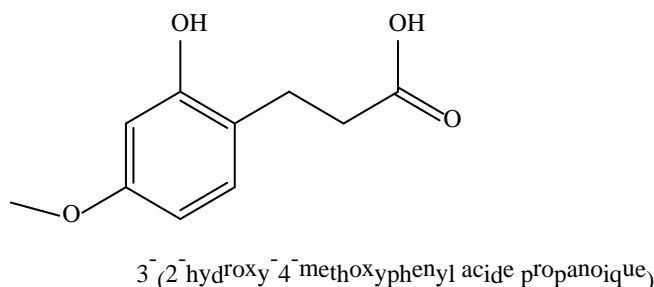
L'indice de sélectivité est égal au rapport des CC_{50} de la lignée cellulaire non tumorale (NIH / 3T3) sur celle des lignées cancéreuses des sous-fractions de *F. umbellata*.

III.1.6.1.4. Identification des composés

Trois (3) composés purs ont été isolés et identifiés de *F. Umbellata*. A partir de la sous-fraction F1, un triterpène a été isolé (structure en cours d'élucidation). De la sous-fraction F2, une coumarine a été isolée et caractérisée comme la 7-méthoxycoumarine et un acide a été obtenu après purification de la sous-fraction F3 et caractérisé comme étant le 3-(2-hydroxy-4-méthoxyphényl) acide propanoïque) (Figure 37). Les figures (Annexe 6) présentent les spectres ayant permis l'élucidation des différents composés.



(Alvarez-Cisneros *et al.*, 2014)



(Periera-Caro *et al.*, 2014)

Figure 38 : Structures des composés isolés

III.1.6.1.5. Potentiel cytotoxique des composés purs

Le potentiel cytotoxique des composés isolés est présenté dans le tableau XXII ci-dessous. On observe que le composé C1 a des meilleures CC_{50} sur toutes les souches testées comprises entre 8,8 (MDA-MB-231) et 31,9 (OAW-42) $\mu\text{g/mL}$. Le composé C3 quant à lui a des CC_{50} comprise entre 20,1 (PA-1) et 36,9 (OAW-42) $\mu\text{g/mL}$. Le calcul des indices de sélectivité (Tableau XXI) permet d'observer des valeurs comprises entre 4,63 et 8,50.

Tableau XXI : Effet cytotoxique des composés isolés

	CC ₅₀ (µg/mL)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PA-1	Hey	OAW-42	NIH-3T3
C1	14,5	8,8	13,18	15,61	31,98	189
C2	56,01	45,8	52,34	38,42	54,85	-
C3	33,2	21,1	20,1	29,6	36,9	171

CC₅₀, concentrations entraînant une réduction de la viabilité cellulaire à 50%. Les cellules ont été traitées pendant 72 h avec les trois composés à des concentrations de 5, 10, 20, 40, 50, 75, 100 et 200 µg / mL

Les courbes doses-réponses des différents composés ci-dessous présentent l'effet des composés à différentes concentrations.

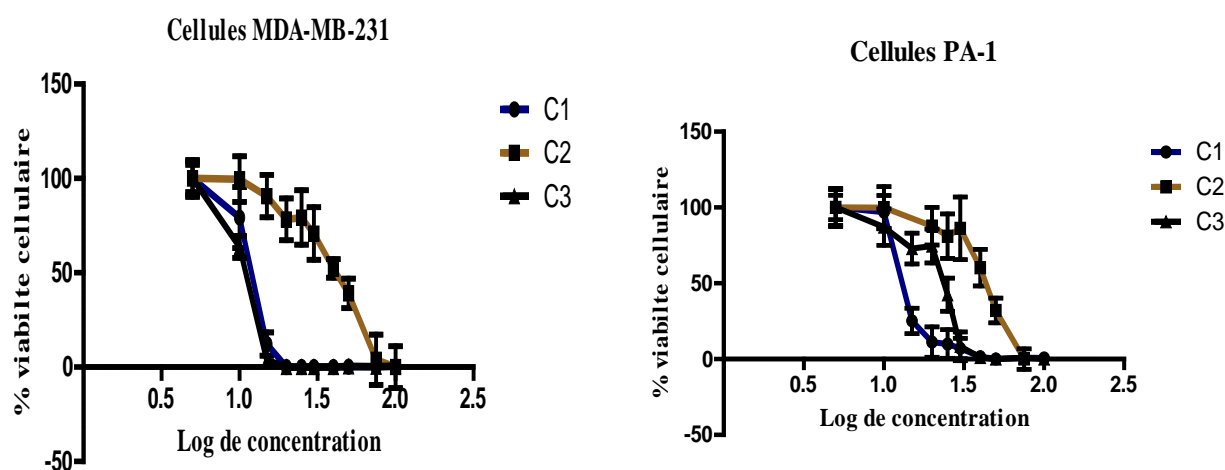


Figure 39: Courbes doses-réponses des composés purs isolés de la fraction à l'acétate d'éthyle de *F. umbellata* sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1

Tableau XXII : Indices de sélectivité des composés isolés

	Indice de sélectivité				
	NIH-3T3/ MCF-7	NIH-3T3/ MDA-MB-231	NIH-3T3/ PA-1	NIH-3T3/ Hey	NIH-3T3/ OAW-42
C1	13.03	21.47	14.33	12.01	5.91
C3	5,15	8,10	8,50	5,77	4,63

L'indice de sélectivité est égal au rapport des CC₅₀ de la lignée cellulaire non tumorale (NIH / 3T3) sur celle des lignées cancéreuses des différents composés.

III.1.6.2. Elucidation du mécanisme d'action du composé le plus actif

Le composé C1 ayant montré de meilleures CC₅₀ sur toutes les cellules testées, l'élucidation des mécanismes par lesquels ce dernier induirait ces effets sur les cellules

cancéreuses mammaires (MDA-MB-231) et ovarienne (PA-1) a été menée. Le choix du mécanisme d'action s'est fait en ciblant des protéines intervenant dans les processus tels que l'invasion, la migration, la prolifération, l'apoptose et l'angiogénèse.

III.1.6.2.1. Expression des gènes apoptotiques

La Figure 39 ci-dessous présente l'expression de l'ARNm des gènes codant pour Bcl-2 et Bax sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1 après 6 h de traitement avec C1 (triterpène) et l'éthanol (0,005 %). On observe une diminution significative ($p < 0,05$) de l'expression de l'ARNm de Bcl-2 et une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'expression de l'ARNm de Bax chez les cellules MDA-MB-231 en comparaison aux cellules du groupe témoin (Figures 39A et 39C).

Concernant les cellules PA-1, on observe une diminution non significative de l'expression de l'ARNm de Bcl-2 et une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'expression de l'ARNm de Bax en comparaison aux cellules témoin (Figure 39B et 39D).

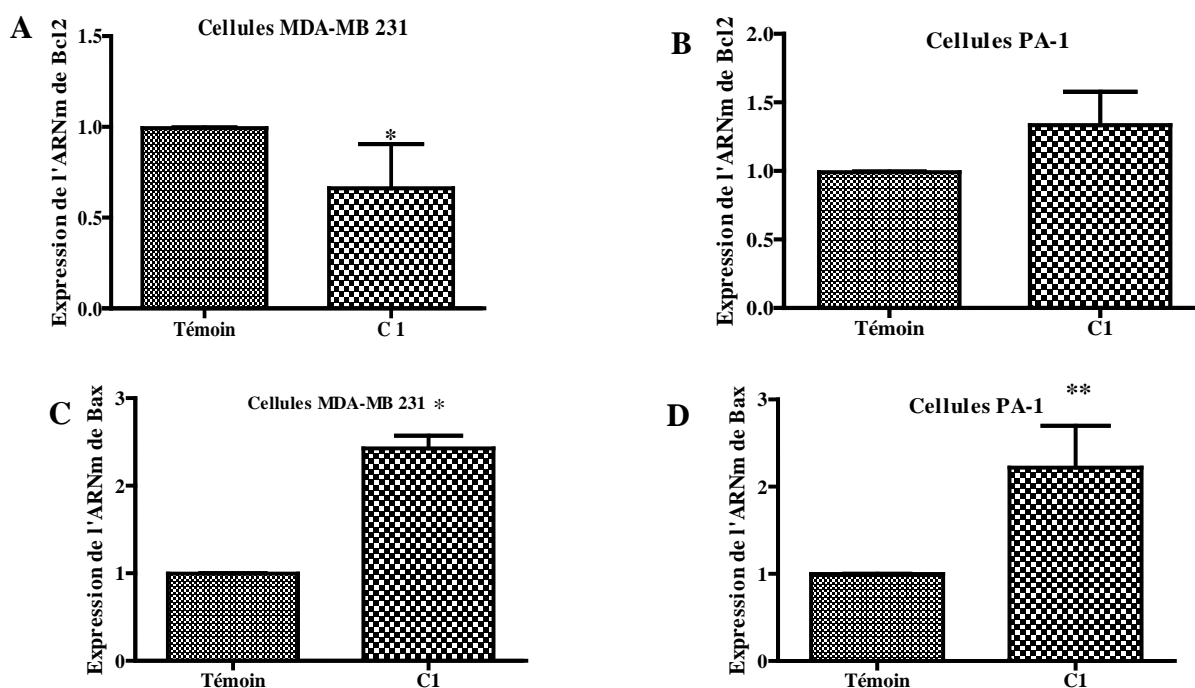


Figure 40: Représentation graphique de l'expression de l'ARNm de Bcl-2 sur les cellules MDA-MB-231(A) et sur les cellules PA-1 (B). Représentation graphique de l'expression de l'ARNm de Bax sur les cellules MDA-MB-231 (C) et sur les cellules PA-1 (D).

Les cellules ont été traitées pendant 6 h. Témoin = cellules ayant reçu l'éthanol 0,005%, C1= cellules traitées au triterpène isolé de la fraction AcOEt de *F. umbellata*. Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ comparés au témoin.

III.1.6.2.2. Expression des gènes d'un facteur de croissance impliqué dans l'angiogénèse

Comme l'indique la figure 40 ci-dessous, après 6 h de traitement, le C1 a réduit significativement ($p < 0,05$) l'expression de l'ARNm de VEGF "vascular endothelial growth

factor" aussi bien chez les cellules MDA-MB-231 que chez les cellules PA-1 en comparaison aux cellules témoin.

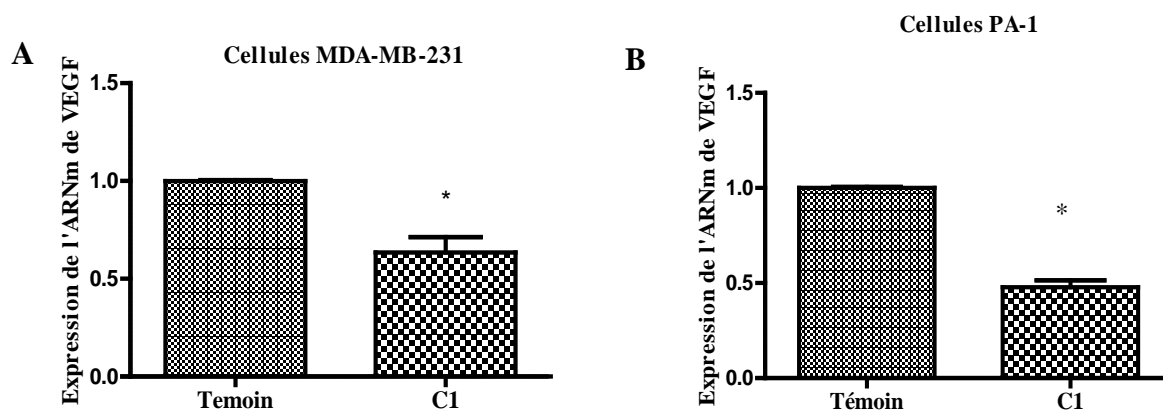


Figure 41: Expression de VEGF sur les cellules MDA-MB-231(A) et sur les cellules PA-1 (B).

Les cellules ont été traitées pendant 6 h. Témoin = cellules ayant reçu l'éthanol (0,005%), C1= cellules traitées au triterpène isolé de la fraction AcOEt. Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$ comparés au témoin.

III.1.6.2.3. Expression des protéines apoptotiques

Le résultat de la quantification du rapport PARP clivé/PARP chez les cellules MDA-MB-231 et PA-1 est présenté sur la figure 41 ci-dessous. On observe une augmentation significative ($p < 0,05$) du rapport PARP clivé/PARP chez les cellules PA-1 (Figure 41 B) et non significative sur les cellules MDA-MB-231 (Figure 41 A) en comparaison aux cellules non-traitées. L'observation des images illustratives du Western Blot indique un clivage de la protéine PARP de 116 kDa en PARP clivé de 89 kDa chez les deux cellules cancéreuses mammaires (Figure 41 C) et ovariennes (Figure 41 D).

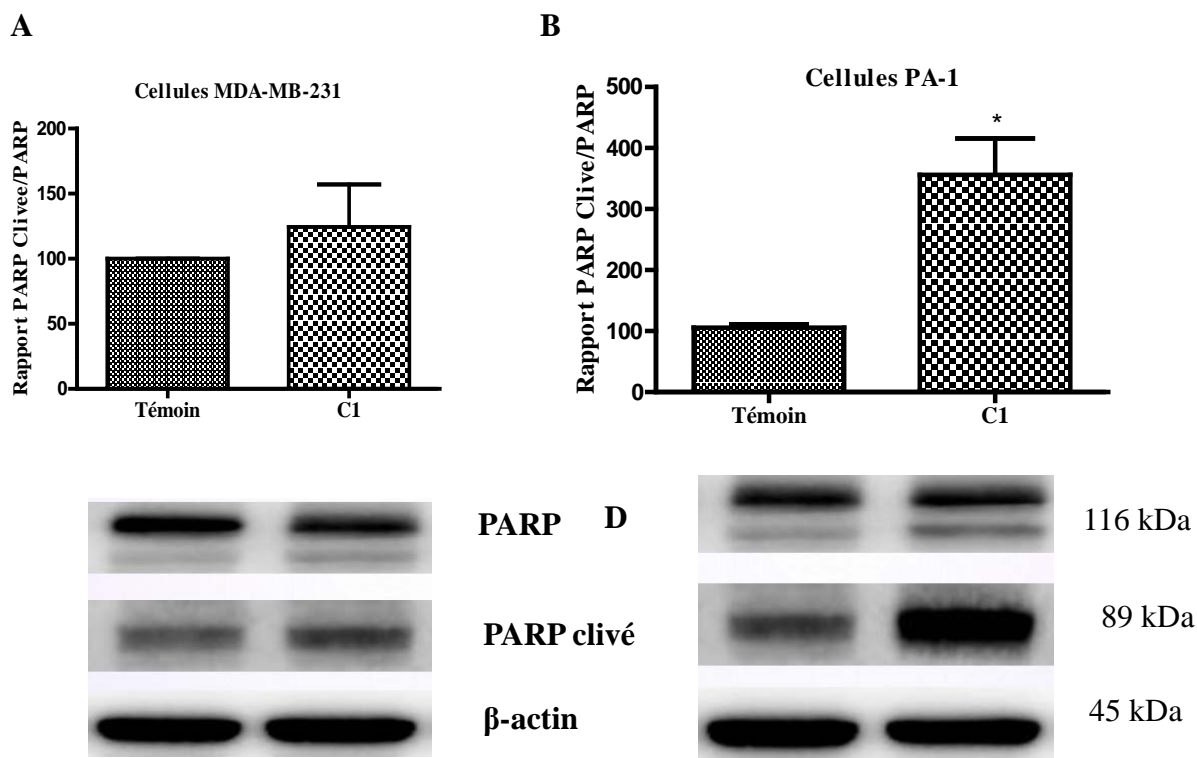


Figure 42: Expression du rapport PARP clivé /PARP chez les cellules MDA-MB-231(A) et chez les cellules PA-1(B) et images illustratives du Western Blot après hybridation des anticorps primaires chez les cellules MDA-MB-231 (C) et PA-1 (D) après traitement avec C1. Témoin = cellules traitées avec l'éthanol 0,005%, C1= cellules traitées avec le triterpène isolé de la fraction AcOEt de *F. umbellata*. Les cellules ont été traitées pendant 24 h. Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$ comparé au témoin.

III.1.6.2.4. Expression des protéines impliquées dans les voies de signalisation

Après 24 h de traitement des cellules MDA-MB-231 et PA-1 avec le composé C1, on observe que ce dernier a entraîné une diminution (non significative) du rapport pERK/ERK sur les cellules cancéreuses mammaires (figure 42A) et une diminution significative ($p < 0,05$) de ce rapport sur les cellules cancéreuses ovariennes (Figure 42B). Cette diminution est observable sur des images du Western Blot chez les cellules MDA-MB-231 (Figure 42 C) et les cellules PA-1 (Figure 42 D).

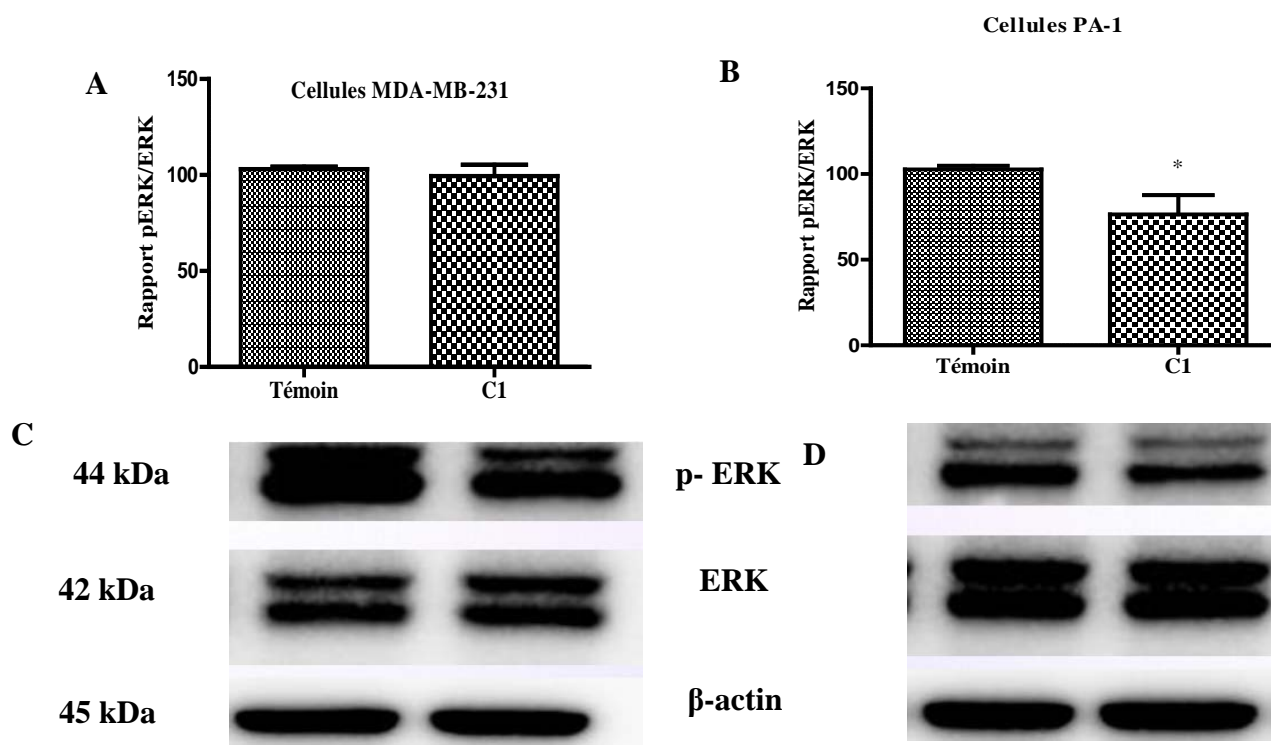


Figure 43: Expression du rapport pERK/ERK chez les cellules MDA-MB-231(A) et chez les cellules PA-1(B). Images illustratives du Western Blot après hybridation des anticorps primaires chez les cellules MDA-MB-231 (C) et PA-1 (D) après traitement avec C1.

Témoin = cellules traitées avec l'éthanol 0,005%, C1= cellules traitées avec le triterpène isolé de la fraction AcOEt. Les cellules ont été traitées pendant 24h. Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$ comparé au témoin.

On observe également après 24 h de traitement avec C1 une diminution non significative du rapport pAkt/Akt chez les cellules MDA-MB-231 et PA-1 en comparaison aux cellules témoin (Figure 43A et B). Le Western Blot après hybridation des anticorps primaires sont illustrés sur les Figures 43 C et D.

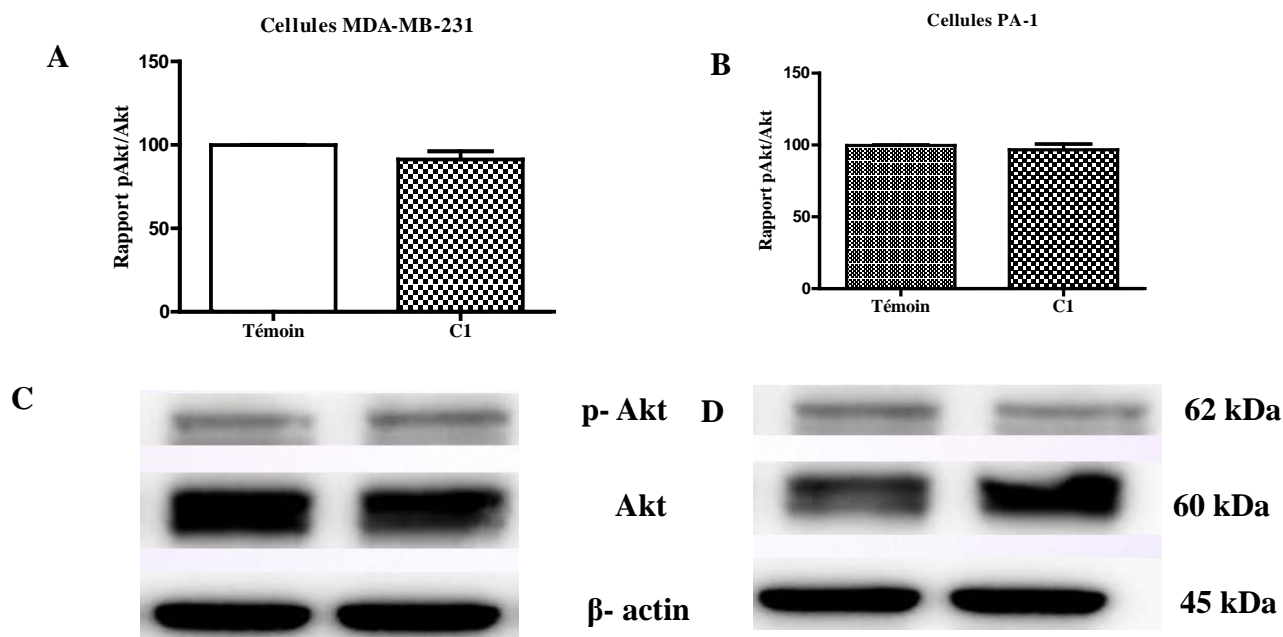


Figure 44: Expression du rapport pAkt/Akt chez les cellules MDA-MB-231(A) et les cellules PA-1(B). Images illustratives des Western Blot après hybridation des anticorps primaires sur les cellules MDA-MB-231 (C) et PA-1 (D) après traitement avec C1.

Témoin = cellules traitées avec l'éthanol 0,005%, C1= cellules traitées avec le triterpène isolé de la fraction AcOEt. Les cellules ont été traitées pendant 24h. Les valeurs représentent les moyennes ± ESM de trois expériences indépendantes.

III.2. Discussion

Le cancer représente une cause majeure de décès et un problème de santé publique dans le monde. D'ici 2025, l'on prévoit une augmentation de 26 millions de nouveaux cas de cancer par an avec plus de la moitié des cas et de mortalité survenant dans les pays en développement (Ferlay *et al.*, 2012). Malheureusement, les gouvernements de ces pays ne sont pas bien préparés pour gérer le fardeau croissant des cancers (Vorobiof et Abratt, 2007), raison pour laquelle la recherche, une alternative thérapeutique demeure un outil efficace. Aujourd'hui encore, 80% des médicaments utilisés pour traiter le cancer proviennent de sources naturelles (Harvey, 2008). Ainsi, les études pharmacologiques des extraits de plantes et des composés phytochimiques sont encouragées (Darvesh et Bishayee., 2013). C'est dans le but d'apporter notre contribution à ce domaine d'actualité que le présent travail a été mené visant à valoriser la plante médicinale *Ficus umbellata* pour son potentiel anticancéreux par les études *in vitro* et *in vivo*.

Les tests de cytotoxicité sont des tests utiles pour mesurer la capacité d'une substance à entraîner la mort cellulaire ou à inhiber la croissance cellulaire en altérant une ou plusieurs fonctions cellulaires (Weyermann *et al.*, 2005). Parmi ces tests de cytotoxicité, le test d'AlamarBleu (réduction de la rézasurine) est un test fiable qui mesure la capacité de la fonction mitochondriale des cellules vivantes au travers des enzymes déshydrogénases à réduire la rezasurine de couleur bleu en résofurine de fluorescence rouge (O'Brien *et al.*, 2000). Dans cette étude, l'extrait au méthanol (MeOH) de *F. umbellata* a entraîné une plus grande cytotoxicité que l'extrait aqueux (EA) sur toutes les lignées cellulaires testées. Cette activité cytotoxique supérieure de l'extrait au MeOH comparé à l'extrait EA serait due d'une part à la différence de leurs compositions en métabolites secondaires et d'autre part à une différence dans la teneur des composés cytotoxiques présent dans les différents extraits. La teneur en composés phénoliques serait proportionnelle à l'activité antioxydante comme rapportée par Boudjou *et al* (2013) et par ricochet proportionnelle à l'activité cytotoxique. En effet, il a été observé que l'extrait au méthanol a une teneur en phénols totaux de $651,31 \pm 12,03$ mg eq de quercetine/g de matières sèches contre $540,21 \pm 04,42$ mg eq de quercetine/g de matières sèches de l'extrait aqueux et une teneur en flavonoïdes de $545,33 \pm 99,39$ pour l'extrait au MeOH contre $268,25 \pm 35,55$ pour l'extrait aqueux. Ces deux familles de composés sont bien connues et étudiées pour leur potentiel antioxydant grâce à leur capacité à piéger les radicaux libres, chélateur des ions métalliques (Kaur et Kapoor 2002). Ils interviennent dans l'étape d'initiation comme piégeurs des mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation de l'ADN muté. Durant les étapes de promotion et de progression, ils agissent également comme des agents supprimeurs de tumeurs par différents mécanismes comme l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire (Gerber *et al.*, 2002). Cette activité cytotoxique des extraits est néanmoins très inférieure à celui du paclitaxel (témoin positif). En effet, le paclitaxel est un produit de l'hémisynthèse d'un constituant de *Taxus baccata* conventionnellement utilisé dans le traitement du cancer du sein et de l'ovaire, qui inhibe la réplication cellulaire en bloquant les cellules dans les dernières phases G2 et/ou M du cycle cellulaire. Il favorise également l'assemblage des microtubules et les stabilise contre la dépolymérisation empêchant ainsi le développement de cancers (Cancer care, 2019).

Dans notre étude, l'activité cytotoxique de l'extrait au MeOH est plus prononcée sur les cellules cancéreuses ovariennes (ER positives) que sur les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (ER négatives). Comme démontré dans les travaux antérieurs, les extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* ont des propriétés antiœstrogéniques/œstrogéniques (Zingue *et al.*, 2016). Les phytoestrogènes exercent deux actions opposées sur les cellules cancéreuses en fonction de leurs concentrations et des tissus (Rice et Whitehead, 2006). A des concentrations

inférieures à 10 μM , certains phytoestrogènes, tels que la génistéine, agissent en tant que ligands des récepteurs des œstrogènes et stimulent les voies métaboliques de prolifération chez les cellules MCF-7 (ER positives), mais pas chez les cellules MDA-MB-231 (ER négatives). Cependant, à des concentrations élevées, les mécanismes ne dépendant pas des voies ER sont déclenchées parmi lesquelles les propriétés antioxydantes des flavonoïdes (Rice et Whitehead, 2006).

Le fractionnement bio-guidé réalisé avec l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* a permis d'observer que la fraction à l'acétate d'éthyle présente de meilleures CC_{50} que la fraction au DCM et la fraction aqueuse. Cette différence d'activité serait donc due à la différence structurale des composés phytochimiques et la polarité des différentes molécules présentes dans les différentes fractions. La fraction à l'acétate d'éthyle a présenté des valeurs de CC_{50} inférieures à celles obtenues avec les extraits bruts et les autres fractions sur toutes les lignées cellulaires testées, indiquant que c'est elle qui serait bioactive. L'évaluation du potentiel cytotoxique des différentes sous-fractions et composés obtenues par chromatographie sur colonne de la fraction à l'acétate d'éthyle a permis d'observer que la sous-fraction F1 a de meilleures CC_{50} allant de 8,8 sur les cellules MDA-MB-231 à 31,98 $\mu\text{g/mL}$ sur les cellules OAW-42 comparées aux autres sous-fractions. Ces résultats suggèrent fortement que cette sous-fraction serait responsable au moins en partie des effets cytotoxiques de *Ficus umbellata*. Après élucidation de la structure par les techniques spectroscopiques, cette sous-fraction F1 est pure et correspond à un triterpène. Des 3 composés isolés, le triterpène a montré de meilleur CC_{50} sur toutes les lignées cellulaires testées. Ce potentiel cytotoxique supérieur du triterpène en comparaison à la coumarine ou à l'acide respectivement isolé des sous-fractions F2 et F3 serait dû au nombre, fonction et type des groupements donneurs que porte ce dernier et cela corrobore les travaux de plusieurs auteurs qui ont montré que les meilleurs métabolites secondaires à potentiel cytotoxique ; anti-migratoire et anti-invasif sont les polyphénols, les terpenoïdes, les alcaloïdes (Jiang et Liu 2011 ; Zdenka *et al.*, 2012).

Ce potentiel cytotoxique des extraits observé *in vitro* nous a poussé à corrélérer l'effet observé par une activité antitumorale *in vivo*. Aussi vrai que EA n'ai pas démontré un potentiel cytotoxique *in vitro* sur la plupart des cellules, il a néanmoins été pris en compte tenant compte du fait que *in vivo*, il y'a des processus métaboliques, de conjugaison, d'hydroxylation qui ont lieu et pourraient d'une façon ou d'une autre intervenir sur l'absorption, la biodisponibilité et le métabolisme de ce dernier. De plus, c'est la forme d'extrait consommée par la population.

L'induction du cancer mammaire par le DMBA est un modèle bien connu et largement utilisé suivant la littérature (Srinivasan *et al.*, 2017 ; Alessandra-Perini *et al.*, 2018). Le DMBA (hydrocarbure aromatique polycyclique) est un polluant environnemental organique présent dans

le tabac, diverses grillades et provenant également de la combustion incomplète des combustibles fossiles (Sagiv *et al.*, 2009). Il est largement utilisé pour induire le cancer chez les rats et souris, car les tumeurs généralement développées chez ces derniers ressemblent étroitement à celles retrouvées chez l'Homme (Russo et Russo, 2000). Dans cette étude, une dose intragastrique unique de 50 mg/kg de DMBA suivie d'une administration sous-cutanée de la 17- β estradiol pendant 10 jours a été utilisée pour induire les tumeurs mammaires et ovariennes chez les rattes Wistar. Le DMBA possède une grande activité génotoxique et induit les tumeurs mammaires chez les rates pubères (50 à 60 jours) ; ceci étant dû à la prolifération active des canaux terminaux mammaires à cet âge (Hakkak *et al.*, 2005). Cette toxicité du carcinogène chimique (DMBA) est associée à son métabolite génotoxique (3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde) et à la formation des radicaux libres mutagènes (anion superoxyde, radical hydroxyle et peroxydes) générés par son métabolisme hépatique et catalysé par les enzymes de la phase I, notamment le cytochrome P-450 (CYP 450) et l'époxyde hydrolase suivie par l'époxydation par l'isoenzyme CYP1A1 et CYP1B1 (Ganer, 1998 ; Rowlands *et al.*, 2001), initiant ainsi le processus de cancérogenèse. L'œstradiol, d'autre part agit via la voie ER-dépendante impliquée dans la prolifération, l'angiogénèse et la métastase des cellules cancéreuses (Wesierska-Gadek *et al.*, 2008). Les cellules mammaires/lobules des rates à cette âge ont un indice de prolifération cellulaire plus élevé, ainsi qu'une activité métabolique plus élevée ; ce qui entraîne donc une importante formation d'époxyde et le développement des tumeurs mammaires (Clarke *et al.*, 1997 ; Russo *et al.*, 2003 ; Balogh *et al.*, 2003).

Par ailleurs, tous les animaux ont eu une croissance continue et normale tout au long de l'expérience à l'exception des animaux traités au tamoxifène qui ont présenté une diminution significative ($p < 0,001$) de leur masse corporelle comparativement au groupe DMBA. Cette perte de poids pourrait s'expliquer par l'action anorexigène connu du tamoxifène (Nathalie, 2010). Ces résultats corroborent ceux de plusieurs auteurs qui ont montré que le tamoxifène entraînerait jusqu'à 22% de réduction du poids corporel chez les animaux traités de manière continue (Zingue *et al.*, 2016a).

Le calcul du pourcentage de survie a permis d'observer un plus faible taux de survie chez les animaux du groupe DMBA (60%) en comparaison aux groupes traités qui ont présenté des pourcentages de survie de 80 à 90%. Ce faible pourcentage de survie dans le groupe DMBA pourraient s'expliquer par l'immunotoxicité de ce carcinogène. En effet, une étude a montré que le DMBA induit une immunotoxicité dans les organes lymphoïdes chez les rats (Miyata *et al.*, 2001). Ces résultats sur le pourcentage de survie des animaux sont en droite ligne avec ceux de l'incidence, de la charge et du volume des tumeurs ovariennes chez le groupe DMBA. Une diminution significative du volume des tumeurs ($p < 0,05$) et de l'incidence des tumeurs et a été

observée chez les groupes traités avec les extraits aqueux (50 et 200 mg/kg) et au méthanol (MeOH 50 mg/kg) de *F. umbellata* ainsi qu'avec le tamoxifène comparativement à ceux du groupe DMBA. Ces résultats suggèrent des effets protecteurs des différents extraits de *F. umbellata* sur la cancérogénèse ovarienne. Ces effets pourraient s'expliquer par la capacité des extraits de *F. umbellata* à piéger les radicaux libres mutagènes du DMBA grâce à leurs métabolites secondaires. En effet, les plantes contiennent une mosaïque de métabolites secondaires chacun ayant un rôle important dans la défense des plantes contre les herbivores, les infections microbiennes et peuvent donc être exploités pour lutter contre les maladies humaines y compris le cancer (Stamp, 2003). Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés dans cette étude qui a montré que les extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* inhibent la croissance de trois lignées cancéreuses ovariennes avec des CC₅₀ autour de 100 µg/mL pour l'extrait au méthanol et > 300 µg/mL pour l'extrait aqueux. De nombreux composés polyphénoliques extraits de plantes ont été identifiés comme ayant de potentiels effets préventifs ou thérapeutiques contre les cancers. Cela inclut une variété de flavonoïdes parmi lesquelles, les flavonols présentant un intérêt particulier, comme la quercétine, l'un des composés les plus largement distribués et des plus étudiés. Cette étude a montré que *F. umbellata* est riche en flavonoïdes et principalement en flavonols, ce qui pourrait être responsable, du moins en partie, des effets chimiopréventifs observés *in vivo*. Les flavonoïdes forment le groupe le plus important de composés polyphénoliques naturels et possèdent d'excellentes propriétés anti-radicalaires et anti-oxydantes. Des alcaloïdes ont également été détectés dans des extraits de *F. umbellata* et ces derniers possèderaient des activités antitumorale et antimittotique (Shoeb, 2006).

Les activités antioxydantes des extraits de *F. umbellata* sont démontrées dans la présente étude par l'augmentation du glutathion réduit (GSH) observée chez les animaux traités aux extraits de *F. umbellata* en comparaison à ceux du groupe DMBA. En effet, le GSH est le principal antioxydant de l'organisme d'autant plus qu'il est aussi le co-facteur d'une série d'enzymes antioxydantes (Defraigne et Pincemail, 2008). Par ailleurs, le MDA, l'un des dérivés de la peroxydation lipidique et biomarqueur du stress oxydatif (Michel *et al.*, 2008), a significativement diminué suite aux traitements avec le tamoxifène ($p < 0,05$) et à l'extrait au méthanol de *F. umbellata* à la dose de 200 mg/kg. Ceci traduirait un effet protecteur de cet extrait de *F. umbellata* contre le stress oxydatif induit par le DMBA ou son métabolite génotoxique (3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde).

Des études ont rapporté qu'un traitement néonatal aux œstrogènes suivi d'un traitement à l'âge l'adulte avec le DMBA induit une tumorigénèse ovarienne rapide (Taguchi *et al.*, 1988). En outre, des études ont révélé qu'une exposition continue des œstrogènes à la surface des ovaires

serait à l'origine du cancer de l'ovaire. Par ailleurs, Jull et collaborateurs (1966) signalent qu'une dose unique de 5 mg de DMBA en solution dans l'huile administrée par voie intragastrique a provoqué l'apparition des tumeurs de l'ovaire. Dans la présente étude, après 20 semaines d'expérimentation, aucune tumeur mammaire palpable n'a été observée chez les animaux des différents groupes. Cependant, l'analyse histopathologique de la glande mammaire a révélé une néoplasie chez les rats du groupe DMBA, et ceux traités avec l'extrait EA de *F. umbellata* à la dose de 50 mg/kg. Ces résultats sont en accord avec de nombreux rapports scientifiques qui ont montré que le DMBA altère le processus normal de différenciation des glandes mammaires (Russo *et al.*, 1982 ; Gibellini *et al.*, 2011 ; Bishayee *et al.*, 2012) par des proliférations cellulaires dépendant des œstrogènes (modèle DMBA œstrogéno-dépendant) (Jordan et Morrow, 1999 ; Bishayee *et al.*, 2013). Les animaux traités avec des extraits de *F. umbellata* (EA 200 mg/kg et MeOH 50 et 200mg/kg) semblent être protégés. Étant donné que l'hyperplasie serait proche des premières étapes conduisant à une néoplasie (Bishayee *et al.*, 2013), l'observation des lobules et des acini de tailles normales chez ces groupes indiquerait ainsi un effet protecteur de ces extraits. Le tamoxifène est un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes efficace pour la prévention du cancer du sein, ce qui peut expliquer son effet protecteur contre l'hyperplasie mammaire (McGuire, 1978). L'hyperplasie prononcée observée sur la microarchitecture chez le groupe DMBA est en accord avec de nombreuses études ayant induit des tumeurs mammaires avec le DMBA (Abakkari *et al.*, 2018). En effet, le métabolisme du DMBA produit des radicaux libres oxygénés (O_2^- , H_2O_2 , HO^*) qui rompent les défenses antioxydantes endogènes et altère l'ADN de la glande mammaire et des ovaires conduisant à l'initiation de la cancérogénèse (Anbuselvam *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2016). La microarchitecture de la glande mammaire et des ovaires observée chez les animaux recevant le tamoxifène et les extraits (EA, 200 mg/kg et MeOH, 50 et 200 mg/kg) confirment les effets protecteurs de ces derniers sur la cancérogénèse mammaire et ovarienne. Le tamoxifène est un antagoniste des œstrogènes aussi bien au niveau de la glande mammaire qu'au niveau des ovaires, qui se lie spécifiquement à leurs récepteurs et empêche les cellules tumorales de se multiplier (Vogel *et al.*, 2006 ; Poirier, 2008). Aucune métastase n'a été observée chez les animaux expérimentaux des différents groupes. En effet, le stade de tumeur le plus avancé était celui observé chez le témoin négatif (DMBA) avec un carcinome *in situ* de l'ovaire et une néoplasie prononcée de la glande mammaire. La séquence d'altération par le DMBA est bien connue allant des conduits terminaux aux proliférations intraductales (hyperplasies) suivies d'un carcinome *in situ* et enfin d'un carcinome invasif avec métastases (Russo et Russo, 2000).

La masse relative des organes étant un indicateur des potentiels effets néfastes des médicaments et/ou de tout autre toxique (Ying *et al.*, 2013) elle a été mesurée dans ce travail. Une augmentation significative ($p < 0,05$) de la masse relative des surrénales chez les groupes EA 200 et MeOH 200 mg/kg ainsi qu'une diminution de la masse relative de l'utérus chez les animaux traités au tamoxifène et une diminution de la masse relative du foie chez le groupe MeOH 50 mg/kg ont été observées. L'augmentation de la masse relative des surrénales serait attribuée à une altération de la production des hormones stéroïdiennes due aux phytoestrogènes présents dans ces extraits. La diminution de la masse relative de l'utérus observée chez les animaux du groupe tamoxifène suggère que la dose de tamoxifène utilisée (3,3 mg/kg) est physiologiquement propice et effective en tant qu'antioestrogène pour inhiber la croissance utérine et ceci corrobore les travaux de Kim et collaborateurs (2006) qui ont également observé une diminution du poids relatif de l'utérus après administration du tamoxifène chez les rates ovariectomisées. La diminution de la masse relative du foie serait due à une diminution de l'activité métabolique de cet organe et serait attribuée à une variation intergroupe plutôt qu'à un effet toxique des extraits car chez les animaux traités aux doses plus élevées (200 mg/kg), il n'a pas été observé d'augmentation de la masse relative du foie de même que sur la microarchitecture du foie. Malgré le fait qu'aucune variation n'ait été observée sur la masse relative du foie des animaux du groupe DMBA, l'activité des transaminases, notamment l'ALAT, spécifique aux hépatocytes et l'ASAT que l'on trouve dans le foie, le muscle cardiaque et le rein (Witthawaskul *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2011), et largement connus comme des marqueurs de la lyse cellulaire et surtout hépatique (Karthikeyan *et al.*, 2006) ont augmenté de façon significative ($p < 0,01$) chez ce groupe comparé à ceux du groupe normal. De façon générale, tout dommage des cellules hépatiques parenchymateuses entraîne une élévation des deux transaminases dans le sang et peut être considéré comme un premier signe de dommage cellulaire qui conduit à l'écoulement des enzymes dans le sérum (Liu *et al.*, 2014). Dans la présente étude, cette augmentation significative de l'activité des transaminases observée chez le groupe DMBA serait due à l'action du DMBA, qui altère les enzymes de phases I et II intervenant dans les processus métaboliques du foie (Al-Attar, 2004 ; Singh *et al.*, 2011). La diminution du taux de transaminases observée chez les animaux traités aux extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* comparés à ceux du groupe DMBA indiquerait ici l'absence de lyse cellulaire chez ces animaux traduisant ainsi une protection des extraits de *F. umbellata*.

La créatinine, qui est un produit de dégradation par déshydratation spontanée du phosphate de créatine dans le muscle et éliminée dans sa totalité par le rein, constitue de ce fait un bon indicateur de la fonction rénale (Lameire *et al.*, 2005). Une augmentation de la créatinémie traduit une défaillance de la filtration glomérulaire. L'augmentation significative ($p < 0,01$) de la

créatinine sérique observée dans cette étude chez les animaux du groupe tamoxifène comparés aux animaux du groupe DMBA serait due à l'action de ce dernier, qui est connu pour entraîner une production de ROS et un épuisement du système cellulaire thiol, qui sont d'importants médiateurs de la néphrotoxicité (Parlakpınar *et al.*, 2005). Ces résultats corroborent ceux d'Ahmed et collaborateurs (2008) qui ont indiqué que le traitement au tamoxifène par voie orale serait associé à la détérioration des tests de la fonction rénale. Il a également été observé dans cette étude, une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de protéines chez les rates du groupe EA 50 mg/kg. De façon générale, le taux de protéines totales sériques fournit une indication générale concernant l'état d'hydratation, le statut nutritionnel ou encore le bon fonctionnement de certains organes importants comme le foie, les reins ou la moelle osseuse (Biron, 2019). Ainsi, cette baisse du taux de protéines chez ledit groupe d'animaux (EA 50 mg/kg) pourrait indiquer une maladie du foie (faible production d'albumine) ou un problème de malnutrition ou de malabsorption des acides aminés nécessaires à la formation des protéines, une trop grande perte de protéines par les reins ou encore une trop grande quantité d'eau dans le sang. Comme observé dans cette étude, les animaux du groupe EA 50 mg/kg n'ont présenté aucun effet significatif aussi bien dans le dosage des paramètres hépatiques et rénales qu'au niveau de l'histomorphologie de ces organes, de même qu'au niveau de l'évolution du poids corporel en comparaison aux animaux du groupe DMBA. Cette diminution du taux de protéines pourrait donc être attribuée à un état d'hydratation élevé chez ces animaux.

Le profil lipidique constitue un facteur important des risques cardiovasculaires (Gohlke-Barwolf, 2000). Les œstrogènes sont connus comme des modulateurs du métabolisme des lipides et la production accrue de cette hormone au sein des tissus est largement associée à un signe prolifératif et au développement de plusieurs cancers. Les triglycérides (TGs) constituent la principale forme de stockage des acides gras dans les tissus. Le cholestérol quant à lui est un composant essentiel des membranes cellulaires et un précurseur métabolique des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes dont les œstrogènes. Il peut être apporté par l'alimentation et est également synthétisé dans le foie. Dans cette étude, nous avons observé une baisse significative ($p < 0,05$) du taux de triglycérides et de cholestérol total chez les animaux du groupe EA (50 et 200 mg/kg) respectivement comparé à ceux du groupe DMBA. Cette diminution du taux de triglycérides et de cholestérol total serait due à la capacité des phytoœstrogènes à inhiber l'enzyme limitante impliquée dans la biosynthèse du cholestérol, à savoir la HMG-CoA réductase, diminuant ainsi la synthèse du cholestérol (Di Croce *et al.*, 1996 ; Parini *et al.*, 2000 ; Moorthy *et al.*, 2004). Cette diminution du cholestérol total et des triglycérides est en accord avec les travaux de Anthony

et collaborateurs (1996) qui ont montré que les phytoestrogènes diminueraient le taux de cholestérol chez l'Homme.

L'analyse des paramètres hématologiques suite aux différents traitements des animaux, a montré une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre de globules rouges chez les animaux du groupe DMBA comparés aux animaux normaux. Cette anémie serait due à une possible hématotoxicité du DMBA. En effet, le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles aux xénobiotiques et constitue de ce fait un indicateur important du statut physiologique et physiopathologique (Diallo *et al.*, 2010). Le fait que l'extrait de *F. umbellata* à toutes les doses testées ait protégé les animaux contre la baisse du taux de globules rouges témoigne de ces effets bénéfiques dans la protection contre l'anémie induite par le DMBA. Par ailleurs, une baisse significative ($p < 0,05$) du taux d'hémoglobine corpusculaire moyen (MCH) et ($p < 0,01$) de la concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (CCMH) ont été observées chez les animaux du groupe tamoxifène en comparaison à ceux du groupe DMBA. Ces diminutions du taux de MCH et de CCMH témoignent d'une anémie hypochrome chez les animaux du groupe tamoxifène et serait due à une carence nutritionnelle des animaux dudit groupe. En effet comme démontré par Nathalie (2010) le tamoxifène entraîne un manque d'appétit qui serait à l'origine d'une carence en éléments essentiels constitutifs tels que le fer, l'acide folique, vitamine B12 et donc une diminution de la production de globules rouges normaux et par ricochet une diminution du taux d'hémoglobine corpusculaire et de la concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (HUG, 2017 ; OMS, 2014).

L'absence de variation des taux de créatinémie, de transaminases ainsi qu'une architecture quasi normale observés sur les microarchitectures du foie et rein des animaux traités avec les extraits de *F. umbellata* à toutes les doses testées suggère que cette plante ne causerait aucun dommage aux reins, et au foie et donc une absence d'effets toxiques. Cela justifierait les valeurs obtenues avec l'indice de sélectivité qui est > 2 sur la plupart des cellules traitées avec l'extrait au méthanol. La valeur de l'indice de sélectivité est la mesure de l'effet bénéfique de l'extrait à faible dose en fonction des effets néfastes à forte dose. Un grand indice de sélectivité est une indication d'une large marge de sécurité entre la dose bénéfique et la dose toxique et cela corrobore les travaux de Zingue *et al.*, (2016) qui ont montré que la DL_{50} des extraits de *F. umbellata* est supérieure à 2000 mg/kg.

Le cancer est principalement caractérisé par la prolifération anarchique des cellules, une insensibilité aux signaux d'apoptose, une activation des capacités d'invasion et de métastases, une induction de l'angiogenèse. Du fait que les cellules passent par ces processus lors de la

cancérogène, les substances/composés à potentiel cytotoxique ou antitumoral inhiberaient ou activeraient une de ces voies afin d'exercer leur action.

Les effets chimiopréventif et cytotoxique de l'extrait au MeOH de *F. umbellata* ont été corrélé à sa capacité à prévenir ou à inhiber le développement des tumeurs via sa capacité à inhiber l'invasion cellulaire, la migration cellulaire et à induire l'apoptose. L'apoptose, considérée comme une voie régulée à plusieurs étapes est responsable de la mort cellulaire programmée dans les tissus normaux. Sur le plan morphologique, elle implique un rétrécissement cellulaire, une condensation de la chromatine et une fragmentation nucléaire ce qui entraîne la formation des corps apoptotiques à membrane fermée contenant des organites. Ensuite, les corps apoptotiques seront absorbés par les cellules phagocytaires sans processus d'inflammation (Cotter, 2009). Dans cette étude, le type de mort cellulaire a été évalué d'une part par la coloration qualitative à l'acridine orange (AO) / bromure d'éthidium (EB). L'AO est un colorant absorbé par les cellules vivantes et non vivantes qui émet une fluorescence verte lorsqu'il intercale l'ADN. Le bromure d'éthidium n'est absorbé que par les cellules non vivantes et émet une fluorescence rouge lorsqu'il se fixe sur l'ADN. L'incubation de l'extrait au méthanol de *F. umbellata* pendant 24 h a induit l'apoptose chez les cellules MDA-MB-231 et PA-1, caractérisée par la fragmentation de l'ADN et une condensation de la chromatine comme observée suite à la coloration à l'AO / BE par comparaison aux cellules témoin. Le comptage des cellules apoptotiques par cytométrie de flux au travers de la coloration annexine V/IP a également permis d'observer une augmentation significative des cellules apoptotiques dans le deuxième quadrant en comparaison aux cellules témoin de MDA-MB-231, aux concentrations de 45, 90 et 180 µg/mL. Cette augmentation a également été observée avec les cellules cancéreuses de l'ovaire en comparaison aux cellules non-traitées. Les cellules traitées avec l'extrait au MeOH de *F. umbellata* présentent des caractéristiques ultrastructurales et biochimiques de l'apoptose l'augmentation de la liaison avec l'annexine-V (Vermees *et al.*, 1995), la condensation et la fragmentation de l'ADN (Saraste *et al.*, 2000 ; Kiechle *et al.*, 2002). Cette capacité de l'extrait au méthanol de *Ficus umbellata* à induire l'apoptose serait également attribuée à la présence de composés phénoliques à l'instar des flavonoïdes qui contrôlent les cascades de réaction impliquées dans la régulation de l'apoptose, notamment : condensation de la chromatine, activation des caspases, la perte du potentiel membranaire mitochondrial, la fragmentation de l'ADN (Ramos, 2007). Cela corrobore les études de nombreux auteurs qui ont montré que l'apoptose peut être déclenchée par des composés tels que les flavonoïdes (Mansoor *et al.*, 2011 ; Banjerdpongchai *et al.*, 2014). Des deux voies (extrinsèques et intrinsèques) de l'apoptose, la voie mitochondriale d'apoptose (ou intrinsèque) est généralement contrôlée via l'interaction entre composants de la famille de protéines Bcl-2 (Danial et Korsmeyer, 2004). Cette voie mitochondriale de l'apoptose

est dépendante de la famille de protéines Bcl-2 pour la libération efficace des facteurs apoptotiques dans l'espace transmembranaire mitochondriale (Chipuk *et al.*, 2006 ; Lindsay *et al.*, 2011 ; Ola *et al.*, 2011). Cette famille de protéines Bcl-2 est divisée en trois groupes, basé sur la présence d'homologie des domaines Bcl-2 (domaines BH1-4) : les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1 et Mcl-1), les membres effecteurs pro-apoptotiques (Bax et Bak) et les protéines BH3 uniquement (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, bNIP3, HrK, Noxa et Puma) (Oltvai *et al.*, 1993 ; Reed 1998 ; Kelly et Strasser, 2011). Des études ont également montré qu'une relation directe inverse existe entre les niveaux de Bcl-2 et Bax dans les cellules au cours de l'apoptose ; une diminution des taux de Bcl-2 provoque un déséquilibre du rapport Bcl-2/Bax, qui, à son tour, entraîne les cellules cancéreuses vers l'apoptose (Tee et Azimahtol, 2005). Dans cette étude, il a été observé une sous-expression des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 chez les cellules mammaires MDA-MB-231 et PA-1, la diminution significative ($p < 0,05$) étant observée chez les cellules MDA-MB-231 suite au traitement avec le triterpène isolé de la fraction à l'acétate d'éthyle de *F. umbellata* en comparaison aux cellules non-traitées. Une surexpression significative (MDA-MB-231) ($p < 0,05$) et (PA-1) ($p < 0,01$) de la protéine pro-apoptotique Bax suite au traitement avec ce composé isolé de *F. umbellata* a également été observé. D'autre part, l'expression quantitative du rapport PARP clivé/PARP a permis de caractériser le type de mort cellulaire induit par ce composé. En effet, PARP (poly (ADP-ribose) polymérase-1) est une enzyme qui catalyse le transfert du fragment ADP-ribose de NAD⁺ à un sous-ensemble spécifique de substrats nucléaires en réponse aux dommages de l'ADN (D'Amours *et al.*, 1999 ; Shall et de Murcia, 2000). Il intervient à plusieurs niveaux de la réponse cellulaire aux dommages causés à l'ADN et constitue un élément important régulateur de la voie de réparation, d'excision de base de l'ADN et est essentiel pour le maintien de l'intégrité génomique (Ménissier-de Murcia *et al.*, 1997 ; Trucco *et al.*, 1998 ; d'Adda di Fagagna *et al.*, 1999 ; Vodenicharov *et al.*, 2000). Durant l'apoptose, PARP est spécifiquement protéolysé par des caspases dans un domaine de liaison à l'ADN de 24 kDa et un fragment catalytique de 89 kDa (Kaufmann *et al.*, 1993 ; Casiano *et al.*, 1996). L'observation des bandes du Western Blot a permis d'observer la présence d'une bande de 89 kDa. D'autre part, le calcul du rapport PARP Clivé/PARP a montré une augmentation significative ($p < 0,05$) de ce rapport sur les cellules cancéreuses ovariennes en comparaison au groupe témoin. Au vu de l'expression de ces protéines, il ressort que le triterpène peut induire l'apoptose via la voie intrinsèque, impliquant la diminution du ratio Bcl-2/Bax et de ce fait, régule l'inactivation de la protéine PARP. Ces résultats corroborent ceux de Girija et collaborateurs (2011) qui ont démontré que les terpénoïdes induisent l'apoptose dans diverses cellules cancéreuses en activant une cascade de signalisation intracellulaire.

La propagation métastatique du cancer du sein est responsable de 90% des décès liés au cancer et reste donc l'un des facteurs prédictifs négatifs importants du pronostic du cancer du sein (Alix-Panabieres *et al.*, 2007 ; Scully *et al.*, 2012). Ce potentiel métastatique est généralement attribué à la capacité de migration et d'invasion des cellules cancéreuses. Le potentiel anti migratoire de l'extrait au méthanol de *F. umbellata* a été évalué en utilisant le test de cicatrisation. Le résultat indique que ce dernier entraîne une inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231, la migration cellulaire ayant été inhibée de manière significative ($p < 0,001$) à 180 $\mu\text{g/mL}$ par rapport aux cellules du groupe témoin. La capacité anti-invasive a été évaluée par le test de transwell et a montré que les cellules traitées à la concentration de 180 $\mu\text{g/mL}$ avec l'extrait au MeOH en comparaison au groupe témoin ont inhibé de façon significative ($p < 0,01$) la capacité invasive des cellules MDA-MB-231. Ces effets anti-migratoire et anti-invasif seraient attribués à la présence de nombreuses substances naturelles qui inhibent la migration et/ou l'invasion cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire ou en inhibant les activités des métalloprotéases matricielles 2 et 9 (MMP2 / 9) (Wang *et al.*, 2010). Plusieurs travaux ont rapporté que l'expression de MMP-2 et MMP-9 est médiée par la voie PI3K / Akt (Li *et al.*, 2013 ; Tian *et al.*, 2010 ; Huang *et al.*, 2009). PI3K est une kinase qui contrôle plusieurs processus cellulaires via l'activation de l'Akt. De plus, l'activation de l'Akt peut entraîner une invasion du cancer et des métastases en stimulant la sécrétion de MMP (Zhang *et al.*, 2012 ; Jung *et al.*, 2013). Cette surexpression de phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) est caractéristique des cellules métastatiques du cancer du sein, par rapport à la lignée cellulaire épithéliale du sein normal ou aux cellules cancéreuses du sein non métastatiques. De plus, il a été rapporté que la surexpression de PI3K/Akt recombinante pourrait augmenter la capacité métastatique de cellules de cancer du sein non métastatiques (Xie *et al.*, 2013). Et l'inhibition de la PI3K pourrait entraîner une réduction de l'activation de la MMP-2, de la migration cellulaire et de l'invasion cellulaire (Karam *et al.*, 2010). D'autre part, les membres de la superfamille MAPK (ERK 1/2) sont connus pour réguler l'activité des MMP dans divers types de cellules (Cohen *et al.*, 2006). L'activation des voies MAPK a été démontrée dans d'autres systèmes comme un mécanisme favorisant la production de MMP, nécessaire à l'invasion, et à la néo vascularisation. Des études ont également montré que l'inhibition de p-ERK1/2 et VEGF peuvent entraîner une réduction de l'expression de MMP-2 et de MMP-9, ainsi que l'invasion de cellules tumorales (Hong *et al.*, 2005 ; Liang *et al.*, 2007). La présente étude a montré une diminution significative ($p < 0,05$) du rapport pERK/ERK sur les cellules cancéreuses ovariennes et une diminution non significative du rapport pAkt/Akt respectivement chez les cellules cancéreuses ovariennes et mammaires après traitement avec le triterpène en comparaison au groupe témoin. Akt1 ou protéine kinase B est une protéine kinase

sérine/thréonine qui régule les processus biologiques tels que la prolifération, l'apoptose et la croissance de divers types de cellules. L'activation de l'Akt est initiée par translocation sur la membrane par liaison au phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate produit par l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) en réponse à la stimulation des récepteurs de la surface cellulaire (Staal, 1987 ; Shih *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2010). La voie PI3K-Akt est l'une des voies les plus fréquemment dérégulées du cancer en raison de fréquentes altérations génétiques observées avec diverses enzymes de la voie et leurs effecteurs, telles que l'activation de mutations et l'amplification de la sous-unité catalytique, mutations de Akt et amplification du récepteur tyrosine kinase (Scheid et Woodgett, 2003 ; Brazil *et al.*, 2004). L'activité de Akt est liée aux effets prolifératifs et anti-apoptotiques observés dans les cellules tumorales du sein, et de l'ovaire de manière dépendante ou indépendante des œstrogènes (Yuan *et al.*, 2008). D'autre part, nos résultats montrent une diminution significative ($p < 0,05$) du rapport pERK/ERK chez les cellules ovariennes. Cette dernière (ERK1/2) est une kinase régulatrice de signal extracellulaire qui appartient à la famille des MAPK kinases. Ces voies répondent à divers stimuli extracellulaires et contrôlent la progression du cycle cellulaire, la prolifération, la cytokinèse, la transcription, la différenciation, la sénescence, la migration, la réponse au stress et la survie (Roskoki *et al.*, 2012). En conséquence, les déficiences dans les voies de signalisation des MAPK sont rapportées dans diverses maladies humaines, notamment le cancer et les maladies neurodégénératives (Kim *et al.*, 2010). Les voies ERK quant à elles améliorent la croissance et la formation de métastases des tumeurs (Ogata *et al.*, 2014 ; Codenotti *et al.*, 2019 ; Faggi *et al.*, 2015). Des études ont démontré qu'une inhibition concomitante d'Akt et ERK inhiberait la croissance cellulaire et induirait l'apoptose *in vitro* (Meng *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activation de Akt et ERK ½ serait en partie impliquée dans le mécanisme d'inhibition des cellules mammaires et ovariennes médiées par l'inhibition de la migration, l'invasion et l'induction de l'apoptose. Cela corrobore les travaux de plusieurs auteurs qui ont montré que les triterpènes auraient une activité cytotoxique en passant par plusieurs mécanismes tels que : l'inhibition de MMP-9, ERK (Qi *et al.*, 2008) et une augmentation de l'expression de la caspase-3 et le clivage de PARP (Pandey *et al.*, 2010).

Les cellules tumorales nécessitent les vaisseaux sanguins pour leur croissance et leur dissémination, processus connu sous le nom d'angiogénèse. De nombreux facteurs de croissance sont impliqués dans l'angiogénèse tumorale mais le plus important d'entre eux est ceux de la famille des facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (VEGF). Ces derniers favorisent l'angiogénèse tumorale en stimulant la prolifération et la survie des cellules endothéliales, en augmentant la perméabilité des vaisseaux et en recrutant des cellules précurseurs vasculaires dans

la moelle osseuse (Sia *et al.*, 2014). Ils jouent un rôle important en tant que régulateurs clés de l'angiogenèse dans le cancer du sein et de l'ovaire, et sont impliqués dans diverses étapes de la cancérogenèse mammaire et ovarienne (Duyndam *et al.*, 2002 ; Hefler *et al.*, 2007). Il a été observé dans cette étude, une diminution significative ($p < 0,05$) de VEGF chez les cellules cancéreuses mammaires et ovariennes après traitement avec le triterpène. Ces résultats suggèrent que ce triterpène inhiberait l'angiogenèse par divers mécanismes. Des études ont démontré que les voies PI3 kinase/Akt pourraient atténuer le cancer par l'intermédiaire de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire (Hu *et al.*, 2005). Ainsi, il est possible que l'extrait au méthanol de *F. umbellata* puisse réduire l'invasion de cellules mammaires et ovariennes d'une part en inhibant la production de MMP via la réduction du rapport pERK_{1/2}/ERK et d'autre part par la diminution du rapport pAkt/Akt et de VEGF comme observé avec le triterpène isolé de cet extrait. Ces résultats corroborent ceux des travaux de Liang et collaborateurs (2007) qui ont montré qu'une inhibition du pERK/ERK pourrait conduire à une réduction de l'expression de VEGF et de l'invasion des cellules tumorales ; et des travaux de Hu et collaborateurs (2005) qui ont démontré que les voies PI3 kinase/Akt pourraient atténuer le cancer de l'ovaire par l'intermédiaire de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Au cours des dernières années, certains produits à base de plantes (phytomédicaments) ont attiré l'attention des chercheurs principalement en raison des propriétés anticancéreuses probantes avec des effets indésirables négligeables. C'est dans cet optique que la présente étude a été réalisée avec pour objectif général d'évaluer les effets de *Ficus umbellata* sur quelques modèles de cancers œstrogéno-dépendants. Afin d'atteindre cet objectif, cette étude a été menée de façon suivie :

Ainsi, la première partie des travaux a consisté à évaluer le potentiel cytotoxique des extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* sur des lignées cancéreuses mammaires et ovariennes puis d'induire un modèle de cancer œstrogéno-dépendant chez les rates de souche Wistar et les traiter pendant 150 jours à l'issue desquels les paramètres tumoraux ont été enregistré, la microarchitecture des organes cibles (ovaires et glandes mammaires), le statut oxydatif, et l'innocuité des extraits ont été évalué. De ces expérimentations, il ressort que :

❖ Les extraits aqueux et au méthanol de *F. umbellata* possèdent des propriétés cytotoxiques sur les cellules cancéreuses mammaires et ovariennes, le potentiel cytotoxique de l'extrait au méthanol étant de 100 et 180 µg/mL sur les cellules PA-1 et MDA-MB-231 respectivement. Le modèle expérimental réalisé sur les animaux de souche Wistar a montré que les extraits aqueux (200 mg/kg) et au méthanol (50 et 200 mg/kg) de *F. umbellata* sont capables d'inhiber le développement de la néoplasie mammaire d'une part et réduire de façon significative l'incidence des tumeurs ovariennes (10%), la charge tumorale totale (58% et 46%, respectivement), et le poids moyen de la charge tumorale (57.8% et 45.6%) d'autre part.

Dans la deuxième partie des travaux qui a consisté à évaluer l'effet de l'extrait au méthanol de *F. umbellata* sur la progression du cycle cellulaire, le type de mort cellulaire induite, l'impact de l'extrait sur la migration et l'invasion cellulaire, il ressort que :

❖ L'extrait au méthanol de *F. umbellata* exerce une activité anticancéreuse au travers de sa capacité à induire l'apoptose sur les cellules MDA-MB-231 et PA-1. L'extrait au méthanol de *F. umbellata* est également capable d'inhiber de façon significative la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231.

Dans la troisième partie de cette étude, un fractionnement bio-guidé a été effectué puis l'élucidation du mécanisme d'action du composé le plus actif a été évalué. A l'issue de cette partie, il ressort que :

❖ Le triterpène isolé de la fraction à l'acétate d'éthyle de *F. umbellata*, constitue le principe actif responsable au moins en partie de l'activité anticancéreuse de *F. umbellata*. Ce dernier ayant montré des meilleurs potentiels cytotoxiques sur toutes les souches testées avec des CC₅₀ de 8,8 et 13,8 µg/mL chez les cellules MDA-MB-231 et PA-1 respectivement. Le triterpène isolé est capable d'induire l'apoptose, d'inhiber la migration, l'invasion et l'angiogenèse des cellules cancéreuses mammaire et ovariennes (MDA-MB-231 et PA-1).

Perspectives

En vue de poursuivre les travaux initiés dans cette étude, les études à venir auront pour objectifs d':

- ❖ Approfondir l'élucidation de la structure du triterpène;
- ❖ Approfondir l'élucidation du mécanisme d'action du triterpène ;
- ❖ Evaluer l'effet curatif du triterpène sur un modèle de cancer œstrogène-dépendant ;
- ❖ Evaluer le potentiel cytotoxique de la combinaison des différents composés isolés de *F. umbellata* ;
- ❖ Réaliser une étude de toxicité chronique du triterpène

|

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed, S., Culleton, B., Tonelli, M., Klarenbach, S., MacRae, J., Zhang, J., Hemmelgarn, B. (2008). Oral estrogen therapy in postmenopausal women is associated with loss of kidney function. *Kidney international*. 74, 370-376.
- Ahoua, A., Kone, M., Konan, A., Bonfoh, B. (2012). Antioxidant activity of eight plants consumed by great apes in Côte d'Ivoire. *African Journal of Biotechnology*. 11, 11732-11740.
- Akbakari, B., Naseri, M., Khazaei. (2018). Methods of inducing breast cancer in animals models: a systematic review. *World cancer research journal*, 5(4), e1182.
- Al-Attar AM (2004). The influence of dietary grapeseed oil on DMBA-induced liver enzymes disturbance in the frog. *Rana ridibunda*. *Pakistan Journal of nutrition*, 3, 304–309.
- Alessandra-Perini., Rodrigues-Baptista, C., Soares, D.M., Thiago, A., Souza, P., Nasciutti, E., Machad, E. (2018). *Euterpe oleracea* extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. *BMC Complement Alternative Medicine*, 18,116.
- Alix-Panabieres, C., Muller, V., Pantel, K. (2007). Current status in human breast cancer micrometastasis. *Current Opinion Oncology journal*, 19, 558 – 563.
- Alvarez-Cisneros, C., Muñoz, M.A., Suárez-Castillo, O.R., Pérez-Hernández, N., Cer-da-García Rojas, C.M., Morales-Ríos, M.S., Joseph-Nathan, P. (2014). Stereo-specific (5) JHortho, OMecouplingsinmethoxyindoles, methoxycoumarins, and methoxyflavones. *Magn. Reson. Chem.* 52, 491–499.
- Anbuselvam, C., Vijayavel, K., Balasubramanian, P. (2007). Protective effect of *Operculina turpethum* against 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in experimental rats. *Chemico-Biological Interactions*, 168, 229-236.
- Andersen, B.O., Shyan, R., Eniu, A., Smith, R.A., Yip, C.-H., Bese, N.S., Chow, L.W.C., Masood, S., Ramsey, S.D., Carlson, R.W. (2006). Breast cancer in limited resource countries: an overview of the Breast Health Global Initiative guidelines. *Breast Journal*, 1, 3-15.
- Anstead, G.M., Carlson, K.E., Katzenellenbogen. (1997). The Estradiol Pharmacophore: Ligand structure-estrogen Receptor Binding Affinity Relationships and a Model for the Receptor Binding Site. *Steroids*, 62(3), 268-303.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes, C.L., Morgan, T.M., Burke, G.L. (1996). Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *Journal of Nutrition*, 126, 43–50.
- Antila, E., Mussalo-Rauhamaa, H., Kantola, M., Atroshi, F., Westermarck, T. (1996). Association of cadmium with human breast cancer. *Science of the Total Environment Journal*, 186, 251-256.
- Ao, C., Li, A., Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., Tawata, S. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa*. *Food Control*, 19, 940–948.
- Arbonnier, M. (2009). Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Editions Quæ RD 10. F- 78026 Versailles Cedex, Service des publications scientifiques, 57 Rue Cuvier, F- 75005 Paris, France, ISBN MNHN978-2-85653- 626-1 : 396-416.

- Aslantürk, Ö.S., Aşkın, C.T., Karabey, B., Karabey, F. (2017). Active phytochemical detecting, antioxidant, cytotoxic, apoptotic activities of ethyl acetate and methanol extracts of *Galium aparine* L. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 15(6), 1-16.
- Ateba, B.S., Mvondo, M.A., Tchoukouegno, N.S., Tchoumtchoua, J., Awounfack, C., Njamen, D., Krenn, L. (2018). Natural Terpenoids Against Female Breast Cancer: A 5-year Recent Research. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 3162-3213.
- Awolola, G.V., Koorbanally, N.A., Chenia, H., Shode, F.O., Baijnath, H. (2014). Antibacterial and anti-biofilm activity of flavonoids and triterpenes isolated from the extracts of *Ficus sansibarica* warb subsp *sansibarica* (Moraceae) extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*, 11, 124-131.
- Ayse, B. (2018). Le cancer du sein chez la jeune femme et sa prise en charge (Thèse de doctorat). Université de Limoges, Limoges.
- Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., Palacios, J., Rakha, E., Richardson, A.L., Schmitt, F.C., Tan, P.H., Tse, G.M., Weigelt, B., Ellis, I.O., Reis-Filho, J.S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology*, 24(2), 157-167.
- Bagwell, C.B. (1993). Theoretical aspects of data analysis in clinical flow cytometry principles and application. Ed Bauer KD, Duque RE and Shankey TV.
- Baillet, F., Follezou, J.Y., Taillibert, S., Fouret, P., Mazon, J.J., Rixe, O., Renard, A., Delcourt, A., Noë, G., Haertig, A. (2015). Cours de cancérologie niveau DCEM3 2002-2003, faculté de médecine, Université Pierre et Marie Curie, France, 298.
- Baliga, M.S et Dsouza, J.J. (2011). Amla (*Embllica officinalis* Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. *European Journal of Cancer Prevention*. 20, 225-239.
- Balogh, G.A., Russo, I.C., Russo, J. (2003). Mutations in mismatch repairs genes are involved in neoplastic transformation of human breast epithelial cells. *International Journal of Oncology*, 23, 411-419.
- Banjerdpongchai, R., Wudtiwai, B., Pompimon, W., (2014). Stigmatalactam from *Orophea enterocarpa* induces human cancer cell apoptosis via a mitochondrial pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 10397-10400.
- Barha, C.K., Lieblich, S.E., Galea, L.A. (2009). Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 155-166.
- Bartrop, J.A., Owen, A.H., Cory, J.G. Cory. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-demethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, 1, 611-614.
- Barnes S. (1995). Effect of genistein on *in vitro* and *in vitro* models of cancer. *Journal of Nutrition*, 125, 777-783.

- Bartels, H., Böhmer, M., Heierli. (1972). Serum creatinine determination without protein precipitation. *International Journal of Clinical Chemistry*, 37, 193-197.
- Bast, R.C. (2005). New tumor markers: CA125 and beyond. *International Journal of Gynecology Cancer*, 15(3), 27481.
- Bauer, K., Brown, M., Cress, D., Parise, C.A., Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR) negative and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, 109, 1721-1728.
- Beaudry, M., Chiasson, S., Lauzière, J. (2006). *Biologie de l'allaitement : le sein, le lait, le geste*, Presse de l'Université du Québec.
- Bhattacharjee, J., Jogdand, S., Shinde, R.K., Goswami, S. (2018). Assessment of oxidative stress in breast cancer patients: a Hospital based study. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 7(5), 966-970.
- Bhuyan, B.K., Loughman, B.E., Fraser, T.J., Day, K.J. (1976). Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Experimental Cell Research*, 97(2), 275-280
- Biron (2019). Protéines sériques totales, protéines totales. Consulté à l'adresse URL <https://www.biron.com/fr/glossaire/proteines-totales/> [consulté le 7/10/2019]
- Bishayee, A. (2012). Current advances in cancer prevention and treatment by natural products. *Current Pharmaceuticals Biotechnology*, 13(1), 115–116.
- Bishayee, A., Mandal, A., Thoppil, R.J., Darvesh, A.S., Bhatia, D. (2013). Chemopreventive effect of a novel oleanane triterpenoid in a chemically induced rodent model of breast cancer. *International Journal of Cancer*, 133, 1054-1064.
- Boersma, A.W., Nooter, K., Oostrum, R.G., Stoter, G. (1996). Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*, 24(2), 123–130.
- Borowski, E., Bontemps-Gracz, M.M., Piwkowska, A. (2005). Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3), 609-627.
- Boudjou, S., Oomah, B. D., Zaidi, F., Hosseinian, F. (2013). Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1543–1550.
- Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., Claing, A. (2008). ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 283(52), 36425-36434.
- Brader, S., Eccles, S.A. (2004). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. *Tumori*, 90(1), 2-8.
- Brazil, D.P., Yang, Z.Z., Hemmings, B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5), 233-242.

- Brouckaert, O., Wildiers, H., Floris, G., Neven, P. (2012). Update on triple negative breast cancer: *prognosis and management strategies. International journal of women's health*, 4, 511-520.
- Brzezinski, A., Debi, A. (1999). Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators? *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 85(1) 47–51.
- Burness, M.L., Grushko T.A., Olopade, O.I. (2010). Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer journal*, 16(1), 23-32.
- Burnet, S.J., Perry, N.M., Gilmore, O.J., Allum, W.H., Carpenter, R., Wells, C.A. (1995). Benign biopsies in the prevalent round of breast screening. Review of 137 Cases. *Clinical Radiology*, 50, 254-258.
- Caizzi, L., Ferrero, G., Cutrupi, S. (2014). Genome-wide activity of unliganded estrogen receptor- α in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111(13), 4892-4897.
- Campeau, P.M., Foulkes, W.D., Tischkowitz, M.D. (2008). Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Human Genetics*, 124(1), 31-42.
- Cancer report worldwide. (2014). Crisis of cancer impact worldwide exposed. Press Release WCD
- Cancer Report Worldwide. (2018). Crisis of Cancer Impact Worldwide Exposed, Press Release, WCD.
- Cannet C. (2004). Artéfacts - Les difficultés de la technique histologique : les gageures de la fixation. *Revue Francaise d’Histotechnologie*, 17, 11-20.
- Cannet C. (2006a). Artéfacts - Les difficultés de la technique histologique : de la circulation à la coupe. *Revue Francaise d’Histotechnologie*, 19, 71-84.
- Cannet C. (2006b). Artéfacts - Les colorations topographiques. *Revue Francaise d’Histotechnologie*, 19, 85-98.
- Carey, L.A. (2011). Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. *The oncologist*, 16 Supplement 1, 71-78.
- Casiano, C.A., Martin, S.J., Green, D.R., Tan, E.M. (1996). Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), 765-770.
- Casimiro, M.C., Wang, C., Li, Z. (2013). Cyclin D1 Determines Estrogen Signaling in the Mammary Gland In Vivo. *Molecular Endocrinology*, 27(9), 1415–1428.
- Castellano, E., Downward, J. (2010). Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Current topics in microbiology and immunology*, 346, 143-169.
- Cavalieri, E.L., Stack, D.E., Devanesan, P.D. (1997). Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(20), 10937-10942.

- Centre International de Recherche sur le Cancer (2018). <https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263>. [Visité le 07/09/2018].
- Chandrashekha, C.H., Latha, K.P., Vagdevi, H.M., Vaidya, V.P. (2008). Anthelmintic activity of the crude extracts of *Ficus racemosa*. *International Journal of Green Pharmacy*, 2(2), 100–103.
- Chanrion, M., Fontaine, H., Rodriguez, C., Negre, V., Bibeau, F., Theillet, C., Henaut, A., Darbon, J. M. (2007). A new molecular breast cancer subclass defined from a large scale real-time quantitative RT-PCR study. *BMC cancer*, 7(1), 39.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Research*, 69(4), 1302–1313.
- Chaturvedula, V.P., Prakash, I. (2012). Isolation of stigmasterol and β sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1, 239-242.
- Chen, V.W. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*, 97(10 suppl), 2631-2642.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F. (2010). The Bcl-2 family reunion. *Molecular Cell*, 37(3), 299-310.
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Green, D.R. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death and Differentiation*, 13(8), 1396-1402.
- Choi, J.M., Lee, E.O., Lee, H.J., Kim, K.H., Ahn, K.S., Shim, B.S., Kim, N.I., Song, M.C., Baek, N.I., Kim, S.H. (2007). Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its Antiangiogenic Activities. *Phytotherapy Research*, 21(10), 954–959.
- Clarke, R. (1997). Issues in experimental design and endpoint analysis in the study of experimental cytotoxic agents in vivo in breast cancer and other models. *Breast Cancer Research and Treatment*, 46(2-3), 255-278.
- Clarke, R., Liu, M.C., Bouker, K.B., Gu, Z., Lee, R.Y., Zhu, Y., Skarr, T.C., Wang, Y., (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*, 22(47), 7316-7339.
- Codenotti, S., Faggi, Ronca R., Chiodelli, P., Grillo, E., Guescini, M., Megiorni, F., Marampon, F., Fanzani, A. (2019). Caveolin 1 enhances metastasis formation in a human model of embryonal rhabdomyosarcoma through Erk signaling cooperation. *Cancer Letters*, 449, 135–144.
- Cohen, J.J. (1993). Apoptosis. *Immunology Today*, 14(3), 126–130.
- Cohen, M., Meisser, A., Haenggeli, L., Bischof, P. (2006). Involvement of MAPK pathway in TNF- α -induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Molecular Human Reproduction*, 12(4), 225–232.

- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. (1995). Related isolation procedures and functional assays. In: Coico R, ed. *Current protocols in immunology*, 1, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 3.17.1.
- Congrès Euro-Africain de Cancérologie. (2016). Le cancer de la femme et de l'enfant, 7ème édition, Palais des Congrès, Yaoundé, Cameroon. <http://congreseac.org>
- Cotter, T.G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 501-507.
- Coumoul, X., Robert, B. (2015). Génotoxicité des métabolites des œstrogènes et cancers, *Medicine sciences*, 18(1), 86-90.
- Crevoisier. R. (2010). Cancérogenèse développement tumoral, classification. Département de Radiothérapie, Centre Eugène Marquis. 15-17.
- D'adda, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q., Jackson, S.P. (1999). Functions of poly (ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nature Genetics*, 23(1), 76- 80.
- Dalenc, F. (2006). Que reste-t-il du bilan d'extension systématique ? Le CA 15-3 : quel intérêt dans le bilan d'extension systématique ? Communication présentée à la 28es journées de la SFSPM, Lille. Consulté à l'adresse: http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/9813/SFSPM_2006_12_314.pdf?sequence=1.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G. (1999). Poly (ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*, 342(2), 249-268.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Defraigne, J.O., Pincemail, J. (2010). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue Medical de Liège*, 63, 10-19.
- Di Croce, L., Bruscalupi, G., Trentalance, A. (1996). Independent behavior of rat liver LDL receptor and HMGCoA under estrogen treatment: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224, 345-350.
- Diallo, A., Eklou, G.K., Agbonon, A., Aklikokou, K., Creppy, E.E., Gbeassor, M. (2010). Acute and subchronic (28-days) oral toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Lannea kerstingii* Engl. and *K.Krause* (Anacardiaceae) stem bark. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5, 343-349.
- Dickson, R.B., McManaway, M.E., Lippman, M.E. (1986). Estrogen induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth. *Science*, 232, 1540-1543.
- Digiovanni, J., Juchau, M.R. (1980). Biotransformation and bioactivation of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (7, 12-DMBA). *Drug Metabolism Reviews*, 11(1), 61-101.
- Dury S. (1991). Approche ethnobotanique des figuiers au nord du Cameroun (Rapport de stage). Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Université de Montpellier.
- Duyndam, M.C., Hilhorst, M.C., Schlüper, H.M., Verheul, H.M., Van, P.J., Pinedo, H.M., Boven, E. (2002). Vascular endothelial growth factor-165 overexpression stimulates angiogenesis and induces cyst formation and macrophage infiltration in human ovarian cancer xenografts. *American Journal of Pathology*, 160(2), 537-548.

- Elgene, L., Gerard, T., Neil, P., Theresa, E., Wayne, D.T., Carlo, P. (2016). Pushing estrogen receptor around in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 23(12), T227-T24.
- Ellman G. (1959). Quantitative Determination of Peptides by Sulfhydryl (-SH) Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.
- Ellouze, S., Krichen, S., Trabelsin, K., Ayadi, L., Sellami, A., Khabir, A. (2006). Tumeur de la granulosa de l'ovaire. À propos de 16 cas. *Journal de Gynecology Obstetrique et Biologie de la Reproduction*, 35, 767-72.
- Faggi, F., Chiarelli, N., Colombi, M., Mitola, S., Ronca, R., Madaro, L., Bouche, M., Poliani, P.L., Vezzoli, M., Longhena, F. (2015). Cavin-1 and Caveolin-1 are both required to support cell proliferation, migration and anchorage-independent cell growth in rhabdomyosarcoma. *Laboratory Investigation*, 95, 585-602.
- Falodun, A., Osakue, J., Uzoekwe, A.S., Sheng-Xiang, Q. (2010). Phytochemical and anticancer studies on ten medicinal plants used in Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 4(1), 36-39.
- Faustina, A., Paula, O., Jaunta P., Catarina, T. (2013). Estimation of rat mammary tumour volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab animal*, 42(6), 217-224.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893-2917.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 136(5), 359-386.
- Fossati, P., Principe, L. (1982). Serum Triglycerides Determined Colorimetrically with an Enzyme that Produces Hydrogen Peroxide. *Clinical Chemistry*, 28, 2077-2080.
- Friedl, P., Wolf, K. (2003). Tumor-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3, 362-374.
- Gaascht, F. (2013). Découverte, identification et caractérisation de molécules d'origine naturelle capables de cibler les voies de transduction, de prolifération, d'inflammation et de mort cellulaire dans des cellules cancéreuses (Thèse de doctorat). Université de Lorraine.
- Gao, J., Mitchell, L.A., Lauer, F.T., Burchiel, S.W. (2008). p53 and ATM/ATR regulate 7, 12 dimethylbenz [a] anthracene induced immunosuppression. *Molecular Pharmacology* 73(1), 137-146.
- Garner, R. (1998). The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutation Research*, 402(1-2), 67-75.
- Gerber, M., Boutron-Ruault, M.C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., Siess, M.H. (2002). Food and cancer: State of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bulletin du cancer*, 89(3), 293-312.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 685-704.

- Germain D. (2011). Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 473–484.
- Ghadam, A., Nasrollah, G., Farshid, H., Marzieh, S. (2011). Cytotoxic effects of different extracts and latex of *Ficus carica* on HeLa cell line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(2), 273-277.
- Ghate, N.B.; Hazra, B.; Sarkar, R.; Mandal, N. (2014). Heartwood extract of *Acacia catechu* induces apoptosis in human breast carcinoma by altering Bax/Bcl-2 ratio. *Pharmacognosy Magazine*, 10(37), 27-33.
- Ghoshal, A., Preisegger, K.H., Takayama, S., Thorgeirsson, S.S., Snyderwine, E.G. (1994). Induction of mammary tumors in female sprague-dawley rats by the food-derived carcinogen 2- amino-1 methyl-6-phenylindazole [4,5-b] pyridine and effect of dietary fat. *Carcinogenesis*, 15, 2429-2433.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J.P., De Biasi S., Roat, E., Bertocelli, L., Cooper, E.L., Cossarizza A. (2011). Quercetin and Cancer Chemoprevention (Review). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, ID 591356.
- Gilani, A.H., Mehmood, M.H., Janbaz, K.H., Khan, A., Saeed, S.A. (2008). Ethnopharmacological studies on antispasmodic and antiplatelet activities of *Ficus carica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 1–5.
- Girija, K., Poyil, P., Kanjoormana, A., Ramadasan, K. (2011). Inhibition of tumour progression by naturally occurring terpenoids. *Pharmaceutical biology*, 49(10), 995-1007.
- Giubellino, A., Burke, T.R., Bottaro, D. P. (2008). Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12, 1021-1033.
- Globocan (2018). Cancer incidence and mortality worldwide: International Agency for Research on Cancer: Cancer Base. Consulté à l'adresse <http://globocan.iarc.fr> (visité le 13/11/2018).
- Gohlke-Barwolf, C. (2000). Coronary artery disease: is menopause a risk factor? *Basic Research in Cardiology*, 95(suppl 1), 77-83.
- Goldman, L. et Schafer, A.I. (2013). Cecil medicine oncologie (24^{ème} Edition). *Elsevier Masson*.
- Gornall, A.G., Bardwill, G.S., David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by the means of biuret reactions. *Journal of Biological Chemistry*. 177, 751-766.
- Gougeon A. (2000). Physiologie ovarienne. *Encyclopédie Médico-chirurgicale*, 10, 27-30.
- Griffin, J.E et Ojeda S.R. (1988). Textbook of Endocrine Physiology (5^{ème} Edition). Oxford University Press.
- Guarrera, P.M. (2005). Traditional phytotherapy in Central Italy. *Fitoterapia*. 76, 1–25.
- Guiu, S., Michiels, S., André, F. (2012). Molecular subclasses of breast cancer: How do we define them? The impact working group statement. *Annals of Oncology*, 23(12), 2997–3006.

- Guo, Z., Yi, X., Xu, Z. (2002). Molecular Simulation of Interaction between Estrogen Receptor and Selective Estrogen Receptor Modulators. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(3), 208-212.
- Hakkak, R., Holley, A.W., MacLeod, S.L., Simpson, P.M., Fuchs, G.J., Jo, C.H., Kieber-Emmons, T., Korourian, S. (2005). Obesity promotes 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. *Breast Cancer Research*, 7, 627-633.
- Halimi, M., Asghari, M., Sariri, R., Moslemi, D., Parsian, H. (2012). Cellular response to ionizing radiation: A microRNA story. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 1, 178-84.
- Han, Y.D., Song, S.Y., Lee, J.H., Lee, D.S., Yoon, H.C. (2011). Multienzyme-modified biosensing surface for the electrochemical analysis of aspartate transaminase 407 and alanine transaminase in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 797-805.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5), 646-674.
- Handgraaf S. (2013). Prévention de l'obésité et du diabète de type 2 par les œstrogènes : rôle des fonctions transactivatrices du récepteur des œstrogènes α (Thèse de doctorat). Université de Toulouse.
- Hauck, A.K, Bernlohr, D.A. (2016). Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*, 57(31), 1976.
- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A., Thomas, P. (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 10751-10756.
- Hazra, B. et Biswas, S. (2008). Mandal M. Antioxidant and free radical scavenging activity of *spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8: 63.
- Head, K.A. (1997). Isoflavones and other soy constituents in Human Health and disease. *Alternative Medicine Review*, 3(1), 433-450.
- Hefler, L.A., Mustea, A., Könsgen, D., Concin, N., Tanner, B., Strick, R., Heinze, G., Grimm, C., Schuster., Tempfer, C. (2007). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(3), 898-901.
- Herrington, D.M. et Klein, K.P. (2003). Randomized clinical trials of hormone replacement therapy for treatment or prevention of cardiovascular disease: a review of the findings. *Atherosclerosis*, 166(2), 203-212.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10: 413-417.
- His, M. (2016). Surpoids, obésité et survie après cancer du sein dans la cohorte E3N (Thèse de Doctorat). Université Paris-Saclay.
- Hollenhorst, P.C. (2012). RAS/ERK pathway transcriptional regulation through ETS/AP-1 binding sites. *Small GTPases*, 3(3), 154-158.

- Hong, I.K., Kim, Y.M., Jeoung, D.I., Kim, K.C., Lee, H. (2005). Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK, and c-Jun pathways in human melanoma cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 37(3), 230–239.
- HUG (Hopitaux universitaire de Geneve). (2017). Anemie- departement de medecine communautaire de premiers recours et d'urgence, 3
- Hu, L., Hofmann, J., Jaffe, R.B. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mediates angiogenesis and vascular permeability associated with ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 11(22), 8208-8212.
- Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M.G., Sawyer, L.R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz, O.A., Dreher, D., Palazzo, J.P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J.F., Ellis, M.J., Olopade, O.I., Bernard, P.S., Perou, C.M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BioMed Central genomics*, 7, 96.
- Huang, C.Y., Fong, Y.C., Lee, C.Y., Chen, M.Y., Tsai, H.C., Hsu, H.C., Tang, C.H. (2009). CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways. *Biochemical Pharmacology*, 77, 794-803.
- Hulkower, K., Renee, H. (2011). Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics*, 3(1), 107-124.
- Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, Freddie Bray. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, 0:1–41.
- Institut National du Cancer (INCA). (2014). Les traitements des cancers du sein. Collection Guides patients Cancer info. Consulté à l'adresse WWW.e-Cancer.fr.
- Institut National du Cancer (INCA). (2016). Les traitements des cancers du sein, Collection Guides patients Cancer info. Consulté à l'adresse WWW.e-Cancer.fr.
- Institut national du cancer (INCA). (2018/6/2). Pilules contraceptives et risque de cancers Consulté à l'adresse <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Reduire-les-risques-de-cancer/Traitements-hormonaux/Pilules-contraceptives>.
- Institut national du cancer (INCA). (2018/05/02). Les facteurs de risques : l'âge. Consulté à l'adresse <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-derisque/Age>.
- Institut National du cancer (INCA). (2018/06/02). Prédispositions génétiques. Consulté à l'adresse <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-derisque/Predispositions-genetiques>.
- Institut National du Cancer (INCA). (2018/15/04). Cancer du sein. Consulté à l'adresse <http://www.ecancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-maladies-du-sein/Cancersdu-sein>.

- Institut National du Cancer (INCA). (2018/15/04). « *Les symptômes du cancer du sein* » Consulté à l'adresse <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Symptomes>.
- Institut National du Cancer (INCA). (2018/07/05). Différents types d'hormonothérapie Consulté à l'adresse <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancerdusein/Hormonotherapie/Differents-types-d-hormonotherapie#toc-choix-du-type-d- hormonothrapie>.
- Institut National du Cancer (INCA). (2018/06/02). *Antécédents personnels*. Consulté à l'adresse <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteursderisque/Antecedents-personnels>.
- Institut National du Cancer (INCA). (2018/15/04). *Cancer du sein*. Consulté à l'adresse <http://www.ecancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-maladies-du-sein/Cancersdu-sein>
- Institut National d'Excellence en santé et Service Sociaux (INESS). (2018). Myriad myriskmd – panel de 25 gènes associés aux cancers héréditaires analysés par séquençage de nouvelle génération (référence–2015.01.001). Consulté à l'adresse https://www.inesss.qc.ca/thematiques/sante/biologie_medicale-et-genomique/processuse_t-criteres-devaluation.html. Visité le 2/06/2019.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Okhura, Y., Ueno, K.A. (1996). Combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(11), 1518- 1520.
- Jacobs, A.J., Curtis, G.L., Newland, J.R., Wilson, R.B., Ryan, W.L. (1984). Chemical induction of ovarian epithelial carcinoma in mice. *Gynecologic Oncology*, 18, 177-80.
- Jacobs, I., & Bast, R.C. (1985). The CA 125 tumour associated antigen: a review of the literature. *Human Reproduction*, 4(1), 1-12.
- Jefcoate, C.R., Liehr, J.G., Santen, R.J. (2000). Tissue specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *Journal of National Cancer Institute Monographs*, 27, 95-112.
- Jehanno, C. (2017). Régulation de l'activité du récepteur alpha des œstrogènes (ER α) par l'hypoxie et par le facteur MKL1 dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires (Thèse de doctorat). Université de Rennes 1.
- Jeziarska-Drutel, A., Rosenzweig, S.A, Neumann. (2013). CA Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Advances in Cancer Research*, 119, 107–125.
- Jiang, Y.L., Liu, Z.P. (2011). Natural Products as Anti-Invasive and Anti-Metastatic Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 808-829.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., Nevins, J R. (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*. 365(6444), 349-352.
- Jordan, V.C., Morrow, M. (1999). Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer. *Endocrine Reviews*, 20(3), 253-278.

- Jull, J.W., Streeter, D.J., Statherland, L. (1996). The mechanism of induction of ovarian tumors in the mouse by 7,12-dimethylbenz (alpha) anthracene. Effect of steroid hormones and carcinogen concentration *in vivo*. *Journal of the National Cancer Institute* 37, 409–420.
- Jung, C.H., Kim, E.M., Park, J.K., Hwang, S.G., Moon, S.K., Kim, W.J., Um, H.D. (2013). Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP2 signaling pathway. *Oncology Reports*, 29, 2109 – 2113.
- Justina, N.N., Akachukwu, I., Conrad, V.S., Fidele, N. (2016). Exploring Cancer Therapeutics with Natural Products from African Medicinal Plants, Part II: Alkaloids, Terpenoids and Flavonoids. *Anti-Cancer Agent in Medicinal Chemistry*, 16(1), 108-127.
- Kaku, T. (2003). Histological classification of ovarian cancer. *Medical Electron Microscopy*, 36(1), 9-17.
- Kallen, J., Schlaeppli, J.M., Bitsch, F., Filipuzzi, I., Schilb, A., Riou, V., Fournier, B. (2004). Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor α (ERR α) crystal structure of ERR α ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49330-49337.
- Karam, A.K., Santiskulvong, C., Fekete, M., Zabih, S., Eng, C., Dorigo O. (2010). Cisplatin and PI3kinase inhibition decrease invasion and migration of human ovarian carcinoma cells and regulate matrix-metalloproteinase expression. *Cytoskeleton*, 67, 535 – 544.
- Karthikeyan, S., Gobianand, Pradeep, K., Molan, C.V., Balasubramanian, M.P. (2006). Biochemical changes in serum, lung, heart and spleen tissues of mice exposed to subacute toxicity inhalation of mosquito repellent mat vapor. *Journal of Environmental Biology*, 27, 355-358.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research*, 53(17), 3976-3985.
- Kaur, C., Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 153-161.
- Keith, A., Crist, Z. Z., Ming, Y., William, T., Gunning, P. B., Conran, V.E., Ronald, A. L. (2005). Characterization of rat ovarian adenocarcinomas developed in response to direct instillation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) coated suture. *Carcinogenesis*, 26(5), 951-957.
- Kelly, P.N et Strasser, A. (2011). The role of *Bcl-2* and its prosurvival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 18(9), 1414-1424.
- Kiechle, F.L et Zhang, X. (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical complications. *Clinica Chimica Acta*. 326(1-2), 27-45.
- Kim, N., Miljan, S., Abdullah, A., Tulay, C., Irzin, G., Abdulmaged, T., (2006). Effects of tamoxifen on vaginal blood flow and epithelial morphology in the rat. *BMC. Women's Health*, 6,14.

- Kim, E.K., Choi, E.J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(4), 396–405.
- Kim, J.Y., Chang, S.K., Park, H., Lee, B.M., Shin, H.S. (2012). Treatment outcome in patients with triple negative early stage breast cancers compared with other molecular subtypes. *Radiation oncology journal* 30(3), 124-131.
- Koterba, K.L., Rowan, B.G. (2006). Measuring ligand-dependent and ligand-independent interactions between nuclear receptors and associated proteins using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET2). *Nuclear receptor signaling*, 4:e021.
- Krause, A.W., Carley, W.W., Webb, W. (1984). Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 12(10), 1081-1090.
- Krishnan, V. (1994). "Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269(22), 15912-15917.
- Kumar, A., Jha, S., Pattanayak, S.P. (2016). Daphnetin ameliorates 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis through Nrf-2, Keap1 and NF- κ B pathways. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 82, 439-448.
- Kumaran, A., Karunakaran, R.J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 334-352.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, 863-870.
- Laflamme, N., Nappi, R.E., Drolet, G., Labrie, C., Rivest, S. (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER alpha and ER beta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *Journal of Neurobiology*, 36(3), 357-378.
- Lameire, V.N., Vanholder, W.R. (2005). Acute renal failure. *Lancet*, 365, 417-430.
- Lee, Y.C., Lin, H.H., Hsu, C.H., Wang, C.J., Chiang, T.A., Chen, J.H. (2010). Inhibitory effects of andrographolide on migration and invasion in human non-small cell lung cancer A549 cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 632(1-3), 23-32.
- Le, D., Chen, K., Husain, S., Marathe, A., Haq, M. (2018). Molecular Genetics of Cancer. *International Journal of Human and Health Sciences*, 2(4), 199-208.
- Le Bail, J.C., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G. (2000). Effects of phytoestrogens on aromatase, 3beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sciences*, 66(14), 1281-1291.
- Le Grand, A. (2009). Etude comparative de récepteurs aux oestrogènes : Aspects moléculaire et cellulaire de la réponse aux oestrogènes et anti-oestrogènes impliqués dans les causes et thérapies du cancer du sein (Thèse de doctorat). Université de Bretagne-Sud.
- Li, J.J., Li, S.A. (1987). Estrogen carcinogenesis in Syrian hamster tissues: role of metabolism. *Federation Proceedings*, 46(5), 1858- 1863.

- Li, X., Yang, Z., Song, W., Zhou, L., Li, Q., Tao, K., Zhou, J., Wang, X., Zheng, Z., You, N., Dou, K., Li H. (2013). Overexpression of Bmi-1 contributes to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by increasing the expression of matrix metalloproteinase (MMP)2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor via the PTEN/PI3K/Akt pathway. *International Journal of Oncology*, 43, 793–802.
- Liang, Y., Brekken, R.A., Hyder, S.M. (2006). Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocrine-related cancer*, 13, 905-919.
- Liang, K.C., Lee, C.W., Lin, W.N., Lin, C.C., Wu, C.B., Luo, S.F., Yang, C.M. (2007). Interleukin-1b induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor- κ B signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. *Journal of Cell Physiology*, 211, 759–770.
- Liehr, J.G., Fang, W.F., Sirbasku, D.A., Ari-Ulubelen A. (1986). Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *Journal of Steroid Biochemistry*, 24(1), 353-356.
- Liehr, J.G., Ricci, M.J., Jefcoate, C.R., Hannigan, E.V., Hokanson, J.A., Zhu, B.T. (1995). 4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9220-9224.
- Liehr, J.G., Ricci, M.J. (1996). 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 3294-3296.
- Lindsay, J., Esposti, M.D., Gilmore, A.P. (2011). Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(4), 532-539.
- Liu, J.F., Silver, D.P. (2010). PolyADP-ribose polymerase inhibitors: science and current clinical development. *Current opinion in oncology*, 22, 567-572.
- Liu, D., Zhang, X., Jiang, L., Guo, Y., Zheng, C. (2014). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Acta Histochemica*, 116(4), 620-654.
- Le D., Chen, K., Husain, S., Marathe, A., Haq, M. (2018). Molecular Genetics of Cancer. *International Journal of Human Health and Science*, 2, 199-208.
- Macek, K. (1972). *Pharmaceutical Applications of Thin-layer and Paper Chromatography*. Elsevier Publishing Company.
- Macgregor, J.I., Jordan, V.C. (1998). Basic Guide to the Mechanisms of Antiestrogen Action. *Pharmacological Reviews*, 50(2), 151–196.
- Made, S., Wawaimuli, A., Melva, L., Deni, R., Puspita, E., Mokhamad, F.U. (2019). Induction of Epithelial Ovarian Cancer by Implantation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) Coated Silk in Rats. *Journal of Young Pharmacists*, 11(1), 56-61.
- Mahato, S.B., and Kundu, A.P. (1994). ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry*. 37, 1517-1575.

- Mansoor, T.A., Ramalho, R.M., Luo, X., Ramalhete, C., Rodrigues, C.M., Ferreira, M.J. (2011). Isoflavones as apoptosis inducers in human hepatoma huh-7 cells. *Phytotherapy Research*, 25, 1819–1824.
- Marieb, E.N., Hoehn, K. (2010). Anatomie et physiologie humaine (8e édition). Pearson.
- Martucci, C.P., Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacology and Therapeutics*, 57(2-3), 237-257.
- Mathe, G., Kenis, Y. (1975). La chimiothérapie des cancers (Leucémies, Hématosarcomes et Tumeurs solides) (3eme édition). Paris: Expansion Scientifique Française.
- McGuire, W.L. (1978). Hormone receptors; their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. *Seminars in Oncology*, 5(4), 428-433.
- Meden, H., Fattani, M. (1998). CA 125 in benign gynecological conditions. *International Journal of Biological Markers*, 13(4), 231-237.
- Meng, J., Dai, B., Fang, B., Bekele, B.N., Bornmann, W.G., Sun, D., Peng, Z., Herbst, R.S., Papadimitrakopoulou, V., Minna, J.D., Peyton, M., Roth, J.A. (2010). Combination treatment with MEK and AKT inhibitors is more effective than each drug alone in human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *PLoS One*, 5: e14124.
- Ménissier-de Murcia J., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F. J., Masson M., Dierich A., LeMeur M. (1997). Requirement of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 94, 7303-7307.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F. (2002). Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biology of Reproduction*, 66(6), 1881-1892.
- Mense, S.M., Remotti, F., Bhan, A., Singh, B., El-Tamer, M., Hei, T.K., Bhat, H.K. (2008). Estrogen-induced breast cancer: alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(1), 78-85.
- Messina, M., Persky, V., Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: a view of in vitro and in vivo data. *Nutrition and cancer*, 21(2), 113-131.
- Metz, H.E., Houghton, A.M. (2011). Insulin receptor substrate regulation of phosphoinositide 3-kinase. *Clinical cancer research*, 17(2), 206-211.
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., Théron, P. (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Annales de Biologie Clinique*, 66(6), 605-620.
- Michel, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L. (2013). New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Medica*, 79(7), 514–532.
- Miyata, M., Furukawa, M., Takahashi, K., Gonzalez, F.J., Yamazoe, Y. (2001). Mechanism of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. *Japanese Journal of Pharmacology*, 86(3), 302-309.

- Moore, R.L., Faller, D.V. (2013). SIRT1 represses estrogen-signaling, ligand-independent ER α -mediated transcription, and cell proliferation in estrogen-responsive breast cells. *Journal of Endocrinology*, 216(3), 273-285.
- Moorthy, K., Yadav, U.C., Mantha, A.K., Cowsik, S.M., Sharma, D., Basir, S.F., Baquer, N.Z. (2004). Estradiol and progesterone treatments change the lipid profile in naturally menopausal rats from different age groups. *Biogerontology*, 5(6), 411-419.
- Morgentaler, A. (2006). Testosterone and prostate cancer: an historical perspective on a modern myth. *European Urology*, 50(5), 935-939.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mustafa, N., Emin, K., Tolga, E., Dilek, C., Neriman, I., Saim, O. (2019). Effects of Paclitaxel on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Tissues of Mice Bearing Ehrlich Solid Tumor. *Eurasian Journal of Medical Investigation*, 3(4), 315-321.
- Nakatsugi, S., Ohta, T., Kawamori, T., Mutoh, M., Tanigawa, T., Watanabe, K., Sugie, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2000). Chemoprevention by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis in rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91(9), 886-892.
- Nathalie, J. (2010). Lipogénèse cérébrale et régulation de la prise alimentaire. Communication présenté au 12e Congrès européen d'endocrinologie, Prague.
- News Santé. (2018, 5 Février). Pourquoi le cancer du sein augmente-il avec l'âge. Consulté à l'adresse <https://www.santenews.eu/2012/07/pourquoi-le-cancer-augmente-t-il-avec-lage/>
- Nishida, T., Sugiyama, T., Kataoka, A., Ushijima, K., Yakushiji, M. (1998). Histologic characterization of rat ovarian carcinoma induced by intraovarian insertion of a 7,12 dimethylbenz[a]anthracene coated suture: common epithelial tumors of the ovary in rats? *Cancer*, 83(5), 965-970.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the alamarBlue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421-5426.
- Ogata, N., Nakanish, H., Taniguchi, M., Hamaoka, T., Maruyama, N., Matoba, S., Ikeda, K., (2014). MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by alpha1-adrenergic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111(10), 3811–3816.
- Ola, M.S., Nawaz, M., Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 351(1-2), 41-58.
- Oladipo, O.T., Bolajoko, A., Abayomi, E., Anyim, G., Segun, E., Oluwatosin, A., Winnie, A. (2017). Chemotaxonomic Study of Six Nigerian Ficus Species (Moraceae). *Notulae Scientia Biologicae*, 9(2), 250-255.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(49), 609-619.

- Olumuyiwa, O.O (2017). Phytochemical, elemental and biological studies of three Ficus species (Moraceae) found in Kwazulu-Natal, South Africa (These de Doctorat). University of KwaZulu-Natal, Westville.
- OMS (2014). Profil des pays pour le cancer : Cameroun. Consulté à l'adresse http://origin.who.int/cancer/country-profiles/cmr_fr.pdf
- Oncolink Team. (2019, 21 Novembre). All about ovarian cancer. Consulté à l'adresse www.oncolink.org/cancers/gynecologic/ovarian-cancer/all-about-ovarian-cancer
- Olson, S.H., Bandera, E.V., Orlow, I. (2007). Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 165(3), 235-245.
- Orczyk, G.P., Caldwell, B.V., Behrman, H.R. (1974). Estrogens: Estradiol, Estrone, and Estriol. Methods for Hormone Radioimmunoassay. *Academic Press, New York*, 333-345.
- Ozawa, Y., Higashiyama, T., Shimizu, Y., Yarborough, C. (1993). Multiple functions of aromatase and the active site structure; aromatase is the placental estrogen 2-hydroxylase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 44(4-6), 469-80.
- Ozbay, T., Nahta, R. (2011). Delphinidin inhibits HER2 and Erk1/2 signalling and suppresses growth of HER2 overexpressing and triple negative breast cancer cell Lines. *Basic and Clinical Research*, 5, 54-143.
- Özlem, S.A. (2017). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, Marcelo L. Larramendy and Sonia Soloneski, IntechOpen, disponible à l'adresse: <https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages>
- Pandey, M.K., Sung, B., Aggarwal, B.B. (2010). Betulinic acid suppresses STAT3 activation pathway through induction of protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human multiple myeloma cells. *International Journal of Cancer*, 127(2), 282-292.
- Pandit, R., Phadke, A., Jagtap, A. (2010). Antidiabetic effect of *Ficus religiosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 462-466.
- Paramita, B., Camelia, M. (2018). Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 1648-1666.
- Parlakpınar, H., Tasdemir, S., Polat, A., Bay-Karabulut, A., Vardi, N., Ucar, M., Acet, A. (2005). Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology*, 207, 169-177.
- Parini, P., Angelin, B., Stavreus-Evers, A., Freyschuss, B., Eriksson, H., Rudling M. (2000). Biphasic effects of the natural estrogen 17 β -estradiol on hepatic cholesterol metabolism in intact female rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20(7), 1817-1823.

- Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G.R., Firestone, G.L., Leitman, D.C (2004). Estrogen receptor inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Research*, 64(1), 423-428.
- Passeport sante, (2015, Aout). Analyse du CA 15-3. Consulté à l'adresse https://www.passeportsante.net/fr/Maux/analyses_medicales/Fiche.aspx?doc=analyse-CA15-3-sang. [Consulté le 27/09/2019].
- Pereira-Caro, G., Borges, G., Van der Hooft, J., Clifford, M., Del Rio, D., Lean, M., Roberts, S., Kellerhals, B., Crozier, A. (2014). Orange juice (poly)phenols are highly bioavailable in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 100 1378–1384.
- Perou C. M. (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The oncologist*, 16, 61-70.
- Pierrekamina, K., Jean-Pierre, R., Michel, S., Jean-Pierrefaure., Xavier, D., (2003). Anatomie clinique de l'appareil génital féminin : Elsevier
- Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, A., Carlquist, M. (1999). Structure of the Ligand-binding Domain of Oestrogen Receptor Beta in the Presence of a Partial Agonist and a Full Antagonist. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 18(17), 4608-4618.
- Poirier, D. (2008). New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens, *Drug Development Research*, 69, 304-318.
- Prat, A., Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 5(1), 5–23.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST and Resazurin. *Cell Viability Assays. Methods and Protocols*, 1601, 1-17.
- Promega (1996). CellTiter 96™ AQueous non-radioactive cell proliferation assay. Madison, Promega Corporation.
- Pujol, P., Maudelonde, T. (2001). SERM: concept et mécanismes d'action : Prévention de l'ostéoporose. *La Lettre du gynécologue*, 258, 29-36.
- Qi, Q., Lu, N., Wang, X.T., Gu, H.Y., Yang, Y., Liu, W., Li, C., You, Q.D., Guo, Q.L. (2008). Anti-invasive effect of gambogic acid in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 86(5), 386-395.
- Quesnelle, K.M., Boehm, A.L., Grandis, J.R. (2007). STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 102(2), 311-319.
- Quetin-Leclercq, J. (1990). Des poisons de flèches aux substances naturelles antimitotiques. Act du 1er Colloque Européen d'Ethnopharmacology Metz, 22-25.
- Rakhi, S., Daman, S., Dwarakanath, B.S., Madhu, C. (2011). Inhibition of Human Cervical Cancer Cell Growth by Ethanolic Extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. (Punarnava) Root. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-13.
- Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 427-442.

- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., Jackson, R. (2012). Campbell biologie (9eme edition). Pearson.
- Reed, J.C (1998). *Bcl-2* family proteins. *Oncogene*, 17(25), 3225-3236.
- Reed, D.S., Malone, K.E., Li, C.I., Buist, S.M., Beaver, E.F., Barlow, W.E. (2014, Aout). Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age consulte a l'adresse <http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/15/4078?sid=ffb4fb68-ccee-494d-ab36-0e12a01e6fe7> [consulté le 6/02/2018].
- Frankel, S., Reitman, S. (1957). Dosage des transaminases sériques. *American Journal of Clinical Pathology*, 28 (1), 56-63.
- Rice, S., Whitehead, S.A. (2006). Phytoestrogens and breast cancer promoters or protectors? *Endocrine Related Cancer*, 13(4), 995–1015.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H., Worzella, T.J., Minor, L. (2004). Cell viability assays. 2013 Mat 1 (updated 2016 Jul 1). In: Sitampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly et Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Robert, J., Marty, M. (2015). Pharmacologie des cancers. Paris : Lavoisier
- Roskoki, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143.
- Ross, J.S. (1996). DNA Ploidy and Cell Cycle Analysis in cancer diagnosis and Prognosis. *Oncology*, 10(6), 867-882.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., Kooperberg, C., Stefanick, M.L. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Journal of American Medical Association*, 288(3), 321-333.
- Rowlands, J.C., Hakkak, R., Ronis, M.J., Badger, T.M. (2001). Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *Journal of Nutrition*, 131(12), 3281-3287.
- Roy, D., Strobel, H.W., Liehr, J.G. (1991). Cytochrome b5-mediated redox cycling of estrogen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 285(2), 331-338.
- Rubnov, S., Kashman, Y., Rabinowitz, R., Schlesinger, M., Mechoulam, R. (2001). Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. *Journal of Natural Products*, 64(7), 993–996.
- Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, M., Moras, D. (2000). Estrogen Receptor Transcription and Transactivation: Structure-function Relationship in DNA-and Ligand-binding Domains of Estrogen Receptors. *Breast Cancer Research*, 2(5), 353-359.
- Russo, J., Tay, L.K., Russo, I.H. (1982). Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2(1), 5–73.
- Russo, J., Russo, I.H. (2000). Atlas and histologic classification of Tumors of rat mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5(2), 187-200.

- Russo, J., Larref, M.H., Balogh, G. (2003). Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 87(1), 1-25.
- Sagiv, S.K., Gaudet, M.M., Eng, S.M., Abrahamson, P.E., Shantakumar, S., Teitelbaum, S.L., Bell P., Thomas, J.A., Neugut, A.I., Santella, R.M. Gammon, M.D. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and survival among women with breast cancer. *Environmental Research*, 109(3), 287-291.
- Sahu, A., Varma, M., Kachhawa, K. (2013). A Prognostic study of MDA, SOD and Catalase in Breast Cancer Patients. *International Journal of Science and Research*, 4(05), 157-159.
- Sak, K. (2014). Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. *Nutrition and Cancer*, 66(2), 177–193.
- Sando, Z., Kemfang, J.D., Kasia, J.M., Yomi, J., Nana, N.A., Ngassam, A., Domkam, I., Ndom, P. (2015). Breast Cancer Survival in Cameroon: Analysis of a Cohort of 404 Patients at the Yaoundé General Hospital. *Advances in Breast Cancer Research*, 4(2), 44-52.
- Sankaranarayanan, R., Ferlay, J. (2006). Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 20(2), 207-225.
- Saraste, A., Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528-537.
- Scheeba, C., Swamidoss, D. Assessment of oxidative stress and antioxidant profiles in patients with breast carcinoma. (2010). *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 7, 1067-1073.
- Scheid, M.P., Woodgett, J.R. (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B / Akt. *FEBS Letters*, 546(1), 108-12.
- Schraub, S., Surowka, J.F. (1991). Phytothérapie et Cancer. Encyclopedie Médicale Nature : Phytothérapie Aromathérapie.
- Schumacher, M., Cerella, C., Reuter, S., Dicato, M., Diederich, M. (2010). Antiinflammatory, pro-apoptotic, and anti-proliferative effects of a methanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract are mediated via modulation of the nuclear factor-kB pathway. *Genes & Nutrition*, 6(2), 149-160.
- Scully, O.J., Bay, B.H., Yip, G., Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics and Proteomics*, 9(5), 311 – 320.
- Sener, D.E., Gönenç, A., Akinci, M. (2007). Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochemistry and Function*, 25(4), 377-382.
- Sevenet, T. (1991). Les orientations de la recherche en phytothérapie, pharmacologie (editions techniques- Encycl. Méd. Nat). Paris : Phytothérapie, Aromathérapie. 8-8-5- 9, 16.
- Shall, S., de Murcia, G. (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutation Research*, 460(1), 1-15.

- Shih, Y.W., Shieh, J.M., Wu, P.F., Lee, Y.C., Chen, Y.Z., Chiang, T.A. (2009). Alpha-tomatine inactivates PI3K/Akt and ERK signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells: effect on metastasis. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1985-1995.
- Shoeb, M. (2006). Anticancer from medicinal plants. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 1(2), 35-41.
- Sia, D., Alsinet, C., Newell, P., Villanueva, A. (2014). VEGF signaling in cancer treatment. *Current Pharmaceutical Design*, 20(17), 2834–2842.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2018). Cancer Statistics 2018. *Cancer journal for clinicians*, 68(1), 7-30.
- Silbergeld, E.K., Waalkes, M., Rice J.M. (2000). Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *American Journal of Industrial Medicine*, 38(3), 316-323.
- Singh, H., Bedi, P.S., Singh, B. (2011). Hepatoprotective activity of turmeric and garlic against 7-12, dimethylbenzanthracene induced liver damage in wistar albino rats. *European Journal of Medicinal Plants*, 1(4), 162–170.
- Sirisha, N., Sreenivasulu, M., Sangeeta, K., Madhusudhana, C. (2010). Antioxidant properties of Ficus species–A Review. *International Journal of PharmTech Research*, 2(4), 2174-2182.
- Sliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M. (2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS One*, 11(5) :e0155772.
- Société canadienne du cancer « Les facteurs de risques du cancer du sein » disponible sur http://www.cancer.ca/frca/cancerinformation/cancertype/breast/risks/?region=qc#Contreceptifs_oraux [consulté le 6/02/2018].
- Srinivasan, R., Chaitanyakumar, A., Mageswari, A., Gomathi, A., Kumar, J.G., Jayasindu, M., Bharath, G., Shravan, J.S., Gothandam, K.M., (2017). Oral administration of lyophilized Dunaliella salina, a carotenoid-rich marine alga, reduces tumor progression in mammary cancer induced rats. *Food and Function*, 8(12), 4517-4527.
- Staal, S.P. (1987). Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84(14), 5034-5037.
- Stamp, N. (2003). Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quarterly Review of Biology*, 78(1), 23–55.
- Stone, V., Johnston, H., Schins, R.P. (2009). Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(7), 613-626.
- Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768-780.
- Suzui, N., Sugie, S., Rahman, K.M, Ohnishi, M., Yoshimi, N., Wakabayashi, K., Mori, H. (1977). Inhibitory effects of diallyl bisulfide or aspirin on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 88, 705-711.

- Taafrout, M. (1986). Contribution à l'étude phytochimique d'extrait de végétaux supérieurs à propriétés antitumorales potentielles, par l'isolement et l'étude structurale des 161 composants du *Bombax costatum*, *Crossopetalum rhacoma* et *Steganotaenia araleacea* (Thèse de Doctorat). Université de Paris 6.
- Tagne, R.S., Telefo, B.P., Nyemb, J.N., Yemele, D., Njina, N.S., Goka, C.M., Lienou, L., Kamd, N.A., Moundipa, F.P., Farooq, D.A. (2014). Activités anticancéreuses et antioxydantes des extraits et fractions au méthanol de quelques plantes médicinales camerounaises. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, 442-444.
- Taguchi, O., Michael, S.D., Nishizuka, Y. (1988). Rapid Induction of Ovarian Granulosa Cell Tumors by 7,12-Dimethylbenz(f)anthracene in Neonatally Estrogenized Mice. *Cancer Research*, 48, 425-429.
- Tariq, A., Mussarat, S., Adnan, M. (2015). Revue sur une preuve ethnopharmacologique, phytochimique et pharmacologique des plantes anticancéreuses himalayennes. *Journal of Ethnopharmacology*, 164, 96-119.
- Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings National Academy of Sciences of the USA*, 107, 15449–15454.
- Tee, T.T and Azimahtol. (2005). Induction of apoptosis by *Eurycoma longifolia* Jack extracts. *Anticancer Research*, 25(3B), 2205- 2214.
- Tessmer, M.S and Anderson K.C. (2016). AACR cancer progress report 2016: Improving lives through research. *Clinical Cancer Research*, 22(19), 4759.
- Thibault., Levasseur, M.C. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme (2eme Édition). Ellipses Edition Marketing : Paris : INRA : Ellipses
- Thomas L. (1984). Labor und diagnose 2 Auflage: Medizinische Verlagsgesellschaft
- Tian, T., Nan, K.J., Guo, H., Wang, W.J., Ruan, Z.P., Wang, S.H., Liang, X., Lu, C.X. (2010). PTEN inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by coordinately decreasing MMP expression via the PI3K/Akt pathway . *Oncology Reports*, 23(6), 1593 – 1600.
- Ting, Y.A., Kimler, B.F., Fabian, C.J., Petroff, B.K., (2007). Characterization of a preclinical model of simultaneous breast and ovarian cancer progression. *Carcinogenesis*, 28, 130–135.
- Toft, D.J., Cryns, V.L. (2011). Minireview: Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies. *Molecular Endocrinology*, 25(2), 199–211.
- Toker, A., Yoeli-Lerner, M. (2006). Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer research*, 66(8), 3963-3966.
- Trucco, C., Oliver, F.J., De Murcia, G., Menissier-de Murcia J. (1998). DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Research*, 26(11), 2644-2649.

- Tulasi, C., Lakshmi, N., Saida, L. (2018). Cytotoxic effect of *Ficus religiosa* and *Ficus benghalensis* latex extracts on MCF-7 cell line. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*, 6(5), 96-100.
- Vanderhyden, B.C., (2005). Loss of ovarian function and the risk of ovarian cancer. *Cell and Tissue Research*, 322(1), 117–124.
- Vanstaevel, A. (2017, 19 Septembre). Facteurs de risque du cancer du sein. Consulté à l'adresse <https://www.radins.com/dossiers/sante/les-facteurs-de-risques-du-cancer-du-sein,3322.html> [consulté le 6/02/2018].
- Varela, C.L. (2013). Design, synthesis and structure-activity relationships studies on steroidal aromatase and 5 α -reductase inhibitors as antitumors (Thèse de Doctorat). University of Coimbra.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51.
- Vodenicharov, M.D., Sallmann, Satoh, M.S., Poirier, G.G. (2000). Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Nucleic Acids Research*, 28(20), 3887-3896.
- Vogel, V.G., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Cronin, W.M., Cecchini, R.S., Atkins, J.N., Bevers, T.B., Fehrenbacher, L., Pajon, E.R., Wade, J.L., Robidoux, A., Margolese, R.G., James, J., Lippman, S.M., Runowicz, C.D., Ganz, P.A., Reis, S.E., McCaskill-Stevens, W., Ford, L.G., Jordan, V.C., Wolmark, N. (2006). Effect of tamoxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes. The NSABP study of tamoxifen and raloxifen (STAR) P-2 trial. *Journal of the American Medical Association*, 295, 3-15.
- Vorobiof, D.A., Abratt, R. (2007). The cancer burden in Africa. *South African Medical Journal*, 97, 937–939.
- Wang, M.Y., Liehr, J.G. (1994). Identification of fatty acid hydroperoxide cofactors in the cytochrome P450- mediated oxidation of estrogens to quinone metabolites. Role and balance of lipid peroxides during estrogen-induced carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(1), 284-291.
- Wang, L., Ling, Y., Chen, Y., Li, C.L., Feng, F., You, Q.D., Lu, N., Guo, Q.L. (2010). Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Letters*, 297(1), 42-48.
- Weisz, J., Bui, Q.D., Roy, D., Liehr, J.G.(1992). Elevated 4-hydroxylation of estradiol by hamster kidney microsomes: a potential pathway of metabolic activation of estrogens. *Endocrinology*, 131, 655-661.
- Wesierska-Gadek, M.P. Kramer, M. Maurer, M. (2008). Resveratrol modulates roscovitine-mediated cell cycle arrest of human MCF-7 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1327-1333.

- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2), 369–376.
- Witthawaskul, P., Ampai, P., Kanjanapothi, D., Taesothikul, T., Lertprasertsuke, N. (2003). Acute and subacute toxicities of Saponin mixture isolated from *Schefflera leucantha* Viguier. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 115-121.
- Xie, Y., Abel, P.W., Kirui, J.K., Deng, C., Sharma, P., Wolff, D.W., Toews, M.L., Tu, Y. (2013). Identification of upregulated phosphoinositide 3-kinase gamma as a target to suppress breast cancer cell migration and invasion. *Biochemical Pharmacology*, 85(10), 1454 – 1462.
- Yager, J.D., Liehr, J.G. (1996). Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 203–232.
- Yagi, K. (1976). Simple Fluorometric Assay for lipoperoxyde in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15, 212-216.
- Yamaguchi, H., Wang, H.G. (2001). The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*, 20, 7779-7786.
- Yerizel, E., Astria, N., Khambri, D. (2019). Role of malondialdehyde (MDA) in patients with breast cancer diseases. *Acta Biochimica Indonesiana*, 2(2), 68-74.
- Ying, P., Yunen, L., Xiaodong, X. (2013). Change Trends of Organ Weight Background Data in Sprague Dawley Rats at Different Ages. *Journal of Toxicology Pathology*, 26(1), 29-34.
- Yuan, T.L., Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497-5510.
- Zdenka, K., Vladimír, M., Slávka, P., Jana, N. (2012). Influence of selected triterpenoids on chemoprevention and therapy of breast cancer. *University Review*, 6, 12-18.
- Zhang, Z.J., Ma, S.L. (2012). miRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review). *Oncology Reports*, 27(4), 903-910.
- Zhang, Y., Ganfeng, L., Mengjie, L., Pi, G., Yuejiao, X., Huanlin, Ji., Yuantao, Hao. (2019). Global patterns and trends in ovarian cancer incidence: age, period and birth cohort analysis. *BioMed Central Cancer*, 19, 984.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Journal of Food Chemistry*, 64, 555-559.
- Zingue, S. (2016). Profil épidémiologique, clinique et devenir des patients suivis à l'Hôpital Général de Yaoundé pour un cancer du sein ses cinq dernières années (mémoire). Université Catholique de l'Afrique Centrale, Yaoundé.
- Zingue, S., Michel, T., Tchatchou, J., Magne, Nde., Winter, E., Monchot, A., Awounfack, C.F., Djiogue, S., Clyne, C., Fernandez, X., Creczynski-Pasa, T.B., Njamen, D. (2016a). Estrogenic effects of *Ficus umbellata* Vahl. (Moraceae) extracts and their ability to alleviate some menopausal symptoms induced by ovariectomy in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 332-344.

Zingue, Stephane., Harquin, Simplicie., Seferin Djogue., Dieudonne Njamen. (2018). Effects of *Ficus umbellata* (Moraceae) Aqueous Extract and 7-Methoxycoumarin on Scopolamine-Induced Spatial Memory Impairment in Ovariectomized Wistar Rats. *Behavioural neurology*, 8, 1-14.

ANNEXE

Annexe 1. Préparation des solutions et colorants

❖ **Annexe.1.1. Solutions, réactifs utilisés pour le dosage des classes de composés phytochimiques**

- **Le réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10^e** a été obtenu par le mélange de 2 mL de Folin-Ciocalteu dans une fiole jaugée (20 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des polyphénols totaux.
- **La solution de carbonate de sodium 7,5 %** a été obtenue par dissolution de 3,75 g de Na₂CO₃ dans une fiole jaugée (50 mL) avec 10 mL d'eau distillée et le volume final complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des polyphénols totaux.
- **La solution de nitrite de sodium 5 %** a été obtenue de la dissolution de 1 g de NaNO₂ dans une fiole jaugée (20 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des flavonoïdes totaux.
- **La solution de chlorure d'aluminium 10 %** a été obtenue par dissolution de 2 g de AlCl₃ dans une fiole jaugée (20 mL) avec 10 mL d'eau distillée et le volume final complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des flavonoïdes totaux.
- **La solution hydroxyde de sodium 1mM** a été préparée en dissolvant de 2 g de NaOH dans une fiole jogée (50 mL) avec 10 mL d'eau distillée et le volume final complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des flavonoïdes totaux.

❖ **Annexe.1.2. Solutions et réactifs utilisés pour le dosage de quelques paramètres du stress oxydant**

- **La solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,37 %**. Pour préparer cette solution, 0,37 g de TBA a été dissous dans une fiole jaugée (100 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 100 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour préparer la Solution TCA-TBA-HCL.
- **La solution d'acide trichloracétique (TCA) 15 %** a été préparée en dissolvant 7,5 g de TCA dans une fiole jaugée (50 mL) avec 20 mL d'eau distillée et le volume final complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour préparer la Solution TCA-TBA-HCl.

- **Le HCl 0,25 N** a été obtenu par un mélange de 1,04 mL de HCl 0,25 N dans une fiole jaugée (50 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour préparer la Solution TCA-TBA-HCl.

- **La solution TCA-TBA-HCL** a été obtenue par le mélange des solutions de TBA, TCA et HCl dans les proportions 1 : 1 : 1.

- **Le réactif d'Ellman** a été obtenu en dissolvant 4,96 mg de DTNB dans une fiole jaugée (250 mL) avec 100 mL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) et le volume final complété à 250 avec du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5). Ce réactif a été utilisé lors du dosage du glutathion réduit.

❖ **Annexe.1.3. Solutions et colorants utilisés pour les coupes histologiques**

Les solutions et colorants ci-après ont été préparés avec de l'eau distillée et/ou avec de l'alcool absolu ou de l'éthanol concentré à 95 %.

- **Le formol à 10 %** a été préparé à partir du formol commercial (37 %). Pour un volume final de 1000 mL, un volume initial de 270,27 mL de formol commercial a été introduit dans une éprouvette graduée et le volume final a été atteint par ajout d'eau distillée.
- **L'alcool à 50, 70 et 80 %** ont été obtenus par dissolution de l'éthanol à 95 % ou de l'alcool absolu d'après la table de Gay-Lussac (voir annexe).
- **L'hématoxyline de Harris** est un colorant nucléaire. Pour une préparation de 200 mL, le mélange suivant a été réalisé dans une fiole jaugée (200 mL): 1 mg d'hématoxyline, 10 mL d'alcool absolu, 20 g d'alun potassique dissous à chaud et 0,5 g d'oxyde de mercure rouge, puis le volume final complété à 200 mL avec de l'eau distillée. Le mélange obtenu est porté à ébullition puis refroidi et filtré. La solution recueillie est la solution d'hématoxyline de Harris.
- **L'éosine alcoolique à 0,5 %** est un colorant cytoplasmique. Pour obtenir un volume de 1000 mL, le mélange suivant a été réalisé : 5 g d'éosine, 950 mL d'éthanol absolu mesurée dans une éprouvette graduée de 1000 mL. Le volume final a été atteint par ajout d'eau distillée.
- **La solution d'eau gélatinée** permet l'étalement des coupes histologiques et une bonne adhésion de celles-ci sur les lames. Cinq grammes de poudre de gélatine ont été dissous dans 1000 mL d'eau distillée chauffée (45°C).
- **La solution saturée d'eau lithinée** est utilisée pour renforcer la coloration nucléaire. Pour un volume final de 300 mL, 10 mg de carbonate de lithium ont été introduits dans un bécher et le volume final a été atteint après ajout d'eau distillée. La solution obtenue a été filtrée avant d'être utilisée.

- **La solution aqueuse de vert lumière à 2 %** a été obtenue par le mélange de 25 mL de solution aqueuse de vert lumière dans une fiole jagée avec (1000 mL) avec 50 mL d'éthanol à 95% et le volume final complété à 1000 mL avec de l'éthanol à 95%.
- **La solution de brun Bismarck à 0,5 %** a été obtenue par dissolution de 0,5 g de brun Bismarck dans une fiole jaugée avec (100 mL) avec 5 mL d'éthanol à 95% et le volume final complété à 100 mL avec de l'éthanol à 95%.
- **La solution d'EA-65** a été obtenue par le mélange, dans une éprouvette, de 450 mL de vert lumière à 0,02 %, 100 mL de brun Bismarck à 0,5 % et 450 mL de solution d'éosine à 0,5 %. Six grammes d'acide phosphotungstique ont ensuite été dissous dans le mélange.
- **La solution d'éthanol / xylène** résulte du mélange de l'éthanol absolu avec du xylène (1:1).

❖ **Annexe 1.4. Solutions et réactifs pour le Western Blot**

La solution de BSA 10% a été obtenue en dissolvant 2,5 g de BSA dans 50 mL d'eau distillée

La solution de lait 5% a été obtenue en dissolvant 5 g de lait dans 100 mL d'eau distillée

La solution RIPA a été préparée en introduisant 0,5 mL d'une solution Igepal, 250 mg de sodium Deoxycholol et 50 mg de SDS dans une fiole jaugée puis le volume a été complété avec 50 mL de PBS.

Annexe 2. Préparation des tampons

❖ **Annexe.2.1. Tampon utilisé pour la préparation des homogénats**

- Le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5 a été préparé en dissolvant 1,74 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 1,57 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) dans 200 mL d'eau distillée.

❖ **Annexe.2.2. Tampon utilisé pour le dosage du Glutathion réduit**

- Le tampon phosphate 0,1M, pH 6,5 a été obtenu à partir du mélange de deux solutions. **Solution A:** 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dissous dans 500 mL d'eau distillée. **Solution B:** 8,9 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans 500 mL d'eau distillée. Un mélange de 500 mL de la solution A obtenue et de 200 mL de la solution B a été réalisé puis 80 mL de la même solution A a été ajouté goutte à goutte pour un volume final de 780 mL. Cette solution a été utilisée pour la préparation du Réactif d'Ellman lors du dosage du glutathion réduit (GSH).

❖ **Annexe.2.3. Tampon utilisé pour le Western Blot**

- Le Tampon de transfert, pH 7 a été préparé en dissolvant 3,03 g de Base Tris (25 mM) puis 14,4 g de Glycine (192 mM) dans 200 mL du méthanol 20 % puis le volume a été complété à 1000 mL avec de l'eau distillée.

- Le tampon de migration, pH 8,3 a été obtenu en dissolvant 30,275 g de Tris (0,25 M) puis 144,1 g de Glycine (1,92 M) et 10 g de SDS (35mM) et le volume a été complété par ajout de 1000 mL d'eau distillée.

Annexe 3 : Table de Gay-Lussac

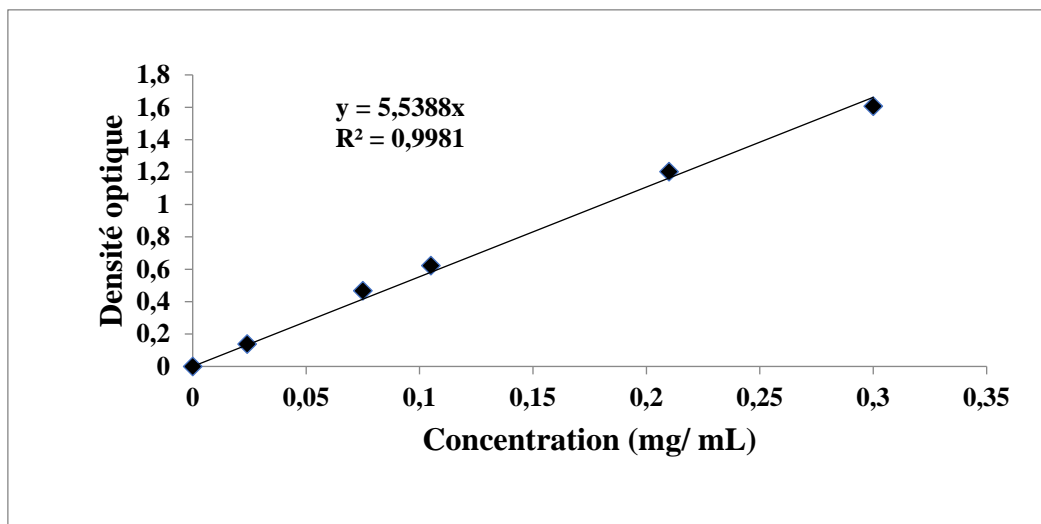
La table de Gay-Lussac, encore appelé table de mouillage de l'alcool, est utilisée pour la dilution de l'alcool.

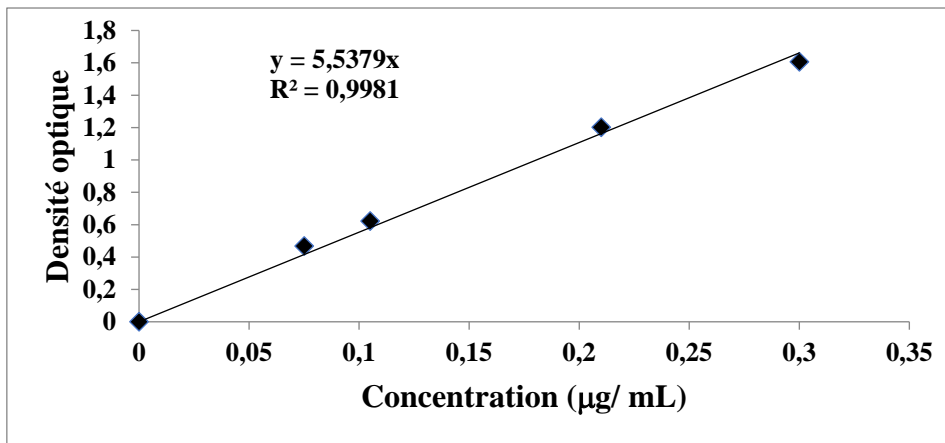
		Concentration initiale															
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50		
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25											
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41										
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56									
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83								
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2							
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64						
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15					
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76				
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47			
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47			
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41		
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55		
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59		
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45		
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73		
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55		
	15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64		
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85			

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale X (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 mL d'eau à 100mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Annexe 4 : Courbes d'étalonnages

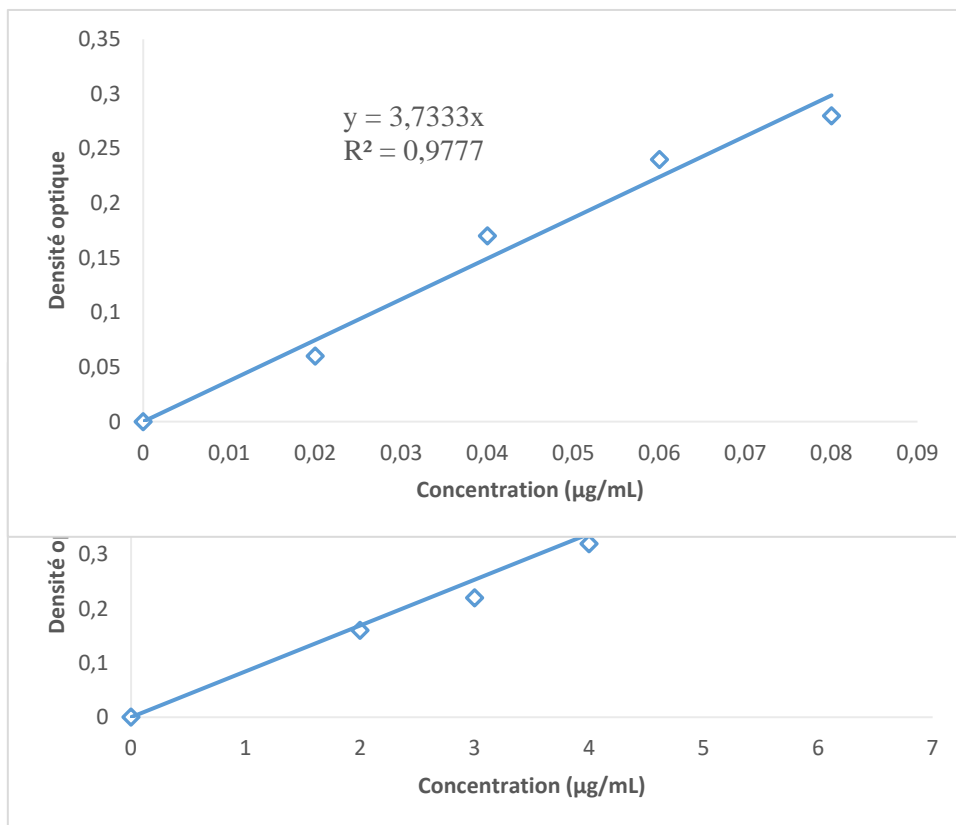




Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Courbe d'étalonnage des flavonols

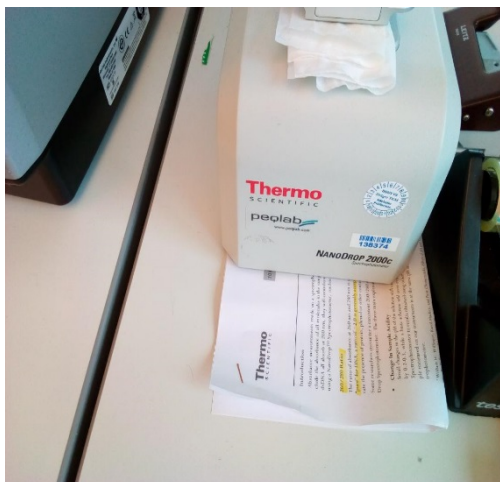


Courbe d'étalonnage des alcaloïdes

Annexe 4 : Récapitulatif des systèmes d'éluion lors de la chromatographie sous colonne

N° de la fraction	Système d'elution						
	Chloroforme	Acetate d'ethyle	Méthanol	N° de la fraction	Chloroforme	Acetate d'ethyle	Méthanol
1	100	0	/	21	50	50	/
2	95	5	/	22	50	50	/
3	90	10	/	23	30	70	/
4	90	10	/	24	30	70	/
5	90	10	/	25	30	70	/
6	80	20	/	26	30	70	/
7	80	20	/	27	20	80	/
8	80	20	/	28	20	80	/
9	80	20	/	29	20	80	/
10	80	20	/	30	10	90	/
11	70	30	/	31	10	90	/
12	70	30	/	32	0	100	/
13	70	30	/	33	0	100	/
14	70	30	/	34	/	80	20
15	70	30	/	35	/	80	20
16	60	40	/	36	/	80	20
17	60	40	/	37	/	50	50
18	60	40	/	38	/	50	50
19	50	50	/	39	/	0	100
20	50	50	/	40	/	0	100

Annexe 5. Photos de quelques appareillages utilisé pour la PCR



Nano drop



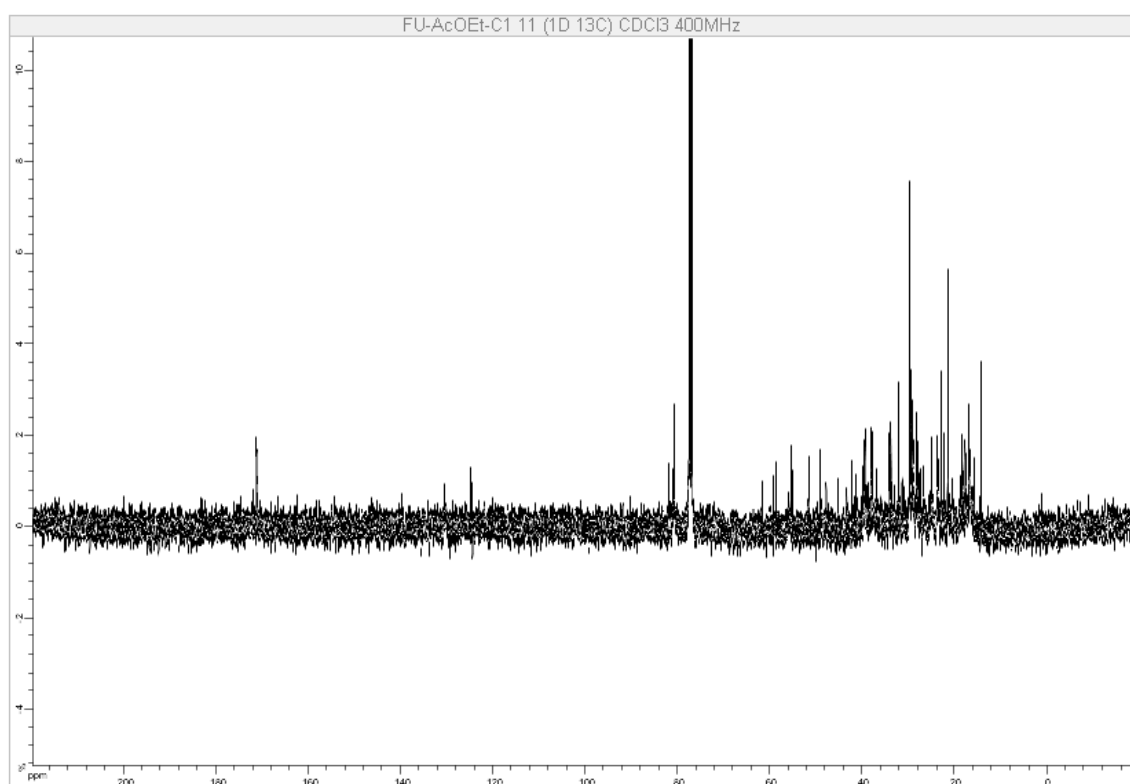
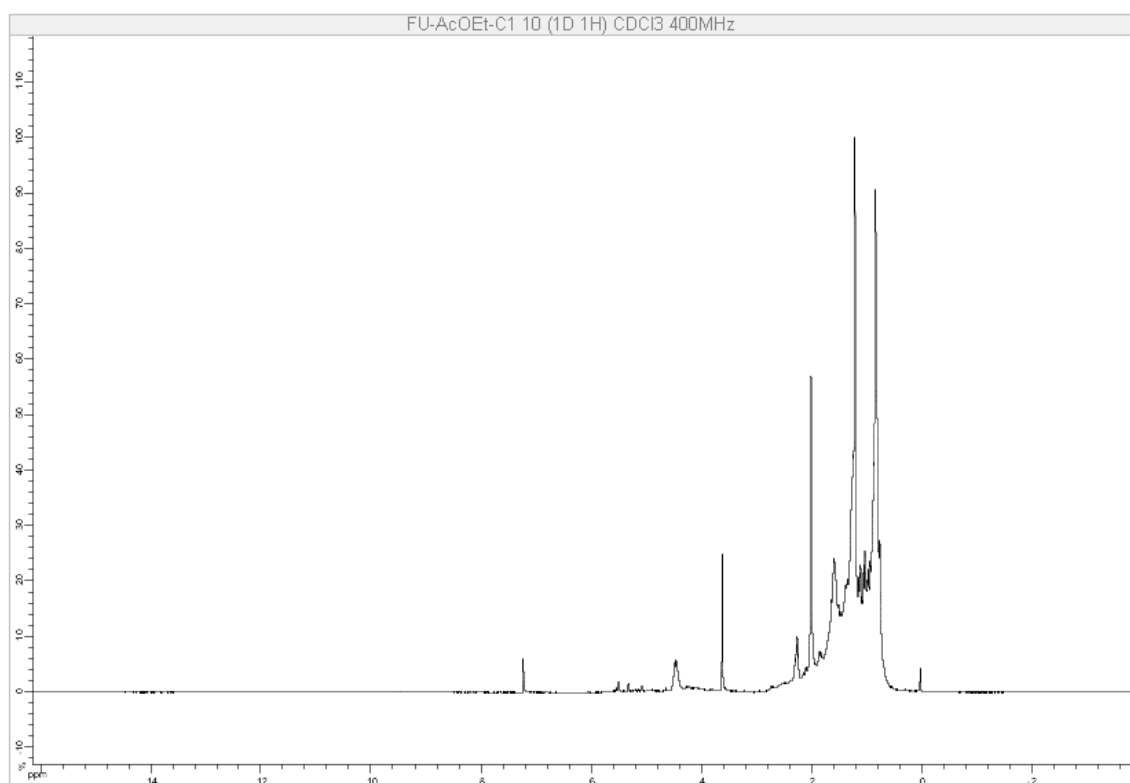
Mini centrifugeuse

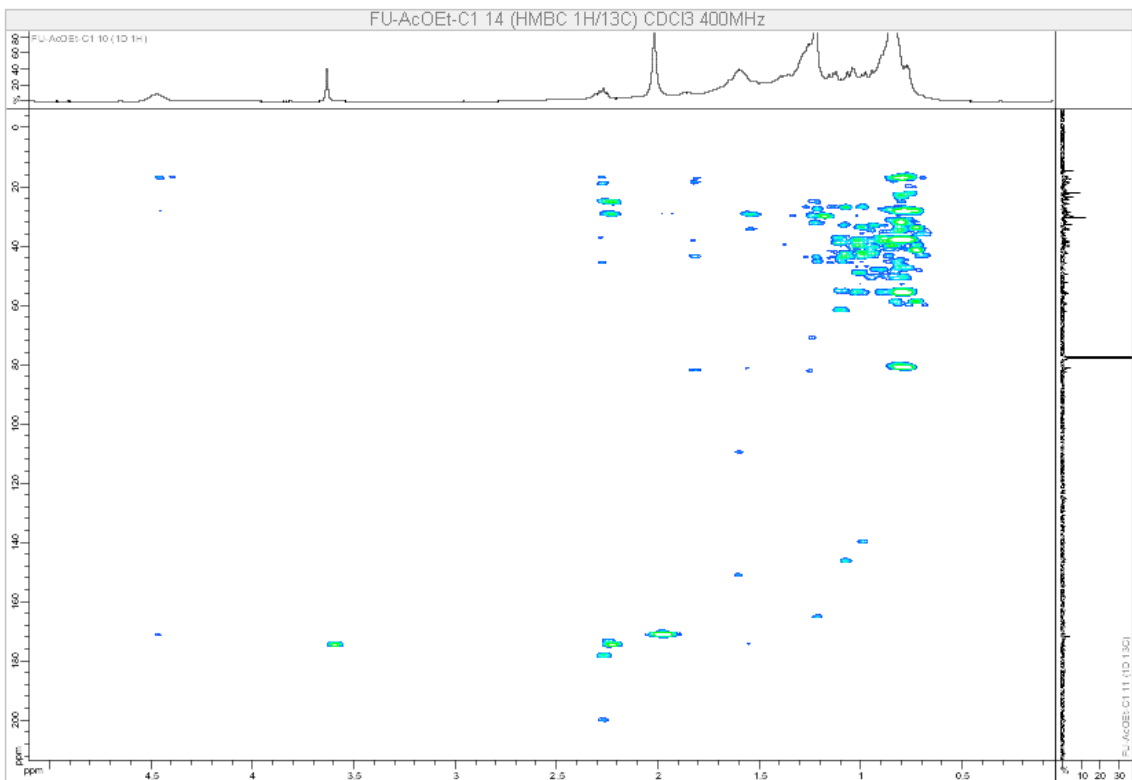
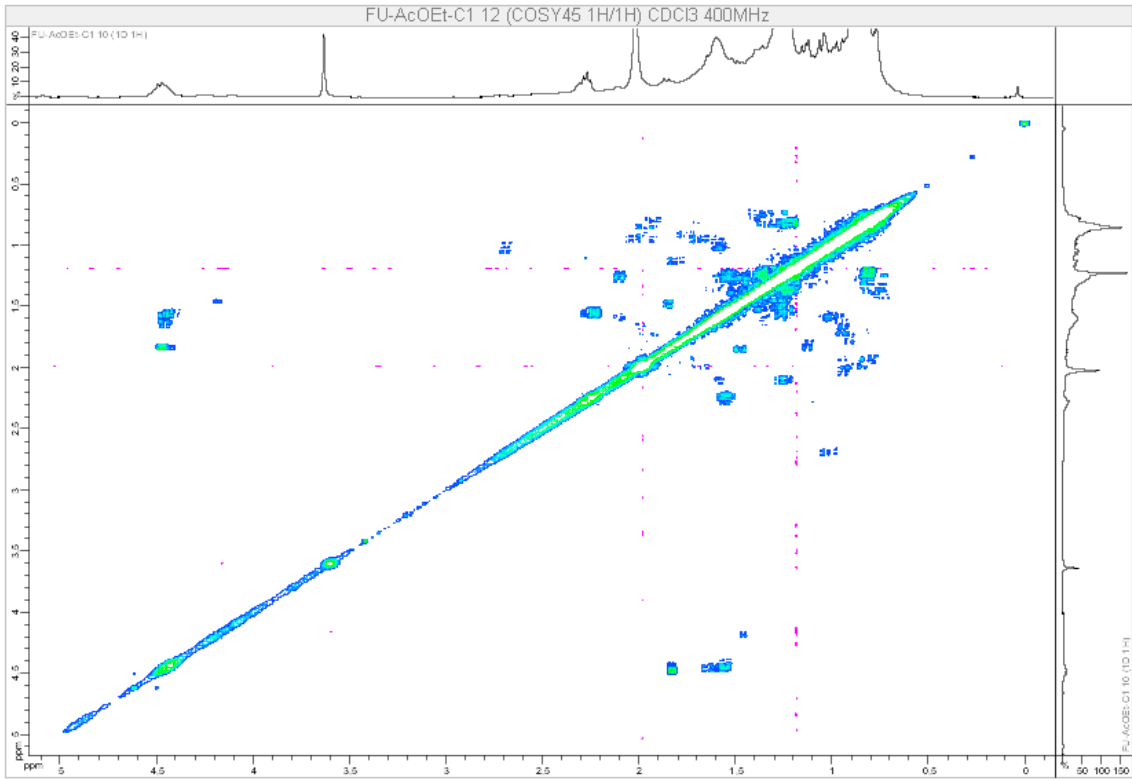


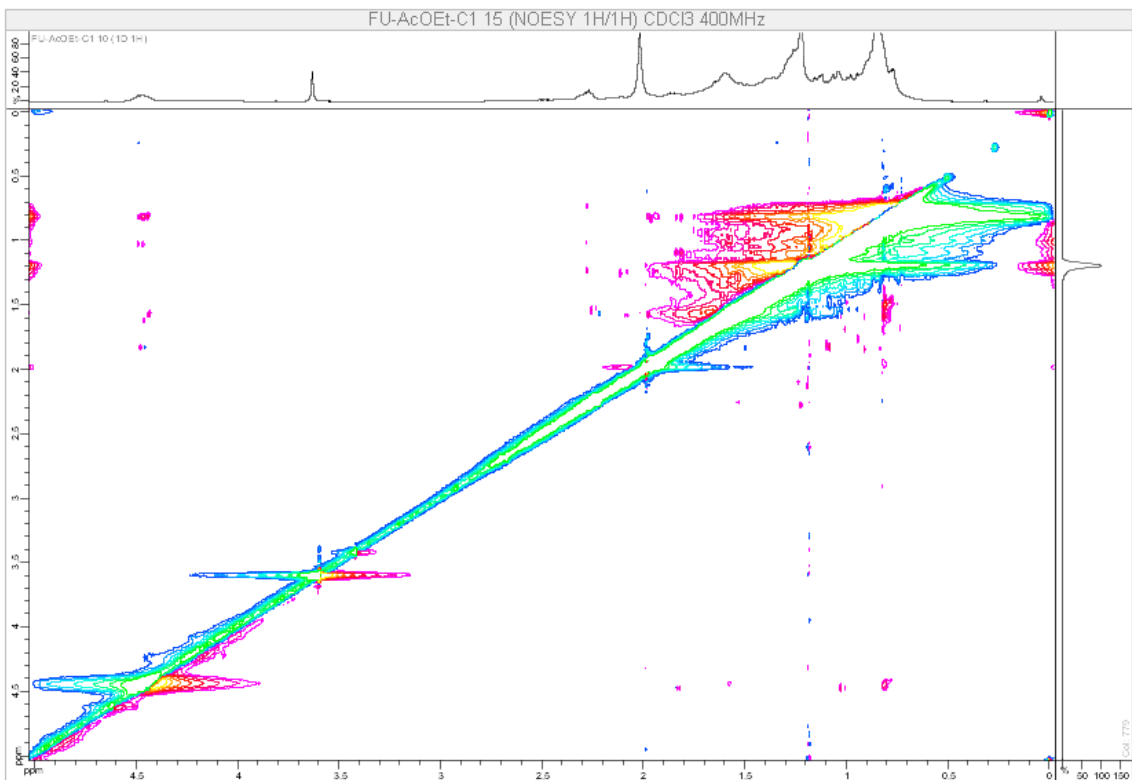
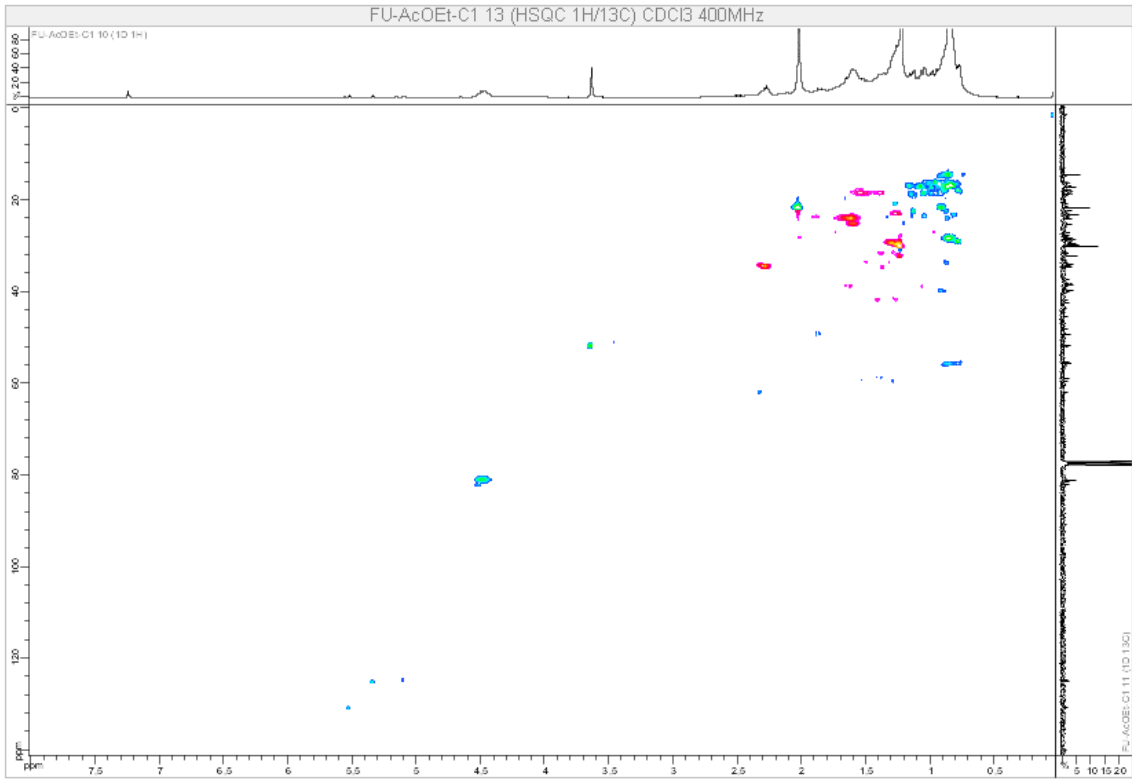
Mini centrifugeuse

Annexe 6 : spectres R MN des composés isolés

- FU-AcEtOH-F1

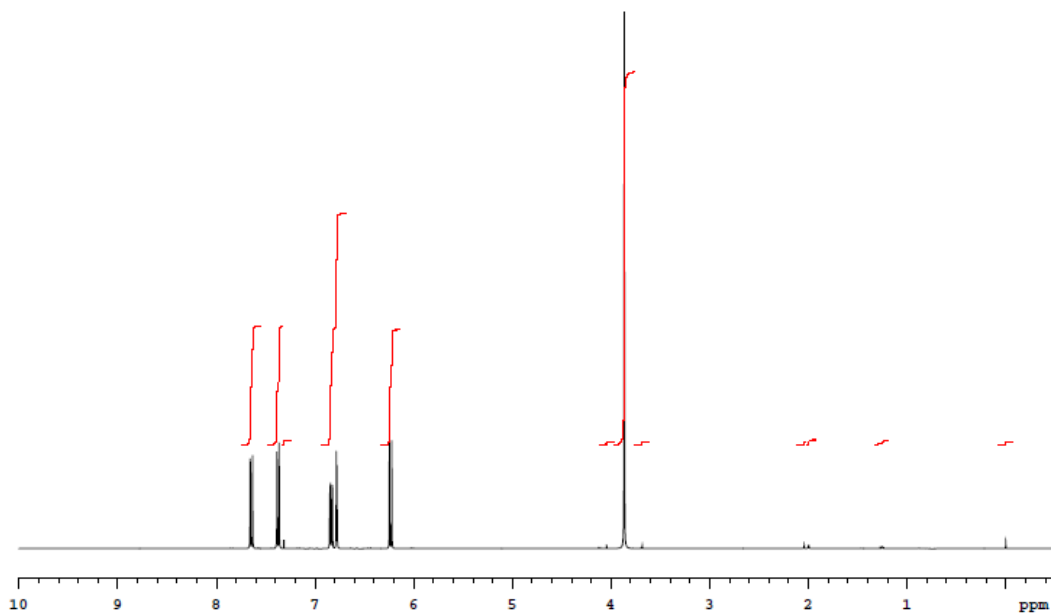




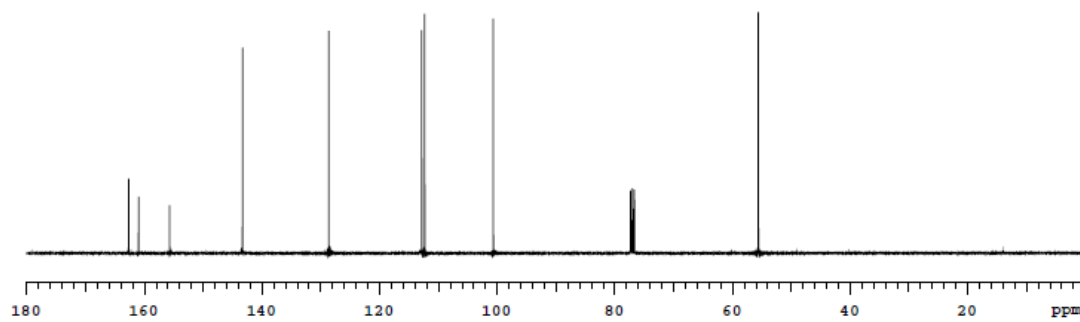


- FU-ACEtOH-F2

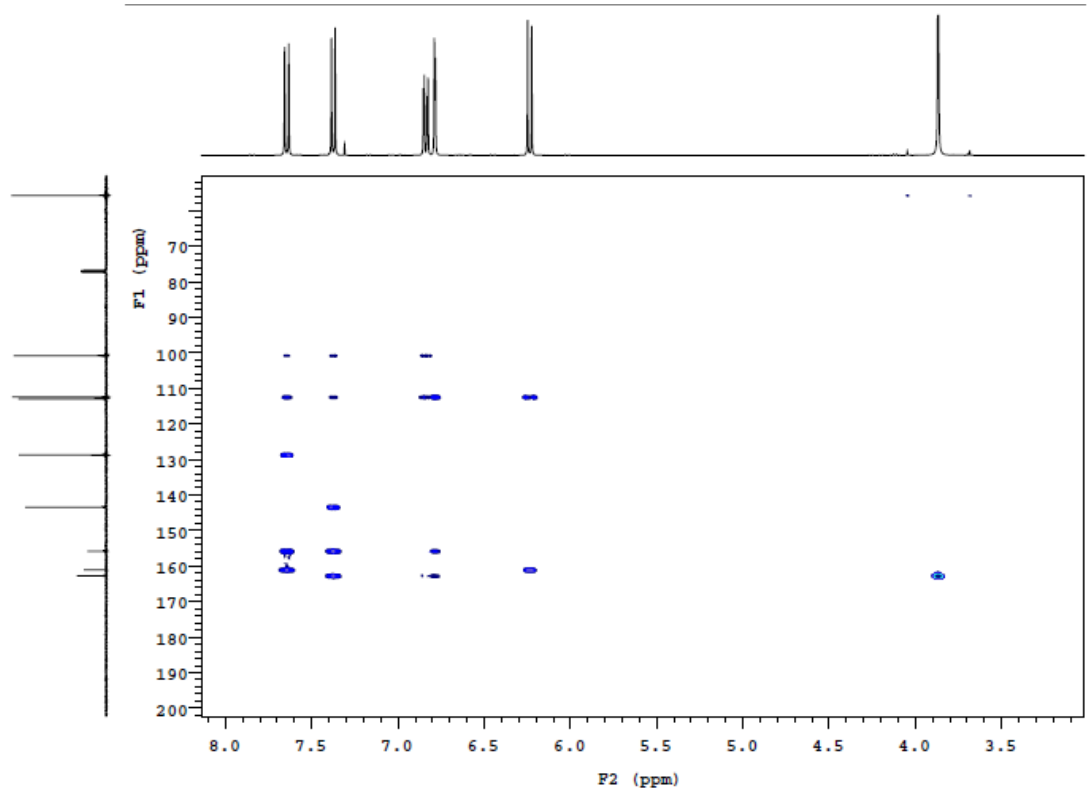
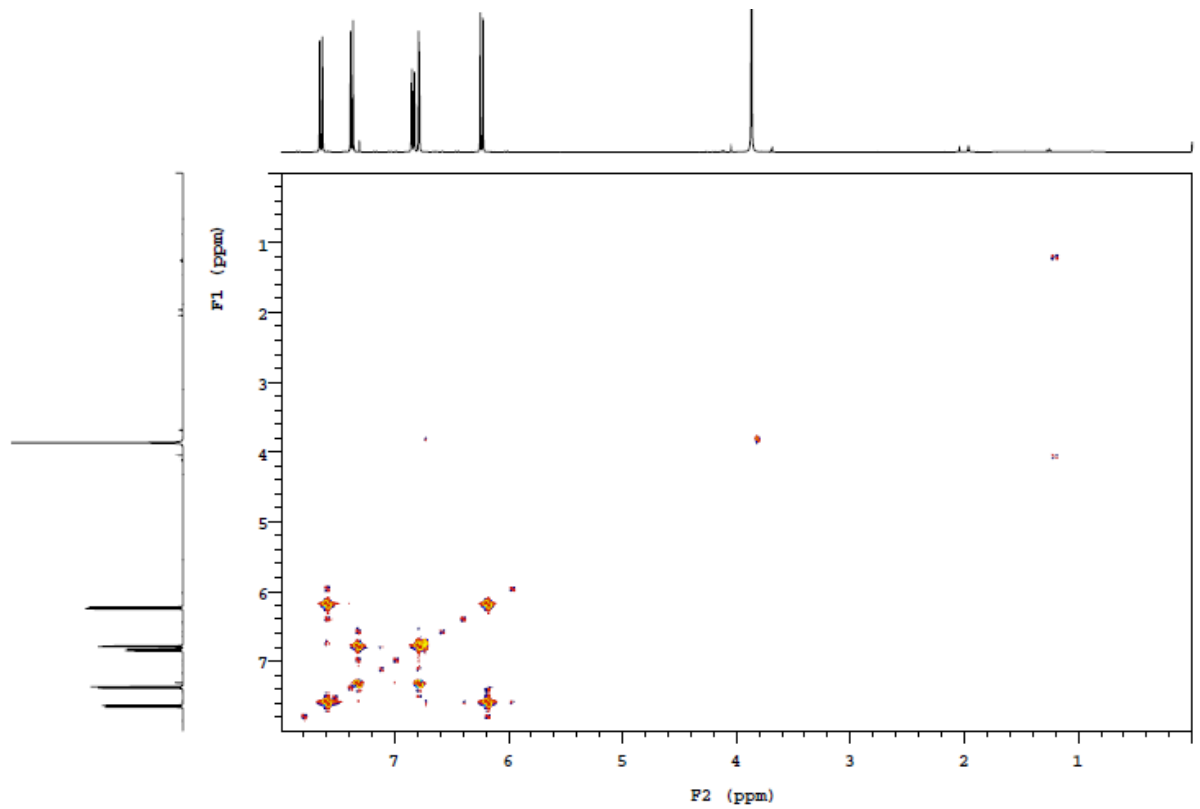
OXA018/CDCl3/1H
Fri Mar 23 09:20 2018
duration: 0h 2min
exp3 PROTON

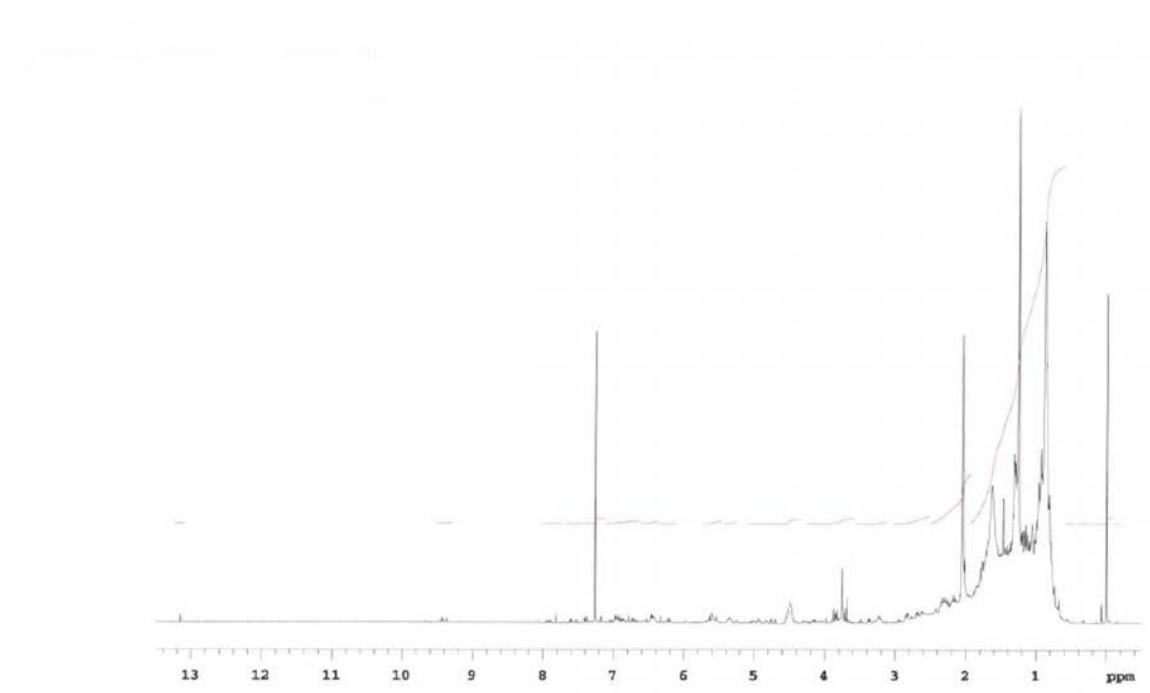


Plotname: OXA018_PROTON_01_plot01

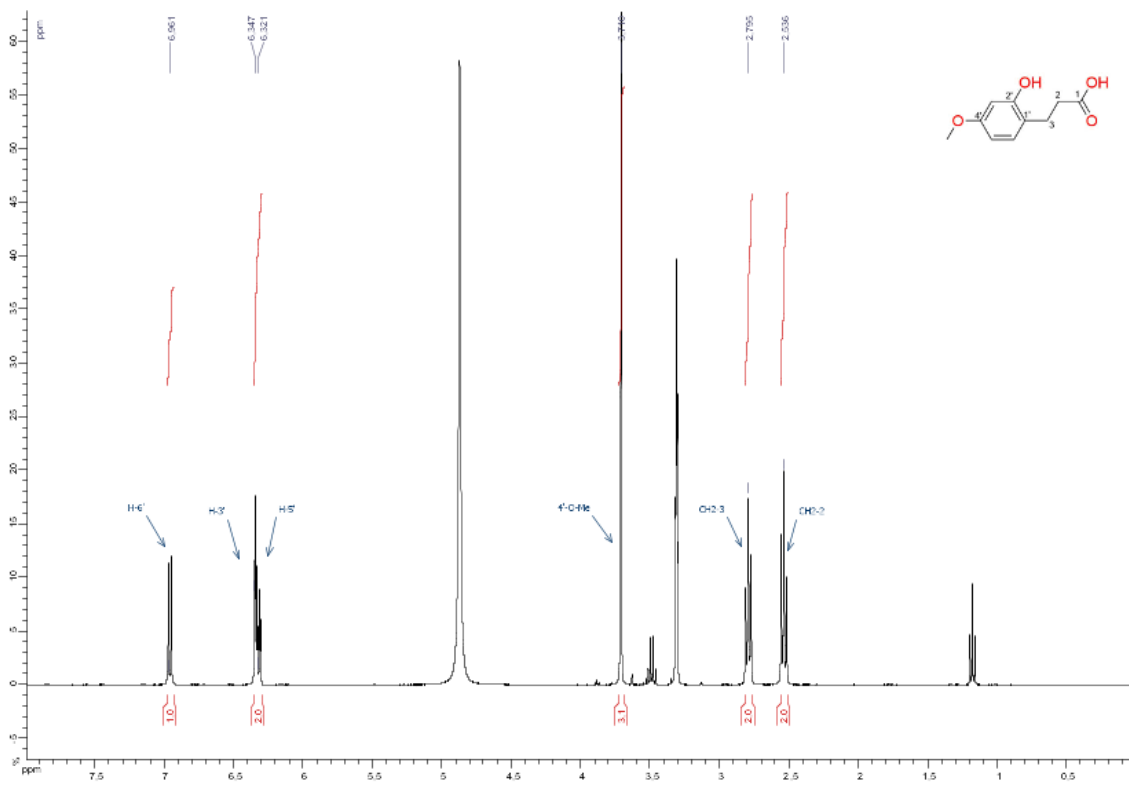


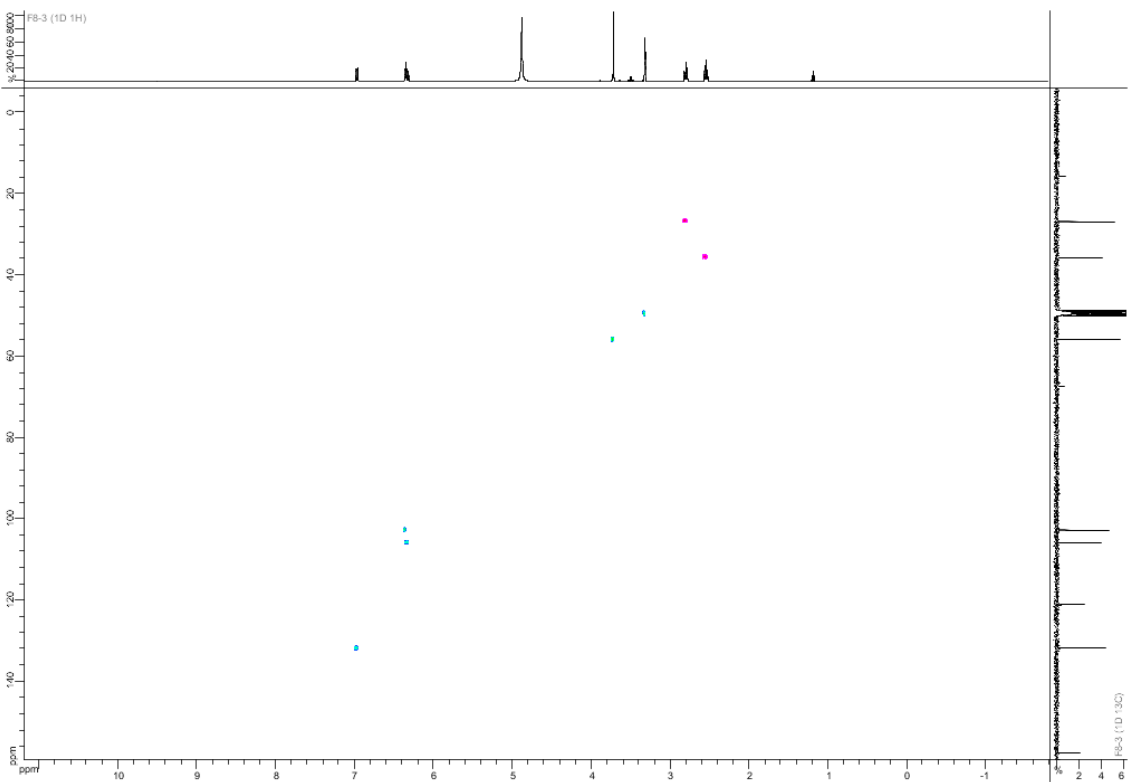
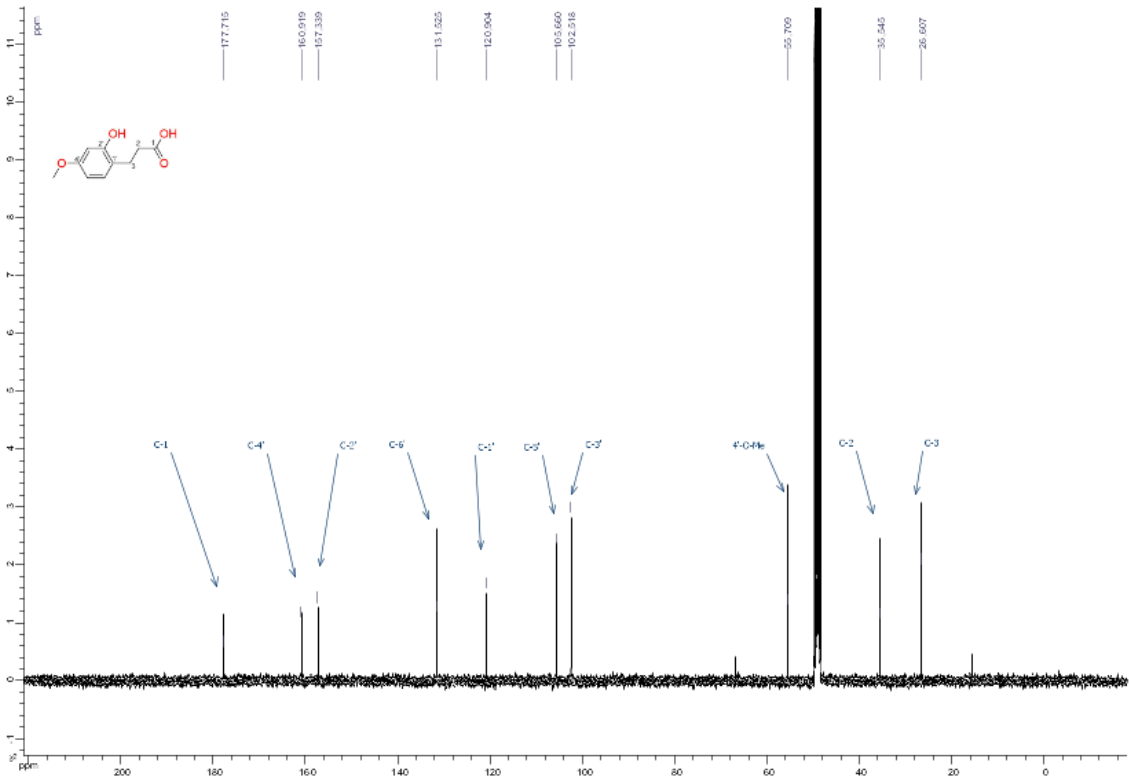
Plotname: OXA018_CARBON_01_plot01

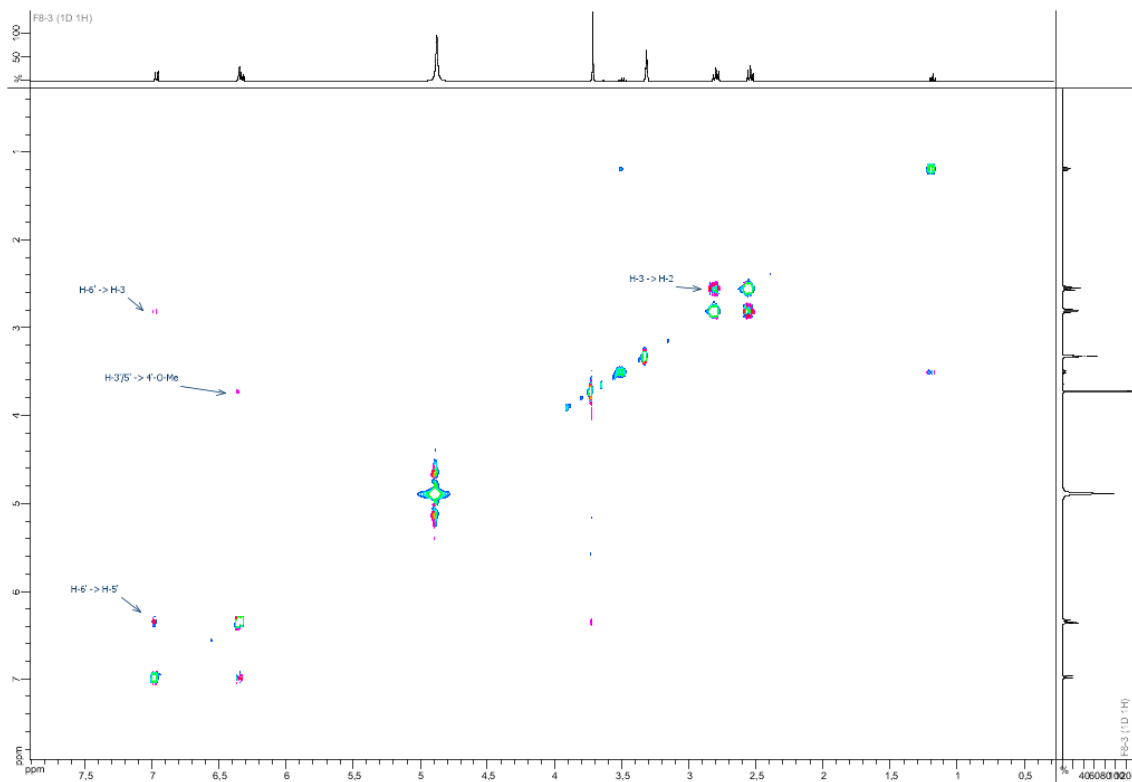
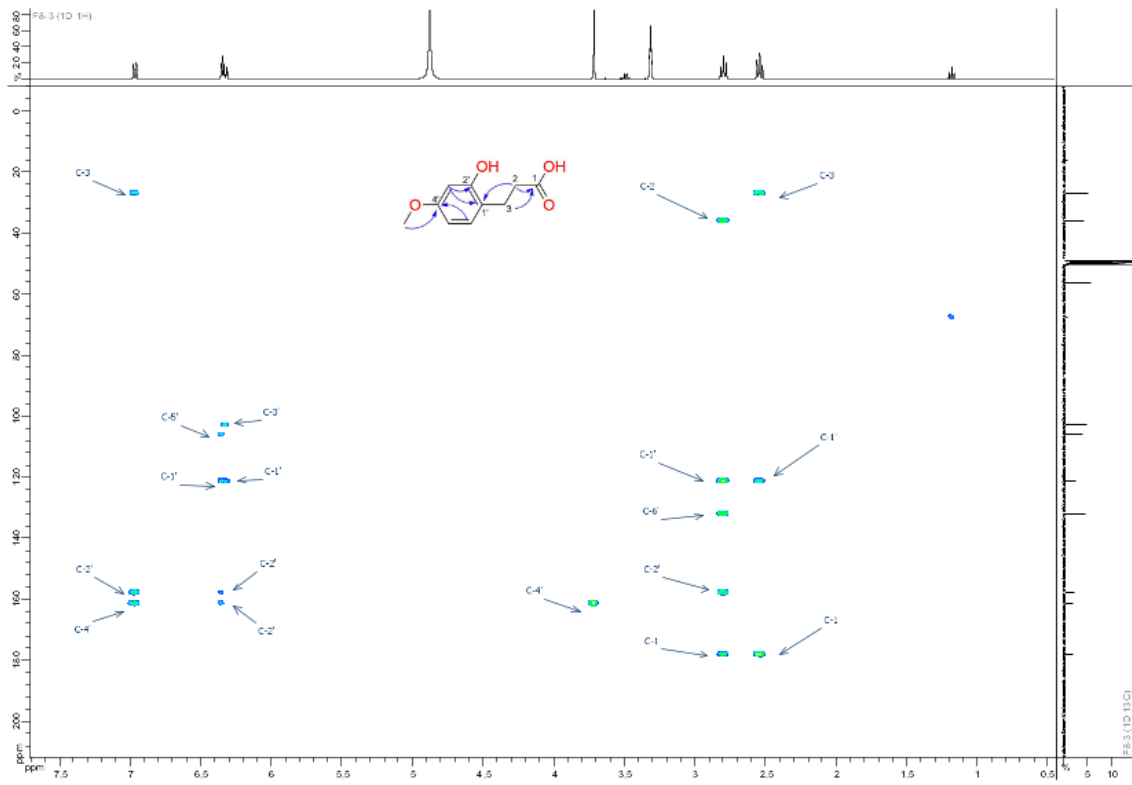




- FU-ACEtOH-C3







PUBLICATION ISSUE DE LA THÈSE

