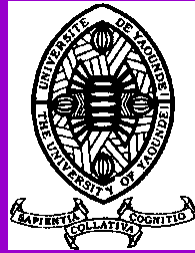


UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET
DE FORMATION DOCTORALE
EN SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE EN
SCIENCE DE LA VIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING SCHOOL FOR LIFE
SCIENCE-HEALTH AND
ENVIRONMENT

DOCTORATE TRAINING UNIT OF
LIFE SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE

LABORATORY OF ANIMAL PHYSIOLOGY

**Effets anticancéreux de l'extrait aqueux des
écorces de *Anthonotha macrophylla* P. Beauv
(Caesalpinaceae) : études *in vitro* et *in vivo***

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/Ph.D. en

Biologie des Organismes Animaux

Option : Physiologie Animale

Par

NANBO GUEYO Telesphore

Master-ès Sciences en Biologie des Organismes Animaux

Option : Physiologie Animale

Matricule : 08Q0677



Défendue publiquement le 15 Septembre 2023, devant un jury composé ainsi qu'il suit :

Président : M. DIMO Théophile, Professeur, Université de Yaoundé I ;

Rapporteur : M. NJAMEN Dieudonné, Professeur, Université de Yaoundé I ;

Membres : M. DONGMO Alain Bertrand, Professeur, Université de Douala ;

M. DZEUFIET DJOMENI Paul, Professeur, Université de Yaoundé I ;

M. ZINGUE Stéphane, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.

Année 2023

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTE DES SCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, membres du jury de la soutenance de thèse de Doctorat/Ph.D en **Biologie des Organismes Animaux**, Option : **Physiologie Animale**, de Monsieur **NANBO GUEYO Telesphore**, matricule **08QO677**, soutenance autorisée par la correspondance N° 2023-00128/UY1/VREPDTIC/DAAC/DEPE/SPD/SPDA/CB-nsr de Monsieur le recteur de l'Université de Yaoundé I en date du 17 juillet 2023 sur le sujet intitulé : « Effets anticancéreux de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonothena macrophylla* P. Beauv (Caesalpinaceae) : études *in vitro* et *in vivo* », attestons que les corrections exigées au candidat lors de cette évaluation, qui a eu lieu le vendredi 15 septembre 2023 dans la salle S01/S02 de la Faculté des Sciences, ont réellement été effectuées.

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

21 DEC 2023

Fait à Yaoundé, le

L'Examineur

Le Président du jury

Le chef de Département



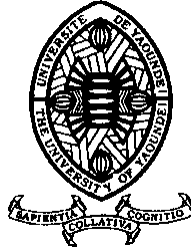
Charles Félix Bilong Bilong
Professeur

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET
DE FORMATION DOCTORALE
EN SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE EN
SCIENCE DE LA VIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING SCHOOL FOR LIFE
SCIENCE-HEALTH AND
ENVIRONMENT

DOCTORATE TRAINING UNIT OF
LIFE SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE

LABORATORY OF ANIMAL PHYSIOLOGY

**Effets anticancéreux de l'extrait aqueux des
écorces de *Anthonotha macrophylla* P. Beauv
(Caesalpinaceae) : études *in vitro* et *in vivo***

THESE

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

Biologie des Organismes Animaux

Option : **Physiologie Animale**

Par

NANBO GUEYO Telesphore

Master-ès Sciences en Biologie des Organismes Animaux

Option : **Physiologie Animale**

Matricule : **08Q0677**

Défendue publiquement le 15 Septembre 2023, devant un jury composé ainsi qu'il suit :

Président : M. DIMO Théophile, Professeur, Université de Yaoundé I ;


Rapporteur : M. NJAMEN Dieudonné, Professeur, Université de Yaoundé I ;

Membres : M. DONGMO Alain Bertrand, Professeur, Université de Douala ;

M. DZEUFIET DJOMENI Paul, Professeur, Université de Yaoundé I ;

M. ZINGUE Stéphane, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.

Année 2023

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 2022/2023
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 31 MAI 2023

ADMINISTRATION

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

VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

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

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (43)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11.	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
15.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
16.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
18.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
19.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
20.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UD's</i>
21.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
22.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste

23.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
-----	-----------------------------	-----------------------	----------

24.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
25.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
26.	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
27.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
31.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
32.	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
34.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35.	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
36.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

37.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
38.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
39.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
40.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Assistant	En Poste
41.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
42.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistant	En poste
43.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (52)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>

14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
-----	-----------------------------	------------	----------

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
22.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
23.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
24.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
25.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
26.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUNSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGO Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
42.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
43.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
44.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
45.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
46.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
47.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
48.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

49.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
50.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
51.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
52.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (34)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
12.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	En poste
13.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
14.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
16.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

19.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
20.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
21.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
22.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
25.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
26.	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
27.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
28.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
29.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
30.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
31.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
32.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
33.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
34.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste

3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen FS Univ.Ngaoundere</i>
6.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
15.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
16.	NJOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
17.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
18.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
19.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
20.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
21.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
22.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste

23.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
24.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
25.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
26.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
27.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
28.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (37)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13.	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste

14	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
15	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
16	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
17	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
18	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
19	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
24	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

25	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
26	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
27	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
28	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
34	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
36	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
37	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général/ MINESUP</i>

3.	NDOUNAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOUE HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste

12	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
15	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
16	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
17	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur ENSET Ebolowa</i>
18	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

19	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
22	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	-----------------------	------------	----------------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
17.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
19.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
20.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
21.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
22.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
23.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste

24.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
25.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
26.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste

27.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
30.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
31.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
32.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste
33.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>

3.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
4.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
5.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

10	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
11	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
12	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
13	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste
14	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
15	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
16	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
17	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

18	NKOUÉ TONG Abraham	Assistant	En poste
19	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistant	En poste
20	EZO'O MENGO Fabrice Télésfor	Assistant	En poste
21	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23	NGOUE NAM Romial Joël	Assistant	En poste
24	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	HONA Jacques	Professeur	En poste
6.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
9.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16.	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18.	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19.	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>
30.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférence	<i>En stage depuis février 2023</i>
31.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
32.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
33.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
34.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
35.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
36.	FOUEJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>

37.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
38.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	Directeur Unité de production des réactifs/IMPM
40.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
43.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA /UDs</i>
2.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
7.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
8.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

9.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
11.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
12.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. d'Etat/MINMIDT</i>
14.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
15.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i>
16.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste
17.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
19.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
20.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
21.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
23.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
25.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

26.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
27.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste

29.	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
31.	MBESSE Cécile Olive	Chargée de Cours	En poste
32.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef Serv./Uté Maroua</i>
34.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
37.	TCHAPCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
40.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

41.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
43.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	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	8 (01)	15 (11)	13 (03)	7 (05)	43 (20)
BPA	14 (01)	16 (09)	18 (04)	4 (02)	52 (16)
BPV	6 (01)	12 (02)	13 (07)	3 (00)	34 (10)
CI	7 (01)	15 (04)	5 (01)	1 (00)	28 (06)
CO	6 (01)	18 (04)	11 (04)	2 (00)	37 (09)
IN	2 (00)	2 (00)	14 (01)	4 (00)	22 (01)
MAT	1 (00)	8 (00)	17 (01)	7 (02)	33 (03)
MIB	2 (01)	7 (03)	8 (04)	7 (02)	24 (10)
PHY	15 (01)	15 (04)	11 (01)	2 (00)	43 (06)
ST	8 (00)	17 (03)	15 (04)	3 (01)	43 (08)
Total	69 (07)	125 (40)	125 (30)	40 (12)	359 (89)

Soit un total de **359 (89)** dont :

- Professeurs **69 (07)**
- Maîtres de Conférences **125 (40)**
- Chargés de Cours **125 (30)**
- Assistants **40 (12)**

() = Nombre de Femmes

89

DEDICACE

*A mes parents M. et Mme Gueyo,
pour tous les sacrifices consentis
pour mon éducation.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier profondément tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Particulièrement :

- **Pr NJAMEN Dieudonné** (Université de Yaoundé I, Cameroun), Directeur de cette thèse, de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et de n'avoir ménagé aucun effort pour la réalisation de ce travail. Je le remercie pour sa rigueur scientifique, sa persévérance et son dynamisme. Je tiens ainsi à lui exprimer toute ma gratitude ;

- **Pr MVONDO Marie Alfrede** (Université de Dschang, Cameroun) de m'avoir proposé ce sujet et pour les corrections apportées au présent document ;

- **Pr ZINGUE Stéphane** (Université de Yaoundé I, Cameroun), pour avoir ménagé du temps pour me suivre sur toutes les lignes dans l'élaboration de ce travail. Merci pour toutes ces connaissances en cancérologie transmises et sa contribution dans la réalisation des tests *in vitro* au Brésil et en Allemagne;

- **Pr DJIOGUE Séfirin** (Université de Yaoundé I, Cameroun), pour ses encouragements, ses discussions scientifiques qui m'ont permis d'améliorer mes travaux de recherche ;

- **Pr PIEME Constant Anatole** (Université de Yaoundé I, Cameroun) pour sa disponibilité et assistance matériel et technique dans la réalisation des tests biochimiques ;

- **Pr NJIOKOU Flobert et Pr FOKOU Elie** (Université de Yaoundé I, Cameroun), pour leur assistance matérielle ;

- **Dr ESSONO Damien Marie**, botaniste systématicien microbiologiste (Université de Yaoundé I, Cameroun), pour sa disponibilité et pour l'aide apportée lors de la récolte de la plante à Yato (Région du Littoral du Cameroun) ;

- **Dr AWOUNFACK Charline Florence** (Université de Yaoundé I, Cameroun), pour sa contribution dans la réalisation de la partie phytochimique (GC-MS) en Afrique du Sud ;

- **Dr ATEBA Sylvain Benjamin** (Université de Douala, Cameroun), **Dr TCHOUPANG NANA Edwige** (Université de Buea, Cameroun), **Dr ZEMO GAMO Franklin**, **Dr SILIHE KAMGANG Kevine**, **Dr SIMO Rudy Valdès**, **Dr MAPTOUOM FOTSO Christiane Laure**, **Dr SIPPING KEMEGNE Marius** et **Dr DJIKEM TADAH Rudig Nikanor** (Université de Yaoundé I, Cameroun), membres de l'équipe de recherche du Pr. NJAMEN. Merci pour votre soutien moral, encadrement et interventions critiques qui ont permis d'améliorer ces travaux de recherche ;

- **Mesdames TOUOMO SANKOCK Aude Jaelle**, **MOTOUM TEDJO Florette**, **BAKAM YENGWA Berlise** et **NDJENGUE MINDANG Elisabeth Louise**, et **Messieurs RIEPOUO**

MOUCHILI Oumarou, GUERNANG NGITEDEM Steve, BIKOI BIKOI René James, TCHATCHOU Jules, (Université de Yaoundé I, Cameroun), **MBE FOGANG Robinson Charly** (Université de Maroua, Cameroun), collègues de laboratoire et membres de l'équipe de recherche du Pr. NJAMEN. Merci pour votre assistance multiforme dans la réalisation de ces travaux de recherche ;

- **M. TAKALA Jean Pierre**, (Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Cameroun), pour sa participation dans la réalisation de la partie histologie de cette thèse.

- **M. NDANGA Thomas** (Institut Médicale et d'études des Plantes Médicinales, Yaoundé, Cameroun), pour son aide apportée au cours de la lyophilisation de l'extrait ;

- **Enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales**, (Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, Cameroun), précisément de l'option Physiologie Animale pour leur encadrement et les connaissances transmises ;

- **Mes frères BIAMY GUEYO Patrick, NDONKE GUEYO Sylvain et BATONYO GUEYO Joël**, pour leurs encouragements et leur soutien moral ;

- **Membres de l'« Association de la Promotion Solidarité »**, pour le soutien moral et la solidarité qui sont de rigueur dans ce groupe.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	xviii
LISTE DES FIGURES.....	xx
LISTE DES TABLEAUX.....	xxiii
RESUME.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxvi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
I.1 Cancer.....	6
I.1.1 Définition et historique du cancer.....	6
I.1.2 Cancer dans le monde.....	6
I.2 Cancer du sein.....	8
I.2.1 Anatomie du sein.....	8
I.2.2 Processus de la cancérogenèse mammaire.....	11
I.2.3 Epidémiologie du cancer du sein.....	14
I.2.4 Classifications histologiques et moléculaires du cancer de sein.....	14
I.2.5 Symptômes du cancer du sein.....	16
I.2.6 Techniques de diagnostic du cancer du sein.....	16
I.2.7 Facteurs de risque.....	17
I.2.8 Œstrogènes et cancer du sein.....	19
I.2.9 Implication du stress dans le développement du cancer du sein.....	26
I.2.10 Modèles de cancérogenèse mammaire.....	27
I.2.11 Prévention et traitement du cancer du sein.....	31
I.3 Plante : <i>Anthonotha macrophylla</i> P.Beauv.....	35
I.3.1 Taxonomie.....	35
I.3. 2 Caractéristiques botaniques.....	36
I.3.3 Synonymes et noms vernaculaires.....	37
I.3.4 Répartition géographique et usages traditionnels.....	37
I.3.5 Etudes scientifiques antérieures.....	38
I.4 Techniques chromatographiques	39
I.4.1 Chromatographie Liquide à Haute Performance	39
I.4.2 Chromatographie Liquide à Moyenne Pression	39

I.4.3 Chromatographie par Centrifugation de Partage	39
I.4.4 Chromatographie Liquide ou Gazeuse couplée à la Spectroscopie de masse.....	40
I.5 Cytotoxicité.....	40
I.5.1 Méthodes colorimétriques.....	40
I.5.2 Méthodes fluorométriques.....	41
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	42
II.1 Matériel.....	43
II.1.1 Matériel végétal.....	43
II.1.2 Lignées cellulaires.....	43
II.1.3 Animaux.....	43
II.1.4 Substances pharmacologiques et réactifs.....	44
II.2 Méthodes.....	44
II.2.1 Préparation de l'extrait aqueux des écorces de <i>Anthonotha macrophylla</i>	44
II.2.2 Détermination des doses à administrer aux animaux expérimentaux.....	45
II.2.3 Evaluation des effets chimiopréventifs de l'extrait aqueux de <i>Anthonotha macrophylla</i> sur le cancer du sein induit par le DMBA.....	45
II.2.4 Détermination des modes et mécanismes d'action de l'extrait aqueux de <i>Anthonotha</i> <i>macrophylla</i>	48
II.2.5 Evaluation de la toxicité orale aiguë de l'extrait aqueux de <i>Anthonotha macrophylla</i>	59
II.2.6 Préparation de l'homogénat de la glande mammaire.....	60
II.2.7 Histologie.....	60
II.2.8 Analyse hématologique.....	62
II. 2.9 Analyses sériques.....	63
II.2.10 Protocoles de dosages des paramètres du stress oxydant.....	66
II.2.11 Protocoles de dosages de groupes de composés phytochimiques.....	71
II.2.12 Analyse microscopique et expression des résultats.....	73
II.2.13 Analyse statistique.....	74
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	75
III.1 Résultats.....	76
III.1.1 Effets chimiopréventifs de l'extrait aqueux de <i>Anthonotha macrophylla</i> sur le cancer du sein induit par le DMBA	76
III.1.2 Modes et mécanismes d'action de l'extrait aqueux de <i>Anthonotha macrophylla</i>	94

III.1.3 Toxicité orale aigüe de l'extrait aqueux de <i>Anthonotha macrophylla</i>	107
III.2 Discussion	109
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	120
REFERENCES	122
ANNEXE	I
PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE	X

LISTE DES ABREVIATIONS

- 4T1:** “4-thioguanine resistant cell line”
- ABTS:** Acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- A. macrophylla:*** *Anthonotha macrophylla*
- BRCA:** “Breast Cancer”
- CC₅₀:** “Cytotoxic concentration”
- CDK:** “Cyclin-dependent kinase”
- c-myc:** “cellular myelocytomatosis”
- CYP:** Cytochrome P450
- DL50:** Dose létale 50
- DMBA:** 7,12- diméthylbenz(a)anthracène
- DMEM:** “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
- DMSO:** Diméthylsulfoxyde
- DPPH:** 1,1-diphényl-2-picrilhydrazyl
- E2V:** œstradiol valérate
- EDTA:** Ethylène Diamine TetraAcétate
- EGF:** “Epidermal Growth Factor”
- FRAP:** “Ferric Reducing Antioxydant Power”
- GSH:** Glutathion réduit
- HDL:** “High density lipoprotein”
- Her2:** “human epidermal growth factor receptor 2”
- HMEC:** “Human mammary epithelial cell”
- HUVEC:** “Human umbilical vein endothelial cell”
- IGF:** “Insulin like Growth Factor”
- IRM:** Imagerie à Résonance Magnétique
- MAPKs:** “Mitogen Activated Protein Kinase”
- MCF-7:** “Michigan Cancer Foundation-7”
- MCR-5:** “Medical research council cell strain-5”
- MDA:** Malondialdéhyde
- MDA-MB-231:** “M.D. Anderson and Metastasis Breast cancer- 231”
- MMPs:** Métalloprotéases Matricielles

MSRO: Modulateur Sélectif des Récepteurs aux Œstrogènes

PC: Poids Corporel

PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

POMC: Pro-opiomélanocortine

pRB : protéine du rétinoblastome

RE: Récepteurs des œstrogènes

RL: Radicaux libres

RP: Récepteurs de la progestérone

RPMI: “Roswell Park Memorial Institute”

SK-MEL-28: “Skin melanoma-28”

SRB: Sulforhodamine-B

Src: “Sarcoma virus tyrosine kinase”

Tamox : Tamoxifène

T-Chol: “Total Cholesterol”

TGF- α : “Transforming Growth Factor α ”

VEGFR: “Vascular endothelial growth factor receptor”

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Incidence et mortalité du cancer dans le monde.....	7
Figure 2: Description anatomique du sein.....	9
Figure 3 : Evolution de l'architecture de la glande mammaire.....	11
Figure 4: Cascade d'évolution métastatique du cancer du carcinome canalaire <i>in situ</i> devenant un carcinome canalaire infiltrant.....	14
Figure 5: Structures chimiques des œstrogènes.....	20
Figure 6: Structures, régions fonctionnelles et pourcentages d'homologies des séquences des récepteurs des œstrogènes α et β	21
Figure 7: Représentation simplifiée de la répartition des récepteurs des œstrogènes α et β dans le corps.....	22
Figure 8: Différentes voies de signalisation des œstrogènes.....	23
Figure 9: Rôle des œstrogènes dans la cancérogenèse mammaire	25
Figure 10: Implication de l'œstradiol dans la progression du cycle cellulaire dans les cellules du sein.....	26
Figure 11: Déséquilibre de l'homéostasie rédox des cellules cancéreuses.....	27
Figure 12: Photographie de <i>Anthothona macrophylla</i>	36
Figure 13: Protocole de préparation de l'extrait aqueux de <i>A. macrophylla</i>	45
Figure 14: Protocole d'évaluation des effets chimioprotecteurs de l'extrait aqueux de <i>A. macrophylla</i> sur les tumeurs mammaires	47
Figure 15: Milieux de cultures des cellules tumorales et non tumorales.....	48
Figure 16: Protocole du test de viabilité cellulaire AlamarBlue.....	50
Figure 17: Protocole d'évaluation des effets œstrogéniques et antiœstrogéniques <i>in vitro</i>	57
Figure 18: Protocole d'évaluation des effets antiœstrogéniques de l'extrait aqueux de <i>A. macrophylla in vivo</i>	58
Figure 19: Protocole d'évaluation de la toxicité orale aiguë de l'extrait aqueux de <i>Anthothona macrophylla</i>	60
Figure 20: Effets de <i>A. macrophylla</i> sur la masse corporelle des animaux.....	76
Figure 21: Effets de <i>A. macrophylla</i> sur le volume et la masse moyenne des Tumeurs mammaires.....	79
Figure 22: Effets de l'extrait aqueux de <i>A. macrophylla</i> sur les glandes mammaires après 28 semaines de traitement.....	81
Figure 23: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur les taux de GSH et de MDA et l'activité de FRAP dans les glandes mammaires.....	82

Figure 24: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur l'utérus. Représentations graphiques des tailles des épithélia utérin et microarchitectures (H&E, 400X) de l'utérus après 28 semaines de traitement.....	84
Figure 25: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur le vagin. Représentation graphique des tailles des épithélia vaginaux et microarchitectures (H&E, 400X) du vagin après 28 semaines de traitement.....	85
Figure 26: Microarchitectures (H&E, 400X) du foie après 28 semaines de traitement.....	86
Figure 27: Microarchitectures (H&E, 400X) des poumons après 28 semaines de traitement.....	87
Figure 28: Microarchitectures (H&E, 400X) du cerveau après 28 semaines de traitement....	87
Figure 29: Microarchitectures (H&E, 400X) du fémur après 28 semaines de traitement.....	88
Figure 30 : Microarchitectures (H&E, 400X) des reins après 28 semaines de traitement.....	89
Figure 31: Croissance des cellules cancéreuses mammaires humaines (MDA-MB 231 et MCF-7), de rongeur (4T-1) et des cellules normales mammaires (HMEC) en présence ou non de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> pendant 24 h, 48 h et 72 h....	96
Figure 32: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur la prolifération des cellules MDA-MB 231 après incorporation du BrdU et sur le nombre de clones de cellules MDA-MB 231 formés après 24 h et 48 h d'incubation.....	97
Figure 33: Type de mort cellulaire induit par l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur les cellules MDA-MB 231 après 24 h et 48 h de traitement et effets dudit extrait sur le cycle cellulaire des cellules MDA-MB 231 après 24 h et 48 h d'incubation.....	98
Figure 34: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur l'adhésion des cellules MDA-MB 231 aux composants de la matrice extracellulaire collagène et fibronectine.....	99
Figure 35: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur la migration des cellules MDA-MB 231. Microphotographies d'un test et représentation graphique des tests de cicatrisation dans la migration des cellules MDA-MB 231 après 12 et 24 h d'incubation.....	100
Figure 36: Chromatogramme de l'extrait aqueux de <i>Anthonotha macrophylla</i> enregistré par GC-MS.....	102
Figure 37 : Effets de <i>Anthonotha macrophylla</i> sur la prolifération des cellules MCF-7.....	104
Figure 38 : Représentations graphiques de la masse de l'utérus frais, de la taille de l'épithélium utérin et microphotographies (H&E, 400X) de la coupe utérine après 3 jours de traitement.....	105
Figure 39: Représentation graphique de la taille de l'épithélium vaginal et microphotographies (H&E, 400X) du tissu vaginal après 3 jours de traitement..	106

Figure 40: Effet de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* sur la glande mammaire après 3 jours de traitement.....107

Figure 41: Effets de *A. macrophylla* sur la masse corporelle des animaux et microarchitectures des coupes de foie, poumon et rein (coloration à l'hématoxyline-éosine, 250 X) chez les rates après une unique administration orale de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* à la dose de 2000 mg/kg PC.....108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Noms vernaculaires de <i>Anthonotha macrophylla</i>	37
Tableau II: Phytocomposés identifiés dans l'extrait méthanolique de <i>Anthonotha macrophylla</i>	38
Tableau III: Composition de l'alimentation standard de laboratoire.....	44
Tableau IV: Composition des milieux de cultures.....	49
Tableau V: Mode opératoire du dosage du cholestérol total.....	63
Tableau VI: Mode opératoire du dosage du HDL cholestérol.....	64
Tableau VII: Mode opératoire du dosage de la bilirubine.....	65
Tableau VIII: Mode opératoire du dosage de la créatinine.....	65
Tableau IX: Mode opératoire du dosage des protéines totales.....	66
Tableau X: Protocole de dosage du malondialdéhyde.....	69
Tableau XI: Etablissement de la courbe d'étalonnage du potentiel antioxydant <i>in vivo</i>	70
Tableau XII: Protocole de détermination du potentiel antioxydant <i>in vivo</i>	71
Tableau XIII: Activité chimiopréventive de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur le cancer du sein après 28 semaines de traitement.....	78
Tableau XIV: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur les masses relatives des organes après 28 semaines de traitements.....	90
Tableau XV: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur les paramètres biochimiques après 28 semaines de traitement.....	92
Tableau XVI: Effets de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> sur les paramètres hématologiques après 28 semaines de traitement.....	93
Tableau XVII: Valeurs de la CC ₅₀ de l'extrait aqueux de <i>A. macrophylla</i> sur les lignées de cellules tumorales et non tumorales.....	95
Tableau XVIII: Activités de piégeage des radicaux libres et capacité antioxydante <i>in vitro</i>	101
Tableau XIX: Analyse phytochimique quantitative.....	101
Tableau XX : Composés chimiques identifiés dans l'extrait aqueux de <i>A. macrophylla</i>	103
Tableau XXI : Masses relatives des organes après administration de l'extrait de <i>A. macrophylla</i> à la dose unique de 2000 mg/kg.....	109

RESUME

Le cancer du sein est la néoplasie maligne la plus fréquente et la première cause de mortalité par cancer chez les femmes dans le monde. Les traitements mis sur pied par la médecine moderne ont été associés à de nombreux inconvénients, d'où la nécessité de trouver des alternatives auxdits traitements. Le présent travail a été entrepris avec pour objectif d'évaluer *in vitro* et *in vivo* les effets anticancéreux de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla*. Les effets chimiopréventifs de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* ont été évalués sur un modèle de cancer du sein induit par le 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) chez la rate. L'évaluation de l'activité antioxydante a été faite par dosage des paramètres du statut du stress oxydant tels que le malondialdéhyde et le glutathion réduit et les activités antiradicalaires (DPPH et ABTS) et chélatrices de l'extrait ont également été évaluées. Une étude phytochimique quantitative et la GC-MS ont été réalisées. Les mécanismes d'action de l'extrait de *A. macrophylla* ont été déterminés à partir des tests *in vitro* à savoir : la cytotoxicité en utilisant le réactif alamar blue (résazurine) sur 5 lignées de cellules cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-231, 4T1, SF-295 et SK-MEL-28) et 2 lignées non cancéreuses (MCR-5 et HUVEC), la croissance et la prolifération cellulaire, l'inhibition de la formation de clones, l'apoptose, l'impact sur le cycle cellulaire et l'effet de l'extrait sur l'adhésion et la migration cellulaire ont été également évalués. Les effets antioestrogéniques de l'extrait de *A. macrophylla* ont été évalués grâce aux tests de prolifération des cellules MCF-7 et utéro-trophique de 3 jours respectivement. La toxicité aiguë de l'extrait a également été évaluée. Les résultats obtenus à l'issue de l'évaluation des effets chimiopréventifs ont montré que l'extrait de *A. macrophylla* aux doses de 75 et de 150 mg/kg a réduit significativement l'incidence des tumeurs ($p < 0,01$ et $p < 0,05$), la charge tumorale et le volume des tumeurs ($p < 0,001$ et $p < 0,01$) respectivement. Aucun signe d'hyperplasie n'a été observé sur les glandes mammaires des animaux traités avec l'extrait à la dose de 75 mg/kg en comparaison au groupe DMBA. L'extrait de *A. macrophylla* a induit *in vitro* un effet cytotoxique non sélectif sur toutes les lignées de cellules cancéreuses avec un effet plus important sur les cellules 4T1 et une inhibition de la croissance de tous les types cellulaires. Après 24 et 48 h, l'extrait a induit une diminution significative ($p < 0,05$) de la prolifération cellulaire à 100 $\mu\text{g/mL}$. L'extrait a également induit une diminution significative ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) du nombre de clones de cellules MDA-MB-231 aux concentrations de 50 $\mu\text{g/mL}$ et de 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivement; l'apoptose des cellules MDA-MB 231 à 100 $\mu\text{g/mL}$ après 24 h ; a inhibé la progression du cycle cellulaire en phase G2/M aux concentrations de 50 et de 100 $\mu\text{g/mL}$ après 24 h et 48 h ; a diminué l'encrage des cellules au collagène et à la fibronectine et a significativement inhibé ($p < 0,05$ et $p < 0,01$) la migration cellulaire aux

concentrations de 50 et de 100 µg/mL respectivement. Les résultats de l'évaluation de l'activité antiœstrogénique *in vitro* ont montré que la prolifération des cellules MCF-7 stimulée par l'œstradiol a été inhibée ($p < 0,001$) par l'extrait à toutes les concentrations testées. Les effets chimiopréventifs de *A. macrophylla* seraient dûs à son activité antiœstrogénique et à sa capacité à augmenter le taux de GHS aux doses de 37,5 mg/kg ($p < 0,05$) et de 75 mg/kg ($p < 0,05$), et à diminuer le taux de MDA aux doses de 37,5 mg/kg ($p < 0,01$) et de 150 mg/kg ($p < 0,01$) dans la glande mammaire. Cet extrait posséderait également une activité antiradicalaire ($EC_{50} = 198,7\mu\text{g/mL}$ DPPH et $EC_{50} = 198,4\mu\text{g/mL}$ ABTS) et une activité chélatrice de métaux. Ces effets bénéfiques de l'extrait de *A. macrophylla* seraient dûs aux composés polyphénoliques ($10,24 \pm 0,55$ mg eq de quercétine/g d'extrait sec) notamment les flavonoïdes ($9,76 \pm 0,99$ mg eq de quercétine) et aux acides hexadécénoïque méthyl ester et 9-octadécénoïque (Z) méthyl ester présents dans l'extrait. L'étude de la toxicité de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* a montré que sa DL_{50} a été estimée supérieure à 2000 mg/kg. Les résultats obtenus justifieraient l'utilisation de *Anthonotha macrophylla* par les tradithérapeutes du département du Mungo dans la prise en charge du cancer du sein chez les femmes.

Mots clés: *Anthonotha macrophylla*, anticancéreux, antiœstrogénique, antioxydant, cytotoxicité.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignant neoplasia and the leading cause of cancer death in women worldwide. The treatments developed by modern medicine have been associated with many inconveniences, hence the need to find alternatives to these treatments. This work was undertaken with the aim to evaluate *in vitro* and *in vivo* anticancer effects of the aqueous extract of barks of *Anthonotha macrophylla*. The chemopreventive effects of the aqueous extract of *A. macrophylla* were evaluated on the breast cancer model induced by 7,12 dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) in rats. The antioxidant activity was done by assaying oxidative stress parameters such as malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) and the anti-free radical (DPPH and ABTS) and chelating activities of the extract were also evaluated. A quantitative phytochemical study and GC-MS were performed. The *A. macrophylla* extract mechanisms of action were determined by *in vitro* tests such as: cytotoxicity using the alamar blue (resazurin) assay on five tumors (MCF-7, MDA-MB-231, 4T1, SF-295 and SK-MEL-28) and two non-tumor cell lines (MCR-5 and HUVEC), cell growth and proliferation, inhibition of clone formation, apoptosis, impact on the cell cycle and the effect of the extract on adhesion and the cell migration respectively. The antiestrogenic effects of the aqueous extract of *A. macrophylla* were evaluated using the MCF-7 cell proliferation assay and following a 3-days uterotrophic test. The acute toxicity of the extract was also evaluated. The results obtained from the evaluation of the chemopreventive effects showed that after 28 weeks of treatment, the extract (75 and 150 mg/kg) significantly reduced tumor incidence ($p < 0.01$ and $p < 0.05$), tumor burden and tumor volume ($p < 0.001$ and $p < 0.01$) respectively. No signs of hyperplasia were observed in the mammary glands of animals treated with the extract of *A. macrophylla* at dose of 75 mg/kg compared to the DMBA group. The extract of *A. macrophylla* induced *in vitro* a non-selective cytotoxic effect on all cancer cell lines with a significant effect on rodent mammary cancer cells (4T1) and inhibition of the growth of all cell types. After 24 h and 48 h, the extract induced a significant decrease ($p < 0.05$) in cell proliferation at 100 $\mu\text{g/mL}$. The extract also induced a significant decrease ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) in the number of MDA-MB-231 cell clones at the concentrations of 50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ respectively; apoptosis of MDA-MB 231 cells at 100 $\mu\text{g/mL}$ after 24 h; inhibited cell cycle progression in S and G2/M phases at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ after 24 h and 48 h; decreased the anchorage of cells to collagen and fibronectin and significantly inhibited ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) cell migration at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The results of the evaluation of antiestrogenic activity *in vitro* showed that

the proliferation of MCF-7 cells stimulated by estradiol was inhibited ($p < 0.001$) by the aqueous extract of *A. macrophylla* at all concentrations tested. The chemopreventive effects of *A. macrophylla* would be due to its antiestrogenic activity and its ability to increase the levels of GHS at the doses of 37.5 mg/kg ($p < 0.05$) and of 75 mg/kg ($p < 0.05$), and to decrease MDA levels at the doses of 37.5 mg/kg ($p < 0.01$) and of 150 mg/kg ($p < 0.01$) in the mammary gland. In addition, this extract may be endowed with anti-free radical activities ($EC_{50} = 198.7 \mu\text{g/mL}$ DPPH and $EC_{50} = 198.4 \mu\text{g/mL}$ ABTS) and a metal chelating activity. These beneficial effects of *A. macrophylla* would be due to polyphenolic compounds (10.24 ± 0.55 mg eq of quercetin/g of dry extract) especially flavonoids (9.76 ± 0.99 mg eq of quercetin) and hexadecenoic methyl ester and 9-octadecenoic (Z) methyl ester acids present in this extract. In addition, the toxicity study showed that the aqueous extract of *A. macrophylla* is weakly toxic. Its LD_{50} has been estimated to be greater than 2000 mg/kg BW. The results obtained would justify the use of *A. macrophylla* by traditional healers of the Mungo department in the management of breast cancer in women.

Keywords: *Anthonotha macrophylla*, Anticancer, Antiestrogenic, Antioxidant, Cytotoxicity.

INTRODUCTION

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde, responsable de près de 10 millions de décès en 2020 (Globocan, 2021). En Afrique, 1.109.209 personnes ont été atteintes de cancer en 2020 avec 711429 cas de décès enregistrés (Globocan, 2021). Au Cameroun, plus de 20745 nouveaux cas de cancer ont été enregistrés en 2020 avec une mortalité annuelle supérieure à 13199 décès (Globocan, 2021). On dénombre une multitude de cancers dans le monde et le cancer du sein est la néoplasie maligne la plus fréquente et la première cause de mortalité par cancer chez les femmes dans le monde (Siegel *et al.*, 2018). Pratiquement un tiers (32%) des cancers diagnostiqués chez les femmes sont des cancers du sein (American Cancer Society, 2012). Au Cameroun, le cancer du sein est le premier cancer parmi les cancers diagnostiqués chez les femmes. Il représente 34,1% des cancers féminins (Globocan, 2020). Le cancer est de nos jours un véritable problème de santé publique dans le monde. De nombreux facteurs de risque contribuent au développement du cancer, notamment l'âge, l'obésité, les œstrogènes exogènes et endogènes (âge précoce de la ménarche, âge avancé de la ménopause, âge tardif de la première grossesse à terme) ; exposition précoce aux polluants de l'environnement (hydrocarbures aromatiques polycycliques) et antécédents familiaux de cancer (Campeau *et al.*, 2008 ; Sagiv *et al.*, 2009).

De nos jours, nombreuses interventions médicales sont utilisées pour traiter le cancer du sein. Il s'agit de la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, thérapie ciblée et immunothérapie (Mongis, 2017). Ces traitements ont été associés à de nombreux effets secondaires. En effet, le paclitaxel (agent antimicrotubule) induit une myélosuppression qui affecte le système immunitaire ; la doxorubicine (antibiotique cytotoxique) conduit à une cardiotoxicité irréversible grave; tandis que le tamoxifène (Modulateur Sélectif des Récepteurs aux Œstrogènes) augmente le risque de cancer de l'endomètre (Wu, 2012 ; Lazzeroni et DeCensi, 2013). Un autre problème qui n'est pas des moindres, est le coût élevé des traitements du cancer du sein (Suyatmi *et al.*, 2012). Comme alternatives à ces limites mentionnées, un grand nombre de personnes font recours à la médecine à base des plantes médicinales (Baliga et Dsouza, 2011). Ces plantes, relativement disponibles et peu toxiques, donnent de l'espoir car elles sont composées d'une grande variété de substances anticancéreuses telles que les polyphénols et les phytostérols (Wang *et al.*, 2016). Il est urgent de découvrir et de développer de nouveaux médicaments chimiopréventifs contre le cancer du sein offrant une sécurité et une efficacité pour améliorer la gestion du cancer du sein et réduire le coût élevé du traitement et la douleur des patients (Steward et Brown, 2013).

La chimioprévention consiste à utiliser les substances d'origine naturelle et/ou synthétique pour prévenir la survenue du cancer (Shu *et al.*, 2010). De nombreuses études

épidémiologiques et précliniques ont montré que la consommation de certaines substances naturelles à l'instar de l'ail, le corossol et le thé vert, ainsi que les phytoestrogènes peuvent considérablement diminuer le risque de développer un cancer (Cragg et Newman, 2001 ; Li *et al.*, 2014; Njamen *et al.*, 2014). Les travaux réalisés dans notre unité de recherche ont rapporté les effets anticancéreux de plusieurs plantes de la pharmacopée Camerounaise. C'est le cas de *Crateva adansonii* DC, *Acacia seyal* (Zingue *et al.*, 2016 ; Zingue *et al.*, 2018) et *Ficus umbellata* Vahl (Silihe *et al.*, 2017). Dans le but de contribuer à la vulgarisation des plantes médicinales Camerounaises efficaces contre le cancer, une investigation des effets de *Anthonotha macrophylla* (Caesalpiniaceae) sur un modèle animal de cancer du sein a été entreprise. *A. macrophylla* est une plante médicinale utilisée traditionnellement contre le cancer du sein dans la localité de Yato (Département du Mungo, Région du Littoral, Cameroun). La GC-MS de l'extrait méthanolique de *A. macrophylla* a révélé la présence de phytostérols, en particulier le campestérol, connu pour leurs effets anticancéreux (Awad *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2001). Aucune étude n'a encore été menée sur l'activité anticancéreuse de *A. macrophylla*.

Question de recherche

La plante *Anthonotha macrophylla* grâce aux phytoconstituants qu'elle contient préviendrait-elle la survenue du cancer du sein qui justifierait son utilisation traditionnelle?

Hypothèse de recherche

Au vu de son utilisation traditionnelle et de ses phytoconstituants, *Anthonotha macrophylla* possède des métabolites secondaires qui auraient des propriétés préventives contre la survenue du cancer du sein.

Objectifs

Objectif principal

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer *in vitro et in vivo* les effets anticancéreux de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla* (Caesalpiniaceae).

Objectifs spécifiques

1- évaluer les effets chimiopréventifs de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* sur le cancer du sein induit par le DMBA chez la rate de souche Wistar ;

2- déterminer les modes et mécanismes d'action de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* ;

3- évaluer la toxicité aiguë de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*.

CHAPITRE I :
REVUE DE LA LITTERATURE

I.1 Cancer

I.1.1 Définition et historique du cancer

Bien que le cancer ne soit devenu un enjeu majeur en santé publique qu'au cours de la deuxième moitié du XXème siècle, il ne s'agit pas d'une maladie récente. Au cours de l'autopsie de certaines momies égyptiennes, des tumeurs osseuses avaient été détectées et certains symptômes évoquant des néoplasies avaient été décrits dans les manuels de médecine chinoise et arabe. Du temps d'Hippocrate (environ 4 siècles avant JC) de nombreux types de tumeurs avaient été répertoriés et décrits. C'est ainsi qu'Hippocrate a introduit le terme carcinome qui est issu du mot grec Karkinos signifiant «crabe ». Il considérait en effet que la progression et la longue persistance de la maladie dans le corps humain rappelait la démarche du crabe (Long, 1928). Environ six siècles plus tard, Galien distinguait 3 types de tumeurs, les tumeurs « naturelles » qui englobaient toutes les augmentations de tailles physiologiques comme la croissance des seins accompagnant la maturation normale de la femme, les tumeurs « surnaturelles » qui se rapportaient aux processus de régénération après une lésion comme la prolifération osseuse à la suite d'une fracture et enfin les tumeurs « contre nature » qui correspondaient à ce que nous considérons aujourd'hui comme des processus néoplasiques ainsi qu'à de nombreuses lésions inflammatoires (Sighoko, 2011). De nos jours, le cancer est défini comme étant une pathologie caractérisée par une prolifération anarchique de cellules se faisant au détriment de l'organe dans lequel elles se développent. On considère que les cellules cancéreuses sont issues d'une cellule initiale transformée capable de se multiplier rapidement pour former un clone. L'origine cellulaire exacte du cancer reste une question controversée. Le développement récent de la recherche sur les cellules souches a mis en évidence les nombreuses similitudes entre ces dernières et les cellules cancéreuses. On pense aujourd'hui qu'il existe des cellules-souches cancéreuses à l'origine des proliférations néoplasiques (Sighoko, 2011).

I.1.2 Cancer dans le monde

Au cours des 30 dernières années le fardeau mondial du cancer a plus que doublé. Les estimations faites pour l'année 2008 portent à plus de 12 millions le nombre de nouveaux cas de cancer diagnostiqués, à environ 7 millions le nombre de décès dû aux cancers et à environ 25 millions le nombre de personnes vivant avec un cancer (Ferlay *et al.*, 2010). Pour l'année 2012, 8,2 millions de décès sont imputables au cancer, soit 13% des décès enregistrés dans le monde (Cancer Report Worldwide, 2014). Selon « American Association for Cancer Research, 2016 », 8,9 millions de décès ont été enregistrés en 2015. En 2018, l'incidence du

cancer était estimée à 18,1 millions de personnes dans le monde et près de 10 millions de personnes sont décédées de la maladie (WHO, 2020) et en 2020, le nombre de personnes diagnostiquées du cancer était de 19,3 millions de nouveaux cas (Globocan, 2021). D'ici 2040, ces chiffres vont presque doubler dans le monde si rien n'est fait (WHO, 2020). Le cancer est à l'origine d'environ 30% de tous les décès prématurés dus aux maladies non transmissibles chez les adultes âgés de 30 à 69 ans. La Figure 1 présente l'incidence et la mortalité du cancer dans le monde. Le cancer le plus fréquemment diagnostiqué est le cancer du sein (11,7% de tous les cas), suivi par le cancer du poumon (11,6%) et le cancer colorectal (10%). Le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer (18% de tous les décès), suivi des cancers du foie (8,3%) et de l'estomac (7,7%) (Globocan, 2021). Le type de cancer le plus courant varie selon les pays, avec certains cancers, comme le cancer du col utérin et Sarcome de Kaposi, beaucoup plus fréquent dans les pays à l'extrémité inférieure de l'indice de développement humain (IDH) que dans les pays à IDH élevé. Le problème majeur pour la plupart des pays (indépendamment de leur niveau de développement) sera de réunir suffisamment de ressources pour assurer la prise en charge préventive, diagnostique et thérapeutique mais aussi d'assumer le coût des soins palliatifs pour tous les malades atteints de cancer (WHO, 2020).

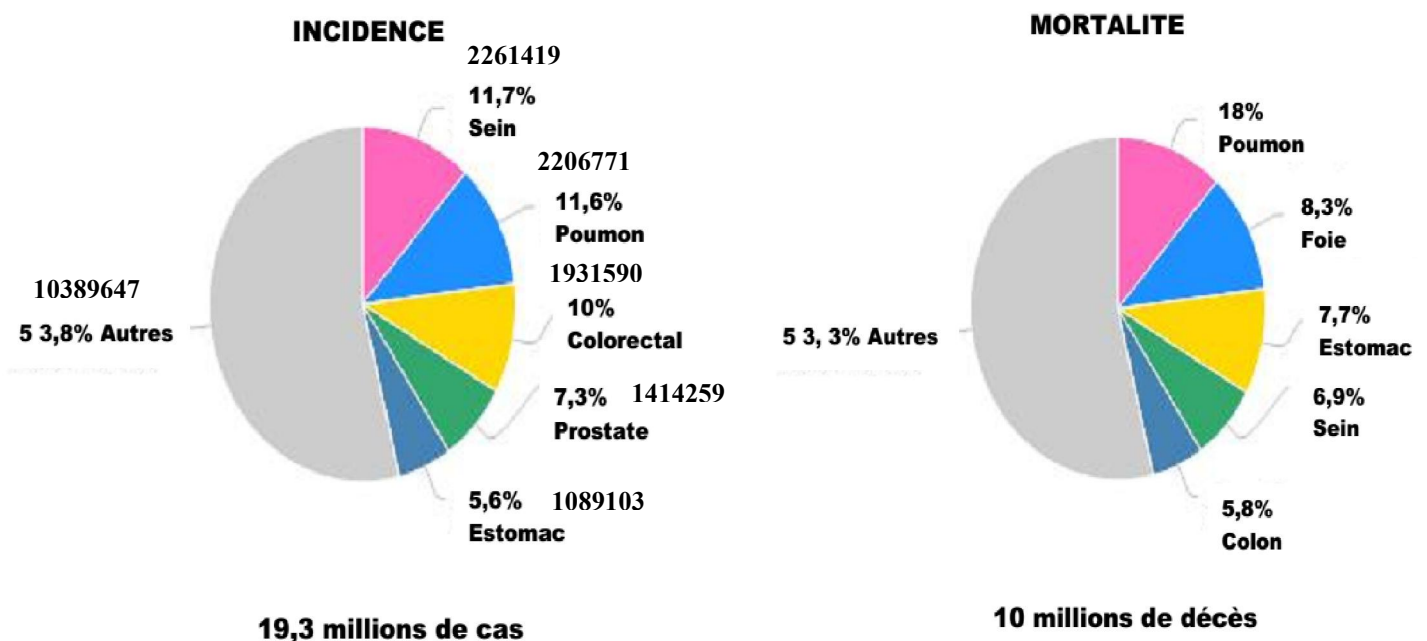


Figure 1: Incidence et mortalité du cancer dans le monde (Globocan, 2021).

Au Cameroun, plus de 15000 nouveaux cas de cancer ont été enregistrés en 2018 avec une mortalité annuelle supérieure à 10000 décès (Globocan, 2018). Dans la seule ville de

Yaoundé, le Comité National de Lutte contre le cancer et l'association solidarité chimio estiment à 107 nouveaux cas pour 100000 habitants, soit 45 hommes et 62 femmes. Plus de 80% de cas sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie, et la plupart décèdent dans les 12 mois qui suivent le diagnostic. Le nombre de personnes en réalité atteint du cancer est bien plus élevé que les chiffres présents, et augmente d'ailleurs chaque jour à grand pas au Cameroun au regard de l'ignorance de certains citoyens tant au sujet de la maladie que de ses facteurs de risques (MINSANTE, 2011).

I.2 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, 2013). Il s'agit d'un cancer qui se développe dans le sein, généralement dans les canaux galactophores et dans les lobules mammaires.

I.2.1 Anatomie du sein

La Figure 2 Présente la description anatomique du sein et l'organisation d'un lobe et d'un acinus. 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). Dans chaque sein, la glande mammaire est une masse de densité variable, discoïde aplatie d'avant en arrière, de contour irrégulier. La fonction primaire de la glande mammaire est exocrine, il s'agit de la sécrétion lactée (Watson et Kreuzaler, 2011). Le tissu mammaire est constitué d'un embranchement de canaux inclus dans le tissu adipeux mammaire et débouchant à l'extérieur de l'organisme au niveau du mamelon par des canaux excréteurs. Reposant sur le muscle pectoral, cette glande est constituée de 10 à 20 unités lobulaires séparées par le pannicule adipeux. Chaque lobe se compose de lobules et donne sur l'extérieur par un canal, le canal galactophore. Un lobule est un ensemble d'acini regroupés autour d'un canal alvéolaire (canalicule intra-lobulaire). Plusieurs canaux alvéolaires se joignent et forment un canal lobulaire (canal extra lobulaire), et plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour former un canal galactophore. Chaque unité sécrétrice est composée de couches de cellules épithéliales polarisées, dites luminales, entourées d'une couche discontinue de cellules myoépithéliales, dites basales, reposant sur une lame basale. On y trouve également une gaine de fibroblastes, incluse dans le tissu conjonctif sous-jacent vascularisé (Fata *et al.*, 2000). Le développement de la glande mammaire se passe en quatre

phases distinctes : l'embryogénèse, la puberté, la grossesse et la ménopause (Watson et Kreuzaler, 2011). Ce processus est hautement coordonné et est dirigé par des facteurs de croissance présents au niveau local et des hormones systémiques (œstrogène et progestérone) dont la production est variable au cours de la vie (Lamarca et Rosen, 2008).

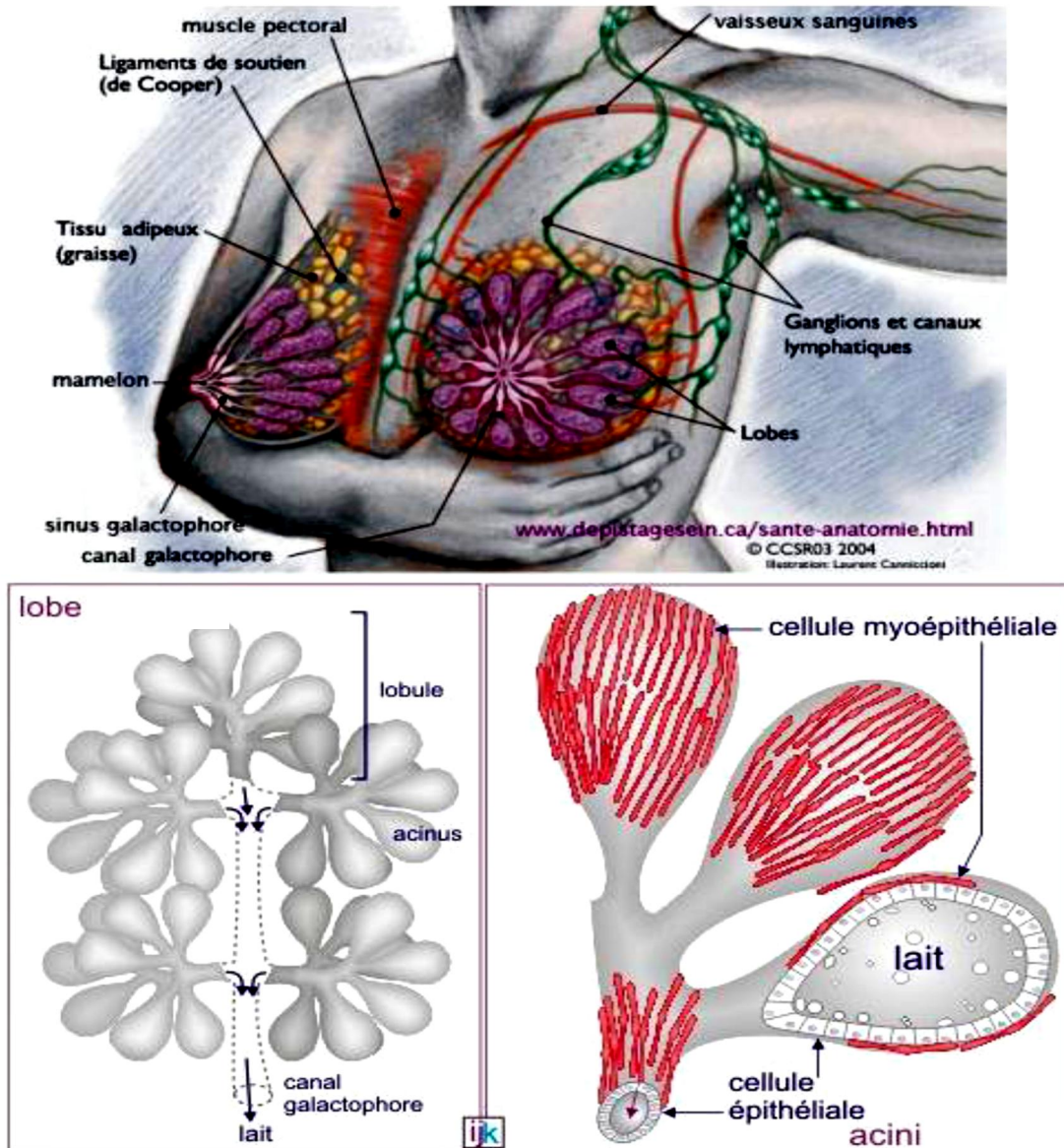


Figure 2: Description anatomique du sein et présentation schématique de l'organisation d'un lobe et des acini (<http://www.cellbiol.net/ste/alphERCEPTIN1images.php>) consulté le 30 août 2015.

Au stade fœtal, le parenchyme (cellules épithéliales et myoépthéliales) et le mésenchyme (fibroblastes et adipocytes) se mettent en place. Le développement de la glande mammaire démarre avec la migration de cellules épithéliales dérivant de l'ectoderme ; ce qui conduit à la formation d'aires d'épaississements épithéliaux de forme arrondies, appelées

placodes, lesquelles envahissent le derme (mésenchyme). Deux tissus mésenchymateux sont impliqués durant l'embryogénèse amenant à la formation de ces structures. Le mésenchyme fibroblastique mammaire stimule les cellules épithéliales mammaires embryonnaires pour former des structures canalaire atypiques branchées avec hyperplasie du canal, alors que le mésenchyme adipeux induit leur élongation. En coupe histologique, les canaux, de nombre limité, sont allongés avec parfois quelques branchements à terminaisons arrondies (Naccarato *et al.*, 2000 ; Kass *et al.*, 2007). Ce système rudimentaire n'évolue plus jusqu'au stade prépubère.

Les développements ultérieurs de la glande mammaire sont directement corrélés à la production d'hormones sexuelles féminines. Hors période de grossesse, depuis la puberté jusqu'à la ménopause, ces hormones évoluent selon un cycle de 28 jours chez les êtres humains. Pendant la grossesse, leurs taux augmentent considérablement jusqu'à l'accouchement. Les interactions épithélio-mésenchymateuses, impliquant des facteurs locaux, vont également être impliquées.

L'évolution de l'architecture de la glande mammaire est représentée sur la Figure 3. A l'adolescence, les hormones sexuelles (œstrogène et progestérone) dont les concentrations ne cessent d'augmenter, favorisent le développement du tissu adipeux et de la glande mammaire. Les bourgeons terminaux se développent dans le tissu adipeux, formant des canaux et des ramifications secondaires (Figure 3). A l'état adulte, à chaque cycle reproductif, cette glande subit un remaniement régulé. La gestation et la lactation représentent le niveau de développement maximal de la glande mammaire (allongement des canaux et développement des lobules avec mise en place des acini) (Naccarato *et al.*, 2000). La structure en « arbre » de la glande mammaire augmente sa surface cellulaire pour l'adaptation structurelle et fonctionnelle sur demande physiologique pour assurer la lactation. A la ménopause, la glande mammaire subit une involution correspondant à une régression des lobules et au maintien des conduits (Watson et Kreuzaler, 2011).

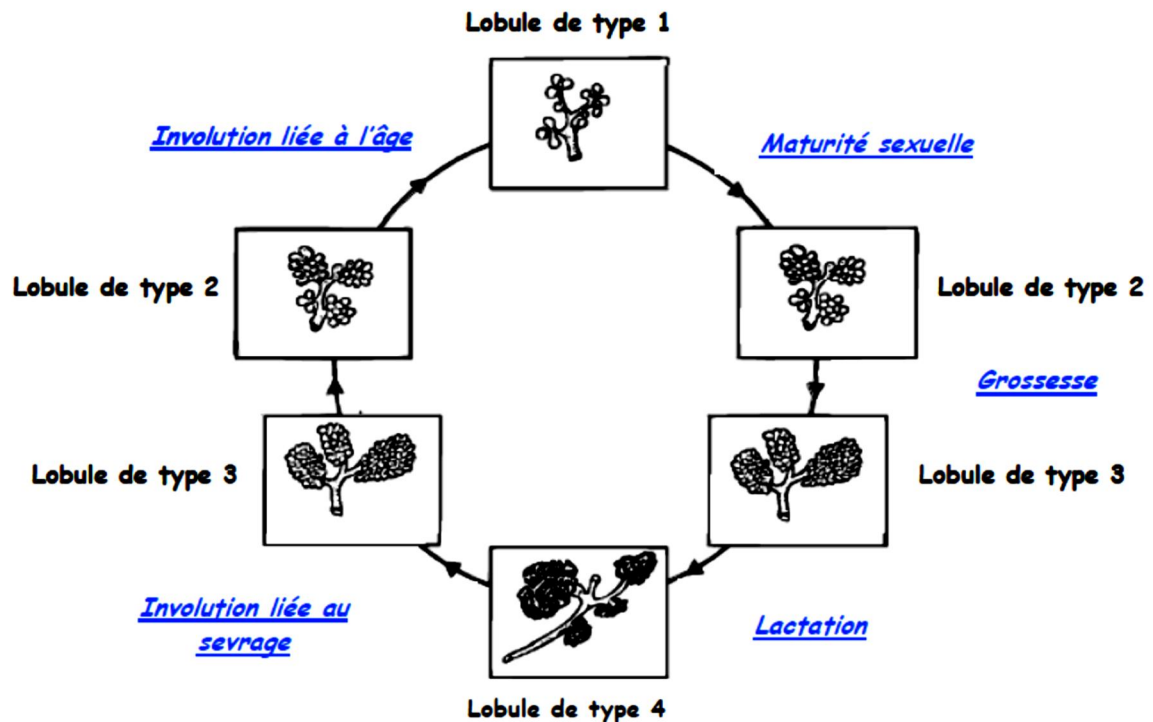


Figure 3 : Evolution de l'architecture de la glande mammaire (Russo et Russo, 1998).

I.2.2 Processus de la cancérogenèse mammaire

La cancérogenèse est l'ensemble de phénomènes transformant une cellule normale en cellule cancéreuse (Gabriel et Danielle, 2005). A l'origine d'un cancer se trouve une cellule seule, possédant un ADN endommagé qui initie des processus chromosomiques aberrants. La grande majorité des cellules de l'organisme ont des processus de contrôle et d'élimination de ces aberrations. Cependant si l'une des cellules défectueuses survit, il en résultera une prolifération cellulaire anormalement importante. La plupart des cancers sont issus de clones provenant d'une seule cellule transformée, nommée cellule initiatrice du cancer. Le processus de cancérogenèse est long et comporte quatre phases : l'initiation, la promotion, la progression et l'invasion.

I.2.2.1 Initiation

C'est le premier stade observé lors du développement d'un cancer. Il correspond à une altération rapide et irréversible de l'ADN après une exposition à un agent carcinogène (produits chimiques, virus, radiations). L'initiation consiste en une dérégulation au niveau de certains gènes aboutissant à une transformation cellulaire. Cette étape cible plusieurs types de gènes qui peuvent être entre autre les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, les gènes de réparation de l'ADN et les gènes de l'apoptose (Crevoisier, 2010). Les proto-oncogènes codent pour des protéines de régulation des signaux de transduction, des acteurs de croissance, des protéines kinases et stimulent la croissance cellulaire. Les proto-oncogènes

mutés (*ras*, *fos*) deviennent parfois des oncogènes actifs, la mutation touche un seul allèle et peut entraîner un gain de fonction ; il y a alors stimulation de la prolifération et/ou dérégulation de la différenciation cellulaire. Certains oncogènes déclenchent une surproduction de facteurs de croissance comme le TGF- α qui peut provoquer la prolifération des cellules qui les ont produits. D'autres oncogènes perturbent la cascade des signaux cytoplasmiques. Par exemple, *ras* muté code pour des protéines continuellement actives ; les oncogènes de la famille *myc*, eux, perturbent l'activité des facteurs de transcription. Quant aux gènes suppresseurs de tumeurs, ils font l'objet d'événements génétiques qui doivent affecter les deux allèles du gène et qui entraînent une perte de fonction. Ils codent pour des protéines qui régulent négativement la prolifération cellulaire. Par exemple *p53* dont le rôle est d'arrêter le cycle cellulaire afin d'effectuer les réparations de l'ADN, est une protéine dont les mutations sont fréquentes dans les cancers et favorisent la croissance cellulaire tumorale. Autre exemple, certaines cellules cancéreuses deviennent insensibles au facteur TGF- β qui bloque habituellement la croissance de divers types de cellules normales; ceci par inactivation d'un des gènes suppresseurs de tumeurs qui code pour un des récepteurs de ce facteur (Weinberg, 1996).

I.2.2.2 Promotion

C'est la phase de " transformation cellulaire ". La promotion est la prolifération clonale des cellules initiées et consiste en une série d'étapes permettant à une cellule initiée d'atteindre le stade de cancer histologiquement décelable. Elle se caractérise par une grande instabilité génomique et une augmentation de la perte d'homéostasie. Pendant cette période, on observe une exposition prolongée, répétée ou continue de la cellule initiée à certaines substances (œstrogène, cytokines et facteurs de croissance (Crevoisier, 2010). Les mécanismes de la promotion tumorale sont de nature épigénétique et participent à la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Decloitre et Puiseux-Dao, 1993). La surexpression des oncogènes et/ou la répression des gènes suppresseurs de tumeurs (inhibition de apoptose) provoquent une stimulation de la croissance des cellules initiées. La perturbation, à chaque étape des systèmes de signalisation cellulaire, (facteurs de croissance, hormones, récepteurs, protéines cytoplasmiques) joue un rôle prépondérant dans la phase de promotion, de même que l'inhibition de la communication intercellulaire (Yamasaki *et al.*, 1995).

I.2.2.3 Progression

La progression est la période au cours de laquelle, les phénomènes amorcés vont évoluer vers un état d'irréversibilité ; il y a émergence et croissance d'une tumeur maligne. Elle se caractérise par une perte d'identité de la cellule atteinte par le cancer ainsi que par une multiplication anormale et localisée de la cellule cancéreuse. Dans cette phase, la cellule cancéreuse forme des nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), pour irriguer et alimenter la tumeur (Crevoisier, 2010). Pendant cette phase de développement du cancer, la multiplication des cellules atteintes par les tumeurs devient incontrôlable. En outre, à cause du nombre très important de mitoses, les cellules finissent par acquérir certaines propriétés d'autonomie de croissance, une adaptabilité métabolique et une pharmaco-résistance (Hanahan et Weinberg, 2011). Durant la progression, les cellules cancéreuses deviennent incapables d'effectuer leurs fonctions normales et perdent leur adhésion tissulaire. C'est généralement à cette phase que le cancer devient cliniquement détectable (Hanahan et Weinberg, 2011).

La formation de métastases est un processus en plusieurs étapes par lequel les cellules cancéreuses doivent envahir la matrice extracellulaire, pénétrer dans la circulation sanguine (intravasation), survivre au transport dans le système circulatoire, et finalement ressortir de la circulation sanguine (extravasation) afin de coloniser les organes distants (Nguyen *et al.*, 2009) (Figure 4). Les nouvelles tumeurs auxquelles on a donné le nom de métastases peuvent ainsi se développer de façon autonome et indépendante de celle de la tumeur initiale (Hanahan et Weinberg, 2011).

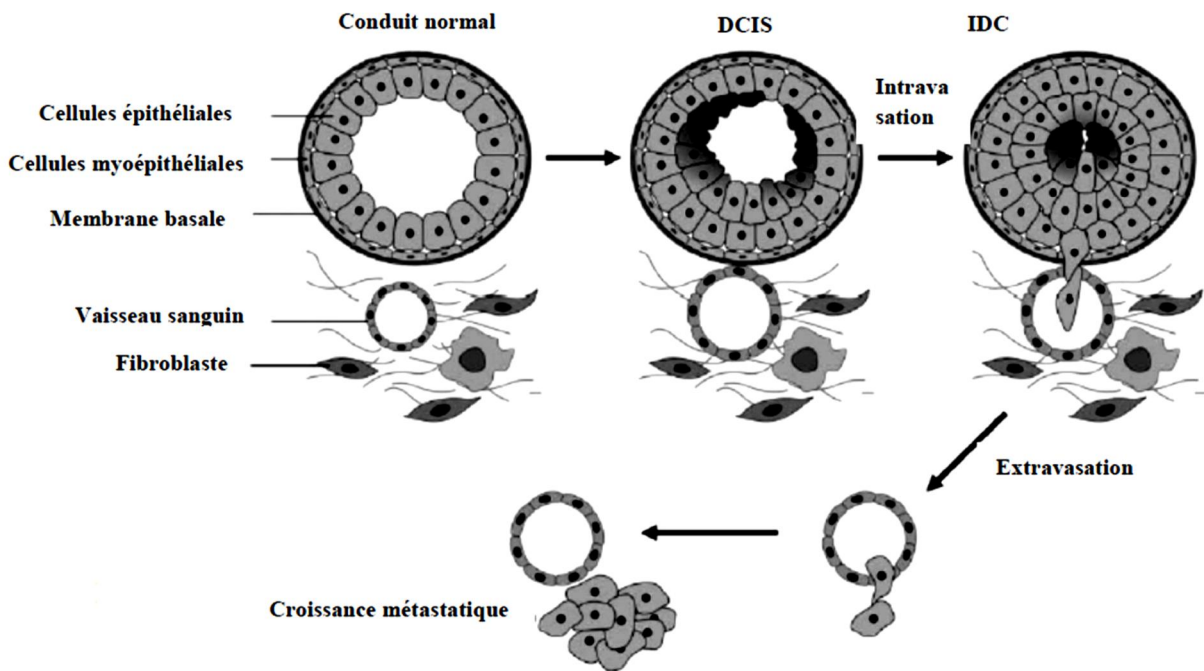


Figure 4: Cascade d'évolution métastatique du cancer du carcinome canalaire *in situ* (DCIS) devenant un carcinome canalaire infiltrant (IDC) (Scully *et al.*, 2012).

I.2.3 Epidémiologie du cancer du sein

Dans le monde entier, le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez les femmes, représentant 25,5% des cas de cancer avec 1,7 million des nouveaux cas et 15% des décès par cancer (Torre *et al.*, 2015). C'est le premier cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans le monde (Globocan, 2021).

Au Cameroun, le cancer du sein est le premier cancer parmi les cancers diagnostiqués chez les femmes. Il représente 34,1% des cancers féminins (Globocan, 2020). Concernant l'aspect hormonal, environ 2/3 des cancers du sein nouvellement diagnostiqués sont œstrogéno-dépendants et les tumeurs mammaires présentant des récepteurs d'œstrogènes (ER⁺) représentent 50 à 80% de toutes les tumeurs mammaires (Clarke *et al.*, 2003). Il semble important de signaler qu'au Cameroun particulièrement, le cancer du sein touche principalement la population jeune, généralement les travailleurs, constituant une perte énorme pour l'économie et le développement du pays (MINSANTE, 2011).

I.2.4 Classifications histologiques et moléculaires du cancer de sein

Le cancer du sein est une pathologie hétérogène tant au niveau moléculaire, histologique, qu'au niveau génétique. Les classifications initiales étaient basées sur la clinique

(taille tumorale et atteinte ganglionnaire). Une évaluation histologique et moléculaire détaillée vient compléter de façon importante les critères de choix thérapeutiques.

I.2.4.1 Classification histologique

Le type histologique se réfère à la croissance de la tumeur. Les cancers du sein les plus fréquents sont des adénocarcinomes (95 %), parmi lesquels on distingue les carcinomes *in situ* (non invasifs) et les carcinomes invasifs (infiltrants). Les carcinomes *in situ* se répartissent entre carcinome canalaire et lobulaire. Le carcinome canalaire *in situ* est plus commun et plus fréquent que le carcinome lobulaire. C'est une forme de cancer très précoce. Il se développe à l'intérieur des canaux galactophores. En fonction de l'apparence et de l'architecture des cellules tumorales, il se classe en deux sous-types principaux, comédocarcinome (la nécrose), et non comédocarcinome. Le carcinome lobulaire *in situ* (néoplasie lobulaire), est, quant à lui, plus rare, et correspond au développement des cellules anormales dans les lobules. Il possède une faible variation histologique et il est considéré comme un facteur de risque de développement du cancer du sein. Le carcinome invasif se propage des lobules ou de l'unité terminale ducto-lobulaire (UTDL), indépendamment de leur type histologique (Malhotra *et al.*, 2010).

I.2.4.2 Classification moléculaire

Elle est basée sur l'expression des récepteurs ER, RP et Her2 (« human epidermal growth factor receptor 2 ») (Malhotra *et al.*, 2010). Ainsi on distingue :

- Le type luminal qui se caractérise par l'expression des récepteurs de deux hormones stéroïdiennes RP+/RE+ (RP : le récepteur de la progestérone ; RE : le récepteur des œstrogènes) ainsi que de leurs gènes associés (Hammond *et al.*, 2010). Il est associé à un pronostic favorable et à une réponse aux traitements anti-hormonaux et constitue 60% des carcinomes mammaires (invasifs).
- Le sous-type basal qui représente 15 à 20% des cancers du sein. L'une de ses caractéristiques est l'absence de l'expression des récepteurs RE, RP et Her2, ce qui lui confère la nomenclature de tumeur triple-négatif (TN). Il ne répond pas à la thérapie endocrinienne (Eroles *et al.*, 2012).
- Le sous type Her2 constituant 10 à 15 % des cancers du sein. Il se caractérise par une sur-expression élevée et une amplification de Her2, une réponse au trastuzumab (Herceptin®) (un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur Her2/Neu) et une absence d'expression de PR/ER (Schnitt, 2010).

I.2.5 Symptômes

Dans la plupart des cas, le cancer du sein se manifeste cliniquement par un nodule plus ou moins profond, dur, habituellement non douloureux. Plusieurs caractéristiques sont susceptibles d'indiquer la présence du cancer du sein chez un sujet. Ces caractéristiques peuvent être entre autres ; une fossette ou une ride creusant la surface du sein ; un aspect de "peau d'orange" ; une déformation du mamelon le rétractant vers l'intérieur ; un aspect eczémateux du mamelon, qui devient rouge, croûteux ou érodé ; un écoulement sanglant ou noirâtre du mamelon (Fumoleau et Bastien, 2008).

I.2.6 Techniques de diagnostic du cancer du sein

Les principales techniques du diagnostic du cancer du sein sont une mammographie de dépistage, une palpation d'une masse dans le sein, une modification de la peau du sein constatée par la patiente ou son médecin ou un écoulement de liquide au niveau de l'un ou des deux mamelons (Moore *et al.*, 2008). Le diagnostic de cancer du sein est basé sur les trois examens suivants : examen clinique, examen radiologique et examen anatomopathologique.

I.2.6.1 Examen clinique

Il consiste en un examen des seins et des ganglions lymphatiques voisins, par observation et palpation et à un prélèvement sanguin pour doser les marqueurs sériques du cancer du sein que sont les antigènes tumoraux CA 15-3 et CA 125.

I.2.6.2 Examen radiologique

L'examen radiologique comprend la réalisation d'une mammographie (radiographie) et d'une échographie des seins et des ganglions voisins. Un examen par IRM des seins peut être requis chez les patientes qui présentent un tissu mammaire dense, chez les femmes porteuses d'une mutation du gène *BRCA* et chez les femmes portant des implants mammaires en silicone. L'examen par IRM peut également être envisagé lorsque des cellules tumorales ont été trouvées dans un ganglion lymphatique suspect des aisselles, mais sans qu'aucune tumeur ne soit détectée dans le sein par mammographie, ou lorsqu'on suspecte la présence de plusieurs tumeurs. Des examens complémentaires, tels qu'une radiographie du thorax, une échographie abdominale et une scintigraphie osseuse, peuvent être réalisés pour exclure la formation des métastases (Guegang *et al.*, 2012).

I.2.6.3 Examen anatomopathologique

C'est un examen en Laboratoire d'un échantillon de la tumeur (prélevé lors d'une biopsie). Cet examen de laboratoire confirmera le diagnostic de cancer du sein et fournira davantage d'informations sur les caractéristiques du cancer. La biopsie est effectuée manuellement par le médecin au moyen d'une aiguille, souvent à l'aide d'une échographie pour guider l'aiguille dans la tumeur. Lorsque l'aiguille est introduite dans la tumeur, un échantillon est prélevé. Selon le type d'aiguille utilisée, cette procédure est appelée aspiration à l'aiguille fine ou biopsie au trocart. Un second examen anatomopathologique sera effectué plus tard sur la tumeur et les ganglions lymphatiques retirés chirurgicalement (Guegang *et al.*, 2012).

I.2.7 Facteurs de risque

Les facteurs de risque du cancer du sein sont avant tout l'âge, l'existence d'une anomalie génétique prédisposant au cancer, les facteurs environnementaux et les facteurs de risque hormonaux.

I.2.7.1 Age

L'âge est le facteur de risque le plus important vis-à-vis du cancer du sein. Le cancer du sein est une maladie de l'âge mur, qui se manifeste fréquemment vers 45 - 50 ans et même 55 ans. En effet la femme âgée de 20 ans a une probabilité de 0,006% de développer un cancer du sein dans les 10 prochaines années ; alors qu'une femme de 60 ans a un risque de 3,45% (American Cancer Society, 2011). Cependant, il est à noter que le cancer du sein est également diagnostiqué chez les jeunes femmes.

I.2.7.2 Susceptibilités génétiques

Entre 5 et 10 % des cancers du sein sont associés à une prédisposition génétique (Bennett, 1999) dont 2 à 5% des cas attribuées essentiellement au syndrome héréditaire du cancer du sein et de l'ovaire (Oesterreich et Fuqua, 1999). C'est une maladie génétique due à la mutation du gène BRCA1 localisé sur le chromosome 17 de l'ADN ou du gène BRCA2 localisé sur le chromosome 13. Ces gènes sont impliqués dans la réparation de l'ADN, la stabilité du génome et dans le contrôle de la mort cellulaire programmée (apoptose) (Turnbull et Rahman, 2008; Tung *et al.*, 2016). La mutation de BRCA1 entraîne une augmentation très significative du risque d'avoir un cancer du sein, avec un risque de récurrence. Elle augmente aussi le risque de développer un cancer de l'ovaire, ainsi que le risque de développer le cancer de la prostate chez l'homme. La mutation de BRCA2 quant à elle entraîne une augmentation

du risque de cancer du sein et de l'ovaire chez la femme; ce risque étant plus bas que celui conféré par la mutation du gène BRCA1. Bien que n'étant responsable que d'un faible pourcentage de cancers du sein, les sujets ayant cette mutation ont un risque élevé de l'ordre de 50 à 60% mais pouvant pour certains groupes ethniques et certaines générations être supérieur à 80% de développer le cancer du sein (Turnbull et Rahman, 2008; Tung *et al.*, 2016). Les cancers dus à ces mutations affectent essentiellement les femmes jeunes.

I.2.7.3 Hormones et antécédents menstruels

Indépendamment de la ménopause, il est établi que les femmes qui ont leurs premières règles à des âges jeunes (≤ 12 ans) ont un risque plus élevé de développer un cancer du sein que celles qui ont eu les leurs à des âges plus tardifs et dont le risque est en général abaissé de 10 à 24% (Bernstein, 2002; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012). En effet, celle-ci (≤ 12 ans) seraient exposées plus longtemps aux hormones et à des cycles ovulatoires réguliers ce qui augmenterait leur risque de faire un cancer du sein (Gaudet *et al.*, 2018). Un jeune âge à la première grossesse menée à terme prédit un risque réduit de développer un cancer du sein au cours de la vie (Nichols *et al.*, 2018). Ceci serait le résultat de la maturation finale des cellules mammaires sous la stimulation des concentrations hormonales pendant la grossesse (Key *et al.*, 2001; Colditz *et al.*, 2006). Les cellules ayant subi cette maturation sont ainsi moins exposées aux risques d'erreurs de réplication de l'ADN lors des divisions cellulaires. Néanmoins, pour des raisons inconnues, l'effet protecteur suivant la première grossesse menée à terme ne serait pas immédiat et prendrait une quinzaine ou vingtaine d'années environ avant d'être effectif (Bruzzi *et al.*, 1988). Certains types de traitement hormonaux substitutifs (THS) utilisés pour atténuer les symptômes de la ménopause, tels que les bouffées de chaleur et les risques d'ostéoporose, accroîtraient le risque de cancer du sein (Agence de la santé publique du Canada, 2009). En outre, les œstrogènes favorisent la prolifération des cellules tumorales soit par liaison aux récepteurs d'œstrogènes (RE), soit par ses métabolites génotoxiques (semi-quinones et les quinones) qui sont capables de causer des mutations de l'ADN; soit encore par régulation des oncogènes cycline D1 et c-myc (Mawson *et al.*, 2005; Yager et Davidson, 2006).

I.2.7.4 Sexe

La femme est la plus exposée au cancer du sein avec un pourcentage de 99% contre 1% chez l'homme. En effet, la plupart (2/3) des cancers du sein diagnostiqués étant œstrogénodépendant et la densité du tissu mammaire étant importante chez la femme, cette dernière se trouve donc plus exposée au cancer du sein (American Cancer Society, 2016)

I.2.7.5 Facteurs environnementaux

La consommation d'alcool, une alimentation trop riche en sucres et en graisses, ou encore le manque d'exercice physique augmenteraient les risques de cancer du sein (Iyengar *et al.*, 2018 ; McTiernan *et al.*, 2019). D'autres facteurs environnementaux sont reconnus comme étant impliqués dans l'apparition du cancer du sein, notamment l'exposition à de fortes irradiations ionisantes et aux polluants environnementaux tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques à l'instar du 7,12 diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) (Baillet *et al.*, 2015).

Les femmes ayant un cancer du sein, et consommant au moins une boisson alcoolique par jour, ont une survie globale diminuée de 15 à 40%, comparativement à celles qui ne boivent pas d'alcool (Agence de la santé publique du Canada, 2009). L'alcool provoque une augmentation du niveau des hormones dans le sérum et une production accrue de facteurs de croissance IGF (*insulin-like growth factor*). Les IGF agissent comme des mitogènes, ils inhibent l'apoptose et interagissent avec les œstrogènes. Une production accrue d'IGF augmente le risque de cancer du sein, surtout avant la ménopause (Agence de la santé publique du Canada, 2009).

I.2.7.6 Antécédents personnels

La présence de cellules tumorales circulantes chez les patientes non malades, ou le développement préalable d'une tumeur bénigne du sein augmente le risque de développer ultérieurement un cancer du sein (Meng *et al.*, 2004).

Le cancer du sein est une maladie hormono-dépendante puisque les hormones dépendantes conditionnent le développement de la glande mammaire notamment les œstrogènes.

I.2.8 Œstrogènes et cancer du sein

I.2.8.1 Œstrogènes: définition et sources endogènes des œstrogènes

La figure 5 illustre les différentes structures chimiques des œstrogènes. Les œstrogènes, hormones stéroïdiennes à 18 atomes de carbone, sont principalement synthétisées dans les ovaires et dans une moindre mesure dans les tissus périphériques où l'activité aromatasé aboutit à la conversion des androgènes en œstrogènes (Matsumine *et al.*, 1991 ; Miller, 1991). On distingue quatre principaux types (Figure 5): la 17 β -œstradiol (E₂) qui est la forme la plus active, l'œstrone (E₁), l'œstriol (E₃) et l'œstérol (E₄) (Parl, 2000 ; Handgraaf, 2013).

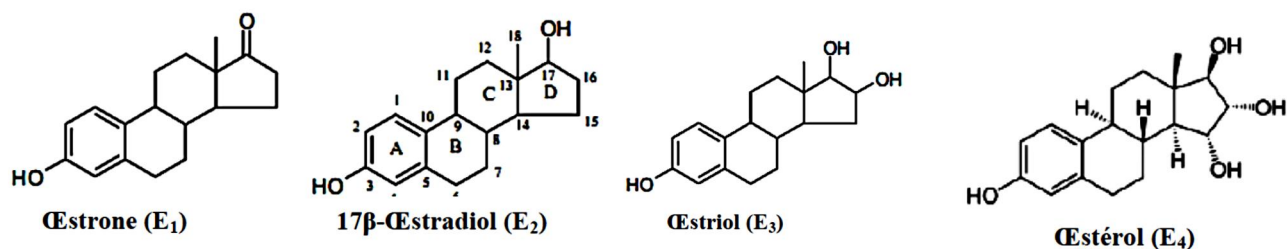


Figure 5: Structures chimiques des œstrogènes (Parl, 2000 ; Handgraaf, 2013).

I.2.8.2 Synthèse, transport et métabolisme des œstrogènes

Les œstrogènes naturels sont des stéroïdes dérivés du cholestérol. Après internalisation par les cellules endocrines de l'ovaire, grâce aux récepteurs de LDL (« Low Density Lipoproteins »), le cholestérol est transféré du cytosol vers la membrane interne des mitochondries où il va être transformé en prégnénolone sous l'action des enzymes telles que: 20-hydroxylase, 22-hydroxylase et 20,22- desmolase. Ce transfert est facilité par la protéine de transport intracellulaire des stérols appelée START protein. Le prégnénolone est ensuite transformé en androgènes et en progestérone par deux voies alternatives connues sous les termes de voies $\Delta 4$ et $\Delta 5$ respectivement (Idelman, 1990). L'aromatisation est la dernière étape de la formation des œstrogènes catalysée par la P450 aromatasase mono-oxygénase (Gruber *et al.*, 2002).

Dans le sérum, les œstrogènes synthétisés (98% œstradiol) sont liés avec une haute affinité à la « Sex hormone Binding Globulin ». Deux à trois pourcents d'œstradiol restent libre et constituent la fraction active (Gruber *et al.*, 2002). Ils sont également liés à l'albumine mais avec une faible affinité. Moins de 10% d'œstradiol sérique sont associés aux HDL et également aux LDL par un mécanisme encore inconnu (Shwaery *et al.*, 1997).

I.2.8.3 Récepteurs des œstrogènes

Les œstrogènes, une fois synthétisés, sont libérés dans la circulation sanguine pour atteindre leurs tissus cibles exprimant les récepteurs des œstrogènes. Ces récepteurs d'œstrogènes (REs) appartiennent principalement à la super famille des récepteurs nucléaires et sont regroupés en deux principaux types : le type α (RE α) et le type β (RE β) (Figure 6) (Toutain, 2009). Après la fixation des œstrogènes, ils ont pour fonction d'activer la transcription des gènes. Un troisième type de récepteur a également été identifié. Il s'agit d'un récepteur membranaire, appelé GPR30 (Filardo *et al.*, 2002). Ce dernier appartiendrait à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et agirait au niveau de la membrane plasmique

(Funakoshi *et al.*, 2006). Le récepteur GPR30 a été identifié pour la première fois dans les cellules cancéreuses du sein (Brailoiu *et al.*, 2007).

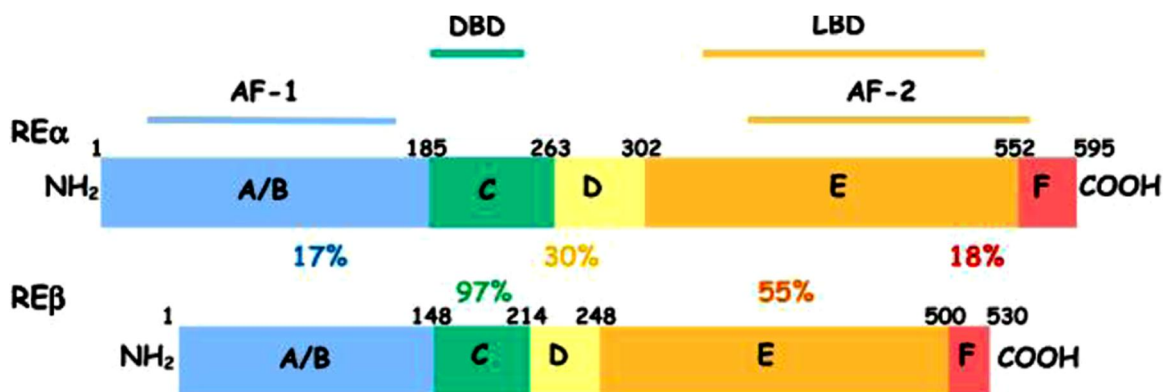


Figure 6 : Structures, régions fonctionnelles et pourcentages d'homologies de séquences des REα et REβ (Metivier *et al.*, 2001).

I.2.8.4 Répartition tissulaire des récepteurs aux œstrogènes

La figure 7 représente de façon simplifiée la répartition des récepteurs REα et REβ dans le corps. Les REs (α et β) sont exprimés différemment selon les tissus, aussi bien chez la souris que chez l'Homme (Enmark *et al.*, 1997). La connaissance du niveau d'expression du RE, de sa distribution tissulaire ainsi que de la forme prépondérante dans un tissu permet de mieux comprendre les effets des REs dans les tissus cibles (Mueller et Korach, 2001). L'expression du gène codant le REα est forte dans l'épididyme, les testicules, l'hypophyse, l'ovaire, l'utérus et le rein et plus faible dans la prostate, le foie, le thymus et le cœur. En revanche, celle du gène codant le REβ est forte dans la prostate et l'ovaire et plus modérée dans l'utérus et le poumon (Jordan, 2007). Les deux REα et REβ ont été détectés au niveau du tissu mammaire (Thibault et Levasseur, 2001). Cette distribution tissulaire hétérogène a été reliée à une sélectivité d'action de l'E2.

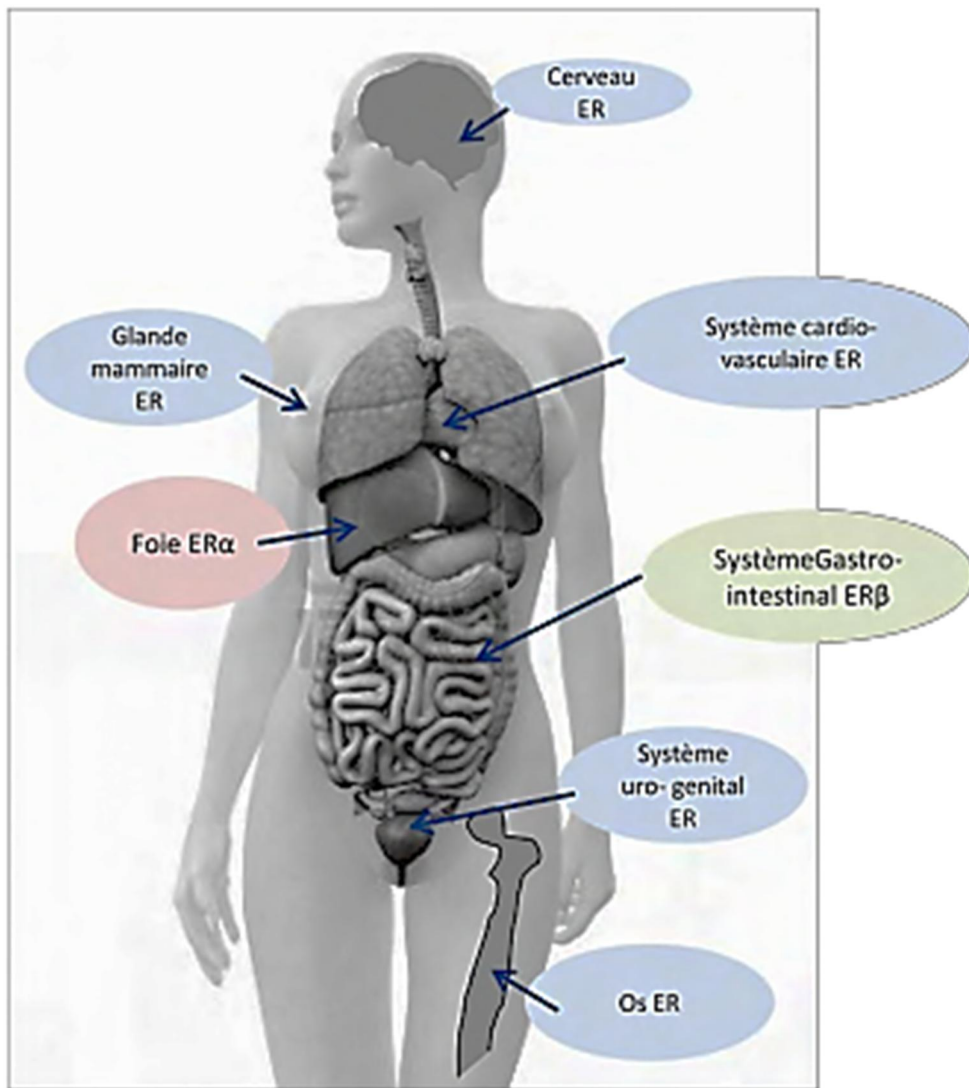


Figure 7: Représentation simplifiée de la répartition des récepteurs ER α et ER β dans le corps (d'après Pearce et Jordan, 2004).

I.2.8.5 Mécanismes d'action des œstrogènes

L'activité œstrogénique passe par la transactivation des récepteurs aux œstrogènes (REs) et se fait suivant deux mécanismes d'action : mécanisme génomique et mécanisme non-génomique (Figure 8).

I.2.8.5.1 Mécanisme d'action génomique

La figure 8 résume les différentes voies de signalisation des œstrogènes. Ils permettent de réguler la transcription des gènes cibles par le biais de la fixation du récepteur intracellulaire à son élément de réponse aux œstrogènes (ERE) situé au sein du promoteur du

gène cible ou par des interactions protéines-protéines. Il existe 3 voies de signalisation génomique: classique, ERE-indépendante et ligand-indépendante.

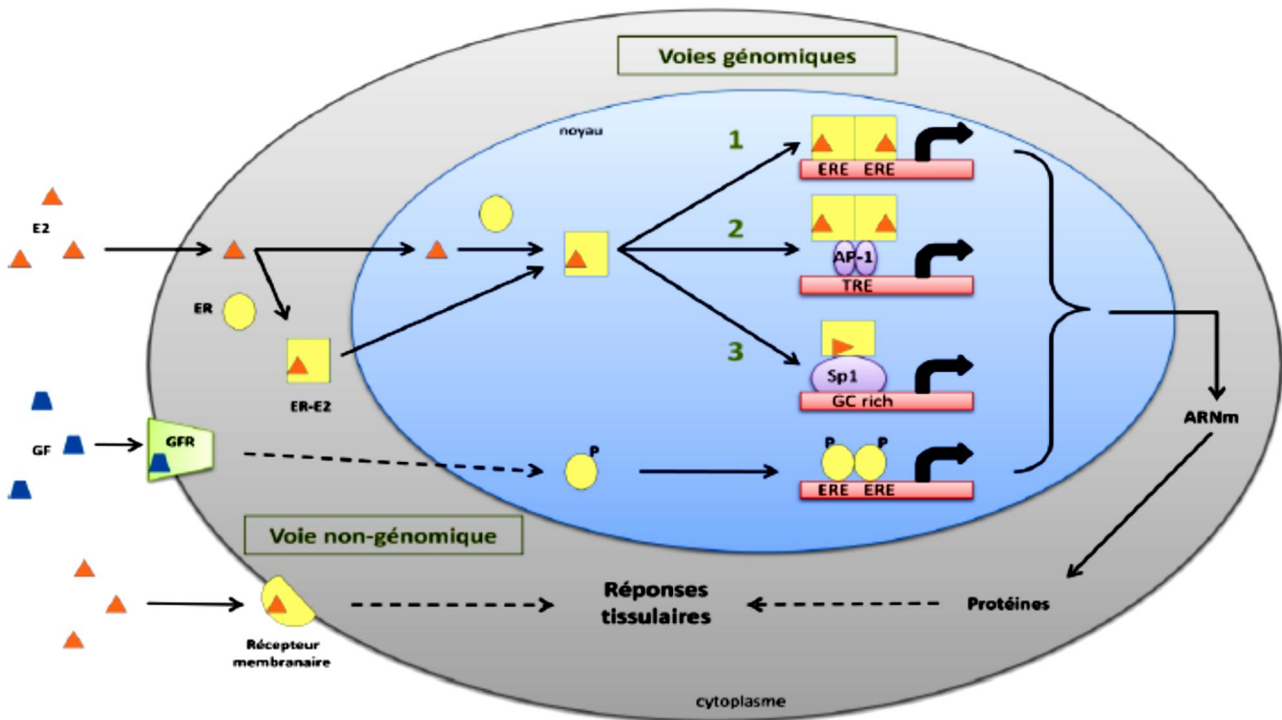


Figure 8: Différentes voies de signalisation des œstrogènes (Cui *et al.*, 2013). La voie 1 est la voie de signalisation génomique classique ligand- et ERE-dépendants. Les voies 2 et 3 font intervenir un mécanisme ERE-indépendant.

- **Voie classique**

En absence de ligand, le récepteur des œstrogènes (RE) est séquestré au niveau cytoplasmique au sein d'un complexe inhibiteur organisé autour d'un hétéro-complexe avec les Hsp 70 et 90 (« heat shock protein »). La fixation d'un ligand agoniste va provoquer la dissociation de l'hétéro-complexe, diverses modifications post-traductionnelles, et induire un changement conformationnel du RE. Tout ceci va activer la dimérisation du récepteur (homodimérisation α/α ou β/β , ou hétérodimérisation α/β). Ce dimère va interagir spécifiquement avec des séquences d'ADN appelées ERE présentes dans la région promotrice du gène (Hall *et al.*, 2001). Les fonctions transactivatrices AF-1 et AF-2 vont recruter des coactivateurs transcriptionnels comme le SRC-1 (« Steroid Receptor Coactivator 1 »), et les histones acétylases CBP/p300. L'activité acétyltransférase de ces protéines permet le remodelage de la chromatine et l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (Nelson et Bulun, 2001 ; Metivier *et al.*, 2001). Les corégulateurs transcriptionnels sont définis comme des protéines qui peuvent interagir avec les récepteurs nucléaires liés à l'ADN

en augmentant leur fonction de transactivation (cas des coactivateurs) ou en la diminuant (cas des corépresseurs).

- **Voie ERE-indépendante**

Le récepteur des œstrogènes est capable d'induire la transcription de gènes dépourvus de séquence ERE, par liaison de l'ADN, via des interactions protéiques AP-1/SP1 ou c-jun /c-fos (Safe et Kim, 2008). La voie impliquant la protéine Sp1 (« Specificity protein 1 ») est le mécanisme le plus fréquemment retrouvé (Ascenzi *et al.*, 2006).

- **Voie ligand-indépendante**

Les récepteurs d'œstrogènes, sans liaison à un ligand, peuvent être activés par phosphorylations *via* les protéines kinases A ou C, par des signaux extracellulaires comme des facteurs de croissance, par des neurotransmetteurs ou des cytokines (Le Goff *et al.*, 1994). L'EGF mime ainsi les effets de l'œstradiol dans l'utérus de souris de même, l'insuline, l'IGF-1, la dopamine ou encore le TGF- α (« Transforming Growth Factor α ») sont capables d'activer les RE en absence d'œstradiol, en induisant leur phosphorylation par le biais des MAPKs (« Mitogen Activated Protein Kinase ») (Heldring *et al.*, 2003).

I.2.8.5.2 Mécanisme d'action non génomique

Une action non génomique se définit comme toute action qui ne va pas initier ou directement influencer, l'expression d'un gène. Elle induit des effets rapides comme l'activation d'une voie de signalisation en cascade, incompatible avec l'activation des gènes. Les effets non génomiques des œstrogènes ont été décrits dans plusieurs tissus de mammifères et types cellulaires tels que l'os, les neurones, le tissu mammaire, l'ovaire et les cellules cardiovasculaires (Belcher et Zsarnovsszky, 2001). Dans ces tissus et cellules, il a été démontré que les œstrogènes activent les voies intracellulaires distinctes telles que la PKA et la MAPK (Honda *et al.*, 2000). D'autres effets rapides induits par l'œstradiol sont : la stimulation de la eNOS (Chen *et al.*, 1999) et l'augmentation du flux intracellulaire de calcium (Kelly et Levin, 2001).

I.2.8.6 Rôle des œstrogènes dans le développement du cancer du sein

Les mécanismes par lesquels les œstrogènes pourraient être à l'origine du développement du cancer du sein ont été décrits (Coumoul et Barouki, 2002 ; Santen, 2003 ; Miller, 2004) (Figure 9). Il a été démontré que l'œstradiol peut promouvoir la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, l'œstradiol peut se lier aux récepteurs d'œstrogènes et stimuler ainsi la transcription des gènes impliqués dans la division cellulaire. Lors de ces

divisions, les cellules sont plus sensibles aux erreurs de réplifications et à l'effet d'agents cancérogènes extérieurs. Les œstrogènes constituent donc des promoteurs de cancérogénèse. Certaines études décrivent une action initiatrice de la cancérogénèse qui passe cette fois par la conversion de l'œstradiol en métabolites génotoxiques. Différentes voies métaboliques peuvent conduire à la synthèse des composés génotoxiques. La principale conduit à la synthèse des dérivés hydroxylés de l'œstradiol, les cathécols (2-hydroxy-œstradiol et 4-hydroxy-œstradiol principalement) qui peuvent aboutir à des semi-quinones et enfin à des quinones. Ces dernières, fortement réactives, sont capables d'une part de former des adduits d'ADN (liaison par covalence à la guanine ou à l'adénine), et d'autre part, de provoquer l'oxydation des lipides cellulaires, via la formation des dérivés réactifs de l'oxygène comme l'ion superoxyde O_2^- (Santen, 2003). Le métabolisme oxydatif des œstrogènes dépend de l'expression et de l'activité de nombreuses enzymes dont des CYP (Coumoul et Barouki, 2002). Les CYP qui métabolisent les œstrogènes sont non seulement exprimés dans la glande mammaire, mais aussi dans l'utérus, le cerveau et autres tissus cibles des œstrogènes y compris les tissus adipeux. Ces deux mécanismes peuvent agir de concert pour stimuler la prolifération cellulaire, favoriser l'accumulation de mutations et augmenter ainsi la tumorigénèse.

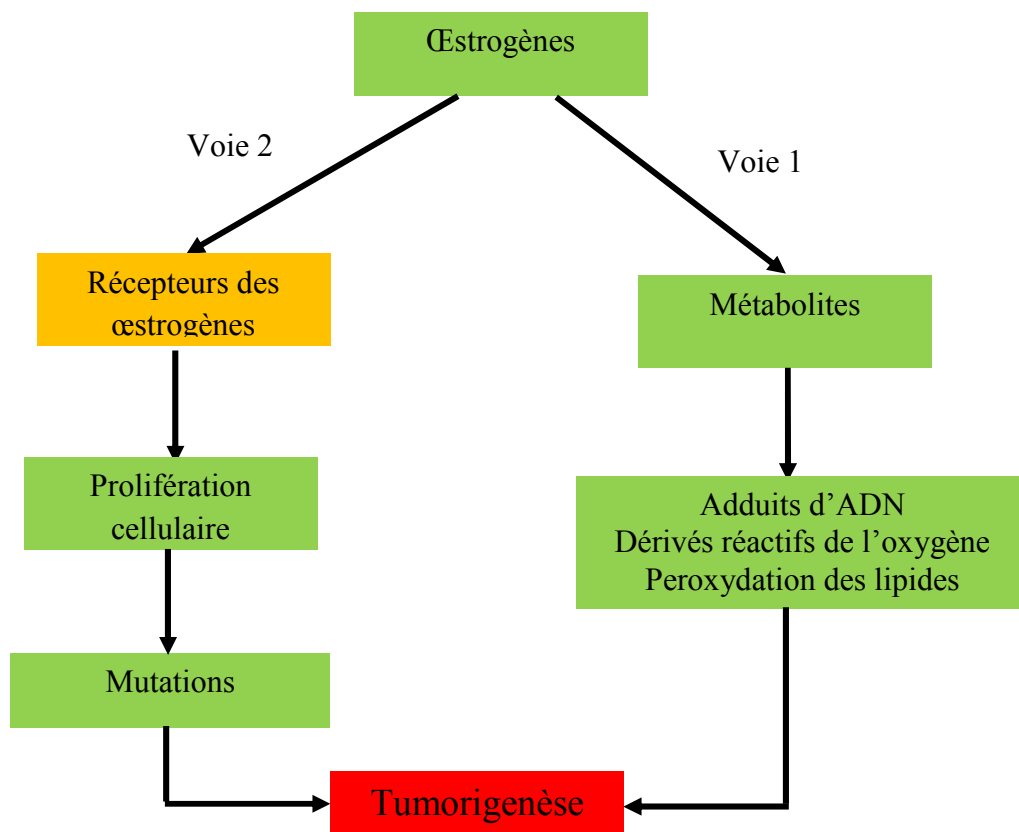


Figure 9: Rôle des œstrogènes dans la cancérogénèse mammaire (Santen, 2003).

Les complexes cyclines-CDK, qui contrôlent la progression du cycle cellulaire sont aussi des cibles de régulation de l'E2. En particulier, en présence d'anti-œstrogènes, une diminution de l'ARNm de la protéine cycline D1 est observée, protéine activant CDK4 et CDK6, ce qui entraîne une diminution de la phosphorylation de pRB (protéine du rétinoblastome) et donc une inhibition de la progression du cycle cellulaire (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003 ; Butt *et al.*, 2005). Le rôle majeur de l'E2 sur la progression du cycle cellulaire est donc son effet sur la cycline D1 et sur c-myc (Mawson *et al.*, 2005), qui entraîne l'activation du complexe cycline E/CDK2 (Figure 10)

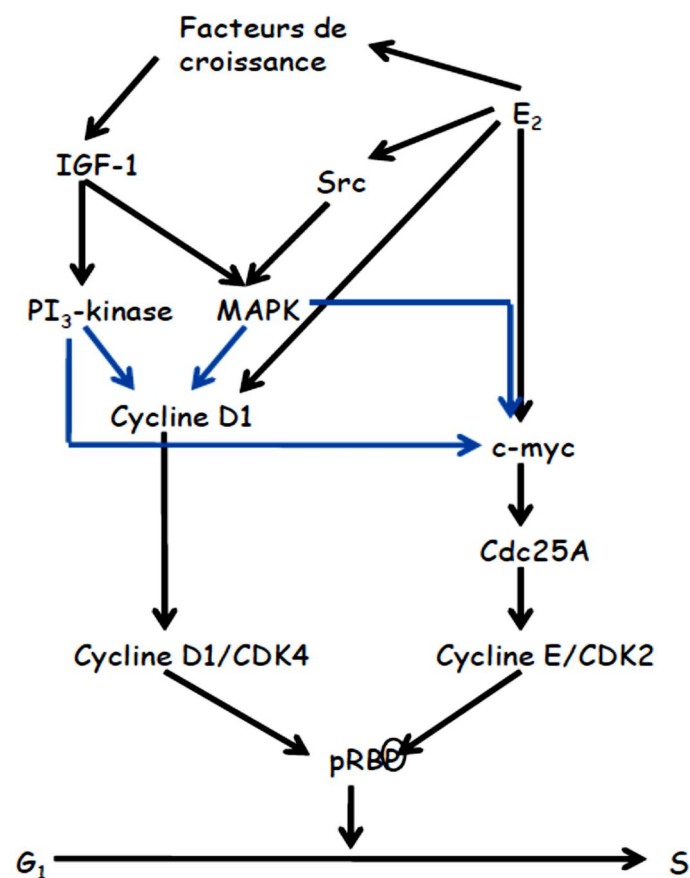


Figure 10: Implication de l'œstradiol dans la progression du cycle cellulaire dans les cellules du sein (Mawson *et al.*, 2005).

I.2.9 Implication du stress dans le développement du cancer du sein

La figure 11 montre le déséquilibre de l'homéostasie rédox des cellules cancéreuses. Le stress oxydant résulte de la rupture de l'homéostasie rédox. À l'état physiologique, la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. Toutefois un apport exogène des EAO (espèces actives de l'oxygène) ou radicaux libres (RL) ou dérivés réactifs de l'oxygène,

une surproduction endogène des EAO ou une défaillance des systèmes antioxydants, conduisent au déséquilibre de la balance rédox en faveur des pro-oxydants. Les cellules sont toutes capables de faire face à ce déséquilibre de manière ponctuelle en activant une réponse génique antioxydante. En ce qui concerne les cellules cancéreuses, le déséquilibre durable de la balance rédox est lié à la production permanente des EAO. Les mécanismes de compensation mis en place par la cellule tumorale ne parviennent pas à rétablir un taux normal des EAO mais évitent un déséquilibre létal pour la cellule. Une telle modification du potentiel rédox favorise la prolifération et la survie cellulaire (Goudable et Favier, 1997 ; Mikkelsen et Wardman, 2003; Migdal, 2011). Les EAO endossent le rôle d'initiateur tumoral (mutations du génome) et de promoteur tumoral (mutations additionnelles, mécanismes épigénétiques). De nombreuses preuves s'accordent sur l'implication d'une augmentation chronique des EAO dans la transformation cellulaire vers un phénotype tumoral et leur participation à la progression cancéreuse par amplification de l'instabilité génomique (Wallace, 2005).

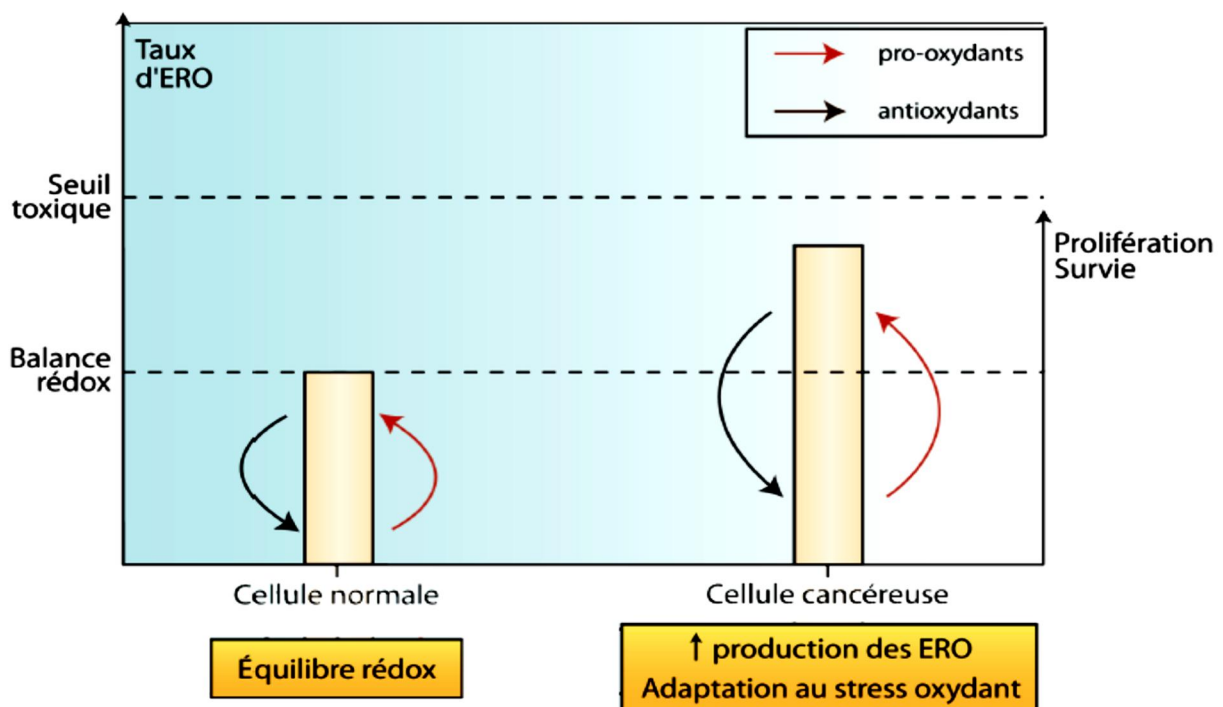


Figure 11: Déséquilibre de l'homéostasie rédox des cellules cancéreuses (Migdal, 2011).

I.2.10 Modèles de cancérogenèse mammaire

I.2.10.1 Modèle de xénogreffe

Les tumeurs de xénogreffe sont produites en injectant des lignées cellulaires humaines ($0,5$ à 5×10^6 cellules) dans la peau (sous-cutanée) ou dans le tissu adipeux mammaire d'une

souris immunodéprimée. Isaacson et Cattanach, 1962 ont été les premiers à signaler que certaines lignées cellulaires de cancer du sein humain forment des tumeurs chez des souris immunodéficientes. Cependant, les procédures étaient compliquées et peu utilisées jusqu'à l'introduction de la souris nude mutante. Récemment, les souris nudes (Foxn1) et les souris à immunodéfiance combinée sévère (SCID) sont les modèles de recherche les plus couramment utilisés dans les expériences de xéno greffe. Ces types de modèles animaux ont des mutations monogéniques naturelles qui affectent leur système immunitaire. Les nudes ont une mutation récessive autosomique du chromosome 11 qui provoque un échec de la croissance des cheveux et d'autres défauts, y compris la dysgénèse épithéliale thymique, ce qui les rend déficients en lymphocytes T (Kindred, 1971). La souris SCID a une mutation spontanée inactivant l'ADN protéine kinase entraînant le manque de cellules T fonctionnelles et de cellules B (Bosma et Carroll, 1991 ; Nakajima et Bosma, 2002). Les modèles de xéno greffes sont utilisés pour étudier les différentes étapes de la formation et de la progression tumorale (signature génétique, interaction avec le microenvironnement tumoral et métastases) (Vargo-Gogola et Rosen, 2007). Les échantillons de maladies préinvasives (carcinome canalaire in situ) ont montré un meilleur succès dans les modèles de xéno greffes (Gandhi *et al.*, 2000 ; Chan *et al.*, 2002).

I.2.10.2 Modèle de cancer du sein induit par les radiations

Le tissu mammaire est l'un des tissus les plus sensibles aux faisceaux de rayonnements ionisants. Le surdosage de rayonnement et les heures supplémentaires induisent le développement de tumeurs (Ito *et al.*, 1991). Les femmes de moins de 20 ans exposées aux rayonnements ionisants sont plus à risque de développer le cancer du sein radio-associé que celles exposées à un âge avancé. Les femmes de plus de 50 ans lors de l'exposition n'ont pas de risque accru mesurable de cancer du sein. Des dommages à l'ADN surviennent après ce rayonnement, et l'ADN endommagé à son tour peut développer des cellules tumorales (Ronckers *et al.*, 2004). Dunlap *et al.* (2010) ont découvert qu'une dose de rayonnement > 1,0 Gy au sein controlatéral (CB) présentait un risque élevé et à long terme de développer un deuxième cancer CB primaire. Cette technique implique généralement l'utilisation de souris Balb/c pour l'induction de tumeurs. Une étude a montré que la radiothérapie à 35 Gy/min pouvait augmenter la probabilité de développement d'une tumeur après 12-14 mois (Imaoka *et al.*, 2009). L'induction de tumeurs dans cette technique dépend du poids et de l'âge de l'animal à l'étude. Une étude a inclus la comparaison du type d'animal et du type de rayonnement (photon, plutonium, neutron et ions lourds) en termes de développement tumoral, concluant

que l'œstrogène avec des faisceaux ionisants produit un effet synergique (Zhang *et al.*, 2005). Calaf et Hei (Calaf et Hei, 2000) ont montré qu'une dose de 30 cGy de particules α a le potentiel de développer des tumeurs qui pourraient se développer chez la souris sans glande thymique. Wazer *et al* (Wazer *et al.*, 1994) ont étudié la croissance cellulaire, la transformation, le caractère invasif et la tumorigénicité de la lignée cellulaire MCF-10F par rayonnement de particules α . Ils ont également évalué l'expression des gènes BRCA1 et BRCA2 en tant que marqueurs de tumeurs mammaires, en utilisant une dose de 60 cGy de particule α pour induire des tumeurs dans cette lignée cellulaire. De plus, des rayons gamma ont été appliqués pour surveiller la transformation dans les lignées de cellules épithéliales de tumeurs mammaires, dans lesquelles l'expression du gène P53 a également été évaluée (Rangarajan *et al.*, 2004). Après exposition aux rayonnements, les rats ont été traités avec des hormones promotrices de tumeurs (diéthylstilbestrol ou œstrogène) pour raccourcir la latence et augmenter la quantité de tumeurs disponibles pour l'étude (Ronckers *et al.*, 2004).

I.2.10.3 Modèle chimio-induit

Plusieurs produits chimiques ont induit des tumeurs mammaires [en particulier le DMBA (7,12-diméthylbenz (a) anthracène), le MNU (N-méthyl – N-nitrosourée) et la Phip (2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo (4,5-b) pyridine)] dans différentes souches à différentes doses selon la voie d'administration (Russo et Russo, 1996 ; Nakatsugi *et al.*, 2000). Le DMBA et le MNU induisent des cancers mammaires chez des rats femelles Sprague-Dawley. D'autres espèces de rats comme les rats Fisher ou Wistar Furth ont été étudiés comme modèles animaux possibles pour induire des cancers mammaires (Ip, 1996). Les deux cancérigènes induisent un adénocarcinome mammaire avec une seule dose. L'induction tumorale est spécifique à la glande mammaire. La dépendance à la dose est bien établie et les tumeurs se développent sans aucune toxicité systémique. Les deux modèles sont extrêmement reproductibles. La multiplicité peut également être ajustée avec une dose de cancérigène. Il existe cependant des différences fondamentales: par exemple, le DMBA appartient à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques et nécessite une activation métabolique qui dépend de systèmes mono-oxygénases liés au cytochrome P450. Les principaux métabolites produits par ce carcinogène sont capables de former des dérivés d'époxyde. Le modèle est plus adapté à l'étude de l'initiation et de la promotion ou à l'évaluation des effets d'agents susceptibles d'affecter les paramètres du métabolisme et de l'activation cancérigènes. Le MNU est un cancérigène à action directe et n'est pas bien adapté à l'étude de l'activité spécifique à un stade d'une chimioprévention. Les tumeurs mammaires induites par la MNU

sont en grande partie des adénocarcinomes, tandis que les tumeurs induites par le DMBA se composent de 60% d'adénocarcinomes et de 40% de fibroadénomes bénins (McCormick *et al.*, 1981). Ainsi, les tumeurs induites par le DMBA nécessitent une histopathologie pour confirmer l'incidence du carcinome. Enfin, contrairement au DMBA, les tumeurs induites par la MNU sont localement invasives et se métastasent vers des sites distants. Les modèles de souris et de rats ont montré une dépendance hormonale des tumeurs mammaires induites chimiquement.

I.2.10.4 Modèle génétiquement modifiés et transgéniques

Les animaux génétiquement manipulés sont générés par des technologies transgéniques de ciblage génique (knockout) et combinées (Kim *et al.*, 2004; Sadanandam *et al.*, 2011). Ils ont aidé à comprendre la fonction et la régulation des gènes au niveau moléculaire dans l'ensemble de l'organisme. Ils ont également amélioré l'exploration de la pathogenèse des tumeurs du sein via l'induction de mutations uniques et multiples dans les régulateurs codant pour les gènes des facteurs de croissance, la transduction du signal, le cycle cellulaire, la différenciation, les métalloprotéinases matricielles et les voies apoptotiques. De plus, ce sont des candidats utiles pour les évaluations thérapeutiques. Bien que les souris génétiquement modifiées (GEM) présentent des différences fondamentales au niveau de l'organisme et de la cellule, elle est conçue pour reproduire des aspects très spécifiques de la formation et de la progression tumorale basée sur la connaissance de la génétique tumorale humaine. Cependant, la pertinence du milieu génétique (type, ampleur et origine) doit être prise en compte. Plusieurs promoteurs ont été utilisés pour stimuler l'expression des oncogènes dans l'épithélium mammaire afin d'initier (modèle de souris transgéniques doubles) ou de moduler la cancérogenèse mammaire ou de développer des métastases (indépendamment ou en fonction de la supplémentation hormonale ou de la grossesse) dans les ganglions pulmonaires et lymphatiques chez la souris (Kavanaugh et Green, 2003 ; Kim *et al.*, 2004; Sadanandam *et al.*, 2011). Il a été démontré que la GEM est affectée par le promoteur utilisé et les souches de fond, qui affectent à leur tour la morphologie et la latence tumorales (Kavanaugh et Green, 2003). Tous les tissus et cellules sont porteurs du même défaut dans la plupart des modèles de désactivation des gènes transgéniques et suppresseurs de tumeurs, ce qui ne reproduit pas la situation réelle mais le cancer familial humain. Des promoteurs spécifiques au type cellulaire ont été introduits pour surmonter ce problème. Outre le fait que ces approches à elles seules sont limitées par leur dépendance hormonale, plusieurs autres modèles (perte du RE,

amplifications HER-2 et mutations BRCA1) ont été développés et qui imitent ceux du cancer du sein humain (Kavanaugh et Green, 2003 ; Kim *et al.*, 2004; King et Robins, 2006).

I.2.11 Prévention et traitements du cancer du sein

I.2.11.1 Prévention

Les mesures de prévention du cancer du sein recommandées par l’OMS sont : l’élaboration d’une feuille de route claire visant à renforcer la prévention ; un dépistage précoce ; une thérapie et des soins palliatifs appropriés et dispensés en temps utile ; l’enregistrement et la surveillance du cancer du sein ; l’adoption des modes de vie sains (OMS, 2012).

I.2.11.2 Traitements

Plusieurs traitements sont proposés pour lutter contre le cancer du sein selon les caractéristiques de la lésion. On peut citer : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l’hormonothérapie, les traitements ciblés et l’immunothérapie (Mongis, 2017). Ils sont utilisés soit en monothérapie, soit en combinaison pour éliminer les cellules cancéreuses plus efficacement.

I.2.11.2.1 Chirurgie

C’est une technique qui consiste à enlever non seulement la tumeur ou l’organe atteint, mais aussi une marge de tissus sains autour de la tumeur et les ganglions voisins. Elle est plus utilisée dans le cas des tumeurs solides, elle permet d’enlever le foyer principal, mais il persiste souvent une possibilité de maladie résiduelle, c’est pourquoi on l’associe souvent à la chimiothérapie et/ou radiothérapie qui quelquefois sont même réalisées avant l’acte chirurgical (Institut national du cancer, 2013).

I.2.11.2.2 Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement également pratiqué pour éliminer les cellules tumorales par l’application de radiations ionisantes tout en préservant autant que possible les tissus sains et organes environnants. Les rayonnements provoquent des lésions au niveau de l’ADN surtout dans les cellules en division et encore plus dans les cellules tumorales qui ont une capacité réduite à réparer leur ADN. Ces nouvelles mutations empêchent les cellules de se multiplier et entraînent leur mort par apoptose ou nécrose. Les cellules tumorales sont ainsi éliminées par les phagocytes et les macrophages environnants. Il existe deux types de radiothérapie : la téléradiothérapie et la curiothérapie. Chaque radiothérapie est personnalisée,

elle dépend du patient et de la localisation de la tumeur (tumeur profonde ou superficielle). La téléradiothérapie est le mode de traitement le plus fréquemment utilisé ; il permet d'irradier la tumeur à distance soit avec des rayonnements électromagnétiques indirectement ionisants (rayons X, rayons gamma), soit avec des rayonnements particuliers (électrons, neutrons, protons, particules alpha, ions carbone). La curieradiothérapie se fait quant à elle par voie interne, elle nécessite d'implanter directement soit dans la tumeur, soit en contact avec celle-ci, des sources d'isotopes radioactifs (^{192}Ir , ^{137}Cs) scellées sous forme de grains (Mongis, 2017).

I.2.11.2.3 Chimiothérapie

La chimiothérapie est une technique de traitement qui consiste à utiliser des substances toxiques pour les cellules cancéreuses permettant de les détruire ou d'inhiber leur croissance. La chimiothérapie est administrée par voie intraveineuse, orale ou directement sur le tissu touché. Les effets secondaires de ce traitement sont: perte d'appétit, nausées et vomissements, constipation ; fatigue ; troubles cardiaques ; baisse des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes sanguines ; lésions de la bouche et réactions allergiques. Les molécules utilisées peuvent être classées en différentes familles en fonction de leur mode d'action : antimitotiques, agents alkylants, anti-métabolites ou encore inhibiteurs de topoisomérase (enzymes assurant la spiralisation/déspiralisation de l'ADN). Toutefois, les tumeurs ne sont pas toujours complètement sensibles aux chimiothérapies. Ainsi, suivant les cas, la chimiothérapie aura une place plus ou moins importante avec les autres types de traitement (chirurgie, radiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie) (Klug *et al.*, 2010).

I.2.11.2.4 Hormonothérapie

L'efficacité de l'hormonothérapie n'est avérée que sur des cellules tumorales exprimant en forte quantité les RE et les RP (Bush, 2007). Dans le cas des cellules tumorales exprimant les RP, des progestatifs de synthèse sont utilisés pour les stades avancés de cancer du sein. Les molécules les plus utilisées sont le mégestrol ou la médroxyprogestérone. En moyenne, 30 à 50% des cancers répondent à ce type de traitement. Les ovaires étant la majeure source d'œstrogènes chez la femme pré-ménopausée, une drogue agoniste de la GnRH peut être utilisée afin de bloquer la production d'œstrogènes par les ovaires (castration pharmacologique réversible). Les molécules utilisées sont la goséreline ou la leuprolide. Une autre alternative pour un traitement hormonal est l'utilisation d'inhibiteurs d'aromatases, visant à diminuer la production œstrogénique, puisqu'elles sont responsables de la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes. Plusieurs générations d'anti-aromatases se sont

succédées, mais les inactivateurs de troisième génération se sont progressivement imposés comme hormonothérapie de référence. Il existe deux types d'agents de troisième génération : les inactivateurs stéroïdiens, qui bloquent irréversiblement le site de fixation de l'androsténone à l'aromatase et les inhibiteurs non stéroïdiens, qui se fixent réversiblement à l'hème du cytochrome P450, coenzyme du complexe à activité aromatase. Ces inhibiteurs d'aromatases ne sont recommandés que chez les femmes ménopausées, leurs effets chez les femmes pré-ménopausées n'étant pas encore connus (Bush, 2007). Enfin, une autre stratégie vise à bloquer les effets des œstrogènes sur les cellules cancéreuses, sans pour autant diminuer les concentrations circulantes d'œstrogènes. Pour cela, les molécules utilisées sont les Modulateurs Sélectifs des Récepteurs aux Œstrogènes (MSRO). La molécule de référence pour le traitement des cancers du sein est à l'heure actuelle le tamoxifène, qui bloque l'action des œstrogènes en se liant aux RE (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000).

I.2.11.2.5 Thérapies ciblées

Les progrès réalisés dans le traitement du cancer ont orienté la recherche actuelle vers les thérapies ciblées. Ce sont des médicaments ou autres substances telles que des anticorps monoclonaux permettant d'identifier et d'attaquer des cellules cancéreuses spécifiques (Bouche *et al.*, 2013). Ces méthodes thérapeutiques sont capables de redonner aux cellules cancéreuses des caractères normaux (traitement redifférenciant) et des traitements visant à bloquer les facteurs de croissance tumorale et favoriser la formation de vaisseaux nouveaux dans le tissu tumoral. Dans ce domaine, des succès réels ont été obtenus récemment dans certains types de leucémie (Reece *et al.*, 2012). Le trastuzumab par exemple est un médicament efficace chez les patientes atteintes de tumeurs HER2 positives, indépendamment de la taille de la tumeur et de son statut hormonal. Toutefois, le trastuzumab ne peut pas être donné à des patientes ayant des problèmes cardiaques, vu son effet toxique pour le cœur (Bouche *et al.*, 2013 ; Duperray *et al.*, 2016).

I.2.11.2.6 Immunothérapie

L'immunothérapie est une thérapie relativement nouvelle, elle vise à éliminer les cellules tumorales en stimulant le propre système immunitaire du patient cancéreux. En effet, les cellules tumorales sont des cellules du soi et de ce fait peu antigéniques ou pas reconnues par le système immunitaire d'où la nécessité de renforcer ce dernier pour qu'il détecte plus efficacement les cellules tumorales à détruire. Il existe différentes types d'immunothérapies : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active. L'immunothérapie passive repose sur l'utilisation d'agents immunologiques qui vont cibler directement les cellules tumorales. Elle

est basée soit sur l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes tumoraux, soit sur le transfert de lymphocytes T dirigés directement contre les cellules tumorales. L'immunothérapie active consiste à solliciter directement le système immunitaire du patient. L'immunothérapie active peut être spécifique (vaccins anti -cancéreux) ou non spécifique (injection de cytokines ou de produits extraits de micro-organismes pathogènes). Parmi les modulateurs du système immunitaire, les cytokines et certains facteurs de croissance peuvent favoriser ou inhiber la croissance tumorale. Les cytokines peuvent ainsi être utilisées pour le traitement de certains cancers. En effet, l'IFN γ peut diminuer la prolifération des cellules tumorales, activer les réponses lymphocytaires T et les cellules dendritiques. L'IFN- γ peut également être utilisé comme un adjuvant dans des vaccinations antitumorales (Mongis, 2017).

I.2.11.2.7 Chimio-prévention du cancer du sein

La chimio-prévention consiste à utiliser les substances d'origine naturelle et/ou synthétique pour tenter de supprimer ou d'inverser le processus de la cancérogenèse (Shu *et al.*, 2010). Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation régulière de fruits, de végétaux et de betteraves réduit le risque de développement du cancer du sein et par conséquent augmente la survie des patients avec ce cancer (Song et Bae, 2013 ; Gaascht, 2013). Un nombre importants d'études *in vitro* ont montré que les extraits bruts de quelques plantes médicinales exercent un effet cytotoxique sur différentes lignées de cellules cancéreuses (Jo *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2010; Rakhi *et al.*, 2011). Plusieurs métabolites secondaires sont présents dans des plantes parmi lesquels les polyphénols. Les composés polyphénoliques renferment un ou plusieurs noyaux aromatiques et groupements hydroxyles. Ils sont présents sous forme de phénols simples, flavonoïdes et tanins. Ils possèdent plusieurs propriétés biologiques parmi lesquelles des propriétés anti-oxydantes et anticancéreuses. Les flavonoïdes, composés polyphénoliques majoritaires sont considérés parmi les molécules bioactives les plus importantes (Ayman *et al.*, 2012 ; Rizwan *et al.*, 2016). Les effets anticancéreux des composés polyphénoliques en général et des flavonoïdes en particulier seraient dus à leur pouvoir antioxydant et à leur capacité à interférer avec les voies de régulation cellulaire comme celles de la croissance cellulaire, du métabolisme énergétique, de l'apoptose, de la division cellulaire, des réparations génétiques et de l'inflammation (Lamoral-Theys *et al.*, 2010 ; Justina *et al.*, 2016).

Plusieurs études scientifiques ont confirmés les bienfaits des plantes médicinales dans la prévention du cancer du sein (Zingue *et al.*, 2016 ; Silihe *et al.*, 2017 ; Zingue *et al.*, 2018).

Ces plantes sont en général riches en phytoestrogènes. Les phytoestrogènes constituent un ensemble de composés ayant un rôle déterminant dans la prévention des cancers du sein, du colon et de la prostate (Messina *et al.*, 1994 ; Barnes, 1995). C'est un groupe de composés naturels non stéroïdiens dérivés des plantes. Les phytoestrogènes présentent des similarités structurales avec le 17- β -oestradiol. De ce fait, ils sont capables d'induire des effets œstrogéniques et/ou anti-œstrogéniques (Halabalaki *et al.*, 2006; Djiogue *et al.*, 2010). Ces effets anti-œstrogéniques seraient bénéfiques pour la prévention des cancers du sein œstrogéno-dépendants ((Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000). En plus des flavonoïdes d'autres phytoestrogènes existent à savoir les coumestanes, les lignanes ou entérolignanes, les stilbènes (Djiogue *et al.*, 2014). Ces phytoestrogènes sont retrouvés dans une variété d'espèces végétales consommées par l'Homme comme les fruits et légumes à l'exemple du soja, des pois, du haricot, du citron, le trèfle-rouge, certains tubercules tel que l'igname sauvage du Mexique et le manioc (Umland *et al.*, 2000). Les recherches sur les agents anticancéreux d'origine naturelle sont d'un intérêt grandissant tant dans les pays développés que dans les pays en développement.

I.3 *Anthonotha macrophylla* P.Beauv

I.3.1 Taxonomie

Anthonotha macrophylla P.Beauv est une espèce décrite en 1806 par Palisot de Beauvois (Palisot, 1806).

Sa position systématique est la suivante :

Règne.....Plantae
 Embranchement.....Angiosperme
 Division.....Magnoliophyta
 Classe..... Magnoliopsida
 Sous-classe..... Rosidae
 Ordre.....Fabales
 Famille..... Caesalpiniaceae
 Genre..... Anthonotha
 Espèce..... *Anthonotha macrophylla*

I.3.2 Caractéristiques botaniques

La figure 12 représente la plante *Anthonotha macrophylla*. *A. macrophylla* est un arbre atteignant 20 m de haut. Son écorce externe de couleur grisâtre (D) est légèrement fissurée et se desquame, tandis que son écorce interne, de couleur orange-brun (B) sécrète un exsudat brun. Ses feuilles composées paripennées (A et C), sont disposées en spirale. Le fruit (E) a la forme d'une gousse renfermant jusqu'à 7 graines (Burkill, 1985).

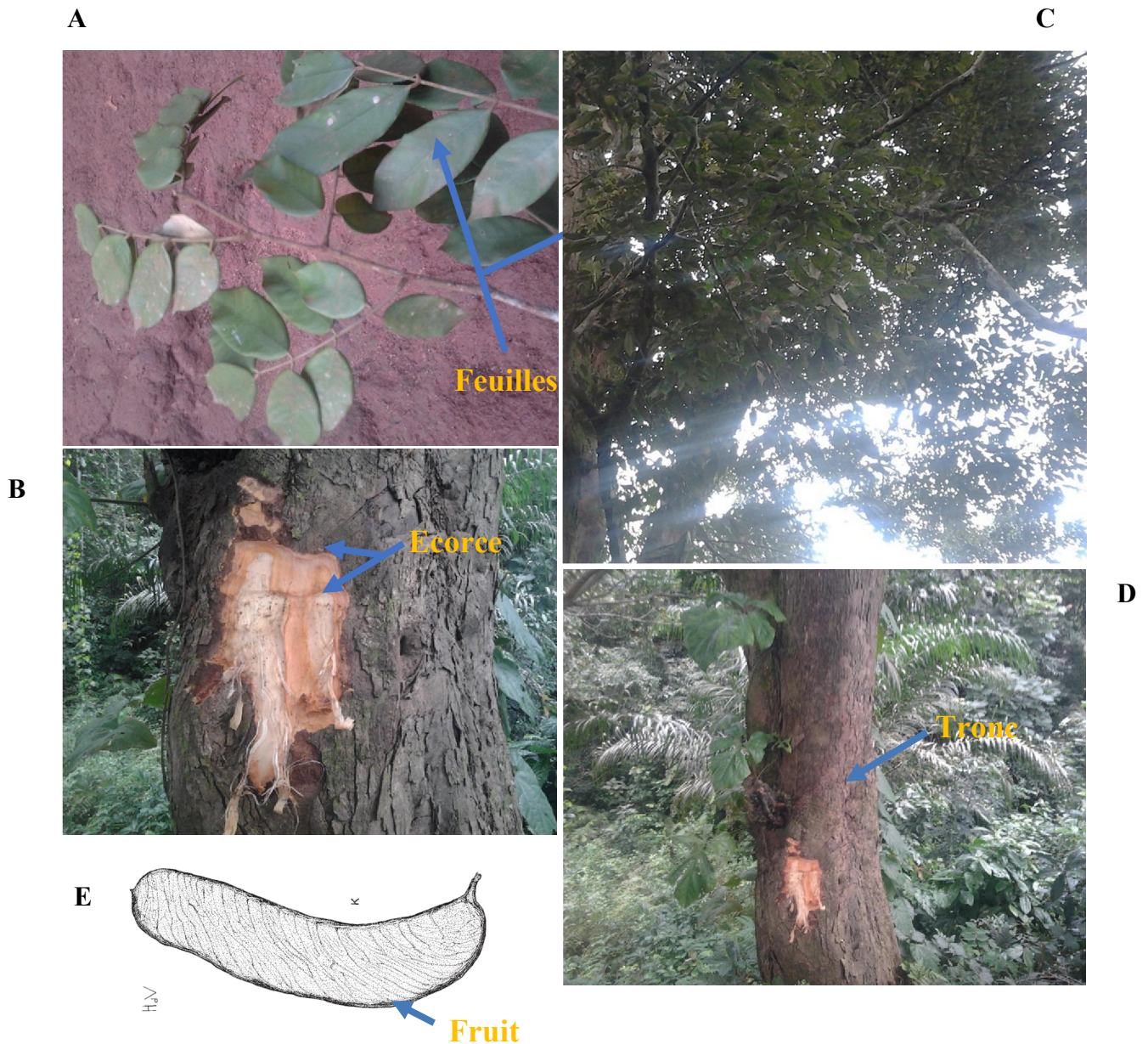


Figure 12: Différentes parties de *Anthonotha macrophylla*. Photos prise à Yato (Mungo) au mois d'août 2015 par NANBO GUEYO Telesphore.

I. 3.3 Synonymes et noms vernaculaires

La plante *Anthonotha macrophylla* a pour synonyme *Macrolobium macrophyllum* (P.Beauv.) (Macbride, 1919). Son nom vernaculaire varie en fonction des pays et des langues (Tableau I). Au Cameroun, dans la localité de yato, on l'appelle réré à long fruit.

Tableau I: Noms vernaculaires de *Anthonotha macrophylla* (Burkill, 1985)

<i>Langues (pays)</i>	<i>Appelations</i>
<i>Igbo (Nigéria)</i>	« <i>Ububa-ikpa</i> »
<i>Yor (Nigeria)</i>	« <i>Abara</i> »
<i>Furudugu (Sierra-Léone)</i>	« <i>Gola kpani</i> »
<i>Français</i>	- <i>Palissandre d'Afrique</i> - <i>Réré à long fruit</i>

I.3.4 Répartition géographique et usages traditionnels

Anthonotha macrophylla est une plante retrouvée dans plusieurs pays d'Afrique à savoir : la Guinée Conakry, le Nigéria, la Sierra-Léone, la Centrafrique, la RDC, le Gabon et l'Angola. Au Cameroun, on retrouve *Anthonotha macrophylla* dans des régions du centre, sud, littorale et sud-ouest.

La plante *Anthonotha macrophylla* est traditionnellement employée pour son bois dans la cuisson des aliments et le fumage du poisson dans certaines parties du Nigeria. Au Liberia, les graines sont consommées. Dans l'est du Nigeria, *Anthonotha macrophylla* est plantée sur les terres en jachère pour restaurer la fertilité du sol. En Sierra Leone, l'infusion de feuilles et d'écorce se boit en cas de jaunisse (Burkill, 1985). On frictionne les furoncles avec un cataplasme de feuilles pour soulager la douleur et favoriser la formation de pus. Les feuilles soignent la dysenterie et les morsures de serpents tandis que la décoction de feuilles se boit pour atténuer les maux de dents. Au Liberia, on applique un cataplasme de feuilles sur les brûlures. En Côte d'Ivoire comme au Nigéria, la décoction d'écorces se boit pour soigner le paludisme (Burkill, 1985). Au Cameroun, plus précisément dans la localité de Yato (région du littorale), la décoction d'écorces du tronc de *Anthonotha macrophylla* est utilisée contre les douleurs et les nodules au niveau du sein.

I.3.5 Etudes scientifiques antérieures

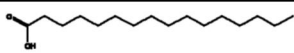
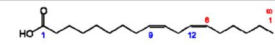
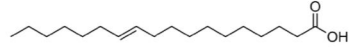
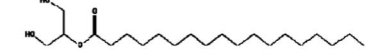
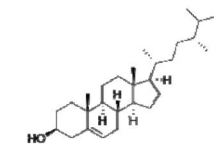
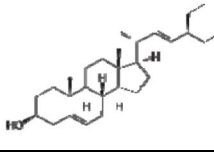
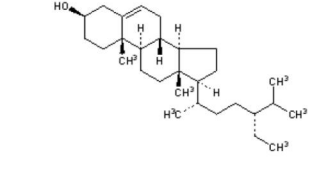
I.3.5.1 Activités biologiques

Des études ont montré que les extraits éthanolique et aqueux de *Anthonotha macrophylla* possèdent des activités antiplasmodiales *in vitro* ($IC_{50} = 43,2 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$) (Zirihi *et al.*, 2010) et aphrodisiaque *in vivo* (Yakubu et Olutoye, 2016).

I.3.5.2 Investigation phytochimique

La GC-MS de l'extrait méthanolique des graines du fruit de *Anthonotha macrophylla* a montré qu'il contient les acides n-hexadécanoïque, n-octadécadiénoïque, cis-vaccénique, octadécanoïque, hexadécanoïque, campestérol, stigmastérol et gamma-sitostérol (Ugoeze *et al.*, 2014) (Tableau II). Plusieurs techniques chromatographiques (TLC, HPLC) ont permis également d'isoler et de caractériser plusieurs phytoconstitués de l'extrait méthanolique des feuilles de *Anthonotha macrophylla*. Il s'agit des alcaloïdes (6 composés), des alcanes (2 composés), des esters d'acides gras (3 composés), des isocoumarines (2 composés), des stérols (6 composés) et des disaccharides (7 composés) (Kinyok *et al.*, 2021)

Tableau II: Phytoconstitués identifiés dans l'extrait méthanolique de *Anthonotha macrophylla* (Ugoeze *et al.*, 2014)

Phytoconstitués	Structure
Acide n-hexadécanoïque	
n-octadécadiénoïque	
cis-vaccénique	
Octadécanoïque	
Campestérol	
Stigmastérol	
gamma-sitostérol	

Plusieurs techniques chromatographiques (MPLC, HPLC, CPC, GCMS) ont permis d'identifier et de caractériser les phytoconstitués présents dans l'extrait de *Anthonotha macrophylla*.

I.4 Techniques chromatographiques

La chromatographie est une technique d'analyse pour séparer les constituants d'un mélange en phase liquide ou gazeuse. On distingue plusieurs techniques chromatographiques : HPLC, MPLC, CPC et GCMS.

I.4.1 Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

D'une manière générale la HPLC, qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus souvent utilisée, car elle présente de nombreux avantages tels que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection.

I.4.2 Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (MPLC)

Cette technique de séparation, à mi-chemin entre la LPLC (Chromatographie Liquide à Basse Pression, 3 bars) et la HPLC permet de fractionner en une analyse plusieurs grammes d'un mélange complexe, avec une résolution convenable. En MPLC, la pression de travail est comprise entre 15 et 20 bars. Le montage se compose généralement d'un système de pompes, d'un système de détection UV à longueur d'onde fixe, d'un enregistreur et d'un système de collecte d'échantillons.

I.4.3 Chromatographie par Centrifugation de Partage (CPC)

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative qui utilise un système de solvant biphasique et pas de phase stationnaire solide (Macuik *et al.*, 2004). De ce fait, la séparation des molécules est basée sur leur différence de partage entre les deux phases liquides non miscibles. D'une manière simplifiée, une colonne CPC est constituée d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partage reliées entre elles par des capillaires.

I.4.4 Chromatographie Liquide (LCMS) ou Gazeuse (GCMS) couplée à la Spectroscopie de Masse

Tout comme la HPLC, la chromatographie liquide (LC) possède une gamme étendue de phases stationnaires alors que dans la chromatographie en phase gazeuse (GC), les composés volatiles sont transportés par un gaz (phase mobile : H₂, N₂, Ar ou He) au travers de la colonne (généralement capillaire, phase solide), où la séparation se fait par un processus d'adsorption/désorption (CDER, 1995). Cependant la chromatographie en phase liquide reste de loin la technique la plus utilisée (Allwood et Goodacre, 2010). La GC-MS (couplée à un détecteur de spectrométrie de masse) est particulièrement adaptée à l'analyse des molécules de faibles poids moléculaire et/ou à caractère hydrophobe facilement volatilissables.

Certains phytoconstitués des plantes peuvent induire des effets cytotoxiques sur des lignées de cellules cancéreuses. Ces effets sont bénéfiques pour le traitement du cancer.

I.5 Cytotoxicité

La cytotoxicité représente l'un des indicateurs les plus importants pour l'évaluation biologique dans les études *in vitro*. Les substances testées 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).

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

- Le type cellulaire utilisé pour l'expérimentation ;
- Le nombre de cellules à tester afin d'obtenir une réponse physiologiquement recevable et reproductible ;
- Le système de mesure qui permettra de quantifier l'effet sur la culture ;
- La durée de l'exposition à la drogue et les concentrations à tester.

Les principales méthodes utilisées dans les études de cytotoxicité sont les méthodes colorimétriques et les méthodes fluorométriques.

I.5.1 Méthodes colorimétriques

Les tests colorimétriques sont basés sur la mesure d'un marqueur biochimique dans le but d'évaluer l'activité métabolique des cellules. Les plus utilisés sont les tests de MTT et de MTS pour les tests de cytotoxicité.

I.5.1.1 MTT

Le test MTT (bromure de 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2-5-diphényltétrazolium) est l'un des tests colorimétriques les plus couramment utilisés pour évaluer la cytotoxicité ou la viabilité cellulaire (Mosmann, 1983). 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).

I.5.1.2 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.5.2 Méthodes fluorométriques

Le test fluorométrique le plus utilisé est celui d' « AlamarBlue ».

❖ Test d' « AlamarBlue »

Le test d'AlamarBlue encore connu sous le nom de réduction de la résazurine, est basé sur la conversion du colorant bleu non fluorescent résazurine, en rose fluorescent, résorufine par les enzymes mitochondriales et d'autres enzymes telles que les diaphorases (O'brien *et al.*, 2000) ; la quantité de résorufine 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.

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Les écorces du tronc de *Anthonotha macrophylla* ont été récoltées le 15 Aout 2015 dans la localité de Yato (Département du Mungo, Région du Littoral). Le matériel végétal a été identifié à l'Herbier National du Cameroun (HNC) par comparaison à un échantillon déposé et référencé sous le numéro 37148 HNC.

II.1.2 Lignées cellulaires

Les cellules MCF-7 (cellules d'adénocarcinome du sein humain ER⁺), MDA-MB-231 (cellules d'adénocarcinome du sein ER négatif), HMEC (cellules normales mammaires), SK-MEL-28 (cellules de mélanome humain), HUVEC (endothélium de la veine ombilicale humaine), MCR-5 (cellules de fibroblastes de poumon foetal humain), 4T1 (cellules tumorales mammaires de souris) et SF-295 (cellules de glioblastome humain) ont été obtenues de la banque de cellules de Rio de Janeiro (Université de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brésil) et de l'hôpital universitaire de Frankfurt, Allemagne.

II.1.3 Animaux

Les animaux utilisés dans ce travail étaient des rates albinos pré-pubertaires de souche Wistar, âgées de 30 à 37 jours au début de l'expérience et pesant entre 49 et 55 g. Ces animaux ont été élevés dans des cages en plastiques à température ambiante au Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I, à raison de 5 rates par cage. Ces animaux avaient libre accès à l'eau de robinet et étaient nourris à la provende pour rat (composition de notre équipe de recherche) dont la composition est consignée dans le tableau III. Les soins apportés aux rats, de même que les différents traitements ont été effectués en suivant les directives de l'Union Européenne sur les soins des animaux (Conseil CEE 86/609).

Tableau III: Composition de l'alimentation standard du laboratoire de Physiologie Animale

Composition de la provende	Proportion
Farine de maïs	42%
Farine de blé	20%
Farine de poisson	20%
Arachide	9%
Tourteaux de palmiste	5,3%
Farine d'os	3%
Premix (concentré de vitamines et sels minéraux)	0,7%

II.1.4 Substances pharmacologiques et réactifs

Le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) a été obtenu de Sigma-Aldrich (Stanford, Allemagne); le benzoate de 17 β -estradiol (Estr-1, 3,5 (10) -trien-3,16 α , 17 β -triol) a été obtenu de Sigma-Aldrich (Hambourg, Allemagne); le bleu trypan, le sulforodamine B, le bleu Alamar et les milieux de culture cellulaire ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le citrate de tamoxifène (Mylan®) a été acheté à MYLAN SAS (Saint-Priest, France). L'œstradiol valerate (E2V) a été obtenu de DELPHARM (Lille, France). Les antibiotiques (pénicilline et streptomycine) ont été achetés chez GIBCO (Island). L'acide 2- [4- (2-hydroxyéthyl) pipérazin-1-yl] éthanesulfonique (HEPES) et la quercétine ont été achetés chez Ludwig Biotecnologia Ltda (Alvorada, RS, Brésil). Le diazépam et la kétamine ont été obtenus de Rotex Medica (Tritau, Allemagne). La Betadine® (MEDA Manufactory, Merignag, France) a été utilisé pour le pansement des animaux après l'ovariectomie.

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla*

La préparation de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla* a été faite à partir des recommandations du tradithérapeute. Pour ce faire, les écorces du tronc de *Anthonotha macrophylla* après la récolte, ont été nettoyées, découpées et séchées à l'ombre. Ces écorces sèches ont été par la suite écrasées à l'aide d'un broyeur à hélice et 4300 g de poudre obtenue ont été portés à ébullition dans 13 litres d'eau pendant 25 minutes. Quarante-neuf grammes (soit 2,07% de rendement) d'extrait brut ont été obtenus après la filtration (à l'aide du papier Wattman N°4) et la lyophilisation de la décoction des écorces (Figure 13).

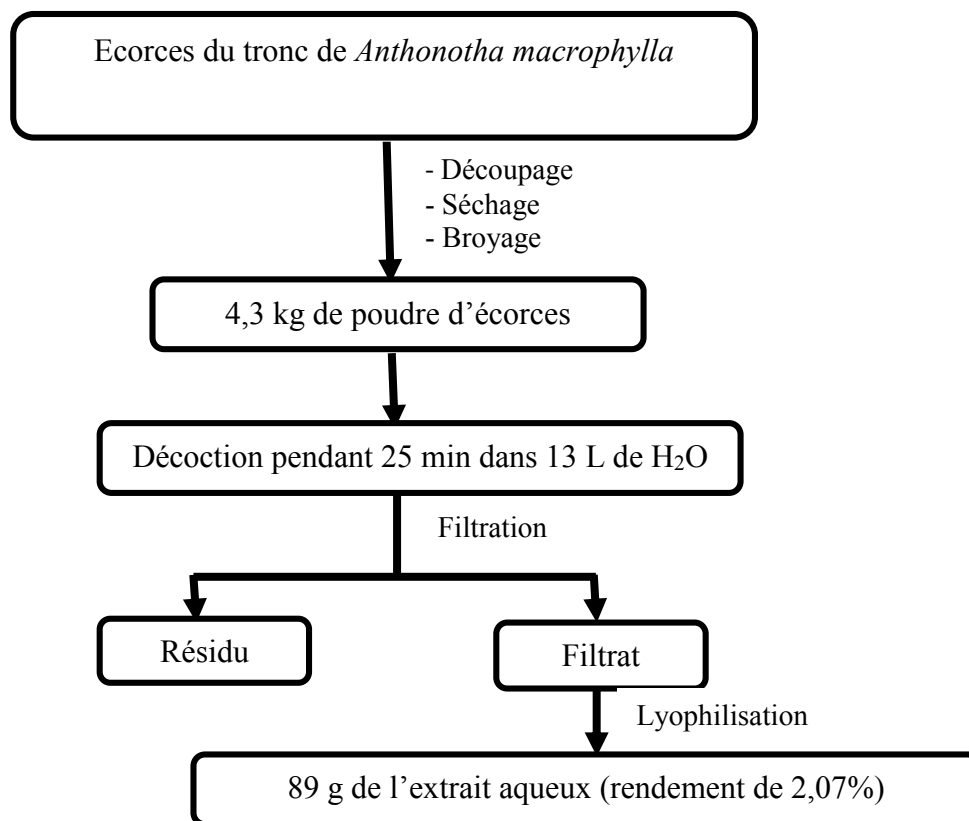


Figure 13: Protocole de préparation de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Anthonotha macrophylla*.

II.2.2 Détermination des doses à administrer aux animaux expérimentaux

La dose pharmacologique de l'extrait de *Anthonotha macrophylla* administrée aux animaux a été extrapolée des indications du tradithérapeute (décoction de 300 g d'écorces dans 1L d'eau). Etant donné que le patient doit boire un verre contenant 190 mL du décocté par jour, la quantité d'extrait sec présente dans un verre a été estimée à 1,710 g. La dose équivalente humaine (HED) calculée pour un individu de 70 kg a été de 24 mg/kg PC. La dose équivalente chez le rat a été calculée à partir de la formule: $NOAL = HED/0,16$ (FDA/CDER, 2005). Cette formule a permis d'obtenir la dose de 150 mg/kg PC à administrer chez le rat. Deux autres doses ont été obtenues à partir de cette dose : 37,5 et 75 mg/kg PC.

II.2.3 Evaluation des effets chimiopréventifs de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* sur le cancer du sein induit par le DMBA

Les effets chimiopréventifs de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* ont été déterminés sur le modèle de cancer du sein induit par le DMBA. La recherche s'est portée sur l'incidence, la charge, le volume et l'analyse histologique des tumeurs du sein. Pour ce faire, 60 rates de souche Wistar âgées de 45 à 52 jours ont été réparties au hasard en six groupes de

10 animaux chacun. Le groupe I servait de témoin normal et le groupe II de témoin négatif (groupe DMBA). Ces deux groupes recevaient de l'eau distillée. Le groupe III servait de témoin positif et recevait le tamoxifène (Mylan®) à la dose de 3,3 mg/kg PC. Les groupes IV, V et VI étaient traités avec l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* aux doses respectives de 37,5, 75 et 150 mg/kg PC. Tous les traitements ont été effectués par gavage intragastrique une semaine avant l'administration du DMBA et se sont poursuivis pendant 7 mois. Les animaux des groupes II à VI ont reçu une unique dose orale de DMBA (70 mg/kg PC) dissous dans l'huile d'olive. Les animaux du groupe I recevaient l'huile d'olive (1 mL/75g). Les animaux étaient pesés chaque semaine et palpés deux fois par semaine en vue de déceler les tumeurs mammaires palpables. Le temps d'apparition des tumeurs a été noté. Les animaux qui mourraient durant l'expérience étaient autopsiés, et ceux devenant morbides étaient sacrifiés et autopsiés. A la fin de traitement, tous les animaux ayant survécu ont été mis à jeun hydrique pendant 12 heures, puis pesés et sacrifiés.

Une partie du sang a été recueillie dans des tubes EDTA (anticoagulant) pour l'analyse hématologique et l'autre partie dans des tubes secs, laissée au repos pendant une heure et centrifugée à 3000 tours/min pendant 15 min pour l'analyse biochimique. Après avoir recueilli le sang, la peau de l'abdomen a été disséquée pour exposer les tumeurs mammaires qui ont été toutes prélevées, comptées et pesées. La taille de ces tumeurs a ensuite été mesurée en utilisant un pied à coulisse électronique (IGAGING®). Le volume des tumeurs a été calculé en utilisant la formule : longueur × largeur × épaisseur × $\pi/6$ (Faustino-Rocha *et al.*, 2013).

Les organes cibles des œstrogènes (ovaires, utérus, vagin et glandes mammaires), les organes majeurs de métastase du cancer du sein (fémur, cerveau, foie et poumons) et autres organes d'intérêt (rate et reins) ont été aussi prélevés et pesés. Tous les organes ont été fixés dans du formol à 10% pour l'analyse histologique. Quelques paramètres du stress oxydant ont également été évalués dans l'homogénat de la glande mammaire (FRAP, GSH et MDA) (Figure 14).

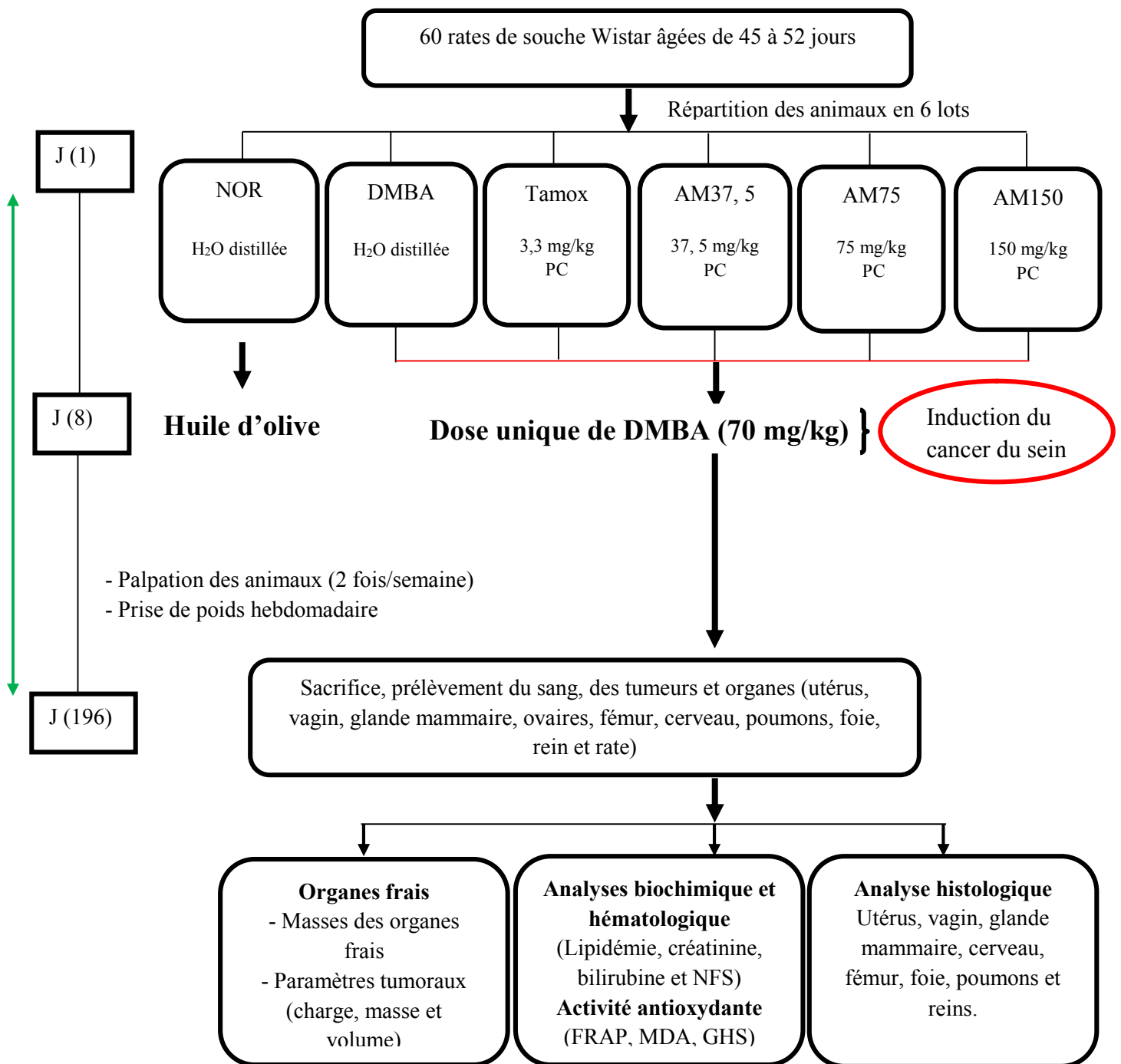


Figure 14: Protocole d'évaluation des effets préventifs de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* sur les tumeurs mammaires. NOR= groupe normal ; DMBA= groupe témoin négatif ; TAMOX= groupe témoin positif ; AM = groupe traité à l'extrait aqueux (37,5 ; 75 et 150 mg/kg).

II.2.4 Détermination des modes et mécanismes d'action de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

L'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* pourrait agir par plusieurs modes qui pourraient être : cytotoxique, antiœstrogénique et antioxydant.

II.2.4.1 Etude de la cytotoxicité de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

Dans le but de déterminer la cytotoxicité de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*, une étude *in vitro* sur les lignées de cellules cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-231, 4T1, SK-MEL-28, et SF-295) et non cancéreuses (HUVEC et MRC-5) a été réalisée.

II.2.4.1.1 Culture de cellules

Les cellules MDA-MB-231, SK-MEL-28 et MCR-5 ont été cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) additionné de 10% de Sérum Bovin Foetal (SBF). Les cellules MCF-7, HUVEC, SF-295 et 4T1 ont été cultivées dans le milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté de 10% de SBF (Figure 15). Toutes les cultures cellulaires ont également été complétées avec 100 µg/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 10 mM de HEPES. Les cultures cellulaires ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ et à pH 7,4. Tous les deux jours, 90% du surnageant était retiré et remplacé par du milieu frais. Avant d'effectuer toutes les expériences, le nombre de cellules viables a été évalué par la méthode au bleu trypan et le comptage a été effectué dans une chambre de Neubauer. Le tableau IV montre les différentes compositions des milieux de cultures DMEM et RPMI.



- DMEM ou RPMI
- 10% SBF (Serum Bovin Fetal)
- 5% de CO₂, 37°C, pH: 7,4.

Figure 15: Milieux de cultures des cellules tumorales et non tumorales.

Tableau IV: Composition des milieux de cultures

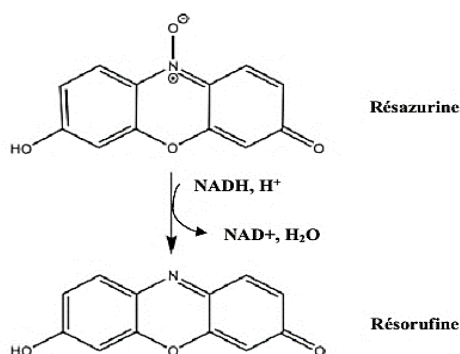
Milieu DMEM	Milieu RPMI
Acides aminés	Avec additifs : L-glutamine, rouge de phénol.
Sels (chlorure de potassium, sulfate de magnésium, chlorure de sodium et dihydrogénophosphate de sodium).	Sans additifs : HEPES, pyruvate de sodium
Glucose	Glucose
Vitamines (acide folique, nicotinamide, riboflavine et vitamine B12).	Biotine
Fer	Vitamine B12

II.2.4.1.2 Test de viabilité cellulaire

La cytotoxicité de l'extrait de *A. macrophylla* a été déterminée à des concentrations allant de 50 à 300 µg/mL à partir de cinq lignées de cellules tumorales (MCF-7, MDA-MB-231, 4T1, SF-295 et SK-MEL-28) et deux non-tumorales (MCR-5 et HUVEC) en utilisant le réactif Alamar Blue (résazurine) comme décrit par O'Brien *et al.* (2000). Ce test évalue la production mitochondriale des cellules en tant que mesure de la viabilité cellulaire.

❖ Principe

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



❖ Mode opératoire

Une suspension cellulaire de 1×10^4 cellules / puits dans 100 μL de milieu de culture a été ensemencée dans une microplaque à 96 puits pendant une nuit. Au bout de 24 h, les cellules ont été exposées à l'extrait de *A. macrophylla* à des concentrations comprises entre 50 et 300 $\mu\text{g/mL}$. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture contenant les substances a été enlevé puis 100 μL d'un milieu de culture contenant 10% « AlamarBlue » ont été introduits dans chaque puit. La microplaque a ensuite été incubée pendant 3 à 4 h et l'intensité de fluorescence a été déterminée par un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS55 (Becton Dickinson, San José, CA) avec une excitation à 530 nm et une émission à 590 nm (Figure 16). Chaque expérience a été réalisée en triplicata et répétée trois fois.

❖ Expression des résultats

La concentration cytotoxique qui tue 50% des cellules (CC_{50}) a été déterminée par analyse de régression non linéaire du logarithme de la concentration en fonction de la réponse normalisée (pourcentage de viabilité cellulaire) à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 (GPW6-242831-RBMZ-03274).

Les valeurs des indices de sélectivité (IS) sur les cellules ont été calculées en utilisant la formule suivante : $\text{IS} = \text{CC}_{50} (\text{Cellule non tumorale}) / \text{CC}_{50} (\text{Cellule tumorale})$.

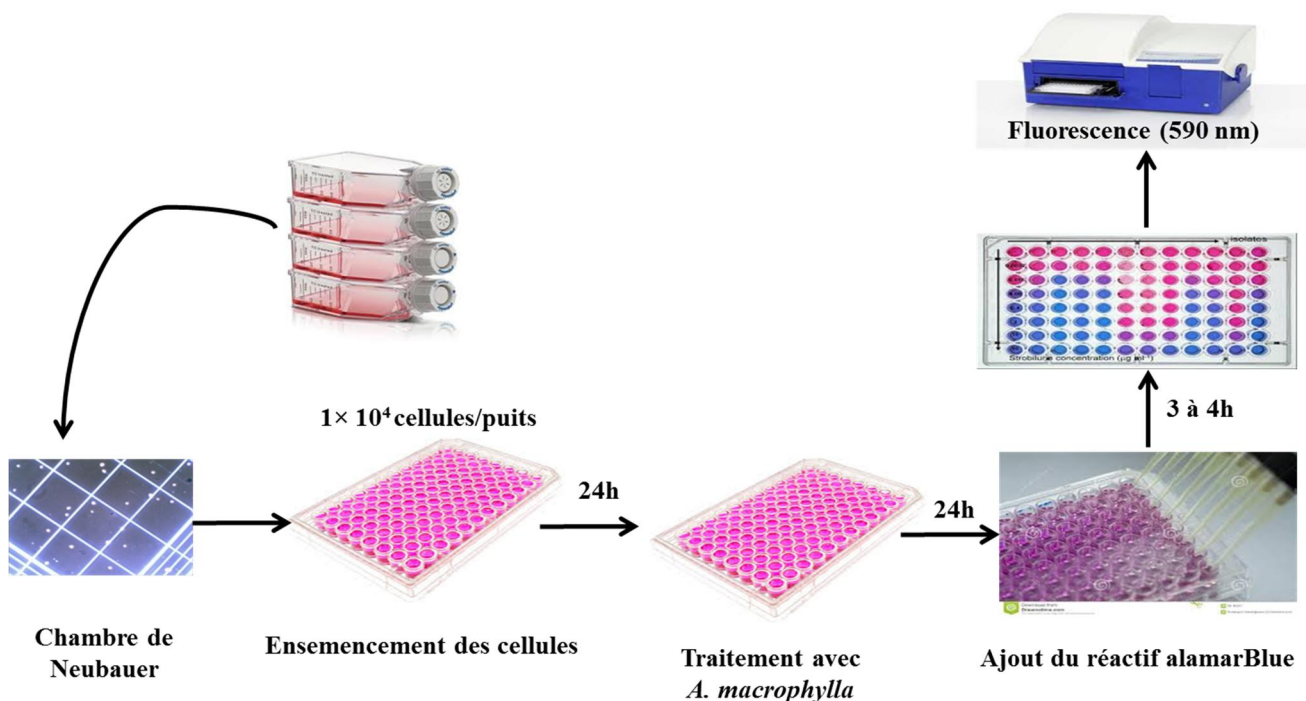


Figure 16: Protocole du test de viabilité cellulaire AlamarBlue (O'Brien *et al.*, 2000).

II.2.4.2 Evaluation de la croissance cellulaire

La croissance cellulaire a été évaluée par le test classique de réduction en utilisant le colorant MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) selon la méthode décrite par Juengel *et al.* (2017). Brièvement, les cellules cancéreuses mammaires humaines (MDA-MB 231 et MCF-7), de rongeurs (4T-1) et les cellules normales mammaires humaines (HMEC) ont étéensemencées à une densité de 1×10^5 cellules/mL dans des microplaques de 96 puits, puis traitées avec l'extrait aqueux de *A. macrophylla* à des concentrations de 12,5 à 200 µg/mL. Après 24, 48 et 72 heures d'incubation, 10 µL d'une solution hydrosoluble de MTT (0,5 mg/mL) ont été ajoutés dans chaque puit et les cellules ont été de nouveau incubées à 37 °C pendant 4 heures. Le sel de formazan formé a été solubilisé à l'aide d'un tampon de révélation (10% de SDS et 0,01 M HCl) qui a été ajouté dans chaque puit. Le lendemain, l'absorbance a été mesurée à 550 nm pour chaque puit à l'aide d'un lecteur ELISA pour microplaques. Les résultats ont été exprimés en nombre moyen de cellules après soustraction de l'absorbance de fond. Chaque analyse a été réalisée en triplicata et répétée 3 fois.

II.2.4.3 Evaluation de la Prolifération cellulaire face à l'antigène bromodésoxyuridine

Un kit ELISA de prolifération cellulaire utilisant l'Ag BrdU (Bromodésoxyuridine) a été utilisé pour évaluer la prolifération des cellules cancéreuses du sein dans cette étude. Les cellules MDA-MB-231 du sein à une densité de 1×10^5 cellules/mL ont étéensemencées dans des microplaques de culture à 96 puits. Par la suite, elles ont été incubées avec l'extrait de *A. macrophylla* aux concentrations de 50 et 100 µg/mL pendant 24 et 48 h. Ensuite, 20 µL de solution de marquage BrdU ont été ajoutés à chaque puit à 0 h et 24 h, puis fixés et détectés à l'aide de l'Anticorps anti-BrdU selon les instructions des fabricants. L'absorbance dans chaque puit a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur ELISA pour microplaques (Zingue *et al.*, 2020).

II.2.4.4 Evaluation de la capacité de *A. macrophylla* à inhiber les formations de clones

Les cellules MDA-MB-231 ont étéensemencées dans des microplaques à 6 puits à une densité de 500 cellules/puit et exposées à *A. macrophylla* aux concentrations de 50 et 100 µg/mL pendant 24 h. Le milieu de culture (RPMI 1640) a été remplacé par un milieu sans extrait et les cellules ont été cultivées pendant 7 jours. Seules les colonies comportant plus de 50 cellules ont été considérées. Chaque expérience a été réalisée en triplicata et répétée 3 fois (Zingue *et al.*, 2020).

II.2.4.5 Evaluation du type de mort cellulaire induit par *A. macrophylla*

Le type de mort cellulaire (nécrose ou apoptose) a été évalué à l'aide du kit de détection de l'apoptose Annexine V-FITC par cytométrie de flux. L'expression de l'Annexine V/iodure de propidium (IP) a permis de vérifier si la croissance des cellules tumorales était altérée ou réduite en raison de l'apoptose. Les cellules MDA-MB-231 ont été incubées avec l'extrait de *A. macrophylla* à 50 et 100 µg/mL ou le solvant de dilution de cet extrait (DMSO 0,01%) pendant 24 h. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec du tampon phosphate (PBS) et incubées avec 5 µL d'Annexin V-FITC et 5 µL d'iodure de propidium dans l'obscurité pendant 15 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux à l'aide de l'appareil de marque FACScalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Allemagne). Le nombre de cellules apoptotiques (précoces et tardives), nécrotiques et viables a été exprimé en % (Boersma *et al.*, 1996).

II.2.4.6 Evaluation de l'impact de *A. macrophylla* sur le cycle cellulaire

Les cellules MDA-MB-231 ont étéensemencées dans des flacons de culture cellulaire de 25 cm² jusqu'à atteindre la subconfluence. Par la suite elles ont été incubées avec l'extrait de *A. macrophylla* à 50 et 100 µg/mL pendant 24 h, puis la trypsine a été ajoutée et les cellules ont été récoltées par centrifugation. Après lavage, les cellules ont été colorées avec de l'iodure de propidium, à l'aide d'un kit « ADN Cycle TEST PLUS ». Les données ont été acquises sur une cytométrie de flux de marque FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Allemagne). Pour chaque échantillon, 10000 événements ont été comptés avec le logiciel « CellQuest » et la distribution du cycle cellulaire a été calculée avec le logiciel ModFit (Becton Dickinson, Heidelberg, Allemagne). Le nombre de cellules détectées en phase G0/G1, G2/M ou S a été exprimé en %. Les expériences ont été réalisées en triplicata et répétées 3 fois (Ross, 1996).

II.2.4.7 Test d'adhésion cellulaire

Les plaques de 6 puits ont été recouvertes toute la nuit avec du collagène ou de la fibronectine, qui sont des composants de la matrice extracellulaire. Ensuite, l'extrait de *A. macrophylla* a été ajouté aux concentrations de 50 et 100 µg/mL ou le véhicule (DMSO) pour les cellules contrôles pendant 1 h sur les plaques. Pour éviter les adhésions cellulaires non spécifiques, les plaques ont été lavées avec le BSA (« Bovin serum albumin ») à 1% dans du PBS. Les cellules tumorales du sein MDA-MB-231 ont été ajoutées à une densité de $0,5 \times 10^6$ dans chaque puit. Par la suite, les cellules tumorales non adhérentes ont été lavées. Les cellules adhérentes ont été fixées avec 2% de glutaraldéhyde et comptées dans cinq champs

différents à l'aide d'un microscope optique pour calculer le taux d'adhésion cellulaire moyen (Zingue *et al.*, 2020).

II.2.4.8 Test anti-migratoire

Ce test a été réalisé pour évaluer la capacité de l'extrait de *A. macrophylla* à inhiber la migration des cellules MDA-MB-231 en utilisant la méthode d'induction d'une plaie (Hulkower et Renee, 2011). Brièvement, les cellules MDA-MB-231 ont étéensemencées sur des plaques de 12 puits à raison de 2×10^5 cellules/puits et incubées pendant 24 heures avec l'extrait de *A. macrophylla* à 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$ ou avec le véhicule (DMSO) pour témoin. Le milieu de culture a été retiré et une plaie a été créée à l'aide d'un embout de pipette, puis lavée deux fois avec du tampon PBS pour éliminer les cellules détachées mécaniquement. Les cellules ont ensuite été maintenues dans du RPMI 1640 pendant 48h. La migration cellulaire et l'occupation relative de la zone blessée par les cellules en migration ont été enregistrées sous un microscope inversé (40 \times) Zeiss Axio Observer.Z1 (Hallbermoos, Allemagne). Des microphotographies ont été réalisées toutes les 12 h et la zone de cicatrisation a été évaluée par le logiciel ImageJ [®]. Chaque expérience a été répétée trois fois (Hulkower et Renee, 2011).

II.2.4.9 Activité antioxydante *in vitro* et étude phytochimique de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

II.2.4.9.1 Activité antioxydante *in vitro* de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

L'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait a été déterminée par les méthodes décrites respectivement par Katalinić *et al.* (2004), Re *et al.* (1999) et Benzie et Strain (1996). Ces différentes méthodes sont entièrement décrites au niveau des protocoles de dosage *in vitro* des paramètres du stress oxydant.

II.2.4.9.1.1 Evaluation de l'activité anti-radicalaire du DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle)

L'activité de piégeage des radicaux libres de *A. macrophylla* a été déterminée en fonction de sa capacité à donner de l'hydrogène ou à piéger les radicaux en utilisant le radical DPPH (Katalinić *et al.*, 2004).

II.2.4.9.1.2 Evaluation de l'activité anti-radicalaire de l'acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS)

L'activité de piégeage des radicaux libres ABTS a été évaluée par la méthode décrite par Re *et al.* (1999).

II.2.4.9.1.3 Activité chélatrice *in vitro* (« Ferric Reducing Antioxidant Power »)

L'activité chélatrice *in vitro* de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* a été évaluée par la méthode décrite par Benzie et Strain (1996). Brièvement, dans un tube à essai, ont été introduits: 100 µL d'extrait de concentration 200 µg/ml et 500 µL de réactif de FRAP. L'acide gallique a été utilisé comme étalon. La densité optique a été déterminée à 593 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu après 30 min d'incubation à température ambiante contre de l'eau distillée. L'activité réductrice du fer a été exprimée en µg équivalent d'acide gallique (EAG)/mg d'extrait sec.

II.2.4.9.2 Etude phytochimique de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

Dans le but d'identifier les métabolites secondaires responsables des activités biologiques observées, une analyse phytochimique de l'extrait aqueux a été réalisée.

II.2.4.9.2.1 Analyse quantitative

Une analyse quantitative a été réalisée dans le but de déterminer la quantité de métabolites secondaires (polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols) contenus dans l'extrait aqueux de *A. macrophylla*. Les différentes méthodes de détermination de la quantité de métabolites secondaires sont entièrement décrites au niveau des protocoles de dosage.

II.2.4.9.2.2 Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse

Dans le but de déterminer les composés volatiles de l'extrait aqueux et de prédire leurs poids moléculaires et leurs formules brutes, une analyse par chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GCxGC-TOF-MS) a été effectuée.

Le profil (GC-MS) a été effectué sur un système constitué d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, USA) couplé à une spectrométrie de masse LECO Pegasus 4D-CGCxGC-TOFMS (LECO Corporation, St Joseph, MI, USA). Le système de colonne primaire et secondaire utilisé était respectivement : Rxi-5 SilMS (29,5 m × 0,25 mm × 0,25 µm) et Rxi 17 Sil MS (0,95 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Restek, Bellefonte, PA, USA). L'hélium a été utilisé comme gaz porteur. L'alignement du temps de rétention, la filtration appariée, la détection des pics et l'appariement des pics ont été effectués à l'aide du logiciel ChromaTOF (LECO, St Joseph, MI, USA).

Les échantillons ont été dissous dans du méthanol pour une concentration de 1 mg/mL. Le volume d'injection était de 10 µL et le débit de 1 mL/min. Le débit de l'hélium était constant (1 ml/min) et à une température d'entrée de 250 °C. La température initiale du four a

été réglée à 40 °C et maintenue pendant 30 secondes, ensuite a progressivement augmenté de 10 °C/60 secondes jusqu'à 300 °C; puis a été maintenue pendant 30 secondes à 250 °C. Le modulateur et le four secondaire ont fonctionné à une température de décalage de 5 °C au-dessus du four primaire. Le spectromètre de masse a été mis en place dans les conditions suivantes : retard au solvant de 180 secondes ; température de ligne de transfert à 300 °C ; ionisation d'électrons à -70eV ; température de la source à 250 °C ; gamme de masse stockée : 45-600 u ; taux d'acquisition : 10 spectres/sec pour GC-TOF-MS ; la tension du détecteur a été réglée à 1650 V. L'alignement du temps de rétention, la filtration appariée, la détection des pics et l'appariement des pics ont été effectués grâce au logiciel ChromaTOF. L'identification subséquente des composés a été faite par comparaison avec les bases de données du spectre de masse (NIST, Adams and EO libraries) et leurs probables formules brutes ont été déterminées. Une semi-quantification de chaque composé a été calculée sur la base des zones de pics et la concentration relative présentée en %.

II.2.4.10 Evaluation *in vitro* et *in vivo* des effets antioestrogéniques de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla*

Le DMBA (7,12- diméthylbenz(a)anthracène) est un carcinogène environnemental qui induit en grande partie les tumeurs oestrogénosensibles, et vu l'implication des œstrogènes dans les phases d'initiation et de progression de la tumeur mammaire (Coumoul et Barouki, 2002 ; Santen, 2003 ; Miller, 2004), les effets antioestrogéniques de cet extrait ont été évalués suivant les tests de prolifération cellulaire (Resende *et al.*, 2013) *in vitro* et utéro-trophique de 3 jours (OECD, 2007) *in vivo*.

II.2.4.10.1 Evaluation *in vitro* des effets antioestrogéniques de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla*

Afin d'évaluer les effets de *A. macrophylla* sur la prolifération cellulaire, un test simple et sensible a été réalisé avec des cellules d'adénocarcinome mammaire RE positif (MCF-7). Ce test détermine l'œstrogénicité/antioestrogénicité des composés indirectement par la mesure de la prolifération des cellules MCF-7. A cet effet, la technique légèrement modifiée par Resende *et al.* (2013) a été utilisée. En bref, les cellules ont été traitées à la trypsine et ensemencées dans des plaques à 24 puits à une concentration initiale de 50 000 cellules par puit supplémentées à du sérum bovin foetal (SBF) à 10% dans du RPMI. Après 24 h d'incubation (37 ° C, 5% de CO₂) pour permettre leur adhésion, les cellules ont été lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et le sérum de remplacement 2 RPMI (0,5×) supplémenté en rouge de phénol libre a été substitué au milieu d'ensemencement. *A.*

macrophylla a été ajouté au milieu expérimental à des concentrations allant de 0,1 µg/mL à 200 µg/mL. Pour le test antioestrogénique, avant l'incubation, 1×10^{-8} M de 17β-estradiol a été ajouté aux puits au même moment que l'extrait aqueux. Le milieu expérimental exempt de stéroïdes consistait en un témoin négatif, tandis que les cellules traitées avec 1×10^{-8} M de 17β-estradiol servaient de témoin positif. Les cellules traitées avec 5×10^{-8} M de quercétine ont servi de témoin phytoestrogène. Il existait d'autres témoins comme le témoin solvant (DMSO à 0,01%) et le témoin milieu (SBF à 10% dans du RPMI). Le test a été arrêté au bout de 144 heures en retirant le milieu des puits, en fixant les cellules et en les colorant avec de la sulforhodamine-B (SRB). En bref, les cellules ont été traitées avec de l'acide trichloracétique froid à 10% et incubées à 4 °C pendant 1 h. Les cellules ont été lavées quatre fois à l'eau du robinet et séchées. Les cellules ont par la suite été colorées pendant 30 min avec 0,057% (p/v) de SRB dissous dans de l'acide acétique à 1%. Les puits ont été rincés quatre fois avec de l'acide acétique à 1% et séchés à l'air. Le colorant lié a été solubilisé avec de la base Tris 10 mM (pH 10,5) dans un agitateur. Enfin, des aliquotes ont été lues dans un appareil Biotek EL800 Multiscan (Winoosky, USA) à 510 nm (Figure 17).

Les résultats exprimant l'activité œstrogénique ont été présentés sous forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne de l'effet prolifératif (EP), ce qui représente la prolifération maximale induite par les composés. Ce paramètre (EP) a été calculé selon la méthode de Schiliro *et al.* (2011), et correspond au rapport entre le nombre de cellules dans l'échantillon ou le 17β-œstradiol et le nombre de cellules dans le témoin avec solvant (0,01% de DMSO) : $EP = \text{nombre de cellules maximum de l'échantillon} / \text{nombre de cellules du témoin avec DMSO}$. L'activité œstrogénique d'un échantillon a été déterminée en tant qu'effet prolifératif relatif (EPR%). L'EPR compare la prolifération maximale induite par un échantillon avec celle induite par le 17β-œstradiol : $EPR (\%) = [EP \text{ pour échantillon} / EP \text{ pour } 17\beta\text{-œstradiol}] \times 100$ (Resende *et al.*, 2013).

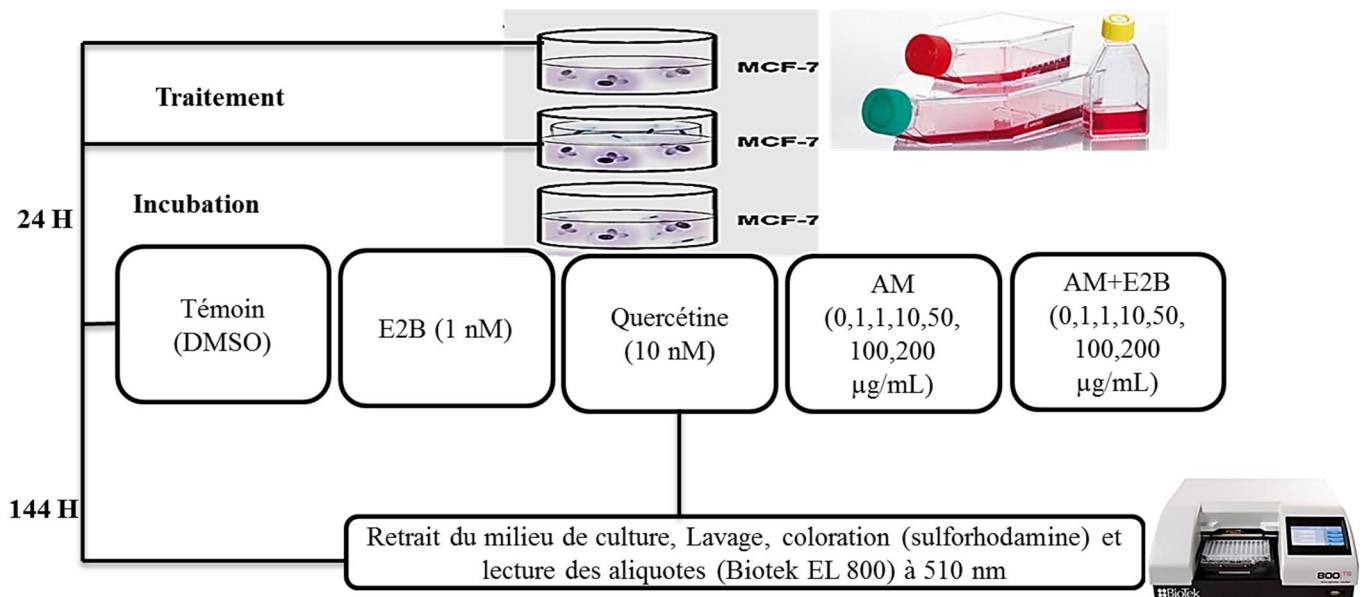


Figure 17: Protocole d'évaluation des effets œstrogéniques et antioestrogéniques *in vitro*. AM : *Anthonotha macrophylla* ; E2B: 17 β -œstradiol benzoate

II.2.4.10.2 Evaluation *in vivo* des effets antioestrogéniques de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla*

- **Ovariectomie des animaux**

L'ovariectomie consiste en l'ablation des ovaires par la méthode de Lane *et al.* (2003). Après anesthésie (diazépam 10 mg/kg PC i.p. et kétamine 50 mg/kg PC i.p.), les animaux ont été placés en décubitus ventral dans un bac à dissection et une boutonnière d'environ 1 cm a été réalisée sur le dos. A partir de cette ouverture, une incision du péritoine a été réalisée de chaque côté de l'abdomen. Les amas de graisse entourant les ovaires ont ainsi été mis en évidence. Les ovaires directement observables ont été séparés des cornes utérines après une ligature effectuée entre la corne utérine et l'ovaire. Durant une semaine, la blessure a été traitée à l'aide de la Betadine®.

- **Protocole expérimental**

Les effets antioestrogéniques de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *A. macrophylla* ont été évalués sur la base des modifications histologiques de l'utérus, du vagin et de la glande mammaire induites par le cotraitement avec l'œstradiol. Pour cette étude, deux doses thérapeutiques ont été utilisées : 75 et 150 mg/kg. La dose 37,5 mg/kg n'ayant pas induite des effets chimioprotecteurs sur les tumeurs mammaires, elle n'a pas été utilisée. Pour ce faire, vingt rates âgées de 10 - 12 semaines (150 g) ont été ovariectomisées. Après 14 jours, les animaux ont été distribués dans 4 lots de 5 animaux chacun. Le lot servant de témoin négatif (TN) a reçu le solvant de dilution des substances (eau distillée). Le lot témoin positif a

été traité à l'œstradiol valérate (E₂V) à la dose suboptimale de 0,75 mg/kg PC. Les deux lots restants ont été co-traités avec l'œstradiol valérate (E₂V) et l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 75 et 150 mg/kg. Les traitements ont été faits oralement à un volume d'administration de 2 mL/150 g pendant 3 jours. A l'issue des trois jours de traitement, les animaux ont été pesés. Ces animaux ont été ensuite sacrifiés et les organes tels que l'utérus le vagin et la glande mammaire ont été prélevés et fixés dans du formol 10% pour analyse histologique. Les utéri ont été préalablement pesés avant fixation (Figure 18).

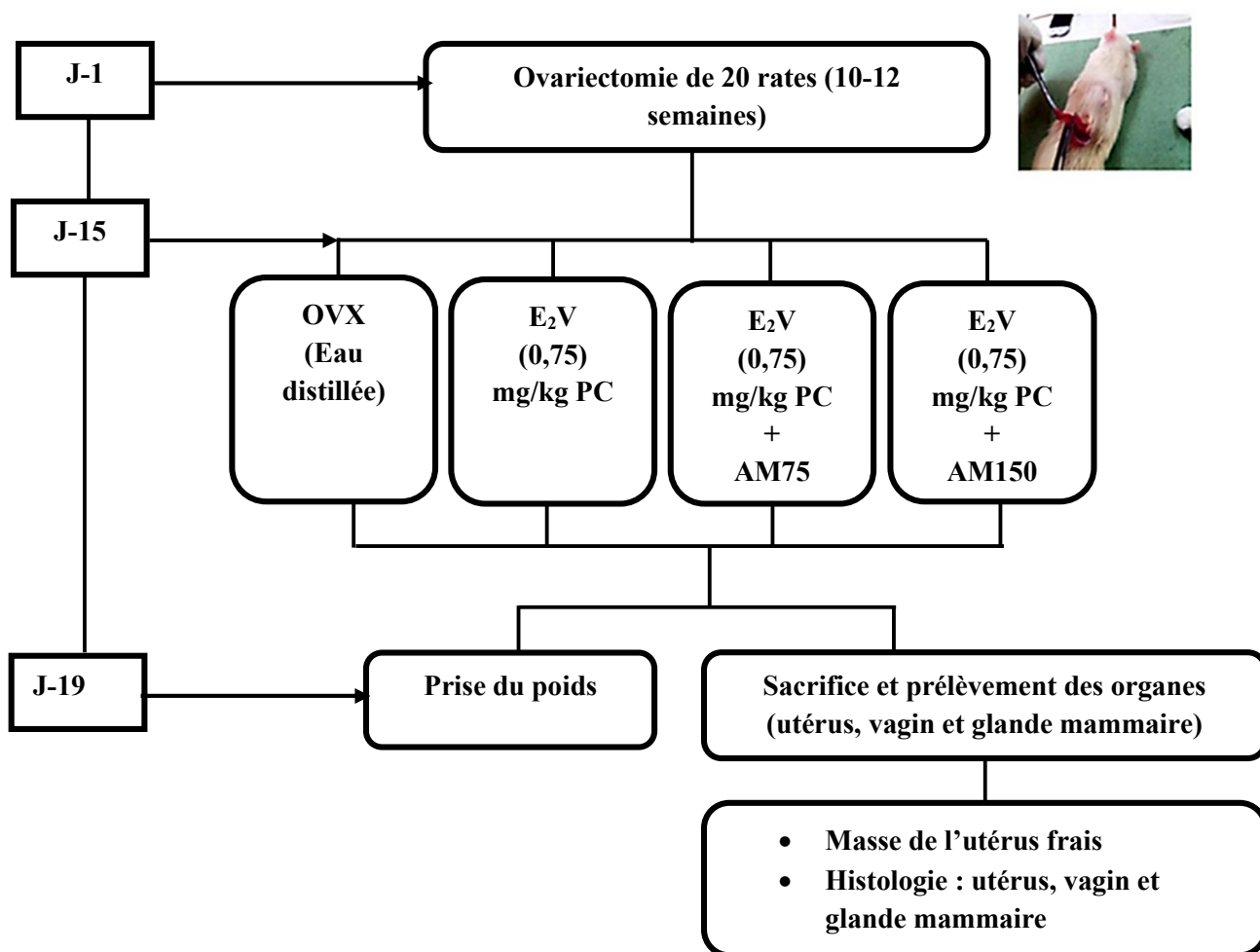


Figure 18: Protocole d'évaluation des effets antiœstrogéniques de l'extrait aqueux de *A. macrophylla in vivo*. OVX = animaux ovariectomisés et traités à de l'eau distillée, E₂V = animaux ovariectomisés et traités à l'œstradiol valérate à la dose de 0,75 mg/kg PC, E₂V +AM = animaux ovariectomisés et co-traités à l'œstradiol valérate et à l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 75 et 150 mg/kg PC.

II.2.5 Evaluation de la toxicité orale aiguë de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait aqueux des écorces de *A. macrophylla* a été évaluée chez la rate suivant le protocole de l'OECD, ligne directrice n°423 pour les essais des substances chimiques adoptée le 17 décembre 2001 (OECD, 2001a). Les animaux ayant un poids moyen de 130 ± 10 g et âgés de 8 à 10 semaines ont été répartis en deux lots de 3 rates chacun. Les animaux ont été soumis à un jeûne non hydrique la nuit précédant l'administration des substances. Après la période de jeûne, ils ont été pesés et le lot témoin a reçu de l'eau distillée; le lot test a reçu l'extrait aqueux de *A. macrophylla* à la dose de 2000 mg/kg PC. L'eau et l'extrait ont été administrés par voie orale (2 mL/150 g PC). Après l'administration de l'eau distillée et de l'extrait, les animaux ont été de nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures. Après traitement, les animaux ont été observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière pendant les 4 premières heures. Ils ont été ensuite observés quotidiennement pendant 14 jours après l'administration des substances. La prise de la masse corporelle a été faite tous les 3 jours. Les signes cliniques de toxicité reposaient sur la respiration, les observations des modifications au niveau du comportement, de la peau, des yeux, des poils et de l'activité somato-motrice. L'attention a été aussi faite sur l'observation des diverses manifestations de convulsion, salivation, diarrhée et la mortalité. Au 15^{ième} jour, les animaux ont été sacrifiés par décapitation et soumis à une nécropsie. Les organes (foie, reins, poumons, rate, estomac, glandes surrénales, cœur, ovaires et utérus) ont été prélevés, pesés et leurs masses relatives calculées (Figure 19).

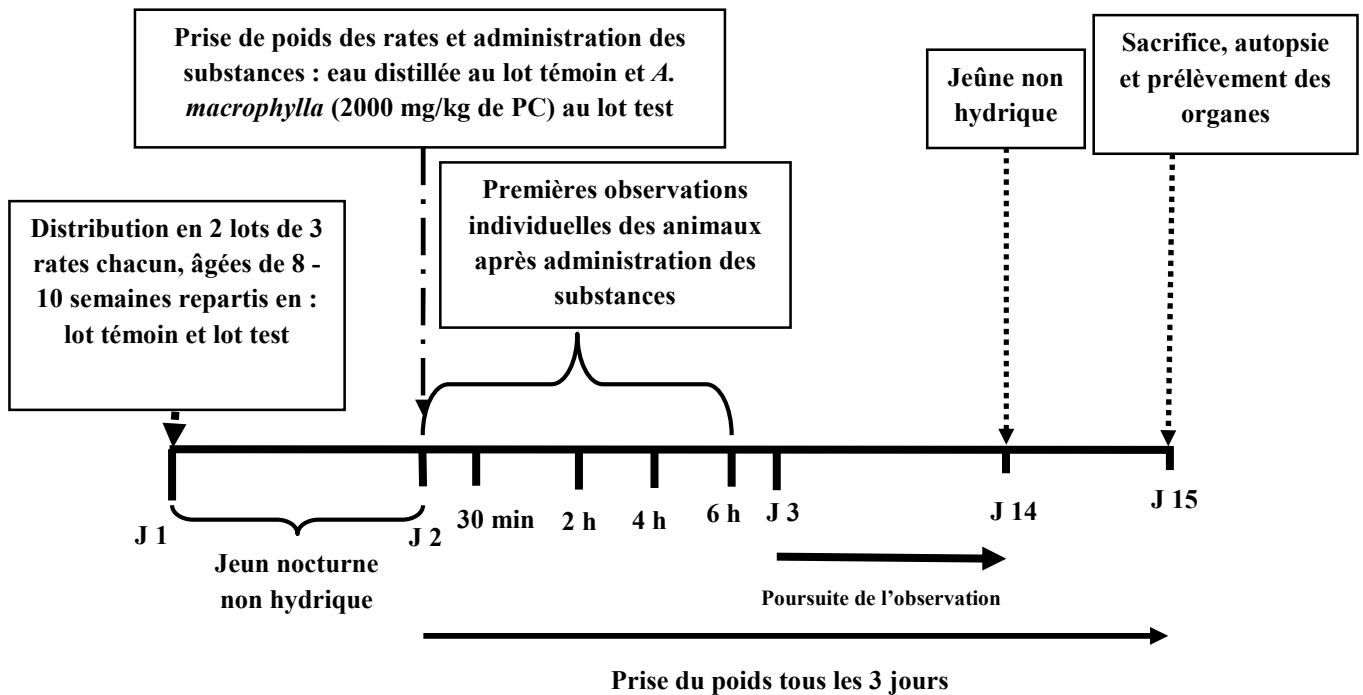


Figure 19: Protocole d'évaluation de la toxicité orale aiguë de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*.

II.2.6 Préparation de l'homogénat de la glande mammaire

L'homogénat utilisé dans ce travail a été préparé comme suit: 0,2 g d'organes pour 1 mL de tampon. La glande mammaire inguinale droite a été coupée, pesée et broyée à l'aide du potter teflon-verre sur un bac de glace dans du tampon phosphate sodium (0,1 M ; pH 7,5). Après centrifugation à 3000 trs/min pendant 15 min à 5°C, le surnageant recueilli a été conservé à -20°C pour le dosage des protéines totales, du GSH, du MDA et la détermination de l'activité chétatrice.

II.2.7 Histologie

Les techniques fondamentales décrites par Cagnet (2004, 2006) ont été utilisées. Il s'agit de la fixation, la macroscopie, la déshydratation, l'inclusion, la coupe, la coloration et le montage des différents tissus.

II.2.7.1 Fixation et macroscopie

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 était du formol à 10%.

La macroscopie s'est déroulée 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.2.7.2 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 x 2 h), 4 bacs d'éthanol à 95% (4 x 2 h) et 3 bacs d'éthanol à 100% (3 x 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 x 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.2.7.3 Inclusion et coupes

L'inclusion fournit un support externe aux tissus. Ce qui permet la réalisation des coupes au microtome. Les tissus ont été 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 gélatinée. 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.2.7.4 Coloration

La coloration permet de voir 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-violacé 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 concentrations décroissantes jusqu'à l'eau distillée ; chaque bain ayant une durée de 5 min. Les coupes ont de ce fait séjournées dans les bains suivants: xylène (3 x 5 min), éthanol à 100 % (3 x 5 min), éthanol à 95% (1 x 5 min), éthanol à 80 % (1 x 5 min) et eau distillée (1 x 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 x 5 min), eau de robinet (2 x 5 min), éthanol à 70% (1 x 5 min), éthanol à 95% (1 x 5 min), éosine alcoolique à 0,5% (1 x 5 min) et eau de robinet (1 x 5 min).

II.2.7.5 Montage

Une 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 (le Baume de Canada) qui est non miscible à l'eau. Le montage s'est fait en deux étapes: la déshydratation dans trois bains d'alcool absolu (3 x 5 min) et l'éclaircissement dans trois bains de xylène (3 x 5 min).

II.2.8 Analyse hématologique

Les cellules en passant à travers une ouverture déplacent un volume égal de fluide conducteur. De plus un courant électrique est appliqué au niveau de cette ouverture. Chaque passage d'une cellule à travers l'ouverture provoque alors une augmentation de la résistance électrique. Cette augmentation est traduite en impulsions électriques dont la hauteur est directement proportionnelle au volume cellulaire. Le nombre de globules rouges est déterminé par le total d'impulsions enregistrées.

Les paramètres hématologiques suivants ont été déterminés au Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Central de Yaoundé (Cameroun) au moyen d'un analyseur Humacount 30 qui compte automatiquement les cellules sanguines de l'échantillon de sang. Il s'agit du taux de globules blancs (lymphocytes, monocytes, et granulocytes), de globules rouges, d'hématocrite, du volume corpusculaire moyen (MCV), des plaquettes sanguines, de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCH), d'hémoglobine (Hb), et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC).

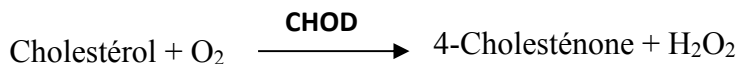
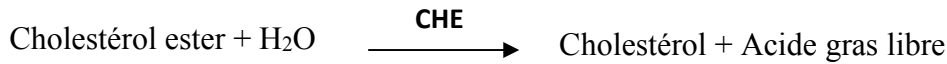
II.2.9 Analyses sériques

Les réactifs du kit CHRONOLAB SYSTEMS (Barcelone, Espagne) ont été utilisés pour effectuer les analyses sériques par la méthode enzymatique.

II.2.9.1 Dosage du cholestérol total

- Principe

Le schéma du principe est le suivant:



CHE = Cholestérol Estérase, **CHOD** = Cholestérol Oxydase, **POD** = Peroxydase

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol présent dans l'échantillon testé.

- Protocole de dosage du cholestérol total

Le tableau V indique le mode opératoire du dosage du cholestérol total.

Tableau V: Mode opératoire du dosage du cholestérol total

Tubes Réactifs	Blanc	Etalon	Essai
Réactif du dosage	1 mL	1 mL	1 mL
Etalon	---	10 µL	---
Echantillon (Sérum)	---	---	10 µL
Eau distillée	10 µL	---	---

Les tubes ont été homogénéisés et laissés au repos pendant 10 minutes à température ambiante. Les absorbances ont été lues à 505 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (de marque SPEKOL1300).

- Détermination de la concentration du cholestérol total

$$\text{Conc. cholestérol (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon} - (\text{A}) \text{ Blanc}}{(\text{A}) \text{ Etalon} - (\text{A}) \text{ Blanc}} \times \text{conc. de l'étalon (200 mg/dL)}$$

Conc = Concentration, **A** = Absorbance.

II.2.9.2 Dosage du cholestérol HDL

- Principe

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les lipoprotéines de faible densité (LDL) du sérum ou plasma se précipitent avec le phosphotungstate en présence d'ions magnésium. Après leur centrifugation, le surnageant contient les lipoprotéines de haute densité (HDL). La fraction de cholestérol HDL est déterminée en utilisant le réactif de dosage du cholestérol total (Grove, 1979 ; Naito, 1984).

- Méthode

Le tableau VI décrit le mode opératoire du dosage du HDL cholestérol.

Tableau VI: Mode opératoire du dosage du HDL cholestérol

Réactifs	Tubes	Tube à centrifuger
Réactif précipitant		100 µL
Echantillon		1 mL

Les tubes ont été laissés au repos pendant 10 minutes à température ambiante. Par la suite le mélange a été centrifugé 20 min à 4000 trs/min et le surnageant recueilli a été dosé.

- Détermination de la concentration du HDL cholestérol

$$\text{Conc.HDLCholestérol (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon} - (\text{A}) \text{ Blanc}}{(\text{A}) \text{ Etalon} - (\text{A}) \text{ Blanc}} \times \text{conc. de l'étalon (50 mg/dL)}$$

II.2.9.3 Dosage de la bilirubine

- Principe

La bilirubine totale réagit avec l'acide sulfanilique diazoté en présence de DMSO pour former un composé coloré. La bilirubine conjuguée réagit avec l'acide sulfanilique diazoté pour former un composé de couleur rouge. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en bilirubine dans l'échantillon.

- Méthode

Le tableau VII indique le mode opératoire du dosage de la bilirubine totale.

Tableau VII: Mode opératoire du dosage de la bilirubine

Réactifs	Tubes	Blanc	Essai
Réactif 2		100 µL	100 µL
Réactif 3		/	50 µL
Echantillon (Sérum)		100 µL	100 µL
Après avoir fait le mélange, les tubes ont été laissés au repos pendant 5 minutes à température ambiante. Par la suite les absorbances ont été lues à 555 nm contre l'eau distillée.			

- Détermination de la concentration de bilirubine totale

$$\text{Bilirubine totale } (\mu\text{mol/L}) = (A \text{ Echantillon} - A \text{ Blanc}) \times 327$$

A= absorbance

II.2.9.4 Dosage de la créatinine**- Principe**

Le test repose sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium. La créatinine réagit avec le picrate alcalin en formant un complexe rouge. L'intervalle de temps choisi pour les mesures évite les interférences d'autres composants du sérum. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon (Murray, 1984).

- Méthode

Le tableau VIII indique le mode opératoire du dosage de la créatinine.

Tableau VIII: Mode opératoire du dosage de la créatinine

Réactifs	Tubes	Blanc	Etalon	Essai
Réactif du dosage		1 mL	1 mL	1 mL
Etalon		/	100 µL	/
Echantillon (Sérum)		/	/	100 µL
Eau distillée		100 µL	/	/
Les absorbances (A1) et (A2) ont été lues respectivement après 30 et 90 secondes (longueur d'onde = 492 nm) suivant l'ajout de l'échantillon. Par la suite la variation des absorbances $\Delta A = A2 - A1$ a été calculée.				

- Détermination de la concentration de la créatinine

$$\text{Conc. créatinine (mg/dL)} = \frac{(\Delta A) \text{ Echantillon} - (\Delta A) \text{ Blanc}}{(\Delta A) \text{ Etalon} - (\Delta A) \text{ Blanc}} \times \text{conc. Etalon (2 mg/dL)}$$

ΔA = variation de l'absorbance

II.2.9.5 Dosage des protéines totales par la méthode de Biuret

- Principe

En milieu alcalin, les protéines donnent une couleur violette/bleue en présence de sels de cuivre ; ces sels contiennent de l'iodure qui agit comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon testé (Koller, 1984 ; Burtis et Ashwood, 1999).

- Méthode

Le tableau IX présente le mode opératoire du dosage des protéines totales.

Tableau IX: Mode opératoire du dosage des protéines totales

Tubes Réactifs	Blanc	Etalon	Essai
Réactif du dosage	1 mL	1 mL	1 mL
Etalon	/	25 μ L	/
Echantillon	/	/	25 μ L
Eau distillée	25 μ L	/	/

Après avoir introduit les différents réactifs, les tubes ont été laissés au repos pendant 10 minutes à température ambiante. Par la suite les absorbances ont été lues à 540 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. La coloration était stable pendant 30 minutes.

- Détermination de la concentration de la concentration des protéines totales

$$\text{Conc. Protéines totales (g/dL)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times \text{conc. Etalon (7g/dL)}$$

II.2.10 Protocoles de dosages des paramètres du stress oxydant

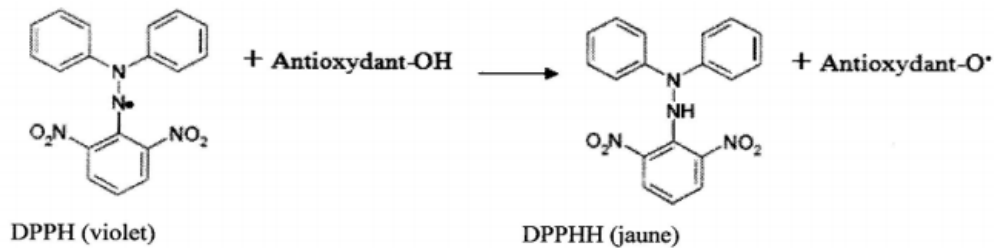
II.2.10.1 Protocoles de dosages *in vitro* des paramètres du stress oxydant

II.2.10.1.1 Activité antiradicalaire DPPH

L'activité antiradicalaire DPPH de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* a été évaluée suivant le protocole décrit par Katalinić *et al.* (2004).

- Principe

Il repose sur la réduction du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) de couleur violette en un composé de couleur jaune par transfert de l'atome d'hydrogène pour former le DPPH-H stable (1,1-diphényl-2-picrylhydrazine). L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre à 517 nm, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés contenus dans l'extrait à analyser.



- Mode opératoire

Dans différents tubes à essai, ont été introduits: 500 μ L d'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* aux concentrations 500 ; 1000 ; 1500 ; 2000 et 2500 μ g/mL et 500 μ L d'une solution méthanolique de DPPH 400 μ M fraîchement préparée. L'acide férulique aux concentrations 1 ; 10 ; 100 et 1000 μ g/mL a été utilisé comme standard. La solution témoin était constituée d'un mélange de 500 μ L d'eau distillée et de 500 μ L de la solution DPPH. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la lecture de la densité optique a été faite à 517 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu contre le blanc constitué d'un mélange de 500 μ L de méthanol et de 500 μ L d'eau distillée.

L'activité antiradicalaire a été exprimée en pourcentage de radical DPPH• réduit et calculée comme suit :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [1 - (\text{DO échantillon 517}/\text{DO témoin 517})] \times 100$$

II.2.10.1.2 Activité antiradicalaire ABTS

Elle a été faite selon le protocole décrit par Re *et al.* (1999).

- **Principe** : En présence d'antioxydant donneur de proton, le radical ABTS^{•+} de couleur verte arrache un proton conduisant à l'ABTS⁺ ; ce qui entraîne une décoloration de la solution avec une absorption maximale à 734 nm.



ΦOH : Antioxydant donneur de proton ;

ΦO : Antioxydant réduit.

$\text{ABTS}^{\bullet+}$: Radical piègeur de proton

ABTS^+ : Radical stable

- Mode opératoire

Dans différents tubes, ont été introduits : 500 µL d'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* aux concentrations 500 ; 1000 ; 1500 ; 2000 et 2500 µg/mL et 500 µL du réactif ABTS fraîchement préparé.

La densité optique a été déterminée à 734 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité contre de l'eau distillée (Blanc). L'acide férulique a été utilisé comme standard aux concentrations de 0,1; 1; 10 ; 100 et 1000 µg/mL. L'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* a été remplacé par de l'eau distillée dans la solution contrôle.

L'activité antiradicalaire a été exprimée en pourcentage de radical ABTS• réduit et calculée comme suit :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [1 - (\text{DO échantillon 734}/\text{DO témoin 734})] \times 100$$

II.2.10.1.3 Activité antioxydante *in vitro* par la méthode de FRAP

- Principe

Cette méthode repose sur la capacité d'un antioxydant à réduire le fer à faible pH. En effet, en milieu acide, le complexe tripyridyltriazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) est réduit en complexe tripyridyltriazine ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) de couleur bleu intense absorbant à 593 nm et dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'antioxydants présents dans le milieu réactionnel (Benzie et Strain, 1996).

- Mode opératoire

Dans un tube à essai, ont été introduits : 100 µl d'extrait de concentration 200 µg/ml; 500 µl de réactif de *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP).

L'acide gallique a été utilisé comme standard. La densité optique a été déterminée à 593 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité contre de l'eau distillée. L'activité réductrice du fer a été exprimée en µg équivalent d'acide gallique (EAG)/mg d'extrait sec.

II.2.10.2 Protocoles de dosage des paramètres du stress oxydant dans l'homogénat de la glande mammaire

II.2.10.2.1 Dosage du malondialdéhyde

Le dosage du malondialdéhyde (MDA) a été effectué suivant la méthode décrite par Wilbur *et al.* (1949). Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde issu de la décomposition des hydroperoxydes d'acides gras réagissent avec l'acide thiobarbiturique

(TBA) pour donner des chromophores dont la concentration est déterminée par la lecture de l'absorbance à 532 nm. Le tableau X présente la procédure adoptée.

Tableau X: Protocole de dosage du malondialdéhyde

Réactifs (µL)	Blanc	Essai
Homogénat	-	100
Eau distillée	100	-
Solution TCA-TBA	2000	2000
<ul style="list-style-type: none"> - Homogénéisation et chauffage à 100 °C (15 min). - Refroidissement et centrifugation à 3000 trs/min (5 min). - Lecture de l'absorbance à 532 nm contre le blanc. 		

TCA: "Trichloroacetic acid"; TBA: "Thiobarbituric acid"

La concentration en MDA a été exprimée en µmol. Le calcul a été effectué en utilisant la loi de Beer-Lambert : $DO = \epsilon \cdot C \cdot L$.

Soit $[MDA] (\mu\text{mol}) = \frac{DO \times 10^6}{\epsilon \times L}$ avec :

DO = densité optique mesurée en 532 nm ;

ϵ = coefficient d'extinction molaire ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$) ;

C = [MDA] : concentration du malondialdéhyde dans l'homogénat (µmol) ;

L = longueur de la cuve (1 Cm).

II.2.10.2.2 Dosage du glutathion réduit

Le dosage du glutathion réduit (GSH) a été réalisé suivant la méthode décrite par Ellman (1959). L'acide 2,2-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements SH du glutathion pour former un complexe coloré jaune qui absorbe à 412 nm. Dans un tube à essai, ont été introduits 10 µL d'homogénat et 1500 µL de réactif d'Ellman. Après agitation au vortex, les tubes ont été laissés au repos pendant 60 min à température ambiante pour le développement de la coloration. Dans le tube blanc, les échantillons ont été remplacés par du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 (10 µL). L'absorbance de chaque tube a été lue à 412 nm contre le tube blanc.

La concentration en GSH a été exprimée en µmol. Le calcul a été effectué en utilisant la loi de Beer-Lambert : $DO = \epsilon \cdot C \cdot L$.

Soit $[GSH] (\mu\text{mol}) = \frac{DO \times 10^6}{\epsilon \times L}$ avec :

DO = densité optique mesurée en 412 nm ;

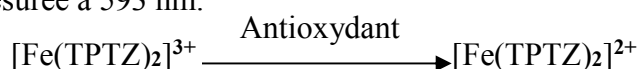
ϵ = coefficient d'extinction molaire ($1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$) ;

$C = [\text{GSH}]$: concentration du glutathion dans l'organe (μmol) ;

L = longueur de la cuve (1 Cm).

II.2.10.2.3 Activité antioxydante *in vivo* par la méthode de FRAP

La détermination du potentiel antioxydant (*in vivo*) de *Anthonotha macrophylla* a été effectuée suivant la méthode de FRAP adaptée de Benzie et Strain (1996). Cette méthode mesure la capacité à réduire le fer à un pH bas (3,6). Une intense coloration bleue est formée lorsque le complexe (TPTZ) ferrique réduit en tripyridyltriazine fer et l'absorbance est mesurée à 593 nm.



Le tableau XI présente la procédure d'établissement de la courbe d'étalonnage.

Tableau XI: Etablissement de la courbe d'étalonnage du potentiel antioxydant *in vivo*

Tubes	Etalons			
	1	2	3	4
Réactifs (μL)				
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \mu\text{M}$	0	75	150	300
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \text{ 300 } \mu\text{M}$	0	150	300	600
Eau distillée	2000	1775	1550	1100
- Homogénéisation et incubation à température ambiante (12 min). - Lecture de l'absorbance à 593 nm contre le blanc (étalon 1).				

Le tableau XII indique la procédure de dosage de la « Ferric Reducing Antioxidant Power » dans les homogénats de la glande mammaire.

Tableau XII: Protocole de dosage de la « Ferric Reducing Antioxidant Power » *in vivo*

Tubes	Blanc	Essai
Réactifs (µL)		
Homogénat	-	75
Eau distillée	75	-
Réactif de FRAP	2000	2000
- Homogénéisation et incubation, à température ambiante (12 min). - Lecture de l'absorbance à 593 nm contre le blanc.		

La

concentration de $[\text{Fe}_2\text{SO}_4]$ des échantillons est déterminée en utilisant une équation de régression obtenue à partir de la courbe d'étalonnage.

La capacité antioxydante a été exprimée en μmol de $[\text{Fe}_2\text{SO}_4]$.

II. 2.11 Protocoles de dosages des groupes de composés polyphénoliques

II.2.11.1 Protocole de dosage des polyphénols totaux

La détermination de la concentration en polyphénols totaux de *A. macrophylla* a été effectuée suivant la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965).

- **Principe:** Les polyphénols en milieu alcalin réduisent les acides phosphotungstiques et phosphomolybdique du réactif de Folin-Ciocalteu en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène qui absorbent la lumière à 760 nm.

- **Mode opératoire**

Le réactif Folin-Ciocalteu (75 μL) a été ajouté à 750 μL d'extrait de *A. Macrophylla* (1 mg/mL). Au bout de 3 minutes, 750 μL de Na_2CO_3 (20%) ont été ajoutés au mélange, puis incubés pendant 30 minutes à l'obscurité. L'absorbance a été déterminée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-VIS 1605. Une courbe d'étalonnage a été obtenue à l'aide de solutions de quercétine à des concentrations de 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ dans le but de déterminer la concentration d'extrait polyphénolique équivalent à la quercétine.

II.2.11.2 Protocole de dosage des flavonoïdes et flavonols

La quantité de flavonoïdes totaux dans l'extrait de *A. macrophylla* a été obtenue en utilisant la méthode colorimétrique décrite par Chang *et al.* (2002).

- **Principe :** Le chlorure d'aluminium forme avec les groupements C-4 et C-3 ou C-5 hydroxy des flavones et flavonols (flavonoïdes), des complexes acides stables. Il forme

également des complexes acides labiles, avec les groupes ortho-dihydroxy dans l'anneau A- ou B- des flavonoïdes.

- **Mode opératoire**

Dans le cas de la détermination des flavonoïdes, l'extrait de *A. macrophylla* (1 mg/mL) a été mélangé avec 100 µL de chlorure d'aluminium à 10% et 100 µL d'acétate de sodium 1 M. Le mélange est resté à la température ambiante pendant 40 minutes. L'absorbance a été déterminée à 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-VIS 1605. La courbe d'étalonnage a été obtenue à l'aide de solutions de quercétine à des concentrations de 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 µg/mL dans de l'éthanol. La méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium a été utilisée pour la détermination des flavonols, mais la période d'incubation était de 150 min et l'absorbance du mélange réactionnel a été déterminée à 440 nm. Les expériences ont été répétées 3 fois.

- **Expression des résultats :** Les flavonoïdes et les flavonols totaux ont été exprimés en équivalent de quercétine/mg de poids sec, qui est un composé de référence courant. Les concentrations en flavonoïdes et en flavanols ont été déterminées par extrapolation sur des courbes d'étalonnage.

II.2.11.3 Protocole de détermination de la teneur en protéines totales

La quantité de protéines présentes dans l'extrait aqueux de *A. macrophylla* a été déterminée par la méthode de Bradford (1976) en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) comme standard.

- **Principe :** En présence des chaînes latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine), aromatiques et sur les fonctions amines libres de la chaîne polypeptidique, le bleu de Coomassie G₂₅₀ forme un complexe chromogène de coloration bleu, présentant un maximum d'absorption à 595 nm.

- **Mode opératoire**

Après introduction de l'extrait de *A. macrophylla* (1 mg/mL) dans le milieu, a été ajouté, le réactif de Bradford fraîchement préparé et le mélange a été incubé pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance a été déterminée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-VIS 1605. La courbe d'étalonnage a été obtenue à l'aide de solutions de BSA à des concentrations de 20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100 µg / mL.

- **Détermination de la quantité de protéines :** La concentration en protéines a été déterminée par extrapolation sur la courbe d'étalonnage.

II.2.12 Analyse microscopique et expression des résultats

L'analyse microscopique de même que la détermination de la taille des différents épithélia ont été effectuées au moyen d'un équipement complet consistant en un microscope AxiosKop 40 relié à un ordinateur où les images sont transférées, éditées et analysées avec les logiciels MRGrab 1.0 et AxioVision 3.1, tous fournis par ZEISS (Hallbermoos, Allemagne).

II.2.12.1 Masse des organes frais

La masse relative d'un organe (MRO) en mg/kg de la masse corporelle a été déterminée par la formule suivante : $MRO (mg/kg) = MO (mg) / MC (kg)$.

MRO = masse relative des organes, MO = masse des organes, MC = masse corporelle.

II.2.12.2 Taille des épithélia

La taille des épithéliums utérin et vaginal a été exprimée en μm et déterminée sur les microphotographies grâce aux logiciels MRGrab 1.0 et AxioVision 3.1.

II.2.12.3 Méthode d'examen des glandes mammaires

Les indicateurs de l'effet anticancéreux de l'extrait sur la glande mammaire ont été: une faible hyperplasie au niveau des lobules (faible prolifération cellulaire), une faible dilatation des conduits lobulaires et une faible diminution des tissus adipeux et conjonctif (Wafa *et al.*, 2008).

II.2.12.4 Paramètres tumoraux

❖ Incidence des tumeurs

C'est le pourcentage d'animaux atteints dans un groupe.

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

❖ Charge tumorale

C'est la somme des masses totales des tumeurs des animaux d'un groupe.

$$\text{Charge tumorale (mg/kg)} = \Sigma \text{ masses relatives totales des tumeurs}$$

❖ Pourcentage d'inhibition lié à la charge tumorale

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

(Silehe *et al.*, 2017)

Volume des tumeurs (cm³) = Longueur × largeur × épaisseur × $\pi/6$ (Faustina *et al.*, 2013)

II.2.13 Analyse statistique

L'analyse des variances (ANOVA) suivie du test de Dunnett pour les comparaisons multiples ont été utilisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.0 pour les tests *in vivo*. Toutes les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (ESM). La significativité a été fixée à $p < 0, 05$. Les expériences *in vitro* ont été effectuées en triplicata et répétées trois fois et le logiciel Sigma plot software a été utilisé pour traiter les résultats.

CHAPITRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Résultats

III.1.1 Effets chimiopréventifs de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* sur le cancer du sein induit par le DMBA

III.1.1.1 Effets sur la masse corporelle

La figure 20 présente l'évolution de la masse corporelle des animaux pendant 28 semaines de traitement. Tous les animaux ont présenté une croissance continue durant la période de traitement. Aucune différence significative n'a été notée sur la masse des animaux entre les différents groupes à l'exception de ceux recevant le tamoxifène et l'extrait de *A. macrophylla* à la dose de 75 mg/kg (au jour 56). Les animaux recevant le tamoxifène avaient une masse corporelle moyenne significativement plus petite ($p < 0,01$) que celle du groupe témoin négatif.

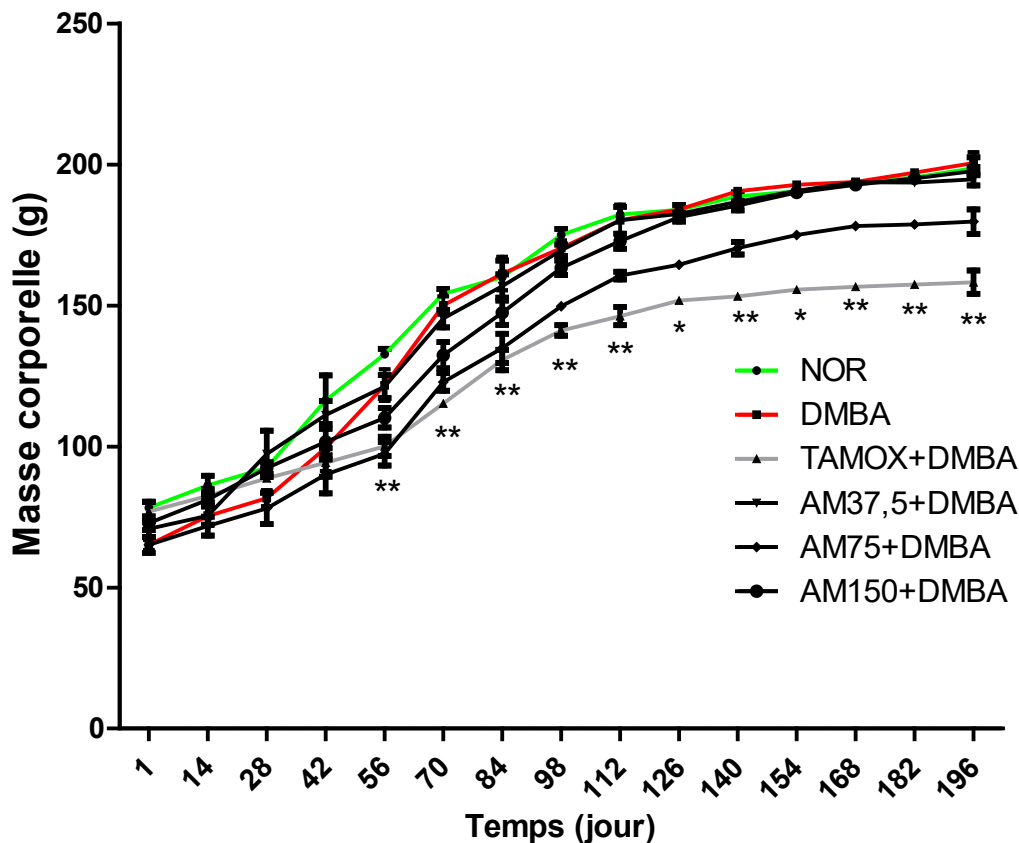


Figure 20: Effets de *A. macrophylla* sur la masse corporelle des animaux. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm ESM (n = 10). * $P < 0,05$ et ** $p < 0,01$ comparé au témoin négatif. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant l'eau distillée; DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant l'eau distillée; TAMOX+ DMBA = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. AM+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg.

III.1.1.2 Effets sur l'incidence, la charge, le volume et la morphologie des tumeurs mammaires

Les données de l'activité chimiopréventive de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* sur l'incidence des tumeurs mammaires, la charge totale des tumeurs et le volume des tumeurs après 28 semaines de traitement sont présentés dans le tableau XIII. Le cancer du sein a été induit par administration unique du DMBA à la dose de 70 mg/kg. Aucune tumeur n'a été observée chez les animaux normaux tandis que les animaux du groupe DMBA ont eu une incidence de 100% de tumeurs mammaires à la fin de l'expérience. Dans le groupe tamoxifène, les animaux ont montré une réduction significative ($p < 0,001$) de l'incidence des tumeurs, de la charge totale des tumeurs ($p < 0,01$) et du volume des tumeurs comparé au groupe DMBA. L'extrait de *A. macrophylla* (75 et 150 mg/kg) a réduit significativement l'incidence des tumeurs (30% à la dose de 75 mg/kg et 50% à la dose de 150 mg/kg), la charge totale des tumeurs (70% à la dose de 75 mg/kg et 53,28% à la dose de 150 mg/kg), et le volume des tumeurs (0,26 cm³ à la dose de 75 mg/kg et 0,59 cm³ à la dose de 150 mg/kg) comparé au groupe DMBA (1,25 cm³).

La figure 21 illustre les effets chimiopréventifs de l'extrait de *A. macrophylla* sur les volumes et les masses moyennes des tumeurs mammaires après 28 semaines de traitement. Les rats traités avec l'extrait de *A. macrophylla* aux doses de 75 et 150 mg/kg et au tamoxifène ont montré une réduction de la masse des tumeurs mammaires comparé au groupe témoin DMBA.

Tableau XIII: Activité chimiopréventive de l'extrait de *A. macrophylla* sur le cancer du sein après 28 semaines de traitement

Groupes	NOR	DMBA	TAMOX + DMBA	AM37,5 + DMBA	AM75 + DMBA	AM150 + DMBA
Paramètres						
Nombre de rats avec tumeurs/rats totaux	0/10	10/10	2/10	6/10	3/10	5/10
Incidence des tumeurs (%)	0	100	20***	60	30**	50*
Charge totale des tumeurs (mg/kg)	0	318,32	88,05**	298,72	98,16**	148,7*
% Inhibition de la charge des tumeurs	-	-	72,33	6,15	70,00	53,28
Volume des tumeurs (cm ³)	-	1,25 ± 0,05	0,25 ± 0,03***	0,86 ± 0,04	0,26 ± 0,03***	0,59 ± 0,08**

Les données sont représentées sous forme de moyenne ± ESM (n = 10). * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparé au témoin négatif. ### $p < 0,001$ comparé au témoin normal. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant l'eau distillée; DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant l'eau distillée; TAMOX+ DMBA = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg. AM+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg.

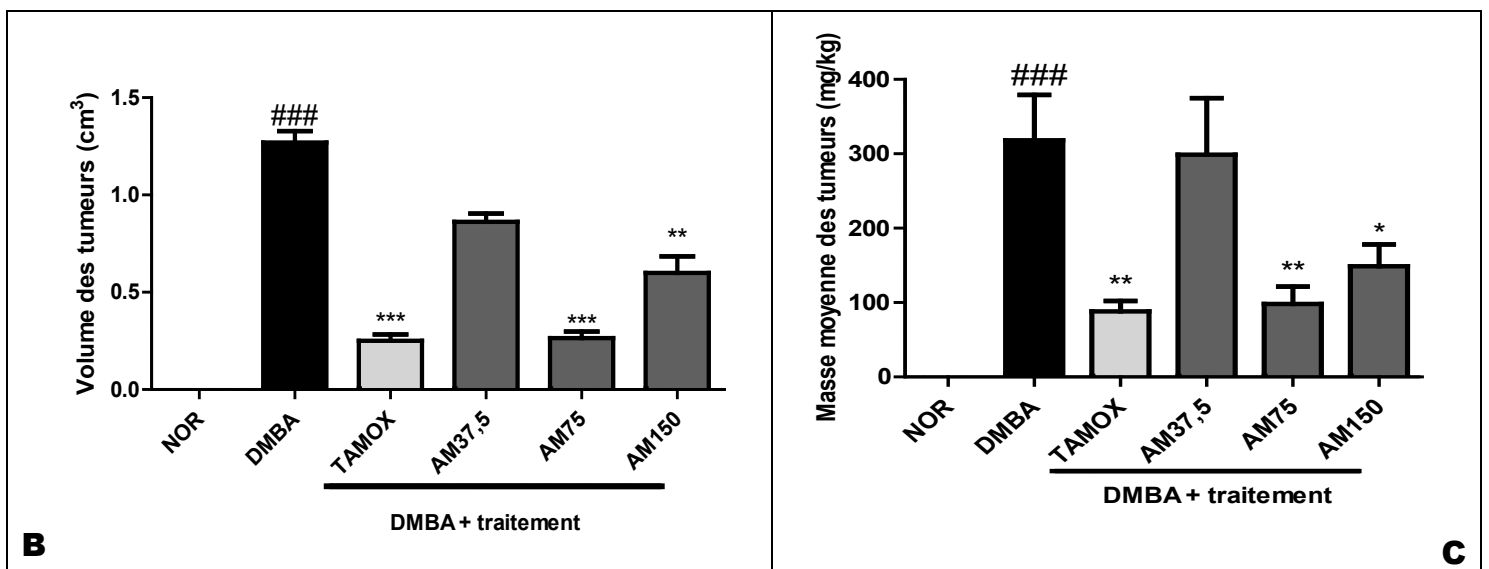
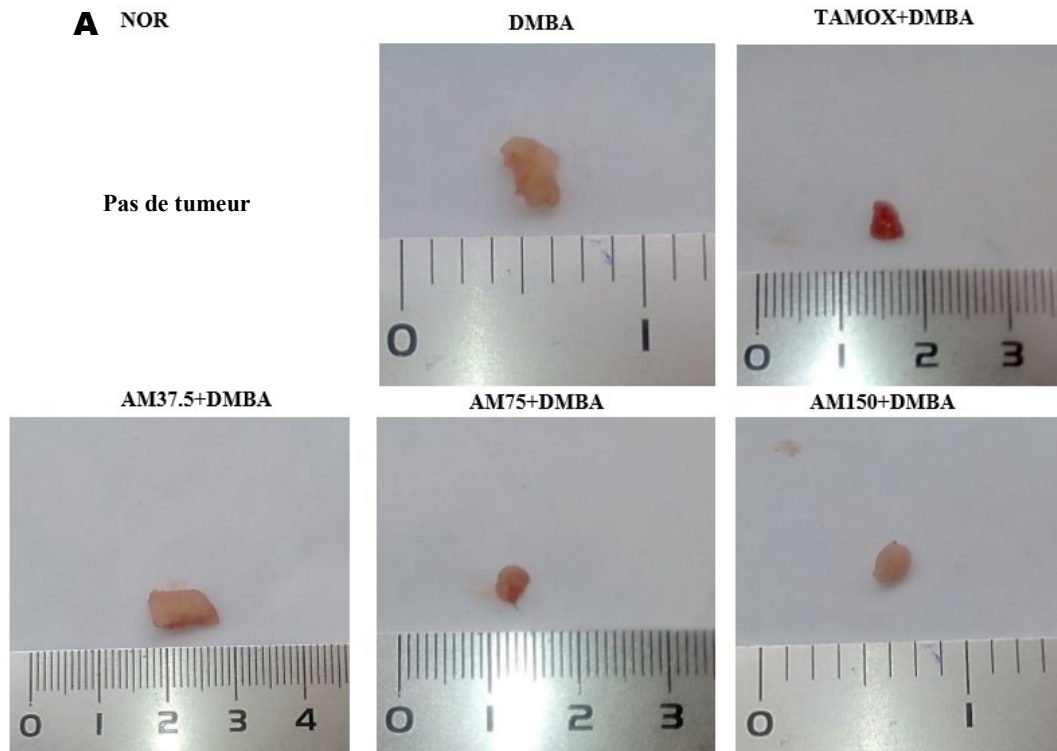


Figure 21: Effets de *A. macrophylla* sur le volume (B) et la masse moyenne des tumeurs (C). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm ESM (n = 10). * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparé au témoin négatif. ### $p < 0,001$ comparé au témoin normal. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX+ DMBA = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM+ DMBA = Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg.

III.1.1.3 Effets de l'extrait sur les microarchitectures des glandes mammaires

Après 28 semaines de traitement, les microarchitectures des glandes mammaires des animaux normaux présentent des acini normaux, avec des conduits étroits, et disséminés dans un volume de tissu adipeux. Les glandes mammaires des animaux traités avec le DMBA étaient caractérisées par une hyperplasie des lobules et une dilatation des conduits mammaires avec diminution du tissu adipeux. Aucun signe d'hyperplasie n'a été observé sur les glandes mammaires des animaux traités avec le tamoxifène. Les rates traitées avec l'extrait de *A. macrophylla* ont développé une hyperplasie aux doses de 37,5 et de 150 mg/kg. Cependant, les animaux qui ont reçu l'extrait de *A. macrophylla* à la dose de 75 mg/kg ont présenté une histoarchitecture quasi normale (Figure 22).

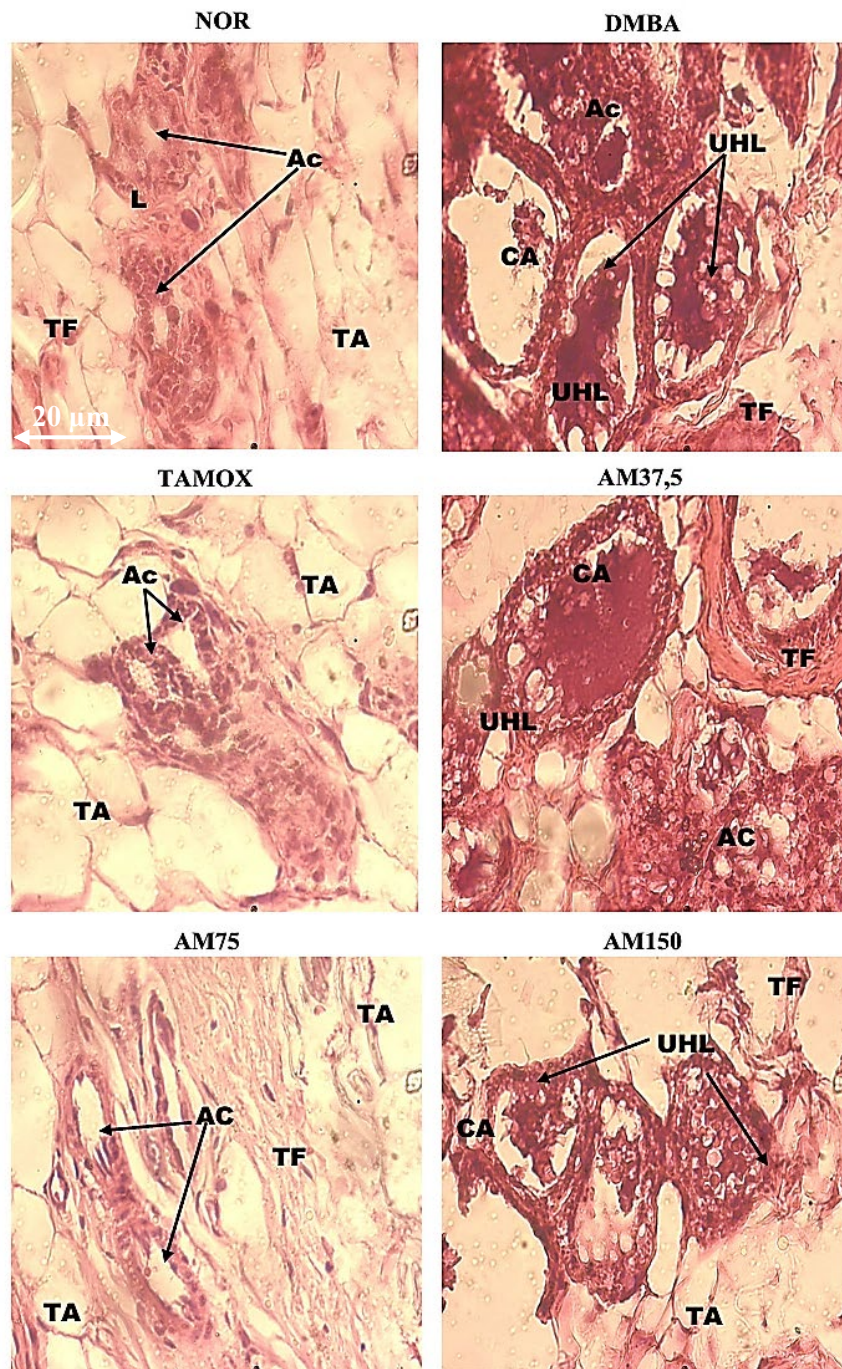


Figure 22: Effets de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* sur les glandes mammaires après 28 semaines de traitement. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM= Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg respectivement. Ac = Acinus; TA = Tissu adipeux; TF = Tissu fibreux; L = Lobule; CA = Conduit atypique; UHL = Unité hyperplasique lobulaire.

III.1.1.4 Effets de l'extrait sur le statut oxydant dans la glande mammaire

Le statut oxydant dans les homogénats des glandes mammaires est présenté sur la figure 23. L'augmentation du taux de MDA et la diminution du taux de GSH et de la force de réduction du Fe^{3+} ont été observées dans les glandes mammaires des rats DMBA comparés aux animaux normaux. L'extrait de *A. macrophylla* a significativement ($p < 0,01$) diminué le taux de MDA dans les glandes mammaires aux doses de 37,5 et de 150 mg/kg. L'extrait de *A. macrophylla* a induit une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de GSH aux doses de 37,5 et de 75 mg/kg et de la force de réduction du Fe^{3+} à la dose de 150 mg/kg comparé au groupe DMBA. Dans le groupe tamoxifène, les animaux ont montré une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de GSH et de force de réduction du Fe^{3+} ($p < 0,01$) dans les glandes mammaires.

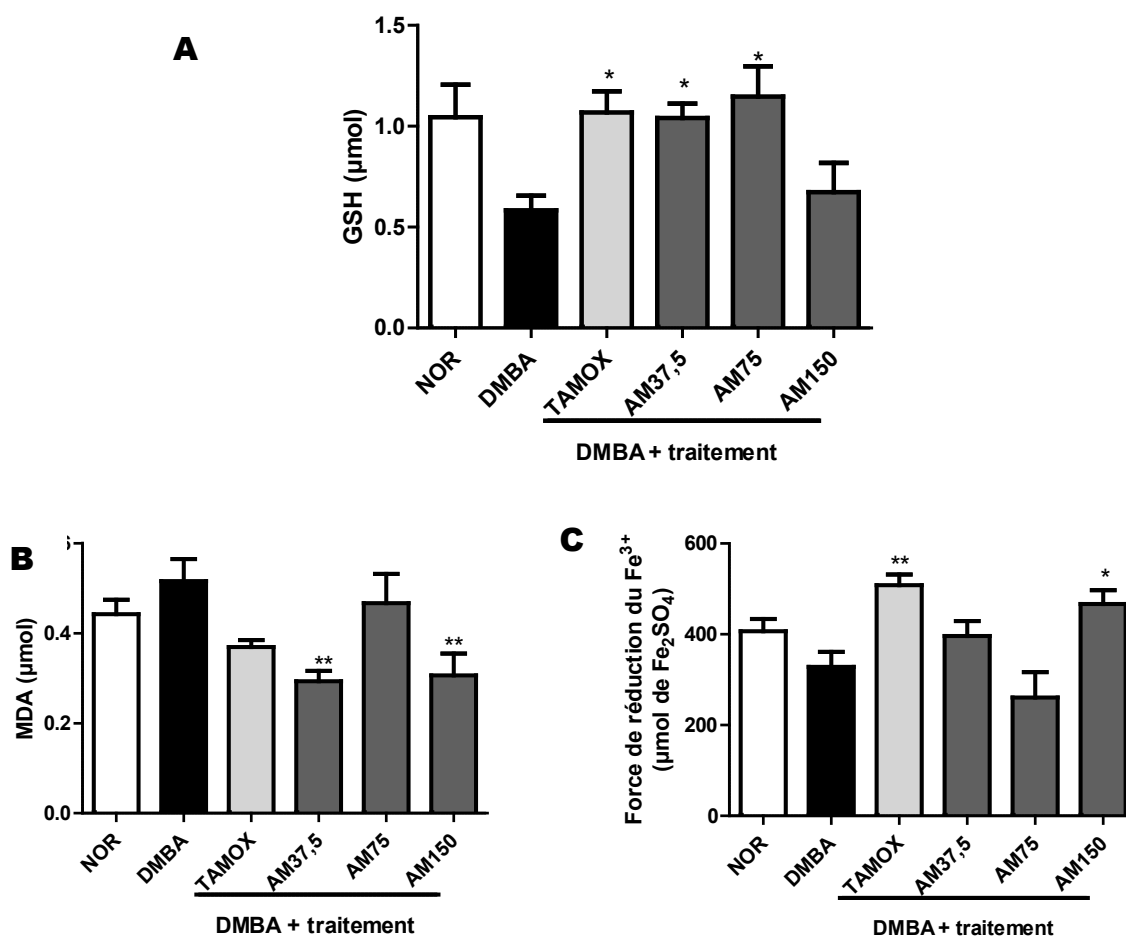
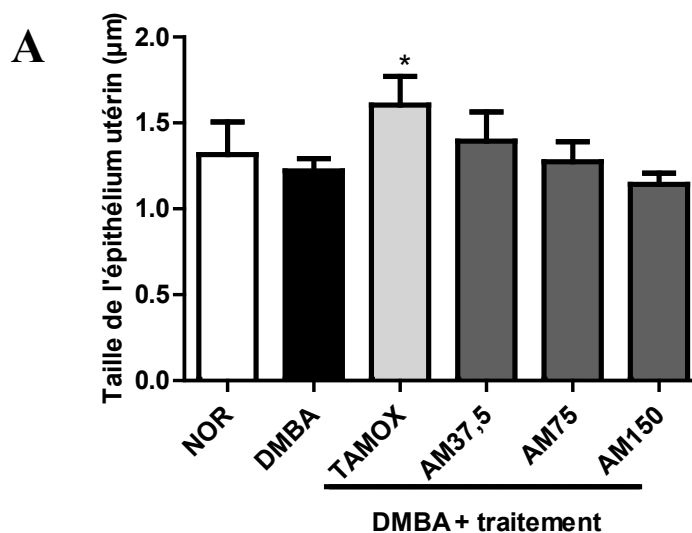


Figure 23: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur les taux de GSH (A) et de MDA (B) et la force de réduction du Fe^{3+} (C) dans les glandes mammaires. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm ESM ($n = 10$). * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparé au témoin négatif. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM = Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg.

III.1.1.5 Effets de l'extrait sur les cibles primaires des œstrogènes

III.1.1.5.1 Sur l'épithélium utérin

Sur l'utérus, aucune différence significative n'a été observée entre la taille de l'épithélium utérin des animaux normaux, et celle des animaux du groupe DMBA. Le tamoxifène a significativement ($p < 0,05$) augmenté la taille de l'épithélium utérin en comparaison au groupe DMBA. *A. macrophylla* à toutes les doses testées n'a induit aucune variation significative de la taille de l'épithélium utérin comparé aux rates du groupe DMBA (Figure 24). L'épithélium utérin est uni stratifié simple comportant deux types de cellules (les cellules volumineuses, claires et les cellules sécrétrices, plus étroites et foncées). La microphotographie de l'utérus du groupe témoin négatif montre une réduction de la taille de l'épithélium utérin comparé au groupe normal.



B

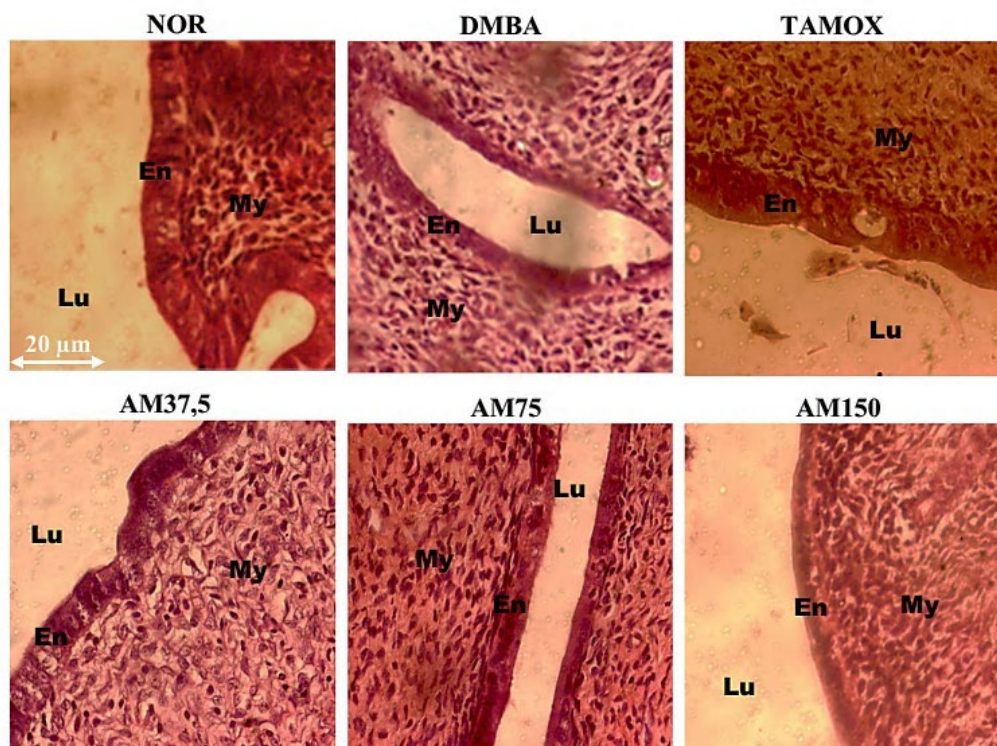


Figure 24: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur l'utérus. Représentations graphiques des tailles des épithélia utérin (A) et microarchitectures (H&E, 400X) de l'utérus (B) après 28 semaines de traitement. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule ; TAMOX= Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM= Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg respectivement. My = Myomètre ; En = Endomètre ; Lu = Lumière utérine.

III.1.1.5.2 Sur l'épithélium vaginal

La figure 25 montre que le DMBA n'a pas affecté la taille de l'épithélium vaginal qui est restée similaire à celle des animaux du groupe normal. Le tamoxifène tout comme l'extrait de *A. macrophylla* n'a pas affecté ce paramètre qui est resté similaire à celui du groupe DMBA. L'épithélium vaginal est pavimenteux, stratifié et non kératinisé. On distingue trois couches : la couche basale et parabasale (couche de multiplication des cellules), la couche intermédiaire (couche de maturation) et la couche superficielle (couche de desquamation). La microphotographie du vagin du groupe témoin négatif montre une augmentation de la taille de l'épithélium vaginal comparé au groupe normal.

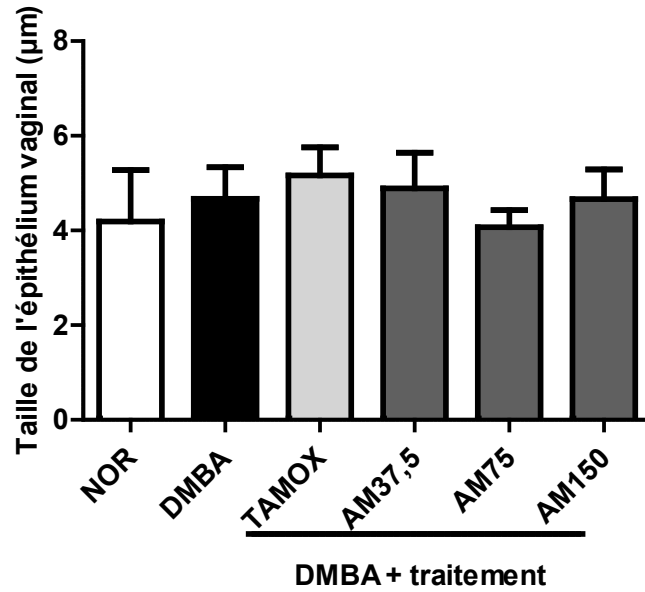
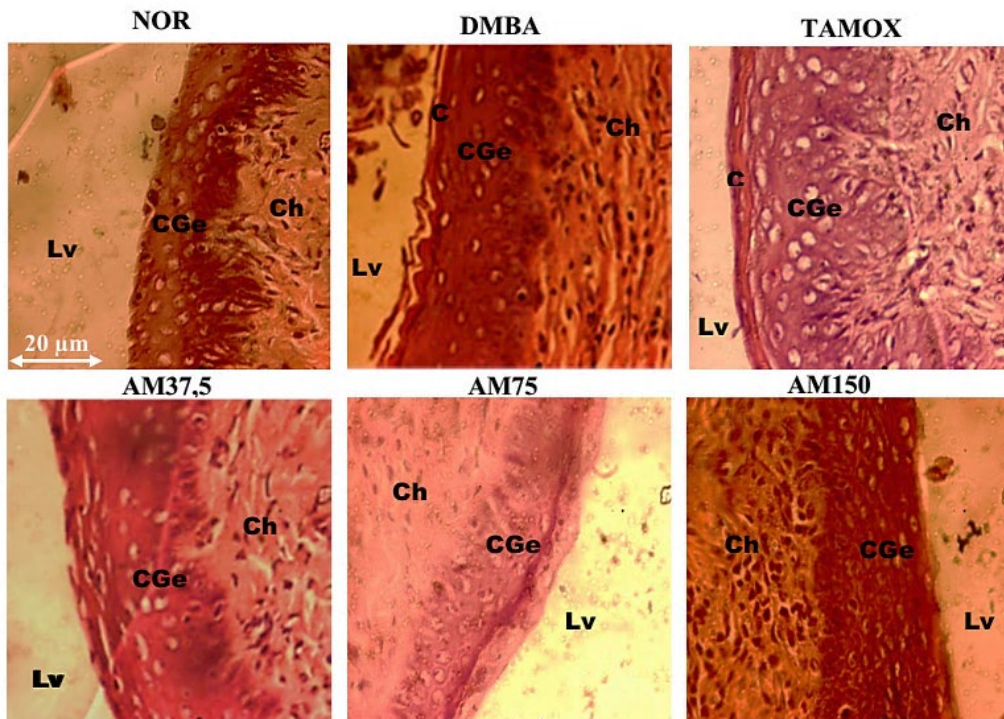
A**B**

Figure 25: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur le vagin. Représentation graphique des tailles des épithélia vaginaux (A) et microarchitectures (H&E, 400X) du vagin (B) après 28 semaines de traitement. CGe = Couche germinative; C = Couche cornée; Ch = Chorion; Lv = Lumière vaginale. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule ; TAMOX= Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM= Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg respectivement.

III.1.1.6 Evolution du statut cancéreux des glandes mammaires sur quelques organes cibles

Au terme de 28 semaines de traitement, aucune métastase du cancer du sein n'a été observée sur le foie (Figure 26), les poumons (Figure 27), le cerveau (Figure 28), l'os (Figure 29) et les reins (Figure 30). Le DMBA n'a pas affecté le foie, les poumons, le cerveau, l'os et les reins qui sont restés similaires à ceux des animaux du groupe normal. Le tamoxifène et l'extrait de *A. macrophylla* n'ont pas affecté ces organes qui sont restés similaires à ceux du groupe DMBA.

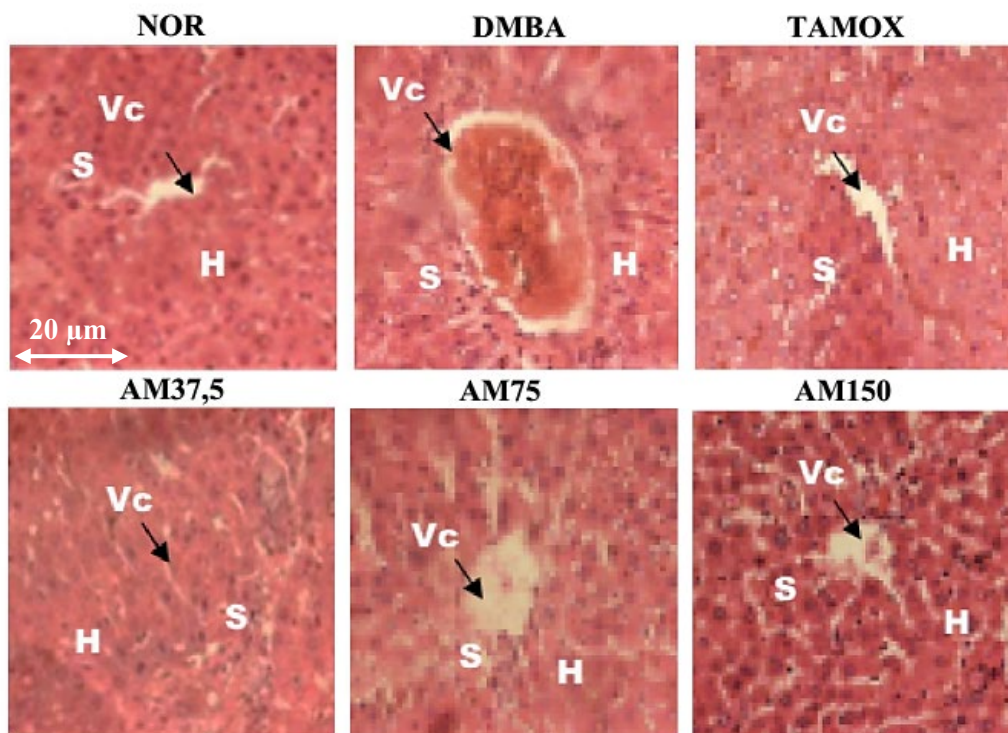


Figure 26: Microarchitectures (H&E, 400X) du foie après 28 semaines de traitement. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM = Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg. Vc = Veine centrale; H = Hépatocyte; S = Sinusoïdes.

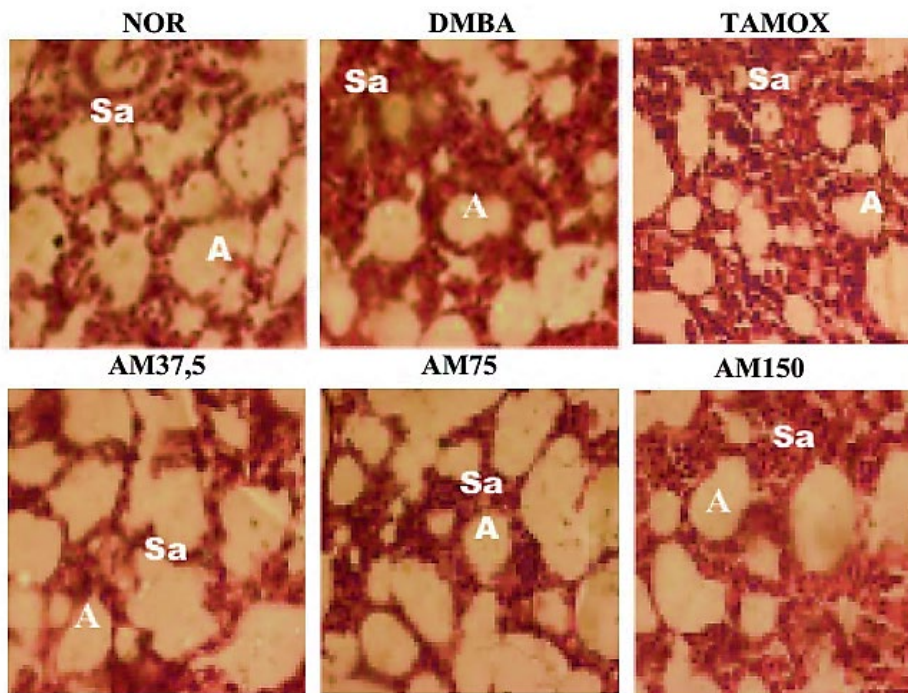


Figure 27: Microarchitectures (H&E, 400X) des poumons après 28 semaines de traitement. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM = Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg. A = Alvéole; Sa = Sac alvéolaire.

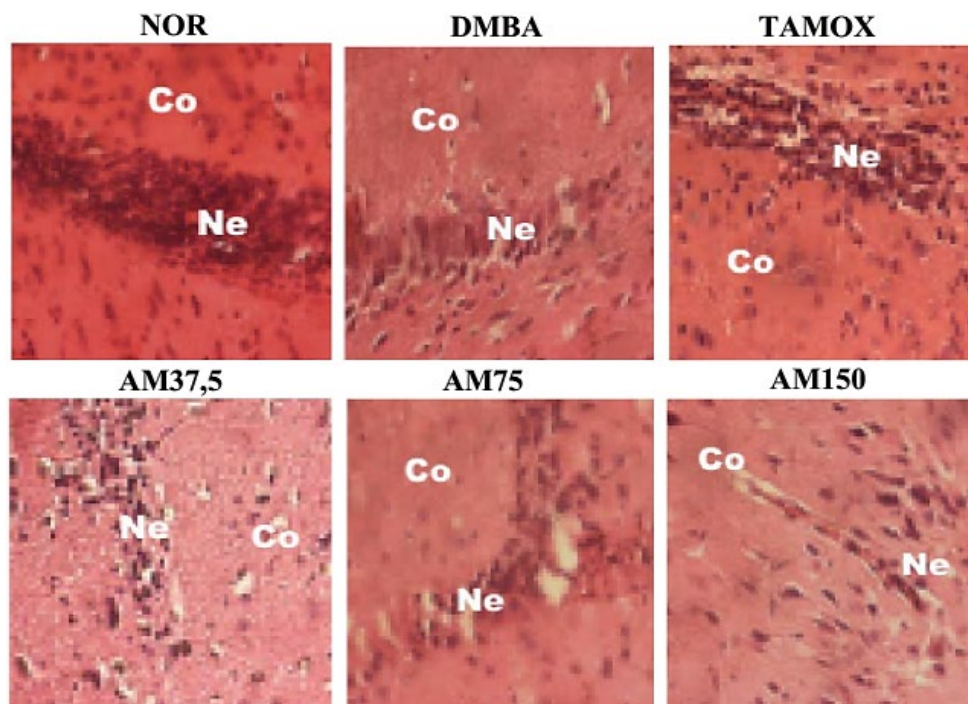


Figure 28: Microarchitectures (H&E, 400X) du cerveau après 28 semaines de traitement. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM = Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg. Ne = Neurone; Co = Cortex.

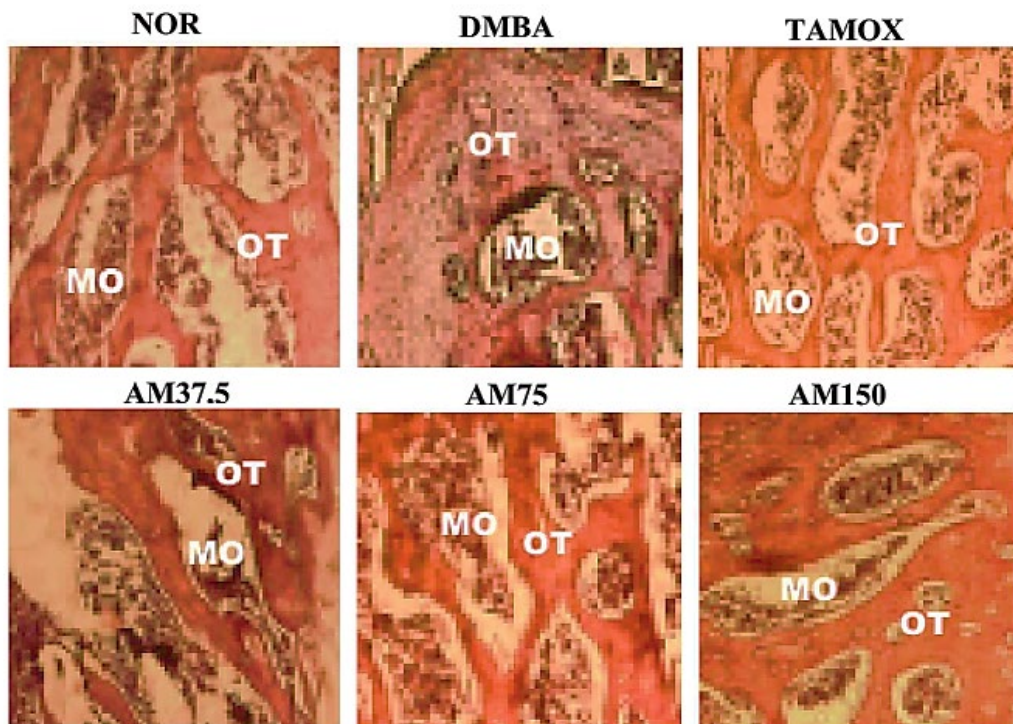


Figure 29: Microarchitectures (H&E, 400X) du fémur après 28 semaines de traitement. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM = Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg. OT = Os trabéculaire; MO = Moelle osseuse.

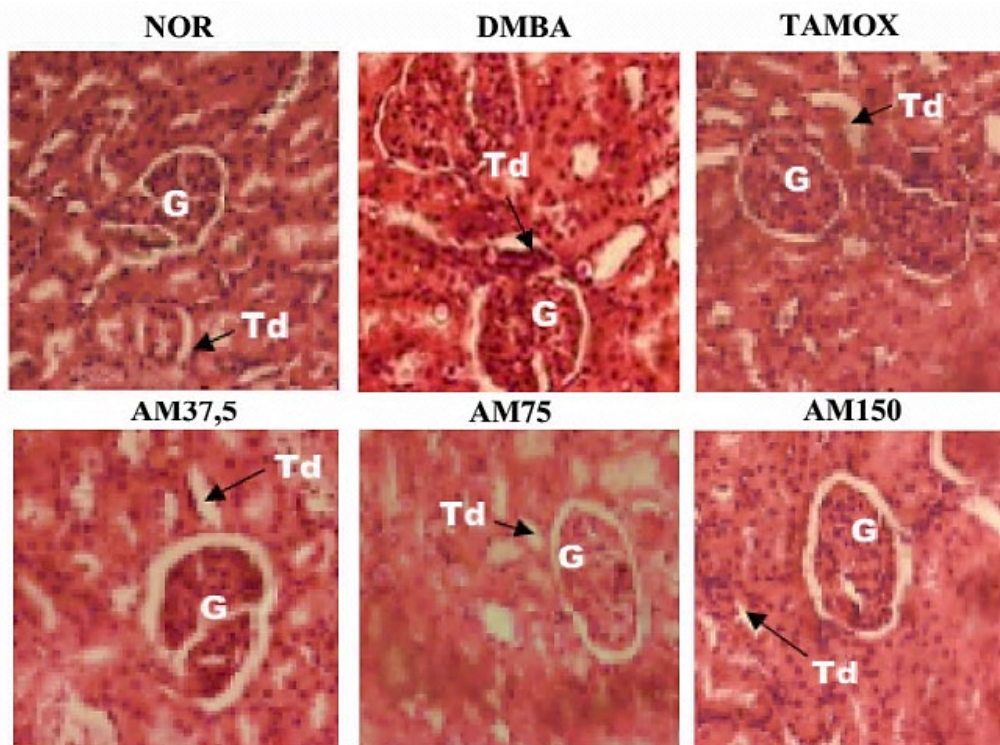


Figure 30: Microarchitectures (H&E, 400X) des reins après 28 semaines de traitement. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM = Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg. G = Glomérule; Td = Tube distal.

III.1.1.7 Effets de l'extrait sur la masse relative des organes frais

Le tableau XIV présente les masses relatives de plusieurs organes après 28 semaines de traitement avec *A. macrophylla*. Aucune différence significative n'a été observée sur la masse des organes chez les animaux ayant reçu le DMBA, exception faite sur la masse de la rate qui a significativement ($p < 0,001$) diminué en comparaison aux rats normaux. Le traitement avec le tamoxifène a significativement diminué la masse de l'utérus ($p < 0,001$) et augmenté les masses du cerveau ($p < 0,001$), des poumons ($p < 0,05$) et de la rate ($p < 0,05$) en comparaison au groupe témoin DMBA. Concernant le traitement avec l'extrait de *A. macrophylla*, il a induit une diminution significative ($p < 0,001$) de la masse de l'utérus à toutes les doses testées, pendant que la masse des poumons a augmenté de façon significative ($p < 0,001$) à la dose de 150 mg/kg. Aucune différence significative n'a été observée sur les masses du foie et du rein dans tous les groupes.

Tableau XIV: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur les masses relatives des organes après 28 semaines de traitements

	NOR	DMBA	Tamox + DMBA	AM37,5 + DMBA	AM75 + DMBA	AM150 + DMBA
Masses relatives des organes (mg/kg)						
Utérus	2510,84 ± 175,34	3119,41 ± 255,70	860,71 ± 68,89***	1995,56 ± 215,87**	1918,32 ± 263,65***	1886,62 ± 132,79***
Ovaires	515,70 ± 32,34	553,00 ± 38,19	271,26 ± 15,70***	508,11 ± 57,60	633,12 ± 39,37	560,67 ± 43,73
Foie	32180,67 ± 1078,55	33445,88 ± 1112,95	32885,53 ± 637,77	32666,69 ± 1242,43	31340,67 ± 555,51	32650,87 ± 1201,50
Poumons	7519,56 ± 323,36	7438,22 ± 322,82	8683,44 ± 315,46*	7829,36 ± 326,67	7072,58 ± 187,54	9722,90 ± 262,86***
Rate	4494,04 ± 420,74	2432,22 ± 197,97###	3589,38 ± 522,78*	2796,97 ± 165,16	3430,71 ± 223,72	3308,45 ± 92,58
Surrénales	287,10 ± 31,37	304,50 ± 23,73	278,05 ± 12,56	312,28 ± 20,66	315,74 ± 24,29	308,53 ± 31,31
Reins	5762,78 ± 98,66	5336,30 ± 189,86	5831,20 ± 144,51	5482,26 ± 229,36	5644,35 ± 180,21	6236,28 ± 127,02
Fémur	2889,83 ± 134,90	2569,72 ± 97,80	2776,19 ± 161,01	2574,52 ± 78,00	2710,88 ± 91,18	2459,38 ± 84,57
Cerveau	7996,21 ± 207,35	8137,33 ± 123,42	9335,01 ± 159,34***	8016,74 ± 275,88	8158,24 ± 147,29	7877,84 ± 134,33

Tous les animaux ont reçu le DMBA par gavage intragastrique à la dose de 70 mg/kg, à l'exception du groupe Normal. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± ESM (n = 10). * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparé au témoin négatif. ### $p < 0,001$ comparé au témoin normal. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX + DMBA = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM+ DMBA= Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg.

III.1.1.8 Effets de l'extrait sur quelques paramètres sériques

Le tableau XV récapitule les effets de *A. macrophylla* sur quelques paramètres sériques. Il a été observé une augmentation non significative du taux de cholestérol chez les animaux traités avec le DMBA comparés aux animaux normaux. Le tamoxifène a induit, tout comme l'extrait de *A. macrophylla* (aux doses de 37,5 et 75 mg/kg) une diminution significative ($p < 0,05$ et $p < 0,01$) du taux de cholestérol total comparés au DMBA. Une augmentation significative du cholestérol HDL ($p < 0,01$) et du rapport cholestérol total/cholestérol HDL ($p < 0,01$) chez les rats traités avec l'extrait de *A. macrophylla* à la dose de 150 mg/kg a été observée en comparaison aux rats du groupe DMBA. Les doses de 37,5 et 75 mg/kg ont réduit ($p < 0,01$) le rapport cholestérol total/cholestérol HDL. Concernant la bilirubine, la créatinine et les protéines totales contenues dans le sang, aucun changement significatif n'a été observé. Seul *A. macrophylla* à la dose de 37,5 mg/kg a réduit ($p < 0,05$) le taux de protéines totales en comparaison au groupe DMBA.

III. 1.1.9 Effets de l'extrait sur quelques paramètres hématologiques

Aucune variation significative n'a été observée entre les différents groupes sur tous les paramètres hématologiques mesurés (Tableau XVI). Seul l'extrait de *A. macrophylla* à la dose de 75 mg/kg ($p < 0,05$) a significativement augmenté l'hématocrite et l'hémoglobine comparé au groupe DMBA bien que cette augmentation reste dans les intervalles de valeurs normales.

Tableau XV: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur les paramètres biochimiques après 28 semaines de traitement

Paramètres	Groupes	NOR	DMBA	Tamox + DMBA	AM37,5 + DMBA	AM75 + DMBA	AM150 + DMBA
Cholestérol total (mg/dL)		57,85 ± 13,51	81,56 ± 14,33	42,64 ± 7,15*	27,81 ± 6,49**	27,29 ± 4,34**	43,79 ± 10,81
Cholestérol HDL (mg/dL)		18,09 ± 0,96	20,00 ± 0,48	18,01 ± 0,22	20,23 ± 0,78	21,01 ± 0,73	24,83 ± 1,37**
Bilirubine totale (µmol/L)		11,44 ± 1,38	13,01 ± 2,24	11,87 ± 1,37	9,36 ± 2,15	9,62 ± 1,72	10,73 ± 1,43
Créatinine (mg/dL)		1,82 ± 0,22	1,76 ± 0,19	1,39 ± 0,08	1,65 ± 0,21	1,53 ± 0,30	1,98 ± 0,17
Protéines totales (g/dL)		6,61 ± 0,44	5,96 ± 0,28	6,27 ± 0,16	4,50 ± 0,37*	5,73 ± 0,17	5,59 ± 0,44

Les données sont représentées sous forme de moyenne ± ESM (n = 10). * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparé au témoin négatif. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX + DMBA = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM+ DMBA= Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg.

Tableau XVI: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur les paramètres hématologiques après 28 semaines de traitement

Paramètres	Groupes	Témoin	DMBA	Tamox + DMBA	AM37,5 + DMBA	AM75 + DMBA	AM150 + DMBA
GB ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)		5,41 \pm 0,68	6,62 \pm 1,13	6,37 \pm 0,98	7,48 \pm 1,01	7,74 \pm 0,81	8,42 \pm 1,21
Lymphocytes (%)		78,18 \pm 5,95	71,00 \pm 1,74	66,77 \pm 2,38	68,70 \pm 2,25	74,18 \pm 1,91	67,04 \pm 1,76
Monocytes (%)		5,88 \pm 1,07	7,66 \pm 0,74	6,55 \pm 0,55	7,44 \pm 0,72	7,40 \pm 0,70	8,10 \pm 0,68
Granulocytes (%)		24,03 \pm 0,92	21,34 \pm 2,29	26,67 \pm 2,32	23,86 \pm 1,70	18,42 \pm 1,62	24,86 \pm 2,20
GR ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)		5,68 \pm 0,40	5,76 \pm 0,27	6,35 \pm 0,15	6,28 \pm 0,61	7,01 \pm 0,24	7,05 \pm 0,31
Hématocrite (%)		32,48 \pm 2,73	32,46 \pm 2,10	36,85 \pm 0,74	39,26 \pm 1,87	41,5 \pm 1,29*	40,18 \pm 1,62
MCV (fL)		57,82 \pm 2,17	56,20 \pm 1,02	58,10 \pm 1,14	58,54 \pm 0,66	59,30 \pm 0,22	57,12 \pm 0,78
Plaquettes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)		307,75 \pm 13,57	320,60 \pm 33,83	349,40 \pm 40,13	402,60 \pm 57,25	421,20 \pm 31,13	383 \pm 17,78
MCH (pg)		18,66 \pm 0,90	18,14 \pm 0,66	18,82 \pm 0,46	18,32 \pm 0,87	19,20 \pm 0,31	18,40 \pm 0,28
Hémoglobine (g/dL)		10,75 \pm 0,99	10,54 \pm 0,83	11,97 \pm 0,32	12,73 \pm 0,57	13,48 \pm 0,46*	13 \pm 0,54
MCHC (g/dL)		32,42 \pm 1,15	32,32 \pm 0,74	32,45 \pm 0,31	31,38 \pm 1,28	32,44 \pm 0,53	32,44 \pm 0,53

GB = Globules blancs ; GR = Globules rouges ; MCV = Volume corpusculaire moyen ; MCH = Hémoglobine corpusculaire moyen ; MCHC = Concentration corpusculaire moyen en hémoglobine. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm ESM (n= 10). * P < 0,05 comparé au témoin négatif. NOR = Animaux du groupe témoin normal recevant le véhicule (l'eau distillée); DMBA = Animaux du groupe témoin négatif DMBA recevant le véhicule; TAMOX + DMBA = Animaux du groupe témoin positif traités au tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg ; AM+ DMBA= Animaux recevant l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux doses de 37,5 ; 75 et 150 mg/kg.

III.1.2 Modes et mécanismes d'action de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

III.1.2.1 Cytotoxicité de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

Les CC_{50} de l'extrait de *A. macrophylla* sur les lignées de cellules cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-231, 4T1, SK-MEL-28, et SF-295) et non cancéreuses (HUVEC et MRC-5) sont présentées dans le tableau XVII. Les CC_{50} des lignées de cellules cancéreuses MCF-7 ($CC_{50} = 300 \mu\text{g/ml}$) et MDA-MB-231 ($CC_{50} = 279 \mu\text{g/mL}$) sont moins importantes que celle observée sur les cellules 4T1 ($CC_{50} = 132 \mu\text{g/mL}$). L'extrait de *A. macrophylla* a induit une CC_{50} de 147 et 155 $\mu\text{g/mL}$ au niveau des cellules SF-295 et SK-MEL-28 respectivement.

III.1.2.2 Effets *in vitro* de l'extrait de *A. macrophylla* sur la croissance des cellules

Les résultats obtenus après incubation des cellules cancéreuses mammaires humaines (MDA-MB 231 et MCF-7), des cellules cancéreuses mammaires de rongeurs (4T-1) et des cellules mammaires normales (HMEC) (Figure 31) montrent une croissance exponentielle des cellules témoins non traitées après 24, 48 et 72 h. En présence de l'extrait de *A. macrophylla* aux différentes concentrations testées (12,5 à 200 $\mu\text{g/mL}$), on observe une inhibition de la croissance de tous les types cellulaires en fonction du temps et de la concentration. Les cellules MDA-MB 231 étaient plus sensibles à l'extrait de *A. macrophylla* que les cellules MCF-7 car à la concentration de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ on observait déjà une diminution de la croissance des cellules MDA-MB 231 comparées aux cellules MCF-7. Les concentrations de 50 et de 200 $\mu\text{g/mL}$ ont entraîné une diminution significative ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) du nombre de cellules cancéreuses.

Tableau XVII: Valeurs de CC_{50} de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* sur les lignées de cellules tumorales et non tumorales

		CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)						
		MCF 7	MDA-MB-231	4T1	SF-295	SK-MEL-28	HUVEC	MCR-5
<i>A.M</i>		300	279	132	147	155	156	147
		Cellules cancéreuses				Cellules non cancéreuses		
		Indice de sélectivité (IS)						
		HUVEC/MCF-7	HUVEC/MBA-MB-231	MCR 5/MCF-7	MCR-5 /MDA-MB 231			
		0,52	0,56	0,46	0,50			

CC_{50} = Concentration de *A. macrophylla* qui résulte de 50% de viabilité cellulaire. IS = CC_{50} de *Anthothona macrophylla* sur les lignées de cellules non tumorales (MCR-5 et HUVEC)/ CC_{50} pour les cellules tumorales (MCF-7, MDA-MB-231 et 4T1).

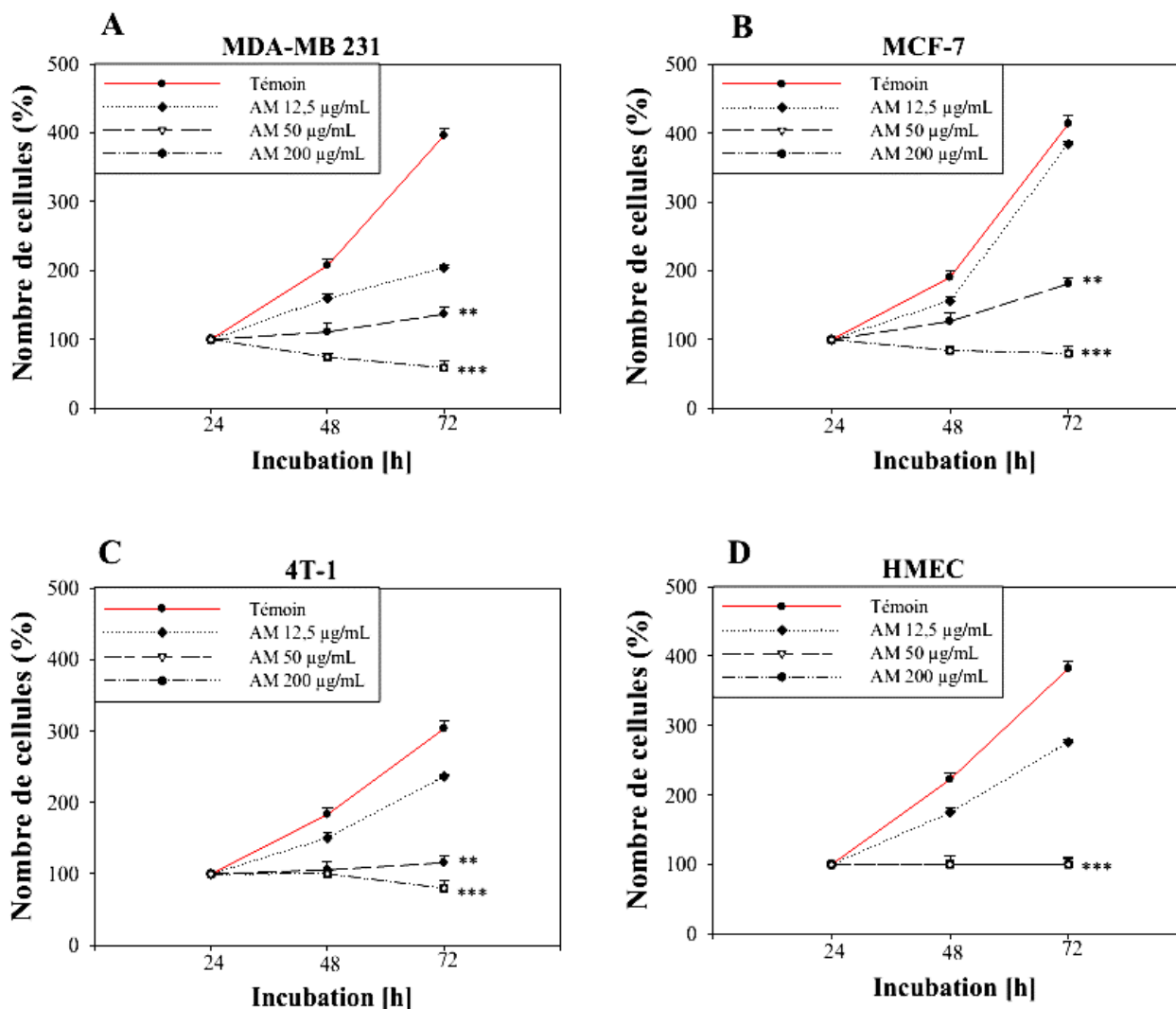


Figure 31: Croissance des cellules cancéreuses mammaires humaines (MDA-MB 231 et MCF-7), de rongeur (4T-1) et des cellules normales mammaires (HMEC) en présence ou non de l'extrait de *A. macrophylla* pendant 24 h, 48 h et 72 h. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparés aux cellules témoins. Témoin = cellules ayant été traitée au DMSO (0,01%), AM = cellules traitées à l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux différentes concentrations de 12,5, 50 et 200 µg/mL.

III.1.2.3 Capacité de *A. macrophylla* à inhiber la prolifération cellulaire et la formation de clones

La figure 32 indique les effets de l'extrait sur la prolifération des cellules MDA-MB 231 après incorporation au BrdU de même que le nombre de clones cellulaires MDA-MB 231 après 24 h et 48 h d'incubation avec l'extrait de *A. macrophylla*. Après 24 et 48 h d'incubation, l'extrait de *A. macrophylla* a induit une diminution de la prolifération cellulaire bien que non significative à la concentration de 50 µg/mL et une diminution significative ($p < 0,05$) à la concentration de 100 µg/mL, en comparaison aux cellules témoins (Figure 32A). L'extrait de

A. macrophylla a également induit une diminution significative du nombre de clones de cellules MDA-MB 231 aux concentrations de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,01$) et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$), en comparaison aux cellules témoins (Figure 32B).

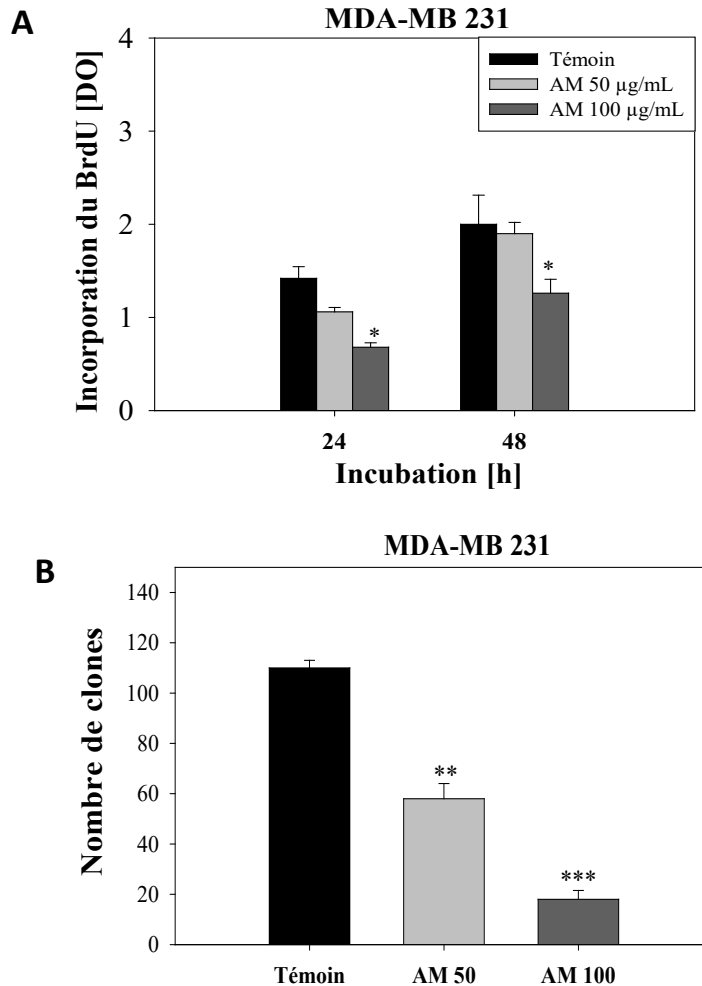


Figure 32: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur la prolifération des cellules MDA-MB 231 après incorporation du BrdU (A) et sur le nombre de clones de cellules MDA-MB 231 formés (B) après 24 h et 48 h d'incubation. Les cellules MDA-MB 231 ont été traitées avec l'extrait de *A. macrophylla*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparé aux cellules témoins. Témoin = cellules ayant été incubées en présence du véhicule DMSO (0,01%), AM = cellules traitées à l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux concentrations de 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

III.1.2.4 Type de mort cellulaire induit par *A. macrophylla* et impact sur le cycle cellulaire

Les résultats présentés sur la figure 33 montrent le type de mort cellulaire induit par l'extrait de *A. macrophylla* et son impact sur le cycle cellulaire. Le nombre de cellules MDA-MB 231 apoptotiques a augmenté à la concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ après 24 h d'incubation en comparaison aux cellules témoins. On note une légère augmentation du nombre de cellules

apoptotiques à la concentration de 50 µg/mL comparé aux cellules témoins (Figure 33A). Après 48 h, une légère augmentation du nombre de cellules apoptotiques et une augmentation significative du nombre de cellules nécrotiques ont été observées à la concentration de 100 µg/mL, en comparaison aux cellules témoins (Figure 33B).

Les résultats sur le cycle cellulaire montrent qu'après 24 h, il y'a eu augmentation du nombre de cellules en phase S et G2/M à la concentration de 50 µg/mL et augmentation du nombre de cellules en phase G2/M à la concentration de 100 µg/mL, en comparaison aux cellules témoins (Figure 33C).

Après 48 h, aucune différence significative n'a été observée à la concentration de 50 µg/mL tandis qu'à la concentration de 100 µg/mL, on observe une augmentation du nombre de cellules bloquées à la phase G2/M (Figure 33D).

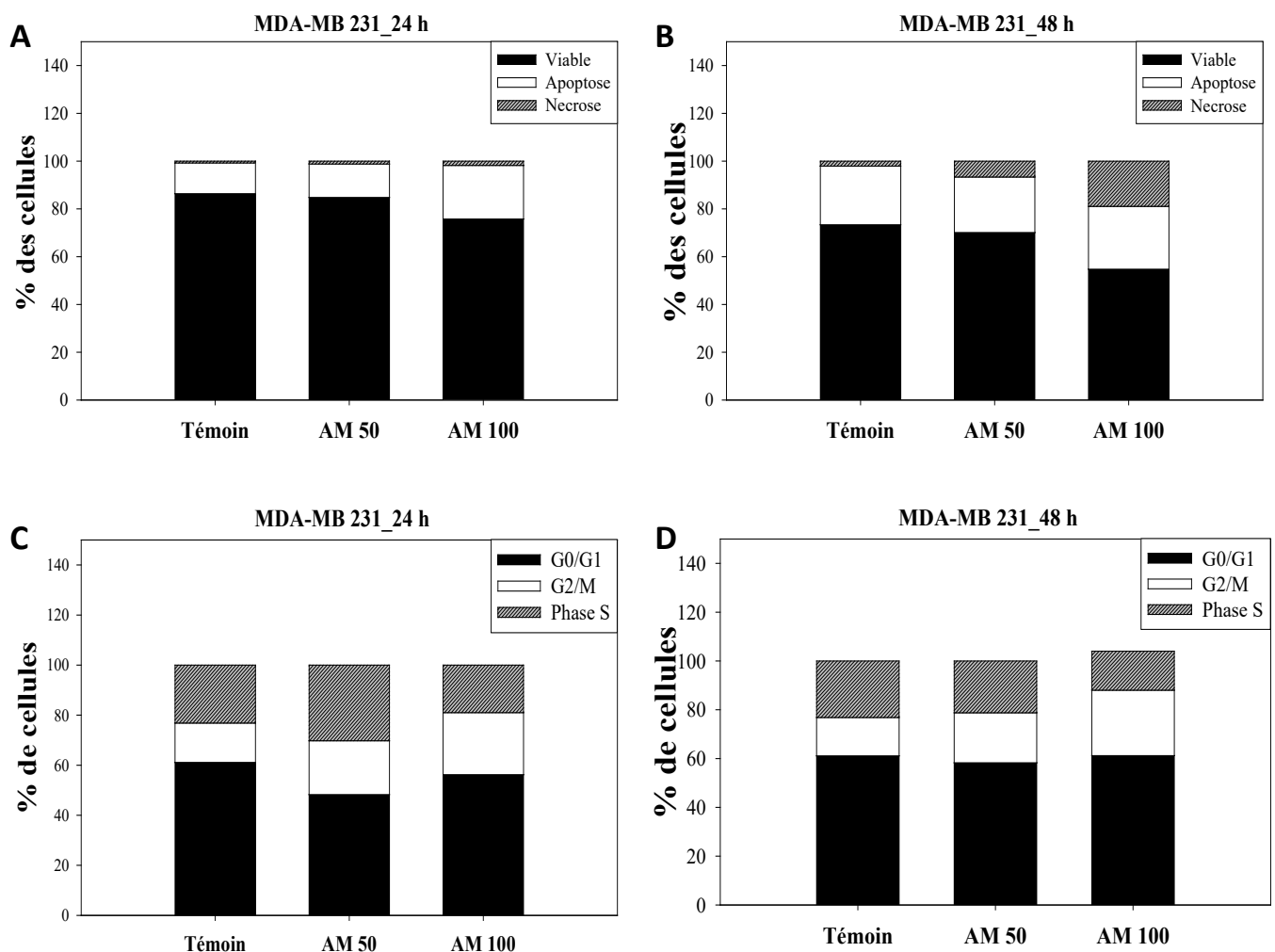


Figure 33: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur le type de mort induit sur les cellules MDA-MB 231 après 24 h (A) et 48 h (B) de traitement et sur le cycle cellulaire des cellules MDA-MB 231 après 24 h (C) et 48 h (D) d'incubation. Témoins = cellules incubées avec le véhicule DMSO (0,01%), AM = cellules incubées avec l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux concentrations de 50 et 100 µg/mL.

III.1.2.5 Effets de *A. macrophylla* sur l'adhésion à la matrice extracellulaire

La figure 34 représente les effets de *A. macrophylla* sur l'adhésion des cellules MDA-MB 231 aux composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène et la fibronectine. L'extrait a diminué de façon concentration-dépendante l'encrage des cellules au collagène et à la fibronectine et ce, en comparaison avec le témoin. Sur le plastique, le nombre de cellules a augmenté avec l'extrait, toujours en comparaison avec le témoin.

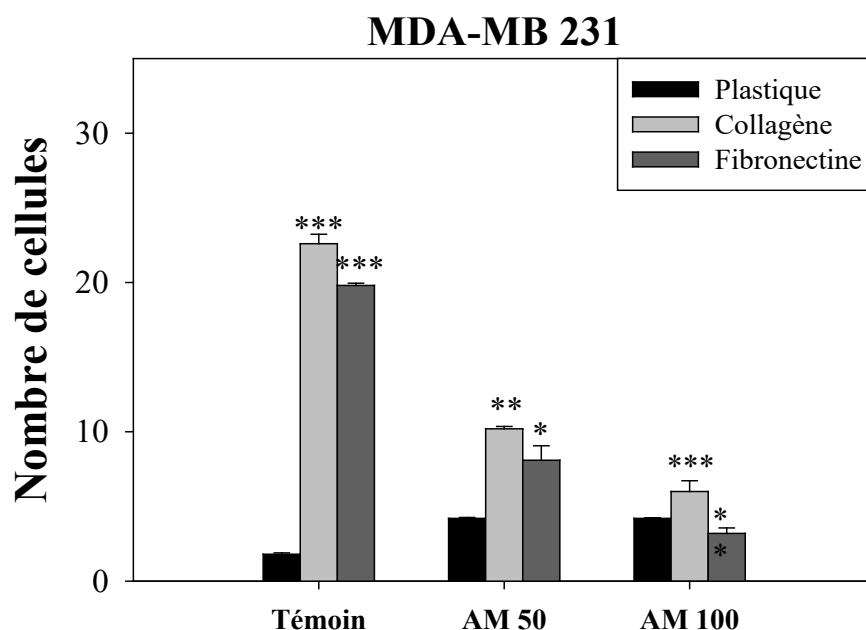


Figure 34: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur l'adhésion des cellules MDA-MB 231 aux composants de la matrice extracellulaire (collagène et fibronectine). Les cellules MDA-MB 231 ont été incubées avec l'extrait de *A. macrophylla*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$, en comparaison aux cellules témoins. Témoin = cellules ayant été incubées avec le véhicule (DMSO 0,01%), AM = cellules exposées à l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux concentrations de 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$.

III.1.2.6 Effets de *A. macrophylla* sur la migration cellulaire

La figure 35 présente les effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur la migration cellulaire. Après induction de la plaie, nous avons observé chez le groupe témoin, la migration cellulaire et l'occupation relative de la zone blessée par les cellules en migration et ce, de façon temps-dépendant. L'extrait de *A. macrophylla* a diminué de façon temps et concentration-dépendante, la migration des cellules MDA-MB-231 vers la zone lésée. Après 12 et 24h d'incubation, l'extrait a inhibé la migration cellulaire aux concentrations de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) et 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$), en comparaison avec le témoin.

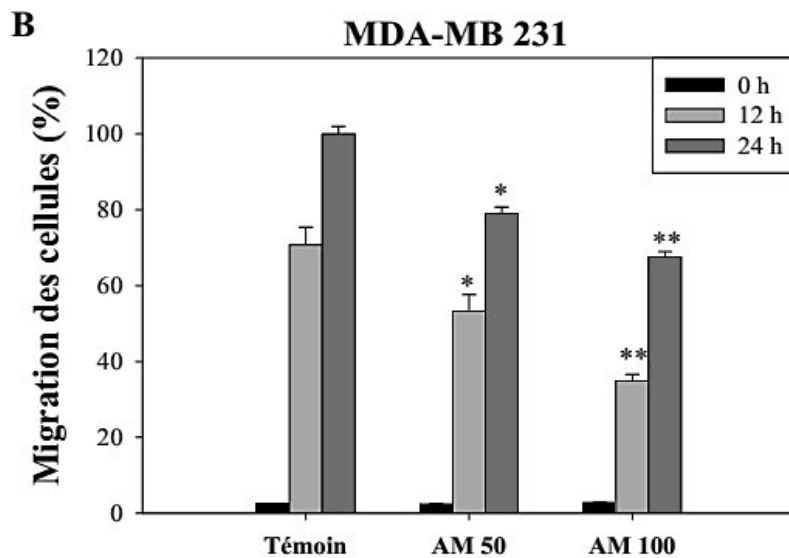
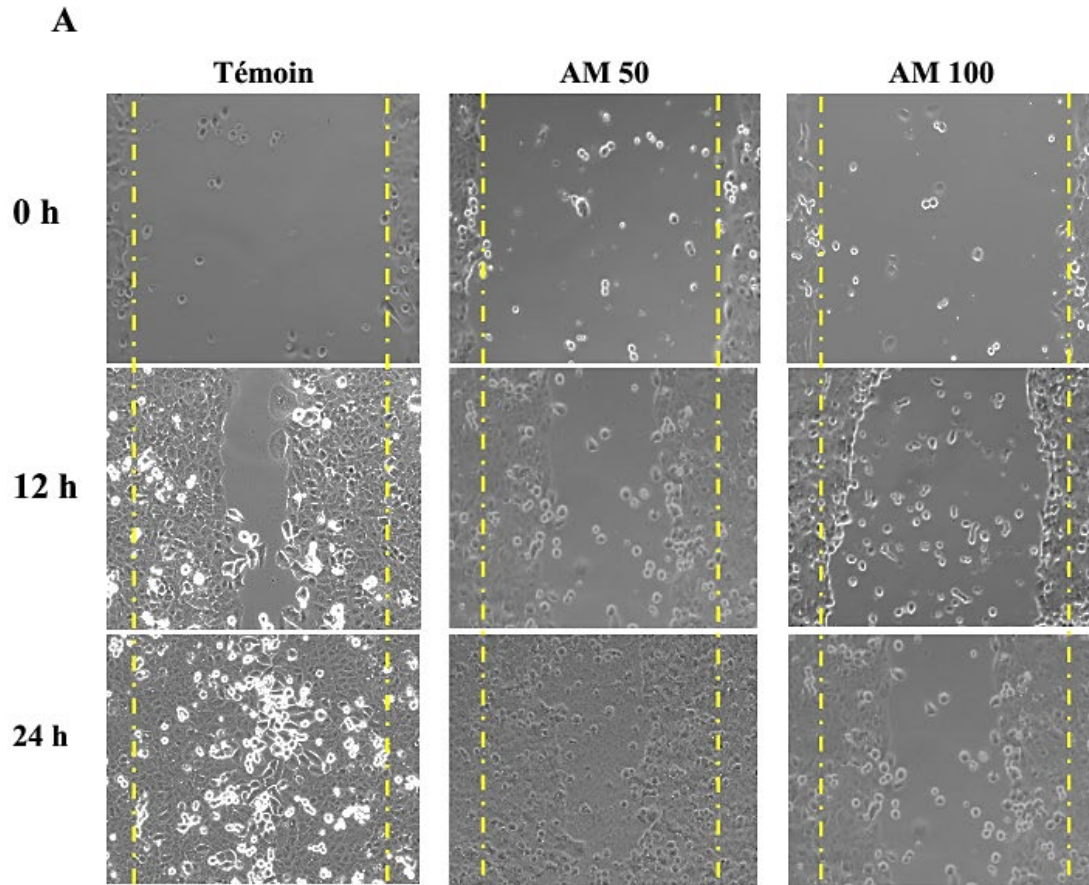


Figure 35: Effets de l'extrait de *A. macrophylla* sur la migration des cellules MDA-MB 231 après 12 et 24 h d'incubation. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$, en comparaison aux cellules témoins. Témoin = cellules ayant été incubées avec le véhicule (DMSO 0,01%), AM = cellules exposées à l'extrait aqueux de *A. macrophylla* aux concentrations de 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$.

III.1.2.7 Activité antioxydante et étude phytochimique de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

III.1.2.7.1 Activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

Les activités de piégeage des radicaux libres de l'extrait de *A. macrophylla* sont 198,7 µg/mL (DPPH) et 198,4 µg/mL (ABTS). Cet extrait posséderait une activité chélatrice des métaux *in vitro* (43,39 ± 0,89 mg eq acide gallique/g d'extrait sec) (Tableau XVIII).

Tableau XVIII: Activités de piégeage des radicaux libres et capacité antioxydante *in vitro*

	Activités de piégeage des radicaux libres de <i>A. macrophylla</i> CE ₅₀ (µg/mL)	
	DPPH	ABTS
Acide ferulique (témoin)	3,44	3,68
<i>A. macrophylla</i>	198,70	198,40
Activités chélatrices <i>in vitro</i> (mg eq acide gallique/g d'extrait sec)		
43,39 ± 0,89		

CE₅₀ = concentration de l'extrait de *A. macrophylla* résultant de 50% de piégeage des radicaux libres

III.1.2.7.2 Etude phytochimique de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

III.1.2.7.2.1 Analyse quantitative

Le screening phytochimique a montré que l'extrait aqueux de *A. macrophylla* contient des protéines, phénols, flavonoïdes et flavonols (Tableau XIX).

Tableau XIX: Analyse phytochimique quantitative

Concentration dans l'extrait de <i>A. macrophylla</i> de certaines classes de composés phytochimiques	
Protéines totales	31,36 ± 1,67 mg eq serum albumine bovine
Phénols totaux	10,24 ± 0,55 mg eq Quercétine
Flavonoïdes	9,76 ± 0,99 mg eq Quercétine
Flavonols	3,66 ± 0,25 mg eq Quercétine

La concentration des protéines totales est exprimée en mg. Les concentrations des phénols, de flavonoïdes et de flavonols sont exprimées en mg d'équivalence de quercétine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM de quatre tests indépendants. eq = équivalent.

III.1.2.7.2.2 Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Douze composés ont été identifiés parmi les soixante-deux composés obtenus à partir du profil GC et ensuite divisés en 7 groupes. Ces groupes étaient constitués d'alcool (1), d'alcool acétonique (1), d'amide (1), d'acides (6), d'amine (2) et d'alcane (1). Les structures des principaux composés aromatiques identifiés dans *A. macrophylla* sont illustrées dans le tableau XX, tandis que le chromatogramme d'un échantillon représentatif est fourni sur la figure 36.

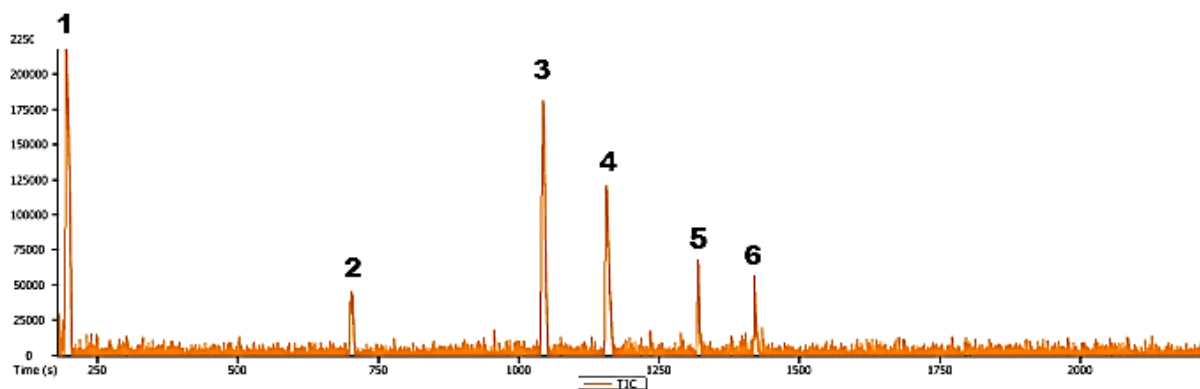


Figure 36: Chromatogramme de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* enregistré par GC-MS.

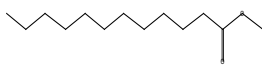
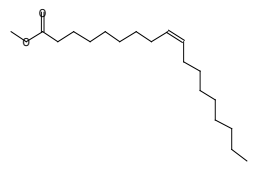
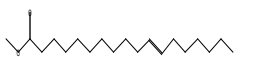
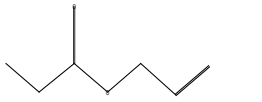
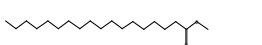
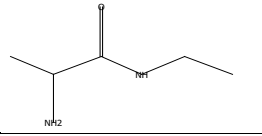
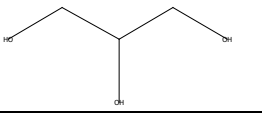
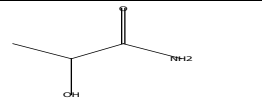
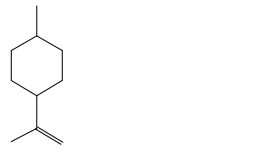

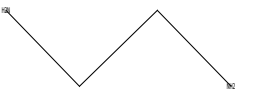
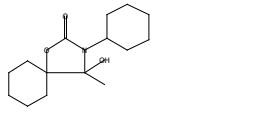
1, 2,3 = Composés non identifiés

4 = Oxa-3-azaspiro[4.5]decan-2-one, 3-cyclohexyl-4-hydroxy-4-methyl-

5 = Acide hexadécanoïque, méthyl ester

6 = Acide octadécenoïque (Z)-, méthyl ester

Tableau XX : Composés chimiques identifiés dans l'extrait aqueux de *A. macrophylla*

Nom chimique	Nature du composé	Formule moléculaire	R.T. (s)	Aire %	Structure
Acide Hexadécanoïque, méthyl ester	Acide gras méthyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1319,2	16,729	
Acide 9-Octadécenoïque (Z)-, méthyl ester	Acide gras insaturé méthyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	1419,72	1,7261	
Acide, 11-Octadécenoïque, méthyl ester	Acide gras insaturé méthyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	1419,62	1,0011	
Acide Propanoïque, 2-propenyl ester	Acide ester	C ₆ H ₁₀ O ₂	304,54	0,06412	
Méthyl stéarate	Acide gras saturé méthyl	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	1433,32	2,5262	
Acide Carbamique, monoammonium salt	Acide	CH ₆ N ₂ O ₂	189,28	5,6397	
Propane-1,2,3-triol	Alcool	C ₃ H ₈ O ₃	184,78	0,58818	
Propanamide, 2-hydroxy-	Amide	C ₃ H ₇ NO ₂	183,72	1,0107	
Cyclohexane, 1-méthyl-4-(1-méthylethenyl) -, trans	Alkane	C ₁₀ H ₁₈	1416,72	0,49398	
Diglycolamine	Amine	C ₄ H ₁₁ NO ₂	182,96	0,41611	
Ethylène diamine	Amine	C ₂ H ₈ N ₂	194,26	59,287	
1-Oxa-3-azaspiro[4.5]decan-2-one, 3-cyclohexyl-4-hydroxy-4-méthyl-	Acétone alcool	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	1156,1	6,0903	

R.T : Temps de rétention ; s : seconde

III.1.2.8 Effets antiœstrogéniques *in vitro* et *in vivo* de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla*

III.1.2.8.1 Effets antiœstrogéniques *in vitro* de l'extrait sur les cellules MCF-7

L'œstradiol et la quercétine ont induit la prolifération des cellules MCF-7 ($p < 0,001$) comparé au groupe témoin. *A. macrophylla* a inversé cet effet aux concentrations de 10; 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$). La prolifération des cellules MCF-7 a été inhibée quand l'œstradiol était co-administré avec l'extrait aqueux de *A. macrophylla* à toutes les concentrations testées (Figure 37).

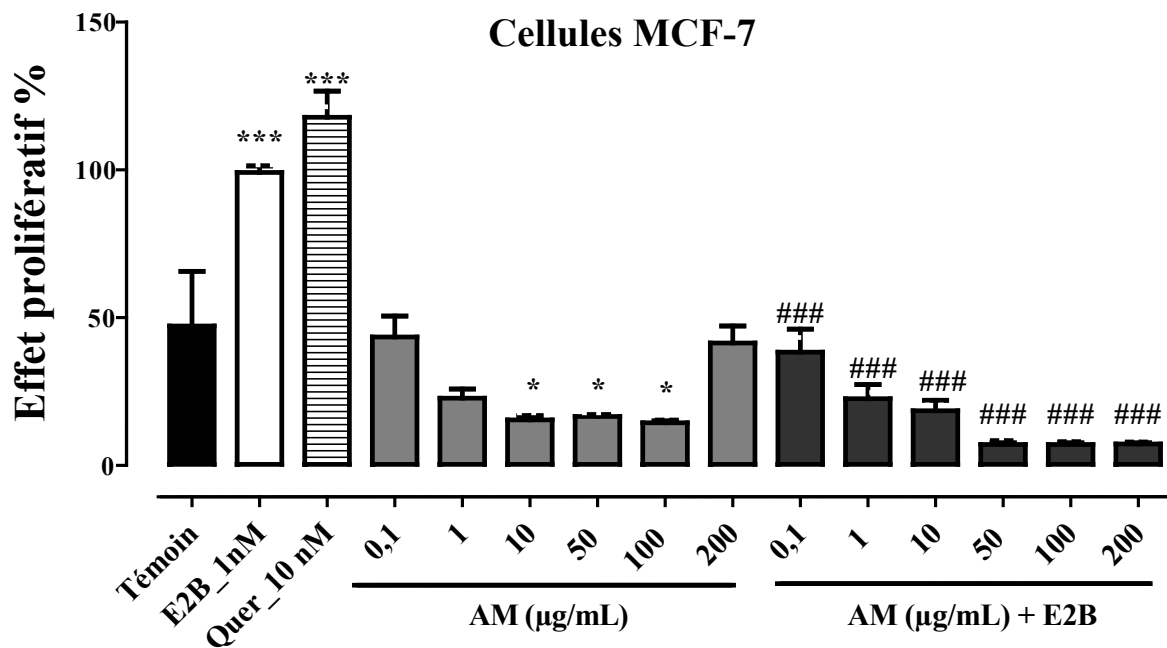


Figure 37: Effets de *Anthonotha macrophylla* sur la prolifération des cellules MCF-7. Ces effets ont été investigués par la mesure de la prolifération des cellules MCF-7. L'effet prolifératif (EP) a été mesuré en présence du DMSO (0,01%), 17 β -œstradiol (10 nM), quercétine (50 nM) et *A. macrophylla*. EP = nombre maximal des cellules de l'échantillon/nombre de cellules du témoin DMSO. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparé au témoin ; ### $p < 0,001$ comparé à E₂B.

III.1.2.8.2 Effets antiœstrogéniques *in vivo* de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

III.1.2.8.2.1 Effets de l'extrait sur la masse et l'épithélium utérin

La figure 38 montre que l'œstradiol a induit une augmentation significative de la masse relative de l'utérus et la taille de l'épithélium utérin. *A. macrophylla* a potentialisé l'augmentation de la masse de l'utérus frais induit par l'œstradiol de 24,39 % à 75 mg/kg et de 88,17% à 150 mg/kg ($p < 0,01$). Une diminution de la taille de l'épithélium utérin de 12,71% à 75 mg/kg et de 27,98% à 150 mg/kg ($p < 0,05$) comparé à E₂V a été observée quand E₂V a été co-administré avec *A. macrophylla*.

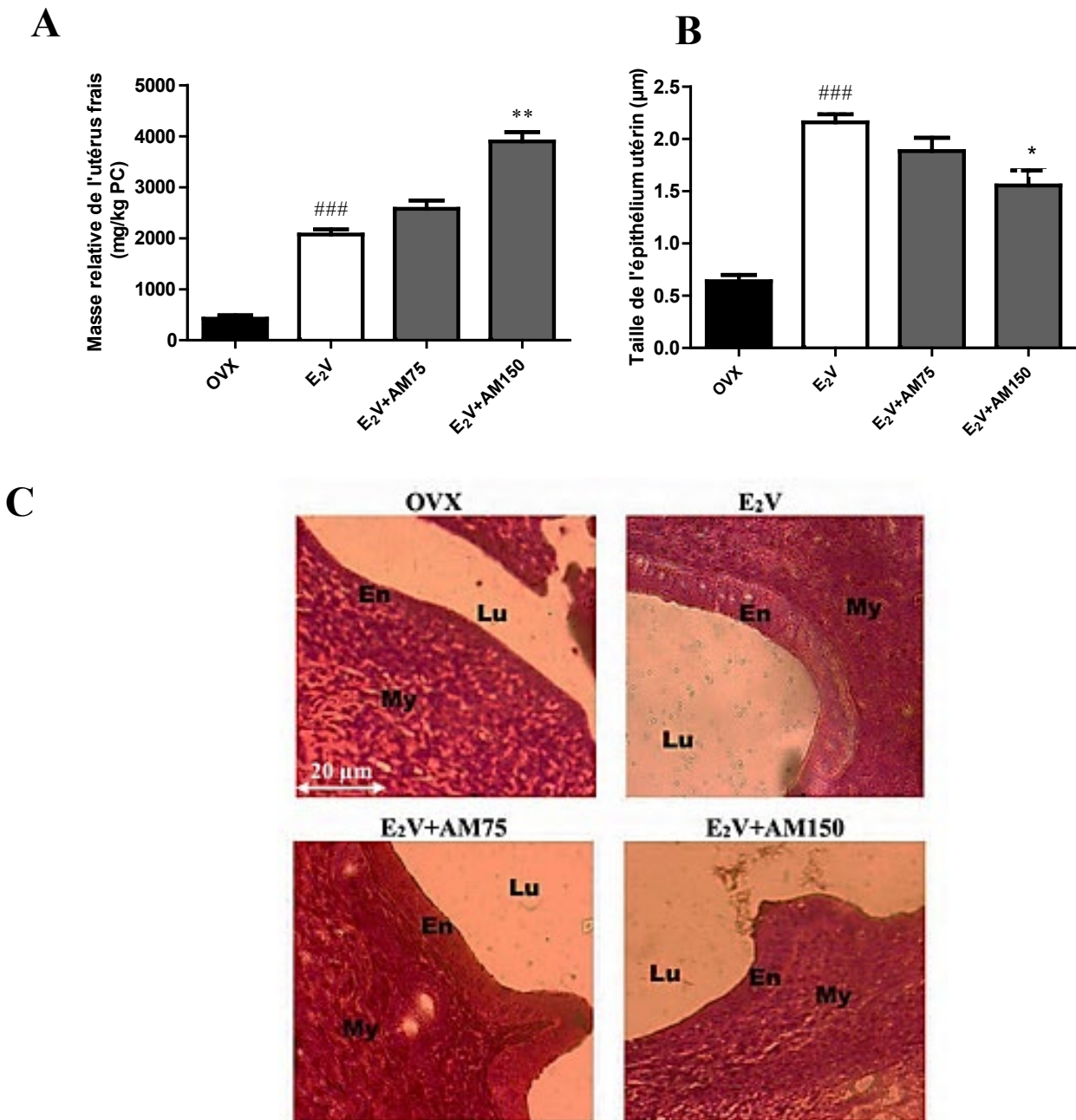


Figure 38: Représentations graphiques de la masse de l'utérus frais (A), de la taille de l'épithélium utérin (B) et microphotographies (H&E, 400X) de la coupe utérine (C) après 3 jours de traitement. OVX= Animaux ovariectomisés, E₂V = œstradiol valérate; AM = extrait aqueux des écorces du tronc de *A. macrophylla*. Lu = Lumière de l'utérus, En = Endomètre, My = Myomètre. ### p < 0,001 comparé à OVX; * p < 0,05 ; ** p < 0,01 comparé à E₂V.

III.1.2.8.2.2 Effets de l'extrait sur l'épithélium vaginal

L'œstradiol a induit la prolifération des cellules et la cornification de l'épithélium vaginal comparé au groupe ovariectomisé (Figure 39). *Anthonotha macrophylla* a réduit l'effet de l'E₂V de 18,59% à 75 mg/kg (p < 0,01), comparé aux animaux traités uniquement avec E₂V. La

microphotographie de l'épithélium montre une réduction des couches et de la lumière vaginale comparée à celle de l'E₂V.

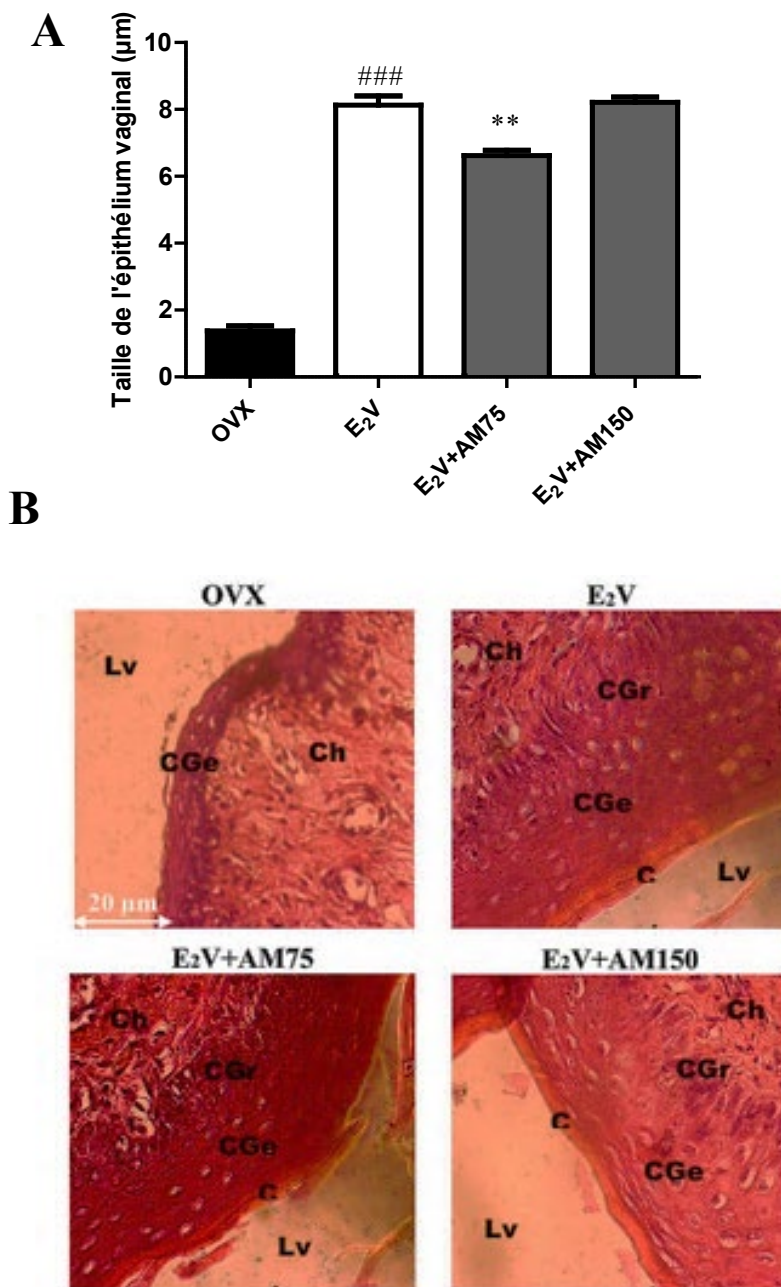


Figure 39: Représentation graphique de la taille de l'épithélium vaginal (A) et microphotographies (H&E, 400X) du tissu vaginal (B) après 3 jours de traitement. Ch = Chorion ; CGe = Couche germinative ; CGr = Couche granuleuse ; C= Couche cornée ; Lv = Lumière vaginale. ### p < 0,001 comparé à OVX; * p < 0,05 ; ** p < 0,01 comparé à E₂V.

III.1.2.8.2.3 Effets de l'extrait sur la glande mammaire

Les observations des coupes de glandes mammaires ont montré que l'E₂V a augmenté le diamètre et la lumière des alvéoles. La lumière alvéolaire a été remplie de sécrétions

éosinophiles après traitement avec E₂V. Ces paramètres ont été réduits lorsque l'E₂V a été co-administré avec *A. macrophylla* aux doses de 75 et 150 mg/kg (Figure 40).

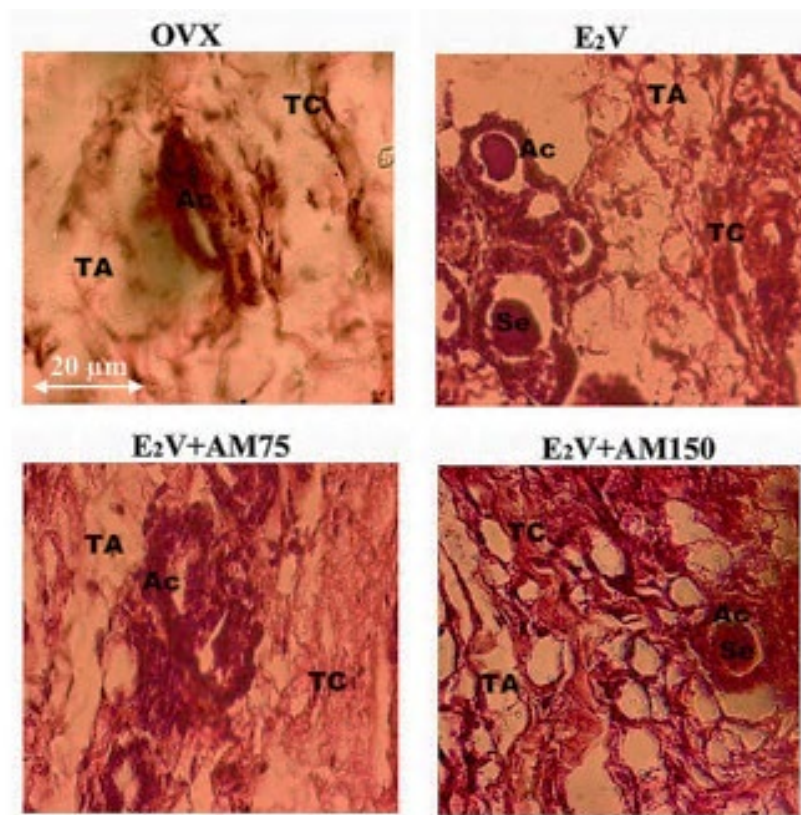


Figure 40: Effets de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* sur la glande mammaire après 3 jours de traitement. Ac = acinus ; TA = tissu adipocytaire ; TC = tissu conjonctif ; Se = Sécrétion éosinophile.

III.1.3 Toxicité orale aigüe de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*

Aucun signe de toxicité n'a été observé après administration de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* à la dose unique de 2000 mg/kg PC jusqu'à la fin de l'expérience. Aucun changement n'a été observé sur la masse corporelle (Figure 41 A) et la masse relative des organes à l'exception de la masse des poumons qui a augmenté de manière significative ($p < 0,01$) (Tableau XXI). Les coupes histologiques du foie, du poumon et du rein n'ont montré aucune altération (Figure 41 B). La DL₅₀ de *A. macrophylla* est estimée à plus de 2000 mg/kg.

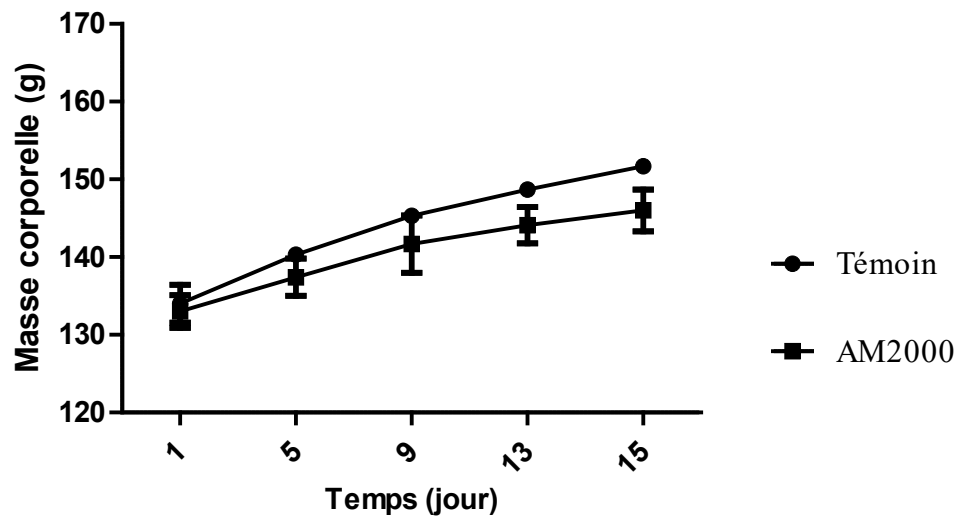
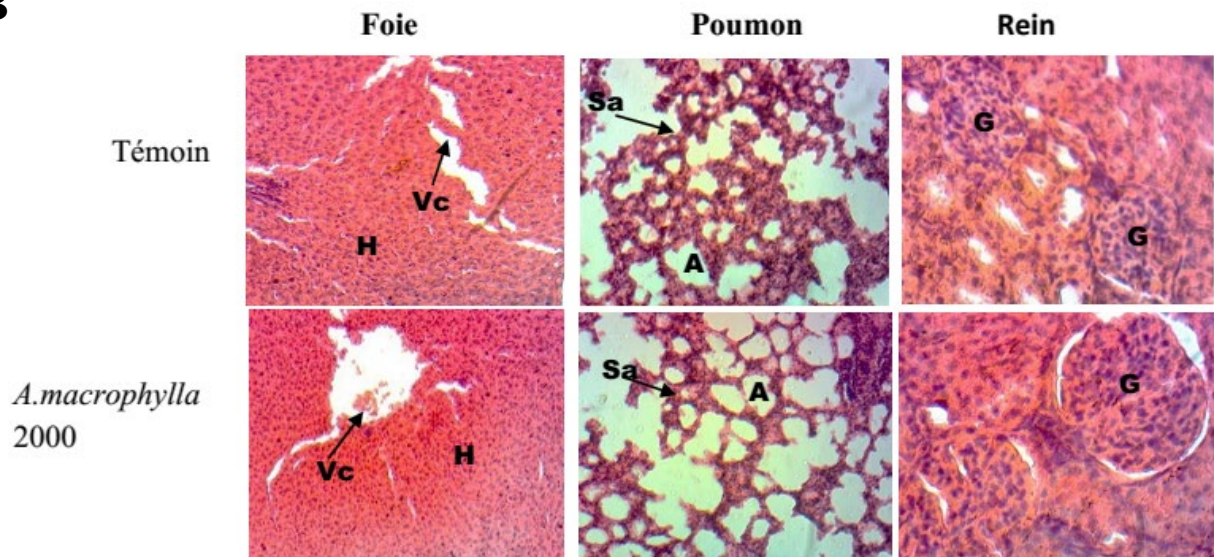
A**B**

Figure 41: Effets de *A. macrophylla* sur la masse corporelle des animaux (A) et microarchitectures des coupes de foie, poumon et rein (coloration à l'hématoxyline-éosine, 250 X) (B) chez les rates après une unique administration orale de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* à la dose de 2000 mg/kg PC. Témoin : animaux traités avec l'eau distillée. Vc : veine centrale ; H : Hépatocyte ; A : Alvéole ; Sa : Sac alvéolaire ; G : Glomérule. Chaque point représente la Moyenne \pm ESM (n=3). Pas de différence significative.

Tableau XXI : Masses relatives des organes (mg/kg PC) des groupes témoin et *A. macrophylla*

Organes (mg/kg)	Témoin	AM2000
Utérus	1742,52 ± 322,17	1199,26 ± 206,54
Ovaires	706,15 ± 42,01	553,657 ± 49,46
Foie	33685,50 ± 2048,61	33741,81 ± 1883,67
Poumons	7420,42 ± 338,85	11549,23 ± 428,13**
Rate	6140,43 ± 302,65	6565,14 ± 239,83
Surrénales	551,65 ± 59,70	467,93 ± 65,85
Reins	6909,32 ± 370,43	6872,84 ± 255,22
Coeur	3747,87 ± 190,06	3186,78 ± 128,07
Estomac	12417,09 ± 577,48	11886,32 ± 927,82

Témoin : animaux traités avec le véhicule ; AM2000 : animaux traités avec l'extrait aqueux de *A. macrophylla* à la dose de 2000 mg/kg PC. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± ESM.

** p < 0,01 comparé au témoin.

III.2 Discussion

Le cancer du sein est la néoplasie maligne la plus fréquente et la première cause de mortalité par cancer chez les femmes dans le monde (Siegel *et al.*, 2018). Pratiquement un tiers (32%) des cancers diagnostiqués chez les femmes sont des cancers du sein (American Cancer Society, 2012). Les traitements utilisés contre le cancer du sein ont été associés à de nombreux effets secondaires (Wu, 2012 ; Lazzeroni et DeCensi, 2013). Comme alternatives à ces traitements, un grand nombre de patients font recours à la phytothérapie (Baliga and Dsouza, 2011). Les plantes médicinales relativement peu coûteuses et peu toxiques, donnent de l'espoir car elles sont composées d'une grande variété de substances anticancéreuses (Wang *et al.*, 2016). Il est urgent de découvrir et de développer de nouveaux médicaments chimio-préventifs contre le cancer du sein offrant une sécurité et une efficacité intéressantes pour améliorer la gestion du cancer du sein et réduire la douleur des patients (Steward et Brown, 2013). C'est ainsi qu'un intérêt grandissant est porté sur les phytoestrogènes. *Anthothona macrophylla* (Caesalpinaceae) est une plante médicinale de la pharmacopée camerounaise utilisée contre les douleurs et apparition des nodules au niveau du sein. Dans la littérature, aucune étude précédente n'a indiqué des activités antitumorales mammaires de *A. macrophylla*. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer *in vitro* et *in vivo* les effets anticancéreux de l'extrait aqueux de *Anthothona macrophylla* P. Beauv (Caesalpinaceae).

Au regard de son utilisation traditionnelle contre le cancer au niveau du sein, il a été nécessaire de commencer par évaluer les effets chimiopréventifs de l'extrait aqueux de *A.*

macrophylla sur le cancer du sein induit par le DMBA chez la rate. Les résultats obtenus sur l'évaluation des effets chimiopréventifs de l'extrait ont montré que tous les animaux ont présenté une croissance continue durant la période de traitement. Il n'a été noté aucune différence significative sur la masse des animaux entre les différents groupes à l'exception de ceux recevant le tamoxifène et *A. macrophylla* à la dose de 75 mg/kg (uniquement au jour 56). Les animaux du groupe tamoxifène avaient une masse corporelle moyenne significativement plus petite que celle des autres groupes, ce à partir de la 8^{ème} semaine. C'est ainsi qu'au bout des 28 semaines de traitement nous avons observé une diminution de la masse corporelle des animaux traités de manière continue au tamoxifène, ceci en comparaison à celle des animaux des autres groupes.

La faible masse des animaux observée chez le groupe témoin positif, pourrait être corrélée à l'administration du tamoxifène. En effet, il est bien connu que le tamoxifène possède des propriétés anorexigènes. Il augmente la synthèse du proopiomélanocortine (POMC), un peptide anorexigène qui diminue la prise alimentaire des rats (Nathalie, 2010). Ces résultats obtenus sur l'évolution pondérale sont en droite ligne avec ceux de Silihe *et al.* (2017) et Zingué *et al.* (2018) qui ont montré que le tamoxifène pouvait entraîner une réduction pouvant aller jusqu'à 22% de la masse corporelle chez les animaux traités de manière continue pendant 6 mois.

Sur l'incidence, la charge et le volume des tumeurs du sein. Les résultats obtenus ont montré que les animaux ayant reçu le DMBA ont développé des tumeurs mammaires contrairement aux animaux n'ayant pas reçu le carcinogène. En effet, l'induction chimique des tumeurs mammaires par le 7,12 diméthylbenz(a)anthracène est un modèle bien caractérisé par de nombreux travaux (Minari et Okeke, 2014; Zingue *et al.*, 2018). Ce carcinogène environnemental possède une grande activité génotoxique et induit les tumeurs mammaires se rapprochant étroitement du cancer mammaire humain (Russo *et al.*, 1990 ; Gamer, 1998). Il est hautement lipophile et nécessite une activation métabolique pour sa cancérogénicité. Dans le sein, le DMBA est converti en époxydes, métabolites actifs capables d'endommager la molécule d'ADN (Clarke, 1997; Balogh *et al.*, 2003). Il induit également une immunotoxicité dans les organes lymphoïdes à l'origine de l'immunodéficience chez les animaux (Miyata *et al.*, 2001), ce qui pourrait justifier l'obtention d'une incidence élevée des tumeurs chez les animaux de ce groupe témoin négatif. Ainsi, la faible masse des tumeurs, leur volume réduit, et même l'incidence réduite à 20% chez les animaux du groupe témoin positif indiquent que le tamoxifène est parvenu à prévenir l'installation du cancer du sein chez la rate dans cette étude. Etant un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (MSRO), le tamoxifène malgré son effet

agoniste sur l'endomètre, exerce un effet antiœstrogénique au niveau du sein (Vogel *et al.*, 2006). Il empêche les cellules cancéreuses de se multiplier en entrant en compétition avec les œstrogènes endogènes pour se fixer sur les récepteurs œstrogéniques au niveau de la glande mammaire (American Cancer Society, 2016). Ainsi, l'action promotrice des œstrogènes dans la genèse des tumeurs mammaires est amoindrie, d'où le volume, la masse, et le nombre des tumeurs exprimés par les animaux de ce groupe réduits. Par ailleurs, la diminution du taux de mortalité, de l'incidence tumorale mammaire de même que l'inhibition de la charge tumorale, et de la masse relative des tumeurs observés chez les animaux traités à *A. macrophylla* aux doses de 75 et 150 mg/kg, suggèrent que cet extrait protégerait contre la génotoxicité et l'immunotoxicité induites par le DMBA.

L'histoarchitecture de la glande mammaire des animaux normaux présente des acini normaux, avec des conduits étroits, et disséminés dans un important volume de tissu adipeux. Par contre, la microarchitecture de la glande mammaire des animaux du groupe témoin négatif DMBA, présente une hyperplasie sévère des unités lobulaires avec une augmentation de la taille des cellules épithéliales bordant les acini, une réduction importante du tissu adipeux, et une dilatation prononcée des conduits se remplissant de cellules tumorales ; signe d'un carcinome *in situ* de la glande mammaire. Chez les rates traitées au tamoxifène on a noté une structure quasi-normale des acini, sans indice de prolifération cellulaire. Les animaux traités à la dose de 37,5 mg/kg de *A. macrophylla* ont présenté une hyperplasie caractérisée par une prolifération cellulaire et une dilatation des conduits. *A. macrophylla* à la dose de 75 mg/kg semble produire un effet similaire à celui du tamoxifène, vue la microarchitecture de la glande mammaire des animaux de ce groupe qui a présenté de petits acini sans signe d'hyperplasie. Par ailleurs, les animaux traités avec la grande dose de *A. macrophylla* (150 mg/kg) ont présenté une hyperplasie caractérisée par une faible prolifération cellulaire et une faible dilatation des conduits, comparés aux animaux du groupe DMBA.

En effet, de nombreuses études ont montré que le DMBA altère le processus normal de différenciation de la glande mammaire au niveau des conduits terminaux et des alvéoles, aboutissant à une hyperplasie atypique (Bishayee *et al.*, 2013 ; Zingué *et al.*, 2016 ; Zingué *et al.*, 2018). Ces travaux justifient à suffisance le carcinome *in situ* observé chez les rates du groupe DMBA comparées aux rates du groupe témoin normal qui ont présenté une structure normale de la glande mammaire. Se basant sur l'analyse histopathologique des microarchitectures des glandes mammaires, on peut déduire que la dose de 75 mg/kg de *A. macrophylla* a pu tout comme le tamoxifène, protéger les glandes mammaires des rates contre l'hyperplasie induite par le DMBA. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur les autres

paramètres tumoraux déjà décrits (nombre de rates avec tumeurs, incidence, volume et charge des tumeurs), et consolident l'hypothèse d'un potentiel effet protecteur de *A. macrophylla* à de petites doses sur le cancer de sein induit par le DMBA.

En général, les extraits de plantes contiennent des milliers de métabolites secondaires qui peuvent avoir différents modes d'action et cibler différents tissus. Les flavonoïdes sont le groupe le plus important de composés phénoliques naturels et présentent d'excellents effets de type anticancéreux (Murakami *et al.*, 2008; Gibellini *et al.*, 2011). L'analyse phytochimique de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* a montré la présence des polyphénols ($10,24 \pm 0,55$ mg eq Quercétine) dont les flavonoïdes ($9,76 \pm 0,99$ mg eq Quercétine) qui sont le groupe le plus abondant. De ce fait les polyphénols, en particulier les flavonoïdes seraient les composés responsables des effets protecteurs observés avec l'extrait de *A. macrophylla* sur le cancer du sein induit par le DMBA dans cette étude. De plus, nombreuses études ont démontré que l'acide hexadécénoïque méthyl ester et l'acide 9-octadécénoïque (Z) méthyl ester sont dotés des effets antitumoraux (Syeda *et al.*, 2011 ; Hema *et al.*, 2011). La GC-MS réalisée avec l'extrait aqueux de *A. macrophylla* a permis d'identifier ces mêmes composés.

Sur l'utérus, aucune différence significative n'a été observée entre la taille de l'épithélium utérin des animaux normaux, et ceux des animaux du groupe DMBA. Le tamoxifène a augmenté de façon significative la taille de l'épithélium utérin en comparaison au groupe DMBA. Par contre, *A. macrophylla* à toutes les doses testées n'a induit aucune variation significative de la taille de l'épithélium utérin comparé aux rates du groupe DMBA. L'administration du tamoxifène a augmenté la taille de l'épithélium vaginal, mais de façon non significative en comparaison aux animaux du groupe DMBA. Toutefois, l'extrait de *A. macrophylla* n'a induit aucune variation significative de la taille de l'épithélium vaginal comparé aux rates du groupe DMBA. L'augmentation significative de la taille de l'épithélium utérin avec le tamoxifène, confirme son potentiel à agir comme MSRO en ayant une activité tissu sélective (Vogel *et al.*, 2006). En effet, il est capable de réduire la biodisponibilité des récepteurs des œstrogènes (REs) endogènes au niveau du sein, d'où son utilisation pour le traitement du cancer de sein chez la femme pré et post-ménopausée (Jordan et Brodie, 2007).

Au terme de 28 semaines de traitement, aucune métastase du cancer du sein n'a été identifiée sur les coupes histologiques du foie, des poumons, du cerveau et de l'os, connus comme des organes de métastase du cancer du sein chez la femme. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au niveau de la microarchitecture des glandes mammaires des différents groupes expérimentaux, où le stade de tumeur le plus avancé était un carcinome *in situ* de la glande mammaire retrouvé dans le groupe témoin négatif (DMBA). En effet, la séquence

d'altération de la glande mammaire par le DMBA est bien connue et va des conduits terminaux aux proliférations intraductales (hyperplasies) ensuite un carcinome *in situ* suivi enfin d'un carcinome invasif avec métastases (Russo *et al.*, 1982 ; Nguyen *et al.*, 2009). Mais aucun carcinome mammaire invasif n'a été observé dans cette étude.

Dans le but de déterminer les modes d'action par lesquels l'extrait aqueux de *A. macrophylla* a induit ses effets chimiopréventifs, l'étude de la cytotoxicité et l'évaluation des effets antioxydants et antiœstrogéniques ont été réalisées. La cytotoxicité est la propriété d'une substance à être toxique pour les cellules, éventuellement jusqu'à les détruire. Le traitement des cellules par un composé cytotoxique peut entraîner une variété de conséquences. Les cellules peuvent perdre leur intégrité membranaire et mourir rapidement à la suite d'une lyse cellulaire. Les cellules peuvent également s'arrêter activement de croître et de se diviser (diminution de la viabilité cellulaire). La production mitochondriale en tant que mesure de la viabilité cellulaire a permis de réaliser le test de cytotoxicité (O'Brien *et al.*, 2000).

Les résultats obtenus sur l'étude de la cytotoxicité *in vitro* de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* ont montré que cet extrait a induit un effet cytotoxique sur les cellules tumorales mammaires de souris (4T1) et sur les cellules cancéreuses mammaires humaines (MCF-7 et MDA-MB-231). Le fait que l'extrait de *A. macrophylla* ait induit un effet cytotoxique assez similaire sur les cellules RE⁺ (MCF-7) et triple RE⁻ (MDA-MB-231) suggère qu'il tue les cellules aussi par une voie indépendante des récepteurs aux œstrogènes. De plus, l'extrait de *A. macrophylla* n'a pas été sélectif pour les cellules cancéreuse et non cancéreuse (avec un indice de sélectivité <1), ce qui est un inconvénient dans la recherche d'une thérapie alternative pour le cancer du sein puisque selon l'Institut National de Cancer (INC, USA), un extrait brut est considéré comme possédant une activité cytotoxique *in vitro* si sa valeur CC₅₀ est inférieure à 20 µg/mL (Boik, 2001). Cependant, une étude phytochimique approfondie pour isoler les composés bioactifs présents dans l'extrait aqueux de *A. macrophylla* est encouragée, ce qui pourrait avoir une meilleure sélectivité pour les cellules cancéreuses. La quercétine, le flavonol le plus abondant dans les plantes, a été décrite comme étant cytotoxique *in vitro* (Indice de sélectivité > 3) (Murakami *et al.*, 2008; Gibellini *et al.*, 2011). En droite ligne avec les résultats sur la viabilité cellulaire, ceux obtenus sur la croissance cellulaire montrent que l'extrait de *A. macrophylla* a induit une inhibition de la croissance des cellules MDA-MB 231, MCF-7 et 4T-1 dépendant du temps et de la concentration. Les cellules MDA-MB 231 étaient plus sensibles à l'extrait de *A. macrophylla* que les cellules MCF-7 puisque la concentration de 12,5 µg/mL a significativement réduit la croissance des cellules MDA-MB 231 alors qu'il n'a pas pu faire de même sur les cellules MCF-7. De plus, l'extrait de *A. macrophylla* a induit une diminution

significative du taux de BrdU à la concentration de 100 µg/mL de même que le nombre de clones dans les cellules MDA-MB 231 aux concentrations de 50 et 100 µg/mL. Le BrdU est un marqueur de la prolifération cellulaire, plus il est élevé plus il y'a prolifération cellulaire. Ces observations suggèrent que certains métabolites secondaires de *A. macrophylla* à l'instar des flavonoïdes pourraient avoir une propriété antiproliférative. En effet, les polyphénols présents dans l'extrait de *A. macrophylla* seraient à mesure d'interférer avec les voies de signalisation PI3K/AKT, la voie de la MAP kinase et le facteur nucléaire KB (NF-kB) qui régulent la prolifération et la survie cellulaire. Ils agiraient donc indirectement sur la régulation de l'apoptose et préviendraient ainsi la signalisation tumorigène (Babich *et al.*, 2006). L'apoptose est un phénomène crucial de la cytotoxicité de nombreux agents antitumoraux (Goldar *et al.*, 2014). Dans cette étude, la cytométrie en flux a indiqué que l'extrait de *A. macrophylla* a induit une augmentation du nombre de cellules apoptotiques à la concentration de 100 µg/mL. En effet, le complexe de signalisation induisant la mort cellulaire est connue pour activer la procaspase-8 et la caspase-8, constituant la voie extrinsèque de l'apoptose ou la procaspase-9 par libération du cytochrome C par la mitochondrie (voie de signalisation mitochondriale ou voie intrinsèque) (O'Brien et Kirby, 2008). L'extrait de *A. macrophylla* pourrait induire grâce aux flavonoïdes qu'il contient, l'apoptose par ces différentes voies ou l'une d'elle. La croissance, le développement et la différenciation des cellules mammaires sont contrôlés par le cycle cellulaire (Harashima *et al.*, 2013). Il convient de noter que de nombreux constituants de plantes bloquent la progression du cycle cellulaire à différents stades (phases G2/M, S ou G0/G1) et induisent ainsi la mort cellulaire apoptotique (Greenwell et Rahman, 2015). Dans le présent travail, l'extrait de *A. macrophylla* a induit l'arrêt du cycle cellulaire en phases S et G2/M à la concentration de 50 µg/mL et en phase G2/M à la concentration de 100 µg/mL, arrêts caractérisés par une accumulation du nombre de cellules dans ces phases. La capacité de bloquer le cycle cellulaire dans la phase G2/M a été démontrée par plusieurs composés phytochimiques possédant des effets antiprolifératifs et cytotoxiques (Visanji *et al.*, 2006). L'arrêt du cycle cellulaire en phases S et G2/M induit par l'extrait de *A. macrophylla* serait dû à la présence des flavonoïdes qui agissent par diminution de l'expression des cyclines A et B1 et inhibition de l'expression de protéines kinases cyclines-dépendantes (CDK1, CDK2 et CDK4) ainsi que les protéines p21, p27 et p53 (Larrosa *et al.*, 2006). Un des résultats les plus saillants obtenus dans cette étude est la capacité de *A. macrophylla* à inhiber la migration et l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (collagène ou fibronectine). Ces effets pourraient être liés aux effets apoptotiques mentionnés ci-dessus. En effet, une accumulation accrue de la matrice extracellulaire a été démontrée dans le microenvironnement tumoral

comparé à celui des cellules normales, ce qui contribue grandement à la migration des cellules cancéreuses (Egeblad *et al.*, 2010). Compte tenu de l'importance de la migration cellulaire dans le processus de métastase (Entschladen *et al.*, 2004), ce résultat mérite d'être exploré en profondeur. Les flavonoïdes possèdent une activité antiproliférative directement liée à l'inhibition des mécanismes moléculaires impliqués dans l'angiogenèse (Demeule *et al.*, 2002). Ils peuvent affecter la dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases (MMPs) en inhibant la sécrétion de la prométalloprotéase-2. Les flavonoïdes peuvent également inhiber la phosphorylation de la VEGFR (*Vascular endothelial growth factor receptor*) (Annabi *et al.*, 2002). De plus les acides hexadécanoïque méthyl ester et 9-octadécénoïque (Z) méthyl ester identifiés dans l'extrait de *A. macrophylla* par GC-MS sont dotés des propriétés anti-néoplasique, anti-métabolite et alkylante (Ali Reza *et al.*, 2021).

Il a été montré de longue date que le stress oxydant est capable d'induire des modifications au niveau du patrimoine génétique d'une cellule, et de participer ainsi aux différents processus d'initiation de la cancérogenèse (Pani *et al.*, 2010). Dans les membranes cellulaires, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) attaquent les acides gras polyinsaturés, causant ainsi une peroxydation lipidique et formation de MDA pouvant mener aux dommages de la structure et des fonctions cellulaires (Kuper *et al.*, 2000). Dans le but de déterminer le mécanisme par lequel l'extrait aqueux de *A. macrophylla* induit ses effets protecteurs sur les tumeurs mammaires, une étude sur l'évaluation de l'activité antioxydante de cet extrait a été réalisée. Dans la présente étude, il a été observé une augmentation du taux de MDA (marqueur de la peroxydation lipidique), une diminution du taux de GSH (extracteur de radicaux libre intracellulaire) et une réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} dans les glandes mammaires des rats DMBA comparés aux animaux normaux, ce qui suppose des dommages dans les glandes mammaires. Le traitement à l'extrait aqueux de *A. macrophylla* a significativement diminué le taux de MDA dans les glandes mammaires aux doses de 37,5 et 150 mg/kg PC, ce qui suggère une réduction de la peroxydation lipidique. De plus, L'extrait de *A. macrophylla* a induit une augmentation significative du taux de GSH à la dose de 75 mg/kg comparé au groupe DMBA. Le glutathion réduit (GSH) est un substrat de plusieurs réactions d'élimination des xénobiotiques. C'est la molécule soufrée la plus importante dans le cytosol (Goudable et Favier, 1997). Hormis cette importance d'ordre quantitative, le GSH constitue un système antioxydant intracellulaire incontournable car ce tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) est le garant du statut rédox cellulaire (Weijl *et al.*, 1997). En plus de son rôle tampon dans l'équilibre rédox, le GSH est à même de neutraliser de nombreuses espèces réactives seul ou en tant que cofacteur des antioxydants enzymatiques. Il peut également chélater le cuivre et donc inhiber ainsi la synthèse

de radicaux hydroxyles et être utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui joue un rôle important dans le catabolisme du peroxyde d'hydrogène (Sajeeth *et al.*, 2011). Son faible taux observé chez les animaux DMBA montre une augmentation du stress oxydant.

Pris ensemble, ces résultats permettent de suggérer que l'extrait aqueux de *A. macrophylla* posséderait une activité antioxydante. Ces propriétés antioxydantes de l'extrait aqueux de *A. macrophylla*, observées *in vivo*, ont été confirmées *in vitro* par les activités antiradicalaires DPPH (198,7 µg/mL), ABTS (198,4 µg/mL) et le Potentiel antioxydant total ($43,39 \pm 0,89$ mg eq acide gallique/g d'extrait sec) de l'extrait aqueux de *A. macrophylla*. De plus, les antioxydants les plus largement connus appartiennent à la vaste famille des polyphénols (Di Meo, 2009; Dugo *et al.*, 2011). Ils peuvent capturer les ERO, inhiber les enzymes impliquées dans la génération du stress oxydatif, inhiber la production de radical hydroxyle en chélatant les métaux de transition, et même régénérer certains antioxydants tels que la vitamine E. En effet, leurs propriétés antioxydantes leur procurent un intérêt thérapeutique potentiel dans diverses pathologies à l'instar des cancers.

Etant donné que les œstrogènes interviennent dans le développement des nodules, les phases d'initiation et de progression de la tumeur mammaire (Clemons et Goss, 2001 ; Key *et al.*, 2002), il a été nécessaire de déterminer les effets antiœstrogéniques de l'extrait aqueux de *A. macrophylla*. Les effets antiœstrogéniques de *A. macrophylla* ont été évalués suivant les tests de prolifération cellulaire (Resende *et al.*, 2013) *in vitro* et utérotrrophique de 3 jours (OECD, 2007) *in vivo*. D'une part, il a été démontré que l'œstradiol peut promouvoir la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, l'œstradiol peut se lier aux récepteurs d'œstrogènes (REs) et stimuler ainsi la transcription des gènes impliqués dans la division cellulaire. Lors de ces divisions, les cellules sont plus sensibles aux erreurs de réplifications et à l'effet d'agents cancérogènes extérieurs. D'autre part, certaines études décrivent une action initiatrice de la cancérogenèse qui passe cette fois par la conversion de l'œstradiol en métabolites génotoxiques (2- hydroxy-œstradiol et 4- hydroxy-œstradiol principalement) (Santen, 2003).

D'après les résultats obtenus, *A. macrophylla* a induit des effets antiprolifératifs *in vitro* aux différentes concentrations testées en inhibant la prolifération des cellules MCF-7. De même à toutes les concentrations, la même plante a inhibé la prolifération des cellules MCF-7 lorsqu'elle a été administrée en combinaison avec l'œstradiol. Les effets antiprolifératifs induits par l'extrait aqueux de *A. macrophylla* seraient dus à son activité antioestrogénique. La majorité des phytoestrogènes ont une affinité dix fois plus élevée pour les récepteurs RE β que pour RE α (Kuiper *et al.*, 1988). Cette forte affinité pour le RE β , reconnue comme impliquée dans les

activités antiœstrogéniques, présente aujourd'hui un grand intérêt pour la lutte contre les cancers œstrogéno-dépendants (Russo *et al.*, 2016).

Les effets observés *in vitro* n'étant pas transposables *in vivo*, l'activité antiœstrogénique de *A. macrophylla* a également été étudiée *in vivo*. L'E₂V a induit à la fois une croissance utérine et une prolifération vaginale. De plus, les glandes mammaires des animaux traités avec E₂V ont présenté une différenciation normale des acini par rapport au témoin. L'effet de E₂V sur la masse relative de l'utérus frais a été potentialisé par *A. macrophylla* à la dose de 150 mg/kg, suggérant que *A. macrophylla* aurait augmenté l'imbibition d'eau induite par l'œstradiol et non la prolifération des cellules utérines puisque à cette même dose une diminution de la taille de l'épithélium utérin a été observée. Cet événement aurait entraîné une augmentation de la masse de l'utérus frais (Yamasaki *et al.*, 2003 ; Takahashi *et al.*, 2007). Ce résultat suggère en outre que *A. macrophylla* pourrait posséder des métabolites secondaires dotés de propriétés œstrogéniques.

Les effets de l'E₂V ont également été inhibés *in vivo* sur la différenciation des glandes mammaires, sur l'épithélium utérin et sur l'épithélium vaginal. Ces résultats suggèrent que l'effet aigu de *A. macrophylla* consiste à inhiber la prolifération cellulaire induite par l'œstradiol, tandis que la perméabilité cellulaire reste inchangée. De plus, à des concentrations 100 à 1000 fois supérieures à celles d'œstradiol, les phytoœstrogènes ont plutôt un effet antiœstrogénique puisqu'ils entrent en compétition avec les œstrogènes endogènes pour la liaison aux REs et empêchent la croissance stimulée par les œstrogènes chez les mammifères (So *et al.*, 1997). Cela indique également que ces composés auraient au moins compété avec l'E₂V pour les récepteurs aux œstrogènes et empêché partiellement les effets de l'E₂V. Il a également été montré que des modèles murins délétés en RE α ne développent pas de tumeurs après administration de DMBA (Day *et al.*, 2001). La non apparition du carcinome chez les animaux traités avec l'extrait aqueux de *A. macrophylla* à la dose de 75 mg/kg serait due en partie à l'activité antiœstrogénique de cet extrait (Gueyo *et al.*, 2019).

Puisque le traitement empirique prévoit une prise du décocté plusieurs fois sur une longue période, les effets de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* sur quelques paramètres de toxicité ont été évalués. Les animaux du groupe DMBA ont présenté une diminution significative de la masse de la rate comparés aux animaux normaux. Par ailleurs, il a été observé une diminution significative des masses de l'utérus et des ovaires chez les animaux recevant le tamoxifène; alors qu'il a augmenté la masse de la rate, des poumons, et du cerveau, comparé aux animaux du groupe DMBA. Une réduction significative de la masse de l'utérus a été observée avec *A.*

macrophylla à toutes les doses. Par ailleurs, une augmentation significative de la masse des poumons a été observée suite au traitement avec *A. macrophylla* à la dose de 150 mg/kg.

En plus de sa fonction d'épuration du sang, la rate constitue à la fois un site de prolifération des lymphocytes, et d'élaboration de la réaction immunitaire (Marieb, 1999). Ainsi, la diminution de la masse relative de cet organe serait due à l'immunotoxicité du DMBA dans les organes lymphoïdes (rate, thymus et moelle osseuse) tel que rapportée par Miyata et collaborateurs (2001), et rejoindrais de ce fait les observations faites ci-dessus sur l'incidence, la charge, et la morphologie des tumeurs mammaires. Le tamoxifène et *A. macrophylla* sont parvenus à inverser efficacement cet effet immunotoxique du DMBA, réaffirmant ainsi l'effet protecteur de *A. macrophylla* tout comme le tamoxifène sur le cancer de sein induit par le DMBA chez la rate (Poirier, 2008). L'augmentation significative de la masse relative des poumons chez les animaux recevant *A. macrophylla* à la dose de 150 mg/kg, traduirait quant à elle une quelconque toxicité pulmonaire. En outre, il est bon de souligner que la diminution de la masse de l'utérus frais et des ovaires chez les animaux recevant le tamoxifène, est en droite ligne avec les résultats obtenus sur l'évolution pondérale des animaux, et ne souligne d'avantage que l'effet anorexigène du tamoxifène (Nathalie, 2010). La diminution de la masse de l'utérus frais chez les animaux recevant *A. macrophylla* vient confirmer ses effets antiœstrogéniques (Gueyo *et al.*, 2019).

Le DMBA n'a eu aucune incidence significative sur les taux de créatinine, bilirubine, cholestérol HDL et cholestérol total, comparé aux animaux normaux. *A. macrophylla* aux doses de 37,5 et 75 mg/kg a tout comme le tamoxifène, diminué le taux de cholestérol total alors que seule la dose de 150 mg/kg a pu augmenter significativement le taux de cholestérol-HDL comparé aux animaux du groupe DMBA. Un taux élevé de cholestérol total est connu comme un facteur de risque prédisposant aux maladies cardio-vasculaires (Li *et al.*, 2013), mais il est aussi un indicateur de la toxicité systémique, se traduisant par une dysrégulation du métabolisme lipidique. La diminution significative du taux de cholestérol total par cet extrait aux différentes doses révèle qu'il contiendrait des métabolites secondaires capables d'améliorer le profil lipidique.

L'absence de modifications sur la microarchitecture du foie, des reins et des poumons ; connus comme étant les organes majeurs de détoxification de l'organisme plaide pour une faible toxicité de l'extrait aqueux de *A. macrophylla*.

Les données obtenues après un essai de toxicité orale aiguë chez l'animal peuvent être utilisées pour satisfaire à des besoins de classification du danger par le biais de la DL₅₀, et pour l'évaluation des risques pour la santé humaine et/ou pour l'environnement (OECD, 2001a).

Dans le but de déterminer l'innocuité de l'extrait aqueux de *A. macrophylla* une évaluation de la toxicité orale aiguë de cet extrait a été réalisée chez la rate Wistar. Comme résultats obtenus, les animaux n'ont montré aucun changement dans l'apparence physique et dans la somatomotricité durant la période d'observation. Aucune manifestation de convulsions, salivation et diarrhée liée au traitement n'a été observée. Cet extrait n'a induit aucune morbidité et/ou mortalité chez les animaux sur la période de 14 jours suivant l'administration orale d'une dose unique de 2000 mg/kg PC. Aucun changement n'a été observé sur la masse corporelle et la masse relative des organes à l'exception de la masse des poumons frais qui a augmenté de façon significative comparée à celle du témoin recevant de l'eau distillée. L'autopsie des animaux d'essai n'a révélé aucune anomalie liée au traitement. Ainsi, selon la méthode d'évaluation de toxicité orale aiguë utilisée dans cette étude (OECD, 2001a), l'extrait aqueux de *A. macrophylla* est classé dans la catégorie 5. Sur cette base, la DL₅₀ est estimée supérieure à 2000 mg/kg PC. Ces résultats permettent de suggérer que l'extrait aqueux de *A. macrophylla* présenterait de faibles risques pour la santé en administration orale.

La résistance aux chimiothérapies anticancéreuses peut être classée en deux types: la résistance intrinsèque (préexistante) et la résistance acquise (Samedi *et al.*, 2016). Concernant la résistance intrinsèque aux médicaments, elle peut être induite par la présence des cellules souches cancéreuses résistantes préexistantes dans la masse tumorale avant toute exposition au médicament. Quant à la résistance acquise, la multi-résistance aux médicaments est une évolution lente et progressive. Il s'agit d'un processus qui force les cellules tumorales à subir des mutations génétiques ou des changements épigénétiques au cours du traitement, ce qui entraîne un phénotype de résistance aux médicaments. La résistance acquise peut être attribuée à: la diminution de la concentration intracellulaire d'agents chimiothérapeutiques; l'augmentation ou diminution d'efflux de médicaments; l'inactivation du médicament ou l'altération de la cible médicamenteuse; l'altération de l'expression des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs; le traitement des dommages induits par la molécule médicamenteuse et l'amélioration de la réparation des dommages à l'ADN; la transition épithélio-mésenchymateuse et le microenvironnement très acide des tumeurs (Samedi *et al.*, 2016).

**CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET
PERSPECTIVES**

Conclusion

L'hypothèse de recherche de ce travail était qu'au vu de son utilisation traditionnelle et de ses phytoconstituants, *Anthonotha macrophylla* possède des phytoconstituants qui auraient des propriétés préventives contre la survenue du cancer du sein. A la fin de cette étude dont l'objectif était d'évaluer *in vitro et in vivo* les effets anticancéreux de l'extrait aqueux des écorces de *Anthonotha macrophylla*, il ressort que l'extrait aqueux de *A. macrophylla* a induit des effets chimiopréventifs sur le cancer du sein induit par le DMBA chez les rats femelles aux doses de 75 et 150 mg/kg. Ledit extrait a également induit une cytotoxicité sur un panel de cellules cancéreuses avec une $CC_{50} \sim 132 \mu\text{g/mL}$ sur les cellules tumorales mammaires de rongeurs (4T1) et l'apoptose des cellules MDA-MB-231. L'extrait a inhibé la croissance de tous les types cellulaires, la migration cellulaire et la progression du cycle cellulaire en phase G2/M. Une diminution de la prolifération cellulaire, du nombre de clones de cellules MDA-MB-231 et de l'encrage des cellules au collagène et à la fibronectine a été observée. De plus, l'extrait de *A. macrophylla* possède des activités antioxydantes et antiœstrogéniques. Les effets antitumoraux observés pourraient être attribués aux flavonoïdes et aux acides hexadécénoïque méthyl ester et 9-octadécénoïque (Z) méthyl ester présents dans ledit extrait. L'évaluation de la toxicité orale aiguë a montré que l'extrait aqueux de *A. macrophylla* serait faiblement toxique. Les résultats obtenus justifieraient l'utilisation traditionnelle de *A. macrophylla* contre le cancer au niveau du sein.

Recommandations

A l'issue de cette étude, il ressort que la dose de 75 mg/kg PC inférieure à la dose thérapeutique (150 mg/kg PC), possède plus des effets bénéfiques sur la majorité des paramètres évalués. Ceci permet de recommander au tradithérapeute de réduire de moitié sa dose thérapeutique au cours de ses prescriptions.

Perspectives

Nous envisageons dans les travaux futurs de :

- évaluer les effets curatifs de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla* sur le modèle de cancer induit par le DMBA ;
- évaluer la toxicité chronique de l'extrait aqueux de *Anthonotha macrophylla*.

REFERENCES

- Agence de la santé publique du Canada**, 2009. www.phac.aspc.gc.ca/publicat/updates/breast_99-fra.php. Consulté en 2009.
- Ali Reza ASM, Anwarul Haque Md, Sarker J, Smima Nasrin, Mahbubur Rahman, Abu Montakim Tareq, Zidan Khan, Mamunur Rashid, Golam Sadik, Toshifumi Tsukahara, Khurshid Alam AHM**, 2021. Antiproliferative and antioxidant potentials of bioactive edible vegetable fraction of *Achyranthes ferruginea* Roxb. In cancer cell line. *Food Sci Nutr*. 9: 3777-3805.
- Allwood JW, Goodacre R**, 2010. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem Anal*. 21: 33-47.
- American Association for Cancer Research**, 2016. Cancer Progress Report 2016. *Clin Cancer Res*. 22: 1-137.
- American Cancer Society**, 2011. Breast Cancer Facts and Figures 2009-2010. Atlanta: *American Cancer Society Inc*. 1-38.
- American Cancer Society**, 2012. Breast cancer facts and figures 2011-2012. Atlanta: *American Cancer Society Inc*. 1-33.
- American Cancer Society**, 2016. Cancer Facts and Figures. Atlanta, GA: *American Cancer Society Inc*. 12-43.
- Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Béliveau R**, 2002. «Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MTI-MMP-driven migration in glioblastoma cells». *Biochim Biophys Acta*. 542: 209-220.
- Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, Moregan TM, Burke GL**, 1996. Soy bean isoflavone improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr*. 126: 43-50.
- Ascenzi P, Bocedi A, Marino M**, 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Mol Aspects Med*. 27: 299-402.
- Awad AB, Down AC, Fink CS**, 2000. Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by β -sitosterol treatment of MDAMB-231 human breast cancer cells in culture. *Int J Mol Med*. 5: 541-54.
- Ayman AJ, Esam AE, Adam MM, Omer AAH, Abdul HY**, 2012. A Preliminary Qualitative Study of Two Common Acacia Species in Sudan. *J Chem*. 9: 851-856.

- Babich H, Pinsky SM, Muskin ET, Zuckerbraun,** 2006. *In vitro* cytotoxicity of a theaflavin mixture from black tea to malignant, immortalized, and normal cells from the human oral cavity. *Toxicol in vitro.* 20: 677- 688.
- Baillet F, Follezou JY, Taillibert S, Fouret P, Mazon JJ, Rixe O, Renard A, Delcourt A, Noe G, Haertig A,** 2015. Cours de cancérologie, niveau DCEM3 2002-2003, faculté de médecine, Université Pierre et Marie Curie, France, 298 p.
- Baliga MS, Dsouza JJ,** 2011. Amla (*Emblica officinalis* Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. *Eur J Cancer Prev.* 20: 225-239.
- Balogh GA, Russo IH, Russo J,** 2003 Mutations in mismatch repairs genes are involved in to neoplastic transformation of human breast epithelial cells. *Int J Oncol.* 23: 411- 9.
- Barnes S,** 1995. Effect of genistein on *in vitro* and *in vitro* models of cancer. *J Nutr.* 125: 777-783.
- Belcher SM, Zsarnovsky A,** 2001. Oestrogenic actions in the brain: oestrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signalling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 299: 408 - 414.
- Bennett IC, Gattas M, Teh BT,** 1999. The genetic basis of breast cancer and its clinical implications. *Aust N Z J Surg.* 69:95-105.
- Benzie IF, Strain JJ,** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239: 70- 6.
- Bernstein L,** 2002. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7:3-15.
- Bishayee A, Mandal A, Thoppil RJ, Darvesh AS, Bhatia D,** 2013. Chemopreventive Effect of a novel oleanane triterpenoid in a chemically induced rodent model of breast cancer. *Int J Cancer.* 133: 1054-1064.
- Boersma AW, Nooter K, Oostrum RG, Stoter G,** 1996. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *J Int Society Anal Cytology.* 24: 123-130.
- Boik,** 2001. Natural Compounds in Cancer Therapy. *Oregon Med Press.* Princeton, MN, USA, pp 25.
- Bosma MJ, Carroll AM,** 1991. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol.* 9:323-50.
- Bouche G, Jezdic S, Kornek G, Catane R,** 2013. Le cancer du sein : un guide pour les patientes, ESMO/FAC Patient Guide Series. www.fondsanticancer.org. Consulté en 2013.

- Bradford MM**, 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ**, 2007. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol.* 193: 311-321.
- Breteler FJ**, 2010. Revision of the African genus *Anthoantha* (Leguminosae, Caesalpinioideae) *Plant Ecology and Evolution.* 143: 70-99
- Brothwell D**, 1967. The evidence for neoplasms. Diseases in Antiquity: A Survey of the Diseases, Injuries, and Surgery of Early Populations. In: Brothwell D, Sandison AT, editors. Charles C. Thomas. 320- 45.
- Bruzzi P, Negri E, La VC**, 1988. Short term increase in risk of breast cancer after full term pregnancy. *Br Med J.* 297:1096 - 8.
- Burkill HM**, 1985. A review of Dalziel's. In: The useful plants of west tropical Africa, 2nd edition. Royal Botanical Garden Kew, UK. Vol.3.
- Burtis AC, Ashwood**, 1999. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Third Edition. Philadelphia, PA: WB Saunders. *Clin Chem.* 45: 1917-1998.
- Bush NJ**, 2007. Advances in hormonal therapy for breast cancer. *Semin Oncol Nurs.* 23: 46-54.
- Butt AJ, McNeil CM, Musgrove EA, Sutherland RL**, 2005. Downstream targets of growthfactor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer.* 12: 47-59.
- Calaf GM, Hei TK**, 2000. Establishment of a radiation-and estrogen-induced breast cancer model. *Carcinogenesis.* 21: 769-776.
- Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD**, 2008. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet.* 124: 31-42.
- Cancer Report Worldwide**, 2014. Crisis of Cancer Impact Worldwide Exposed, Press Release, WCD.
- Cannet C**, 2006. Artéfacts: les difficultés de la technique histologique de la circulation à la coupe. *R FH* 19: 71-84.
- Cannet C**, 2004. Artéfacts - Les difficultés de la technique histologique: les gageures de la fixation. *Rev Fr Histotechnol.* 17: 11-20.
- CDER**: Center for Drug Evaluation and Research, 1995. Validation of chromatographic methods. Reviewer guidance.

- Chan KC, Knox WF, Gee JM, Morris J, Nicholson RI, Potten CS, Bundred NJ**, 2002. Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition on epithelial proliferation in normal and premalignant breast. *Cancer Res.* 62:122-8.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S**, 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biol Med.* 29: 323-33.
- Chang CC, Yang MH, Wen MH, Chern JC**, 2002. "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods." *J Food Drug Anal.* 10: 178-182.
- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW**, 1999. Estrogen receptor alpha mediates the non-genomic activation of endothelial nitric oxide synthase by oestrogen. *J Clin Invest.* 103: 401- 406.
- Clarke R**, 1997. Issues in experimental design and end point analysis in the study of experimental cytotoxic agents in vivo in breast cancer and other models. *Breast Cancer Res Treat.* 46: 255-78.
- Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, Skarr TC, Wang Y**, 2003. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene.* 22: 7316-7339.
- Clemons M, Goss P**, 2001. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 344: 276-285.
- Colditz GA, Baer HJ, Tamimi RM**, 2006. *Cancer Epidemiology and Prevention*. Third ed. New York, Oxford University Press.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer**, 2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 1:1141-1151.
- Comité national de lutte contre le cancer**, 2016. Pris sur <https://actu cameroun.com>. Consulté le 09 Novembre 2016.
- Coumoul X, Barouki R**, 2002. Génotoxicité des métabolites des œstrogènes et cancers. *Med Sci.* 18: 86-90.
- Cragg M, Newman D**, 2001. *Natural Product Drugs Discovery in Next Millennium*. Frederick, Md, USA, National Cancer Institute. 39: 8-17.
- Crevoisier R**, 2010. Cancérogénèse développement tumoral, classification. Département de Radiothérapie, Centre Eugène Marquis:15-17.
- Cui J, Shen Y, Li R**, 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in mol med.* 19:197–209.

- Day JK, Besch-Williford C, Mcmann TR, Hufford MG, Lubahn DB, Macdonald RS,** 2001. Dietary genistein increased DMBA-induced mammary adenocarcinoma in wild-type, but not ER alpha KO, mice. *Nutr Cancer*. 39: 226-232.
- Decloitre, Puiseux-Dao S,** 1993. Mécanismes épigénétiques de la cancérogenèse. In Cancérogenèse. Aspects génétiques et épigénétiques. Mécanismes et méthodes d'évaluation. Association Toxicologie - CNAM, Paris, 53- 93.
- Demeule M, Michaud-Levesqle J, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J, Lamy S, Bertrand Y, Béliveall R,** 2002. «Green tea catechins as novel antitllmor i: Ind antiangiogenic compounds». *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2: 441- 463.
- Di Meo F,** 2009. Les polyphénols naturels et la chimie théorique ou comment prédire et comprendre par le calcul le comportement des antioxydants présents dans notre assiette. Thèse de Doctorat, Université de Limoges.
- Dias MF, Sousa E, Cabrita S, Patrício J, Oliveira CF,** 2000. Chemoprevention of DMBA-Induced Mammary Tumors in Rats by a Combined Regimen of Alpha-Tocopherol, Selenium, and Ascorbic Acid. *Breast J*. 6:14-19.
- Djiogue S, Halabalaki M, Njamen D, Kretzschmar G, Lambrinidis G, Hoepping J, Raffaelli FM, Mikros E, Skaltsounis AL, Vollmer G,** 2014. Erythroidine alkaloids: A Novel Class of Phytoestrogens. *Planta Med*. 80: 861- 869.
- Djiogue S, Njamen D, Halabalaki M, Kretzschmar G, Beyer A, Mbanya JC, Skaltsounis AL, Vollmer G,** 2010. Estrogenic properties in U2OS human osteosarcoma cells: Structure-activity relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 120: 184-191.
- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL,** 2003. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 10: 179-86.
- Dugo L, Negis Y, Azzi A,** 2011. Antioxidants. In: Encyclopedia of Life Science (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Dunlap NE, Cai J, Biedermann GB, Yang W, Benedict SH, Sheng K, Schefter TE, Kavanagh BD, Larner JM,** 2010. Chest wall volume receiving > 30 Gy predicts risk of severe pain and/or rib fracture after lung stereotactic body radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 76: 796-801.
- Duperray M, Marie DM, Dahan M, Belorgey C, Finzi J,** 2016. Cancers du sein/du diagnostique au suivi. Outils pour la pratique. Médecin généraliste. Institut national du cancer. Pris sur e-cancer.fr.

- Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM**, 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol.* 22: 697-706.
- Ellman GL**, 1959. Arch Tissue sulfhydryl groups. *Biochem Biophys.* 82: 70-7.
- Engel J, Eckel R, Kerr J, Schmidt M, Fürstenberger G, Richter R, Hölzel D**, 2003. The process of metastasisation for breast cancer. *Eur J Cancer.* 39: 1794-1806.
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA**, 1997. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 4258-4265.
- Entschladen F, Theodore L, Drell IV, Lang K, Joseph J, Zaenker KS**, 2004. Tumour-cell migration, invasion and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet.* 5: 254-258.
- Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A**, 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 38: 698-707.
- Fata JE, Ho ATV, Leco J, Moorehead RA, Khokha R**, 2000. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci.* 57: 77-95.
- Faustino-Rocha A, Oliveira PA, Pinho-Oliveira Teixeira-Guedes C, Soares-Maia R, da Costa RG, Colaço B, Pires MJ, Colaço J, Ferreira R, Ginja M**, 2013. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim.* 42: 217- 224.
- Favier A**, 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* 108-115.
- FDA/CDER**, Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research, 2005. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. Department of Health and Human Services. Pharmacology and Toxicology. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Consulté le 6 juillet 2005.
- Ferlay j, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM**, 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer Dec.* 15: 2893-917.

- Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI**, 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol*. 16: 70-84.
- Fumoleau P, Bastien H**, 2008. Les cancers du sein, Ligue nationale contre le cancer, Paris, 1-22. www.ligue-cancer.net. Consulté le 19 décembre 2008.
- Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y**, 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 346: 904910.
- 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.
- Gabriel G, Danielle F**, 2005. La prévention pharmacologique de certains cancers. Le Médecin du Québec, volume 40, numéro 10, P: 71-77.
- Gamer R**, 1998. The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutat Res*. 402: 67-75.
- Gandhi A, Holland PA, Knox WF, Potten CS, Bundred NJ**, 2000. Effects of a pure antiestrogen on apoptosis and proliferation within human breast ductal carcinoma *in situ*. *Cancer Res*. 60:4284-8.
- Gaudet MM, Gierach GL, Carter BD**, 2018. Pooled Analysis of Nine Cohorts Reveals Breast Cancer Risk Factors by Tumor Molecular Subtype. *Cancer Res*. 78: 6011-6021.
- Gibellini L, Pinti M, Nasi M**, 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-Based Complement Altern Med*. Article ID 591356, 15 pages.
- GLOBOCAN, 2021**. Cancer Incidence and Mortality in the world: International Agency for Research on Cancer/ World Health Organization; 2020. <https://gco.iarc.fr>. Consulté en mars 2021.
- GLOBOCAN, 2018**. Cancer Incidence and Mortality in Cameroon: International Agency for Research on Cancer/ World Health Organization; 2018. <https://gco.iarc.fr>. Consulté en 2018.
- Goldar S, Khaniani M, Derakhshan S, Baradaran B**, 2014. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 16: 2129-2144.
- Goudable J, Favier A**, 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin & Métab*. 11:115-120.

- Greenwell M, Rahman PKSM**, 2015. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 6: 4103- 4112.
- Grove T H**, 1979. Effect of reagent pH on Determination of HDL Cholesterol by precipitation with Sodium Phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem.* 25: 560.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC**, 2002. Mechanism of disease: production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 346: 340-352.
- Guegang GE, Sandjong TI, Tebeu PM, Temgoua BA, Sando Z, Moulion JR, Gonsu FJ**, 2012. Contribution de l'échographie dans le dépistage et le diagnostic des cancers du sein : une expérience de Yaoundé, Cameroun. *Clinics in Mother and Child Health.* 9: 1-4.
- Gueyo TN, Mvondo MA, Zingue S, Sipping MTK, Kenmogne LV, Ndinteh TD, Njamen D**, 2019. *Anthonotha macrophylla* P Beauv (Caesalpiniaceae) aqueous extract exhibits antiestrogenic effects *in vitro* and *in vivo*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 12 pages.
- Halabalaki M, Alexi X, Aligiannis N, Lambrinidis G, pratsinis H, Florentin I, Mitakou S, Mikros E, Skaltsounis AL, Alexis MN**, 2006. Estrogenic activity of isoflavonoids from *Onobrychis ebenoides*. *Planta med.*72: 488-493.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS**, 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 276: 36869 - 36872.
- Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S**, 2010. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract.* 6: 195-197.
- Hanahan D, Weinberg RA**, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144: 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.
- Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A**, 2013. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* 23: 345-356.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Herrington DM, Klein KP**, 2003. Randomized clinical trials of hormone replacement therapy for treatment or prevention of cardiovascular disease: a review of the findings. *Atherosclerosis.* 166: 203-212.

- Hema R, Kumaravel S, Alagusundaram**, 2011. GCMS determination of bioactive components of *Murraya koenigii*. *J Am Sci.* 7: 27.
- Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S**, 2000. Phosphatidylinositol 3-Kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurones. *J Neuroscience Res.* 60: 321-327.
- Hulkower K, Renee H**, 2011. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics.* 3:107-124.
- Idelman S**, 1990. Endocrinologie. Fondements physiologiques. Presses univ Grenoble.
- Imaoka T, Nishimura M, Iizuka D, Daino K, Takabatake T, Okamoto M, Kakinuma S, Shimada Y**, 2009. Radiation-induced mammary carcinogenesis in rodent models: what's different from chemical carcinogenesis? *J Radiat Res.* 50: 281-293.
- Institut national du cancer**, 2013. Les traitements des cancers du sein, Collection Guides patients Cancer info : 11-12. www.e-cancer.fr. Consulté en 2013.
- International Agency for Research on Cancer**, 2010. Globocan Cameroon Fact Sheets: Breast Cancer. Lyon, France. <http://globocan.iarc.fr/>.
- Ip C**, 1996. Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. *J Mammary Gland Biol.* 1:37-47.
- Isaacson JH, Cattanaach BM**, 1962. Report. *Mouse News Lett.* 27:31.
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Okhura Y, Ueno KA**, 1996. Combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharmaceutical Bulletin.* 19: 1518- 1520.
- Ito N, Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Esumi H, Takayama S, Sugimura T**, 1991. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP). *Carcinogenesis.* 12: 1503-1506.
- Iyengar NM, Arthur R, Manson JE**, 2018. Association of Body Fat and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women with Normal Body Mass Index: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial and Observational Study. *JAMA Oncol.* 6: 6.
- Jo KJ, Cha MR, Lee MR, Yoon MY, Park HR**, 2008. Methanolic extracts of *Uncaria rhynchophylla* induce cytotoxicity and apoptosis in HT-29 human colon carcinoma cells. *Plant Foods for Human Nutr.* 63: 77-82.
- Jordan VC**, 2007. SERMs: meeting the promise of multifunctional medicines. *J Natl Cancer Inst.* 99: 350-6.

- Jordan VC, Brodie AM**, 2007. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*. 72: 7-25.
- Juengel E, Najafi R, Rutz J, Maxeiner S, Makarevic J, Roos F, Tsauro I, Haferkamp A, Blaheta RA**, 2017. HDAC inhibition as a treatment concept to combat temsirolimus resistant bladder cancer cells. *Oncotarget*. 8:110016-110028.
- Justina NN, Akachukwu I, Conrad VS, Fidele N**, 2016. Exploring Cancer Therapeutics with Natural Products from African Medicinal Plants, Part II: Alkaloids, Terpenoids and Flavonoids Anti-Cancer Agents. *Med Chem*.16:108-127.
- Kass L, Erler JT, Dembo M, Weaver VM**, 2007. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 1987-1994.
- Katalinić V, Milos M, Modun D, Musić I, Boban M**, 2004. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem*. 86: 593- 600.
- Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA**, 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2: 335-44.
- Kavanaugh C, Green JE**, 2003. Nutritional genomics and proteomics in cancer prevention: the use of genetically altered mice for breast cancer prevention studies. *J Nutr*. 133:2404S-9.
- Kelly MJ, Levin ER**, 2001. Rapid actions of plasma membrane oestrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 12: 152-156.
- Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G**, 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst*. 94: 606-616.
- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E**, 2001. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*. 2:133-40.
- Kim JB, O'Hare MJ, Stein R**, 2004. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res*. 6:22-30.
- Kim MC, Cui FJ, Kim Y**, 2013. Hydrogen peroxide promotes epithelial to mesenchymal transition and stemness in human malignant mesothelioma cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 14: 3625-30.
- Kindred B**, 1971. Antibody response in genetically thymus-less nude mice injected with normal thymus cells. *J Immunol*.107:1291-5.

- King RJB, Robins MW**, 2006. Cancer biology. 3rd ed. Harlow: Pearson Education Ltd.
- Kinyok McJ, Wilhelm A, Kamto EL, Mbing JN, Bonnet SL, Pegnyemb DE**, 2021. Chemical constituents of the leaves of *Anthonotha macrophylla* (Leguminosae). *Natural Product Research*. 35: 3865-3872.
- Klug WS, Cumming MR, Spencer CA, Palladino MA**, 2010. Essentials of genetics. 7th ed. San Francisco: Pearson Education Inc.
- Koller A**, 1984. Total serum protein. Kaplan A *et al.* *Clin Chem*. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1316-1324 and 418.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson BO, Corton JC, Safe SH, van der Saal PT, Burg V, van der Gust^oafsson JA**, 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinol*. 139: 4252-4263.
- Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, Hsieh CC, Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D, Stuver SO**, 2000. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 85: 498-502.
- Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, Hsieh CC, Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D, Stuver SO**, 2000. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 85: 498-502.
- Lamarca HL, Rosen JM**, 2008. Minireview: Hormones and Mammary Cell Fate- What Will I Become When I Grow Up? *Endocrinol*. 149: 4317- 4321.
- Lamoral-Theys D, Pottier L, Dufasne F, Nève J, Dubois J, Kornienko A, Kiss R, Ingrassia L**, 2010. Natural polyphenols that display anticancer properties through inhibition of kinase activity. *Curr Med Chem*. 17: 812-825.
- Lane NE, Yao W, Kinney JH, Modin G, Balooch M, Wronski TJ**, 2003. Both hPTH (1-34) and bFGF increase trabecular bone mass in osteopenic rats but they have different effects on trabecular bone architecture. *J Bone Miner Res*. 18: 2105-2115.
- Larrosa M, Tomas-Barberan FA, Espin JC**, 2006. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem*. 17: 611-25.
- Lazzeroni M, DeCensi A**, 2013. Breast cancer prevention by antihormones and other drugs. Where do we stand? *Hematol Oncol Clinics of North America*. 27: 657- 672.

- Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS**, 1994. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem.* 269: 4458 - 4466.
- Li JH, Awad AB, Fink CS, Wu YW, Trevisan M, Muti P**, 2001. Measurement variability of plasma beta -sitosterol and campesterol, two new biomarkers for cancer prevention. *Eur J Cancer Prev.* 10: 245-249.
- Li MJ, Yin YC, Wang J, Jiang YF**, 2014. Green tea compounds in breast cancer prevention and treatment. *World J Clin Oncol.* 5: 520-528.
- Li Y, Zhou C, Zhou X, Li L**, 2013. Egg consumption and risk of cardiovascular disease and diabetes: a meta-analysis. *Atherosclerosis.* 229: 524-530.
- Long ER**, 1928. A History of Pathology. London; Bailliere; Tindall; Cox. 291 pages.
- Macbride JF**, 1919. Notes on certain Leguminosae. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University. 59: 1-27.
- Maciuk A, Renault JH, Margraff R, Trébuchet P, Zèches-Hanrot M, Nuzillard JM**, 2004. Anion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *Anal Chem.* 76: 6179-6186.
- Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V**, 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 10: 955-960.
- Maltoni C, Minardi F, Pinto C, Belpoggi F, Bua L**, 1997. Results of Three Life-Span Experimental Carcinogenicity and Anticarcinogenicity Studies on Tamoxifen in Rats. *Ann NY Acad Sci.* 837: 469-512.
- Marieb EN**, 1999. Anatomie et physiologie humaine. 4e éd. De Boeck Université.
- Marieb EN, Hoehn K**, 2010. Anatomie et physiologie humaine. 8e éd. Pearson.
- Matsumine H, Herbst MA, Ou SH, Wilson JD, McPhaul MJ**, 1991. Aromatase mRNA in the extragonadal tissues of chickens with the henney-feathering trait is derived from a distinctive promoter structure that contains a segment of a retroviral long terminal. *J Biol Chem.* 266: 19900-19907.
- Mawson A, Lai A, Carroll JS, Sergio CM, Mitchell CJ, Sarcevic B**, 2005. Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. *Mol Cell Endocrinol.* 229: 161-73.

- McCormick DL, Adamowski CB, Fiks A, Moon RC**, 1981. Life time dose response relationship for mammary tumor induction by a single administration of MNU. *Cancer Res.* 41:1690-4.
- McTiernan A, Friedenreich CM, Katzmarzyk PT**, 2019. Physical Activity in Cancer Prevention and Survival: A Systematic Review. *Med Sci Sports Exerc.* 51:1252-1261.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW**, 2004. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res.* 10:8152-62.
- Messina M**, 1994. Soy intake and cancer risk: a view of *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr cancer.* 21: 113-131.
- Metivier R, Penot G, Flouriot G, Pakdel F**, 2001. Synergism between ER alpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol.* 15: 1953 -1970.
- Migdal M**, 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci.* 27: 405-412.
- Mikkelsen RB, Wardman P**, 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene.* 22: 5734-5754.
- Miller WR**, 1991. Aromatase activity in breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 39: 783-790.
- Miller WR**, 2004. Biological rationale for endocrine therapy in breast cancer. *Best Practice & Res Clin Endocrinol & Metab.* 18: 1-32.
- Minari JB, Okeke U**, 2014. Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice. *Egypt J Med Hum Genet.* 15:32-334.
- MINSANTE, 2011.** Yaoundé Cancer Registry Technical Report 2004 - 2010.
- Miyata M, Furukawa M, Takahashi K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y**, 2001. Mechanism of 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene-induced immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. *Jpn J Pharmacol.* 86: 302-9.
- Mongis A**, 2017. Une nouvelle stratégie d'immunothérapie : cibler directement des immunostimulants à la surface des cellules tumorales par ligation bio-orthogonale. Thèse de Doctorat, Université d'Orléans.
- Moore KL, Dalley AF, Agur AM**, 2008. Clinically Oriented Anatomy. 6th ed. Philadelphia, Saunders.

- Mosmann T**, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63.
- Mueller SO, Korach KS**, 2001. Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr Opin Pharmacol*. 1: 613-9.
- Murakami A, Ashida H, Terao J**, 2008. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*. 269: 315- 325.
- Murray RLT**, 1984. Creatinine. Kaplan A *et al. Clin Chem*. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1261-1266 and 418.
- Naccarato AG, Viacava P, Vignati S, Fanelli G, Bonadio AG, Montruccoli G, Bevilacqua G**, 2000. Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Arch*. 436:431- 438.
- Naito H K**, 1984. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol. Kaplan A *et al. Clin Chem*. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1207-1213 and 437.
- Nakajima PB, Bosma MJ**, 2002. Variable diversity joining recombination: nonhairpin coding ends in thymocytes of SCID and wild type mice. *J Immunol*. 169:3094-104.
- Nakatsugi S, Ohta T, Kawamori T, Mutoh M, Tanigawa T, Watanabe K, Sgie S, Sugimura T, Wakabayashi K**, 2000. Chemoprevention by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, of 2- amino-1-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis in rats. *Japanese J of Cancer Res*. 91: 886-892.
- Nathalie J**, 2010. Lipogénèse cérébrale et régulation de la prise alimentaire, 12 Congrès européen d'endocrinologie (ECE). Prague, République Tchèque.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J**, 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 9: 274-284.
- Nichols HB, Schoemaker MJ, Cai J**, 2018. Breast Cancer Risk after Recent Childbirth: A Pooled Analysis of 15 Prospective Studies. *Ann Intern Med*. 11:11.
- Njamen D, Zingue S, Mvondo MA, Magne N CB**, 2014. The Efficacy of Some Comestible Natural Products in Treatment of Cancer. *Altern Integ Med*. 3: 2.
- O'Brien J, Wilson O, Orton T, Pognan F**, 2000. Investigation of the Alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267: 5421-5426.
- O'Brien MA, Kirby R**, 2008. "Apoptosis: a review of proapoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease" *J. Veterinary Emergency and Critical Care*. 18: 572-585.

- OECD**, Organization of Economic Cooperation and Development, 2001a. OECD Guidelines for testing of chemicals: Acute oral toxicity-Acute toxic class method. Test No. 423, adopted 22nd March 1996, and revised method adopted 17th December 2001. OEDC, Paris.
- OECD**, Organization of Economic Cooperation and Development, 2007. Third meeting of the validation management group for the screening and testing of endocrine disrupters (mammalian effects). Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemical, pesticides and biotechnology. <http://www.oecd.org>.
- Oesterreich S, Fuqua SA**, 1999. Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 6:405-19.
- OMS**, 2012. Organisation mondiale de la Santé. Cancer Prevention. Accessible sur le site Web: <http://who.int/cancer/prevention/en/index.html>.
- Özlem SA**, 2017. *In vitro* cytotoxicity and cell viability Assays: Principles, Advantages, and disadvantages Genotoxicity-A Predictable Risk to Our Actual World, Intech Open. 1601: 1-17: [https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual](https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages) world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and disadvantages. Consulté le 11 juillet 2018.
- Palisot de Beauvois AMFJ**, 1806. Flore d'Oware et de Benin en Afrique. Tome 1. Paris, Fain Jeune et Compagnie. 100 pages.
- Pani G, Galeotti T, Chiarugi P**, 2010. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer and Metastasis Rev*. 29: 351-378.
- Parl FF**, 2000. Estrogens, estrogen receptor and breast cancer. *Biomed Health Res*. 36: 1-263.
- Pearce ST, Jordan VC**, 2004. The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Critical Rev in Oncol/Hematol*. 50: 3-22.
- Poirier D**, 2008. New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens. *Drug Develop Res*. 69: 304-318.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E**, 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. 11: 1163-82.
- Rakhi S, Daman S, Dwarakanath BS, Madhu C**, 2011. Inhibition of Human Cervical Cancer Cell Growth by Ethanolic Extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. (Punarnava) Root. *Evidence-Based Complementary Alternative Med*. 1-13.
- Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA**, 2004. Species and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*. 6: 171-183.

- Ray RB, Raychoudhuri A, Steele R, Nerurkar P**, 2010. Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extract Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Modulating Cell Cycle Regulatory Genes and Promotes Apoptosis. *Cancer Res.* 70: 1925–1931.
- Re N, Pellegrini A, Proteggente A, Pannala M, Yang C, Rice-Evans**, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Reece J, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R**, 2012. *Campbell Biology*. 4th ed. Pearson, Quebec, Canada.
- Resende FA, de Oliveira APS, de Camargo MS, Vilegas W, Varanda EA**, 2013. Evaluation of Estrogenic Potential of Flavonoids Using a Recombinant Yeast Strain and MCF7/BUS Cell Proliferation Assay. *PLoS ONE.* 8: 74881.
- Rizwan A, Niyaz A, Atta A N, Adeeb S, Mastour S A**, 2016. Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy. *JTCM.* 1: 1-10.
- Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE**, 2004. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* 7: 21.
- Ross JS**, 1996. DNA ploidy and Cell Cycle Analysis in cancer diagnosis and prognosis. *Oncology.* 10:867-882.
- Russo J, Tay LK, Russo IH**, 1982. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2: 5-73.
- Russo IH, Russo J**, 1996. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect.* 104: 938-67.
- Russo IH, Russo J**, 1998. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 3: 49-61.
- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, Van Zwieten MJ**, 1990. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest.* 62: 244-278.
- Russo M, Russo GL, Daglia M, Kasi PD, Ravi S, Nabavi SF, Nabavi SM**, 2016. Understanding genistein in cancer: The good and the bad effects: A review. *Food Chem.* 196: 589-600.
- Sadanandam A, Futakuchi M, Lyssiatis CA, Gibb WJ, Singh RK**, 2011. A cross-species analysis of a mouse model of breast cancer-specific osteolysis and human bone metastases using gene expression profiling. *BMC Cancer.* 11:304–13.
- Safe S, Kim K**, 2008. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 41: 263-75.

- Sagiv SK, Gaudet MM, Eng SM, Abrahamson PE, Shantakumar S, Teitelbaum SL, Bell P, Thomas JA, Neugut AI, Santella RM, Gammon MD**, 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and survival among women with breast cancer. *Environ Res.* 109: 287-291.
- Sajeeth CI, Manna PK, Manavalan R**, 2011. Antioxidant activity of polyherbal formulation on streptozotocin induced diabetes in experimental animals. *Der pharmacia sinica.* 2: 220-226.
- Samadi N, Barazvan B, Rad JS**, 2016. Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *The Breast.* 30: 92-100.
- Santen RJ**, 2003. Inhibition of aromatase: insights from recent studies. *Steroids.* 68: 559-557.
- Schiliro' T, Gorrasi I, Longo A, Coluccia S, Gilli G**, 2011. Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the E-screen assay in relation to pesticide residues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 127: 139-146.
- Schnitt SJ**, 2010. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol 23 Suppl.* 2: 60-64.
- Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y**, 2012. Breast Cancer Metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics.* 9: 311-320.
- Setchell KD, Cassidy A**, 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr.* 129: 758S-767S.
- Shu L, Cheug KL, Khor TO, Chen C, Kong AN**, 2010. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 29: 483-502.
- Shwaery GT, Vita JA, Keany JF**, 1997. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta- oestradiol. Requirement for oestradiol modification. *Circulation.* 95: 1378-1385.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A**, 2018. Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 68: 7-30.
- Sighoko MFD**, 2011. Cancers du sein (féminin) et du foie en Afrique de l'Ouest: évolution temporelle de l'incidence et évaluation des facteurs de risque en Gambie et au Mali. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard, Lyon 1, France. <https://tel.archives-ouvertes.fr>. Consulté le 1 avril 2015.
- Silihe KK, Zingue S, Evelyn W, Awounfack CC, Anupam B, Nishil N D, Leonidas JMJ, Thomas M, Nzufu FT, Ndinteh DT, Riwoom SH, Njamen D, Creczynski-Pasa TB**, 2017. *Ficus umbellata* Vahl. (Moraceae) stem bark extracts exert antitumor activities in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci.* 18.

- Singleton V, Rossi Jr J**, 1965. "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents." *American J Enology Viticulture*.16: 144-158.
- So FV, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK**, 1997. Inhibition of proliferation of estrogen receptor positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoïds in the presence and absence of excess of estrogen. *Cancer Letter*: 112: 127-133.
- Song JK, Bae JM**, 2013. Citrus fruit intake and breast cancer risk: a quantitative systematic review. *J Breast Cancer*. 16: 72-76.
- Soto AM, Lin TM, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C**, 1992. An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: Colborn T and Clement C. (Eds.). Chemically induced alterations in sexual development: The wildlife/human connection Princeton, NJ: *Princeton Sci Publishing*. 295-309.
- Steward WP, Brown K**, 2013. "Cancer chemoprevention: A rapidly evolving field". *British J Cancer*. 109:1-7.
- Stone V, Johnston H, Schins RP**, 2009. Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations. *Critical Rev in Toxicol*. 39: 613-626.
- Suyatmi S, Suselo YH, Jusuf SA**, 2012. The selective cytotoxicity of ethanolic extract of *Annona muricata* leaf on HeLa cervical cancer cells. International conference: research and application on traditional complementary and alternative medicine in health care (TCAM). Surakarta, Indonesia, from 22-23rd.
- Syeda FA, Habib-ur-Rahman AM, Choudahry MI, Atta-Ur-Rahman**, 2011. *Inter J Genetics Mol Biol*. 3: 95.
- Takahashi O, Oishi S, Yoneyama M, Ogata A, Kamimura H**, 2007. Antiestrogenic effect of paradichlorobenzene in immature mice and rats. *Arch Toxicol*. 81: 505-17.
- Thibault C, Levasseur MC**, 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. *INRA Ellipse Eds*. 936.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A**, 2015. Global cancer statistics, 2012 CA. *Cancer J Clin*. 65: 87-108.
- Toutain C**, 2009. Effets vasculoprotecteurs des œstrogènes dans l'ischémie cutanée et après agression artérielle. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- Tung N, Lin NU, Kidd J**, 2016. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients with Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 34:1460-1468.

- Turnbull C, Rahman N**, 2008. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 9:321-345.
- Ugoeze K C, Ehianeta T, Alaribe C, Anyakora C**, 2014. Analysis and identification of oils from seed extract of *Anthonotha macrophylla* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). *African J Biotechnol.* 13: 2260-2264.
- Umland EM, Cauffield JS, Kirk JK, Thomason TE**, 2000. Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. *Pharmacotherapy* 20: 981-990.
- Vargo-Gogola T, Rosen JM**, 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer.*7: 659-72.
- Visanji JM, Ompon DG, Padfield PJ**, 2006. "Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels" *Cancer Letters.* 237: 130 - 136.
- Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Wade JL, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman SM, Runowicz CD, Ganz PA, Reis SE, McCaskill-Stevens W, Ford LG, Jordan VC, and 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. *JAMA.* 295: 3-15.
- Wafa S, Al-Dhaheri IH, Suhail A, Sherif MK**, 2008. Characterization of Breast Cancer Progression in the Rat. *New York Academy Sci.* 1138:121-131.
- Wallace DC**, 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 39: 359-407.
- Wang Y, Wang J, Wang H, Ye W**, 2016. Novel taxane derivatives from *Taxus wallichiana* with high anticancer potency on tumor cells. *Chem Biol & Drug Design.* 88: 556-561.
- Watson CJ, Kreuzaler PA**, 2011. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int J Dev Biol* 55: 757-762.
- Wazer DE, Chu Q, Liu XL, Gao Q, Safaii H, Band V**, 1994. Loss of p53 protein during radiation transformation of primary human mammary epithelial cells. *Moll Cell Boil.* 14: 2468-2478.
- Weijl N I, Cleton F J, Osanto S**, 1997. Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. *Cancer Treatment Rev.* 23: 209-240.
- Weinberg R**, 1996. L'apparition des cancers. *Pour la Science.* 229: 34-55.

- WHO report on cancer**, 2020. Setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wilbur KM, Bernheim F, Shapiro OW**, 1949. Determination of lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 24: 305-310.
- Wu X**, 2012. Effect of catalpol on doxorubicin-induced cytotoxicity in H9c2 cells. *J Med Plants Res.* 6: 849-854.
- Yager JD, Davidson NE**, 2006. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 354: 270-82.
- Yakubu MT, Olutoye AF**, 2016. Aphrodisiac activity of aqueous extract of *Anthonotha macrophylla* P. Beauv. Leaves in female Wistar rats. *J Integ Med.* 14: 400- 408.
- Yamasaki H, Mesnil M, Omori Y, Mironov N, Krutovskikh V**, 1995. Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat Res.* 333: 181-188.
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M**, 2003. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicol.* 183: 93-115.
- Zhang L, Shapiro R, Broyde S**, 2005. Molecular dynamics of a food carcinogen-DNA adduct in a replicative DNA polymerase suggest hindered nucleotide incorporation and extension. *Chem Res Toxicol.* 18: 1347-1363.
- Zingue S, Gbaweng AJY, Thomas M, Ndinteh DT, Jochen R, Auberon F, Maxeiner S, Chun FKH, Tchinda AT, Njamen D, Blaheta RA**, 2020. Bioguided identification of daucosterol, a compound that contributes to the cytotoxicity effects of *Crateva adansonii* DC (capparaceae) to prostate cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 247: 112251.
- Zingue S, Njuh NA, Tueche AB, Tamsa J, Tchoupang NE, Kakene DS, Sipping KMT, Njamen D**, 2018. *In vitro* cytotoxicity and *in vivo* antimammary tumor effect of the hydroethanolic extract of *Acacia seyal* (Mimosaceae) stem bark. *BioMed Res Inter.* 13:1-13.
- Zingue S, Cisilotto J, Tueche AB, Bishayee A, Mefegue AF, Sandjo LP, Magne NCB, Winter E, Michel T, Tantoh Ndinteh D, Awounfack CF, Silihe KK, Melachio TTT, Creczynski-Pasa TB, Njamen D**, 2016. *Crateva adansonii* DC, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity *in vitro* and prevents experimental mammary tumorigenesis *in vivo*. *J Ethnopharmacol.* 190:183-199.
- Zirihi GN, N'guessan K, Dibié ET, Grellier T**, 2010. Ethnopharmacological study of plants used to treat malaria, in traditional medicine, by Bete populations of Issia (Cote d'Ivoire). *J Pharm Sci & Res.* 2: 216-227.

ANNEXES

Annexe 1: Préparation des solutions

Annexe 1.1 Substances pharmacologiques et solution de DMBA

Le tamoxifène et l'œstradiol valérate ont été les substances pharmacologiques utilisées dans ce travail.

- **Solution de tamoxifène 0,25 mg/mL** a été préparée en solubilisant un comprimé de 20 mg dans un volume de 20 mL d'eau distillée et le volume final complété à 80 mL avec de l'eau distillée. Le volume d'administration était de 1 mL/100g.

- **Solution d'œstradiol valérate 0,1 mg/mL** a été préparée en solubilisant un comprimé de 2 mg d'œstradiol valérate 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. Le volume administré aux rats était de 2 mL/150g.

- **Solution de DMBA 5,2 mg/mL**: cette solution a été obtenue par solubilisation de 520 mg de DMBA dans un volume total de 20 mL d'huile d'olive, puis homogénéisée à l'ultrason de marque Elmasonic S40H (Elma, Singen) à 40° C. Le volume final a été complété à 100 mL avec de l'huile d'olive et le volume administré aux animaux était de 1 mL/75g.

Annexe 1.2 Tampon phosphate sodium 0,1 M, pH 7,5

Pour l'obtention du tampon, 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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ont été dissous dans un volume de 100 mL d'eau distillée et le volume final a été complété à 200 mL avec de l'eau distillée. Le pH a été ajusté à 7,5 à l'aide de l'HCl.

Annexe 1.3 Solutions utilisées pour le dosage des protéines

- **Solution de Biuret**: elle résulte du mélange de 2 solutions A et B. Solution A : 0,75 g de sulfate de cuivre hydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et 3 g de tartrate de sodium et de potassium ont été dissous dans de l'eau distillée pour un volume total de 100 mL. Solution B : 15 g de soude ont été dissous dans de l'eau distillée pour un volume total de 100 mL. Les deux solutions ainsi obtenues ont été mélangées et le volume final a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

- **Réactif de Bradford 0,1 mg/mL**: il a été préparé par dissolution de 50 mg de Bleu de Coomassie G250 dans 15 mL d'éthanol 95% puis complété à 25 mL d'éthanol. Après 30 min d'agitation, 50 mL d'acide orthophosphorique 85% ont été ajoutés au mélange. L'ensemble a été agité pendant 10 min. Le volume total de la solution a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée puis filtré.

- **Solution de BSA 10 mg/mL**: elle a été préparée à partir de 100 mg d'albumine sérique bovine (BSA) dissous dans une fiole jaugée (10 mL) avec 8 mL d'eau distillée et le volume final a été complété à 10 mL avec de l'eau distillée.

Annexe 1.4 Solutions et réactifs utilisés pour le dosage des composés polyphénoliques

Le dosage des composés polyphénoliques a été réalisé à l'aide de plusieurs solutions et réactifs préparés comme suit :

- **Solution de quercétine 0,1 mg/mL**: elle a été préparée par dissolution de 1 mg de quercétine dans un volume total de 10 mL d'éthanol 80%. Cette solution a été utilisée pour déterminer des concentrations des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavonols.

- **Réactif de Folin-Ciocalteu**: il 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 a été complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des polyphénols totaux.

- **Solution de carbonate de sodium 20%**: elle a été préparée par dissolution de 4 g de poudre de Na_2CO_3 dans une fiole jaugée (20 mL) avec 10 mL d'eau distillée et le volume final a été complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des polyphénols totaux.

- **Solution de chlorure d'aluminium 10%**: elle a été obtenue par dissolution de 2 g de AlCl_3 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 des concentrations des flavonoïdes totaux et flavonols.

- **Solution d'acétate de sodium 1M**: elle a été obtenue par dissolution de 0,82 g d'acétate de sodium dans un volume de 5 mL d'eau distillée et le volume final a été complété à 10 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination des concentrations des flavonoïdes totaux et flavonols.

Annexe 1.5 Solutions et tampons utilisés pour le dosage de quelques paramètres du stress oxydant, la détermination du pouvoir antioxydant *in vivo* et de l'activité de piégeage des radicaux du DPPH et ABTS *in vitro*

Les solutions et tampons utilisés pour le dosage de quelques paramètres du stress oxydant et la détermination du pouvoir antioxydant ont été préparés comme suit:

- **Tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4** a été obtenu par dissolution de 1,21 g de tris base et 2,79 g de KCl dans une fiole jaugée (500 mL) avec 250 mL d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 7,4 par ajout de HCl 11,8 N et un pH-mètre a permis de vérifier son obtention. Le volume

final a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été conservée à 4°C et a été utilisée lors du dosage du glutathion réduit (GSH).

- **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 a été complété à 100 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour préparer la solution de TCA-TBA-HCL.

- **Solution d'acide trichloracétique (TCA) 15%**: elle 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 a été complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour préparer la solution de TCA-TBA-HCL.

- **HCl 0,25 N**: il 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.

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

- **Tampon phosphate 0,1M, pH 7,4**: il a été obtenu à partir du mélange de deux solutions. Solution A: 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$) dissous dans 200 mL d'eau distillée puis le volume final complété à 500 mL avec de l'eau distillée. Solution B: 8,9 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, \text{H}_2\text{O}$) dissous dans 200 mL d'eau distillée puis le volume final complété à 500 mL avec de l'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 ont été ajoutés 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).

- **Réactif d'Ellman**: il a été obtenu en dissolvant 4,96 mg d'acide-2,2-dithio-5,5-dibenzoïque (DTNB) dans une fiole jaugée (250 mL) avec 100 mL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4) et le volume final a été complété à 250 mL avec le même tampon. Ce réactif a été utilisé lors du dosage du glutathion réduit (GSH).

-**Tampon acétate 300 mM, pH 3,6**: il a été obtenu par dissolution de 0,66 g d'acétate de sodium dans une fiole jaugée (250 mL) avec 200 mL d'eau distillée, puis le pH a été ajusté à 3,6 par titration avec 4,13 mL d'acide acétique. Le volume final a été complété à 250 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour la préparation du réactif de FRAP lors de la détermination du potentiel antioxydant.

-HCl 40 mM: il a été obtenu par le mélange de 0,86 mL de HCl 12 M dans une fiole jaugée (25 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 25 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour la préparation du TPTZ lors de la détermination du potentiel antioxydant.

-Solution de 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ) 10 mM: elle a été préparée par dissolution de 0,078 g de TPTZ dans une fiole jaugée (25 mL) avec 5 mL de HCl 40 mM et le volume final complété à 25 mL avec du HCl 40 mM. Cette solution a été utilisée pour la préparation du réactif de FRAP lors de la détermination du potentiel antioxydant.

-Solution de FeCl₃ 10 mM: elle a été obtenue par dissolution de 0,34 g de FeCl₃ dans une fiole jaugée (25 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 25 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour la préparation du réactif de FRAP lors de la détermination du potentiel antioxydant.

-Réactif de FRAP: il a été obtenu par le mélange des solutions de tampon acétate (300 mM, pH 3,6), de TPTZ (10 mM) et de FeCl₃ (10 mM) dans les proportions 10 :1 :1. Ce réactif a été utilisé lors de la détermination du potentiel antioxydant (réduction du Fe³⁺) dans l'homogénat de la glande mammaire.

-Solution de DPPH 0,4 mM: elle a été préparée par dissolution de 3,95 mg de DPPH dans un volume total de 25 mL de méthanol 65 °.

-Solution de ABTS: elle a été préparée en mélangeant 20 mL d'une solution de ABTS 7 mM à 20 mL d'une solution de permanganate de potassium 4,9 mM (KMnO₄) pour un volume final de 40 mL. Par la suite, Le mélange a été conservé à l'obscurité pendant 15 heures dans le but d'oxyder l'ABTS.

Annexe 1.6 Solutions et colorants utilisés pour les coupes histologiques

Les solutions utilisées dans ce travail pour les coupes histologiques ont été préparées de la façon suivante :

- Formol à 10%

La préparation a été faite à partir du formol commercial (solution concentrée à 37%). Pour un volume final (Vf) de 1000 mL, un volume initial (Vi) de 275 mL de formol a été introduit dans une éprouvette graduée et le Vf a été atteint par ajout d'eau distillée.

- Alcool à 50°, 70° et 80°

La préparation a été faite par dilution de l'éthanol 95° se référant à la table de dilution des alcools ou table de Gay-Lussac (voir annexe). C'est une opération qui consiste à amener un alcool à un degré plus faible en lui ajoutant de l'eau distillée.

- Hématoxyline de Harris

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.

- Eosine alcoolique à 0,5%

Pour obtenir une solution de 500 mL, 3 g d'éosine ont été dissous dans 100 mL d'eau distillée. A cette solution initiale, 125 mL d'éthanol 95° ont été ajoutés et le volume final complété à 500 mL avec de l'eau distillée. Après homogénéisation et filtration, 2 gouttes d'acide acétique ont été ajoutées. La solution finale obtenue a été laissée à l'abri de la lumière et filtrée avant usage.

- Solution d'eau gélatinée

Pour la préparation de 100 mL de cette solution, 5 mg de poudre de gélatine ont été dissous dans 80 mL d'eau distillée et le volume du mélange a été complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

- Solution d'orange G à 10%

Cette solution a été obtenue après dissolution de 10 g d'orange G dans 100 mL d'eau distillée.

- Solution d'éthanol/xylène

Cette solution résulte du mélange d'éthanol absolu avec du xylène dans les proportions d'un volume d'éthanol pour un volume de xylène (1/1).

Annexe 2 : Table de Gay-Lussac

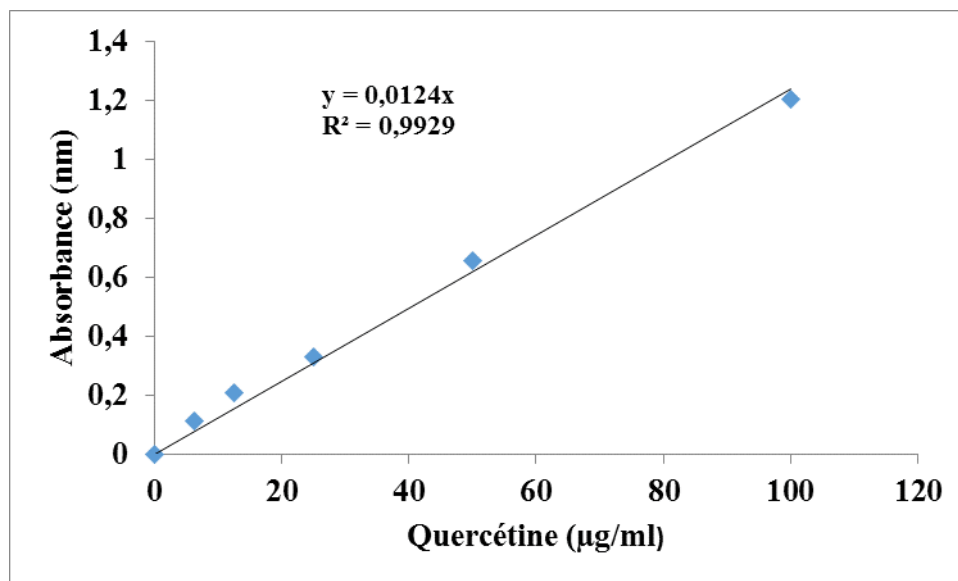
La table de Gay-Lussac, encore appelé table de mouillage de l'alcool, est utilisée pour la dilution de l'alcool.

		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	

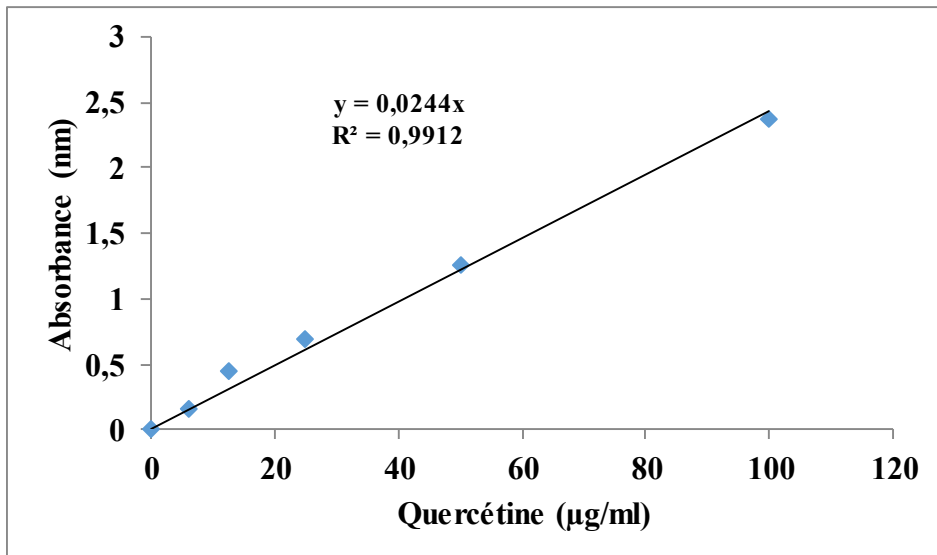
Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale X (**en bleu**) pour obtenir la concentration désirée.

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°.

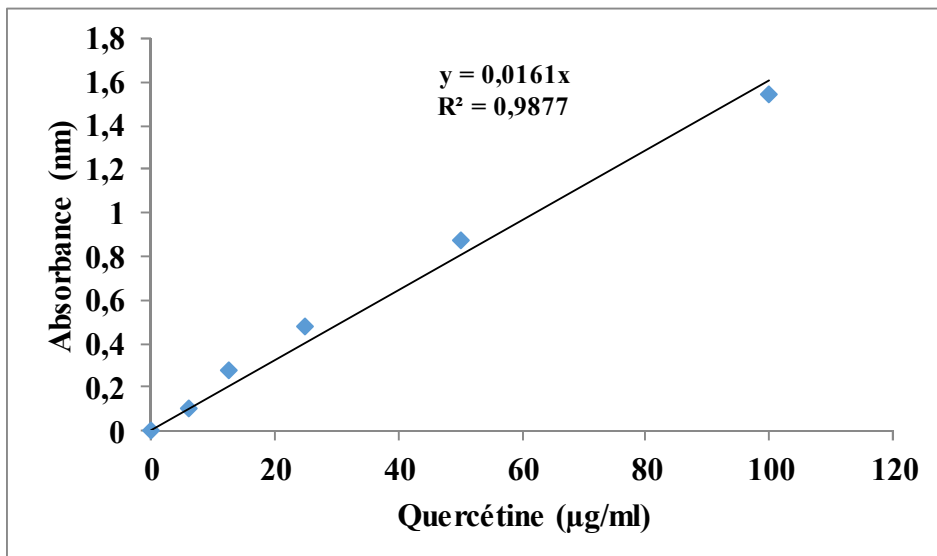
Annexe 3 : Courbes d'étalonnages



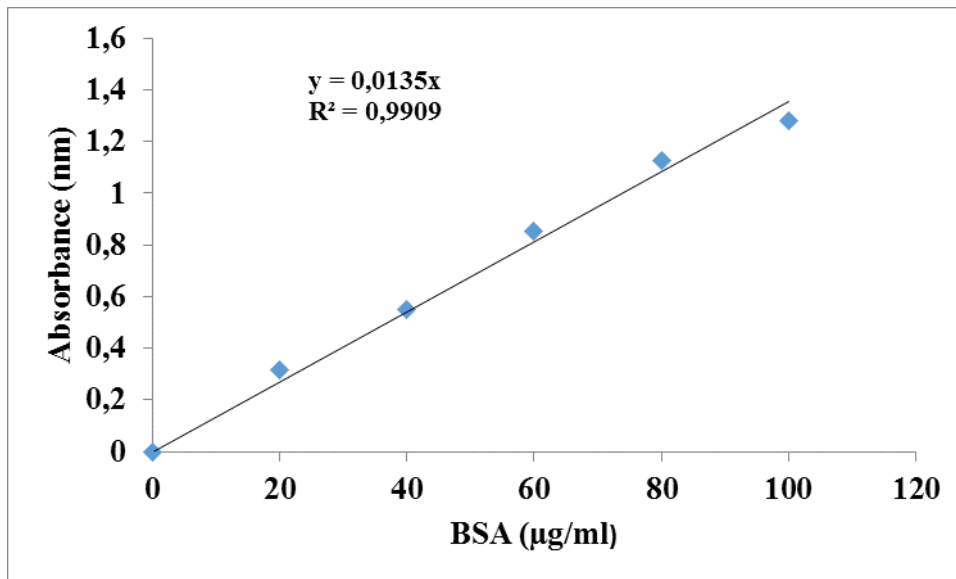
Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux



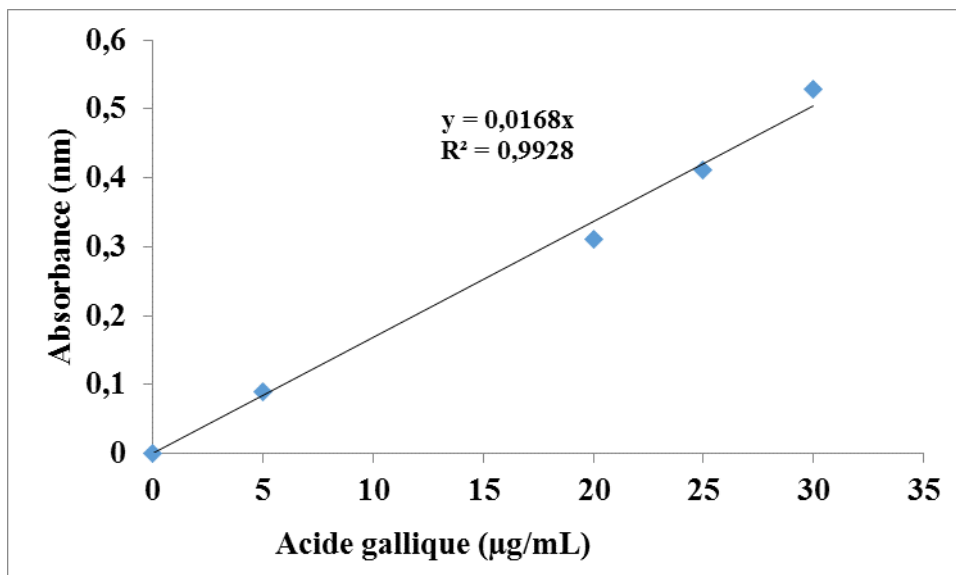
Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes totaux



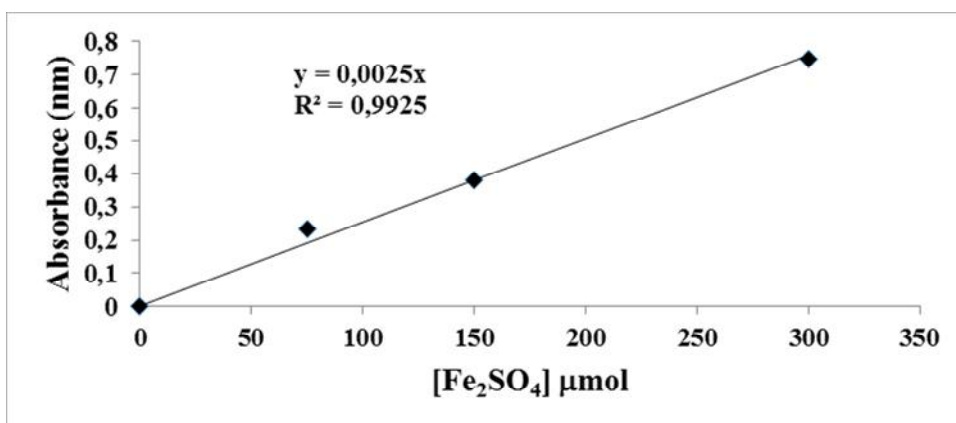
Courbe d'étalonnage du dosage des flavonols totaux



Courbe d'étalonnage du dosage des protéines totales



Courbe d'étalonnage de détermination de la capacité antioxydante totale (FRAP) *in vitro*.



Courbe d'étalonnage de détermination de la capacité antioxydante totale (FRAP) *in vivo*.

**PUBLICATIONS ISSUES DE LA
THESE**

Liste des publications

Telesphore Nanbo Gueyo, Marie Alfrede Mvondo, Stéphane Zingue, Marius Trésor Kemegne Sipping, Larissa Vanelle Kenmogne, Derek Tantoh Ndinteh, Dieudonné Njamen, 2019. *Anthonotha macrophylla* P Beauv (Caesalpinaceae) aqueous extract exhibits antiestrogenic effects *in vitro* and *in vivo*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 12 pages.

Telesphore Nanbo Gueyo, Stéphane Zingue, Marie Alfrede Mvondo, Edwin Mmutlane, Derek Tantoh Ndinteh, Constant Anatole Pieme, Dieudonné Njamen, 2020. Cytotoxic and cancer chemopreventive potentials of the *Anthonotha macrophylla* P. Beauv aqueous extract on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced breast cancer in rats. *Biologia*. 11 pages.

Telesphore Nanbo Gueyo¹ / Marie Alfrede Mvondo² / Stéphane Zingue^{3,4} /
Marius Trésor Kemegne Sipping⁵ / Larissa Vanelle Kenmogne⁵ / Derek Tantoh Ndinteh⁴ /
Dieudonné Njamen^{4,6}

Anthonotha macrophylla P. Beauv (Caesalpinaceae) aqueous extract exhibits antiestrogenic effects *in vitro* and *in vivo*

¹ Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon

² Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Dschang, Dschang, Cameroon

³ Department of Life and Earth Sciences, Higher Teachers' Training College, University of Maroua, Maroua, Cameroon

⁴ Departement of Applied Chemistry, Faculty of Sciences, University of Johannesburg, Doornfontein, South Africa, E-mail: dnjamen@gmail.com

⁵ Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon

⁶ Laboratory of Animal Physiology, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon, E-mail: dnjamen@gmail.com

Abstract:

Background: Phytoestrogens are natural compounds known as natural selective estrogen receptor modulators used as alternatives against estrogen-dependent cancers. This study aims to evaluate the antiestrogenic effects of *Anthonotha macrophylla*, a plant used to treat cancer in Cameroon.

Methods: The estrogenic/antiestrogenic activities of *A. macrophylla* aqueous extract were evaluated *in vitro* using MCF-7 cell proliferation assay. Moreover, a classical uterotrophic test was carried out to evaluate the antiestrogenic effects of *A. macrophylla* in rats. Changes in the uterus, vagina, and mammary glands were used as endpoints of estrogenicity.

Results: *Anthonotha macrophylla* induced antiestrogenic effects *in vitro* at all the tested concentrations by inhibiting estradiol-induced MCF-7 cell proliferation ($p < 0.001$). *In vivo*, a coadministration of estradiol with *A. macrophylla* extract led to the decrease of uterine [150 ($p < 0.05$) and 300 ($p < 0.01$) mg/kg body weight (BW)] and vaginal [75 ($p < 0.01$) and 300 ($p < 0.05$) mg/kg BW] epithelial thickness. In addition, a reduction in the mammary gland acini lumen's diameter was also observed at 75 and 150 mg/kg. Gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry analysis showed that phenolic acid derivatives are present in *A. macrophylla* extract, which are well known to be endowed with estrogenic/antiestrogenic properties. The LD₅₀ of *A. macrophylla* was estimated to be less than 2000 mg/kg.

Conclusions: *Anthonotha macrophylla* aqueous extract has antiestrogenic properties. This could promote more studies to explore its ability to prevent estrogen-dependent cancers.

Keywords: *Anthonotha macrophylla*, antiestrogenic effects, estrogen-dependent cancer, MCF-7 cell proliferation assay

DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0032

Received: July 10, 2019; **Accepted:** October 25, 2019

Introduction

Phytoestrogens are chemicals derived from plants that may bind to estrogen receptors (ER) [1] and mimic or inhibit endogenous estrogen actions [2], [3]. Their antiestrogenic properties make them a vital treatment against cancers [4]. Cancer is defined as a group of heterogeneous diseases characterized by an anarchic proliferation of abnormal cells that could attack surrounding tissues. Cancer is a major public health problem worldwide, which is responsible for about 8.2 million deaths per year [5]. With 50,000 new cases per year, breast cancer is the primary cancer among women [6]. Many factors have been associated with breast cancer, among which exogenous and endogenous estrogen stimulation, age, and genetics are the most important [7], [8]. However, estrogen-dependent cancers account for two thirds of all diagnosed breast cancers [9].

Dieudonné Njamen is the corresponding author.

© 2019 Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston.

Nowadays, surgery, chemotherapy, radiotherapy, and hormone therapy are the main medical treatments used against breast cancer [7]. Hormone therapy is the first systemic treatment of breast cancer and exists in three types: anti-aromatase (anastrozole), pure antiestrogen (fulvestrant), and selective ER modulator (tamoxifen) [8]. However, these treatments put in place encountered some disadvantages [9] coupled with the resistance phenomenon of cancer cells to well-established drugs [10]. Moreover, high cost remains the principal limitation of breast cancer therapy [11], especially in developing countries, where 80% of patients resort to medicinal plants for their primary health-care [12].

Plants produce a wide variety of bioactive compounds with significant applications in the pharmaceutical industry for the treatment of different diseases as well as cancer. *Anthonotha macrophylla* P. Beauv (Caesalpiniaceae) is a small tree (20 m high) that is widely distributed in tropical Africa and in the Littoral Region of Cameroon. The stem barks are used in folk medicine to treat venereal diseases and against worms. The leaves are used to treat diarrhea, dysentery, and skin infections [13]. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) reveals that *A. macrophylla* contains phytosterols. Phytosterols have been reported to be endowed with anticancer activities [14], [15]. These data from the literature have led us to the hypothesis that *A. macrophylla* might have antiestrogenic properties and prevent cancerous cell growth. To test this hypothesis, the effects of *A. macrophylla* stem bark aqueous extract was assessed *in vitro* on human ER+ breast cancer cells (MCF-7) and *in vivo* in ovariectomized (OVX) adult rats using a 3-day uterotrophic test.

Materials and methods

Chemicals

Fetal bovine serum (FBS), antibiotics, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES), quercetin, and 17 β -estradiol benzoate (E₂B) were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA), Ludwig Biotecnologia Ltda. (Alvorada, RS, Brazil), and Sigma-Aldrich (Hamburg, Germany). Trypan blue (0.4%), sulforhodamine B (SRB), resazurin, and cell culture media were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Estradiol valerate (E₂V) was from Delpharm (Lille, France). Serum Replacement 2 was obtained from Ludwig Biotecnologia Ltda.

Plant material

The stem barks of *A. macrophylla* were harvested in August 2015 in Yato, Cameroon Littoral Region, and the plant was authenticated at the Cameroon National Herbarium (CNH) in comparison to a reference specimen registered under number 37148 CNH.

The aqueous extract of *A. macrophylla* stem barks was prepared based on the traditional healer recommendations. In short, 300 g stem barks' dried powder was boiled in 1 L water for 25 min and then filtered using Whatman paper no. 4. The filtrate was then lyophilized to obtain a total dried mass of 9 g aqueous extract.

Phytochemical analysis

Estimation of total protein

The quantity of proteins present in *A. macrophylla* extract was determined by Bradford method [16] using bovine serum albumin (BSA) as standard. Practically, *A. macrophylla* extract (1 mL) was added to the same volume of freshly prepared Bradford reagent. Absorbance was measured at 595 nm using a UV-visible (UV-vis) 1605 Shimadzu spectrophotometer after incubation for 30 min in the dark.

Determination of phenolic compound content

The phenolic compounds were quantified in *A. macrophylla* extract by Folin-Ciocalteu method [17]. Folin-Ciocalteu reagent (75 μ L) was added to 750 μ L *A. macrophylla* extract (1 mg/mL). After 3 min, 750 μ L Na₂CO₃ (20%) was added. Absorbance was measured at 760 nm using a UV-vis 1605 Shimadzu spectrophotometer after incubation for 30 min in the dark. Gallic acid was used as standard in this experiment.

Estimation of flavonoid and flavonol contents

The total amount of flavonoids in *A. macrophylla* extract was determined using the colorimetric method as described previously [18] with modifications. *Anthonotha macrophylla* extract (1 mL; 1 mg/mL) was mixed with 100 μ L of 10% aluminum chloride and 100 μ L of 1 M sodium acetate. The mixture remained at room temperature for 40 min. Absorbance was then measured at 415 nm with a UV-vis 1605 Shimadzu spectrophotometer. The calibration curve was prepared using quercetin solutions at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μ g/mL in ethanol. Similarly, the aluminum chloride colorimetric method was employed for flavonol determination, but the incubation period was 150 min, and absorbance was determined at 440 nm. The experiments were repeated three times. Total flavonoids and flavonols were expressed in terms of Eq quercetin/mg dry weight, which is a common reference compound.

GC-MS analysis

Anthonotha macrophylla was analyzed using comprehensive GC coupled with time-of-flight (TOF) MS under the following conditions: analyte samples were analyzed using a LECO Pegasus 4D TOF MS (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA) equipped with a modified Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA), a LECO GC \times GC modulator and secondary oven (LECO Corporation), and a split/splitless inlet. The column sets used were Rxi-5 SilMS (29.5 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) as a primary column and Rxi 17 Sil MS (0.95 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) as the secondary column (Restek, Bellefonte, PA, USA). Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min and an inlet temperature of 250 $^{\circ}$ C. An initial oven temperature of 40 $^{\circ}$ C was set and held for 0.5 min and then slowly ramped at 10 $^{\circ}$ C/min to 250 $^{\circ}$ C and then held for 0.5 min at 250 $^{\circ}$ C. The modulator and secondary oven were run at an offset temperature of 5 $^{\circ}$ C above the primary oven. The MS was set up under the following conditions: no solvent delay because it was an SPME analysis; transfer line temperature at 250 $^{\circ}$ C; electron ionization at -70 eV; source.

In vitro study

Cell line

MCF-7 cells, estrogen-positive adenocarcinoma cells from human cancer, were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (Brazil).

MCF-7 cell culture

MCF-7 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 10 mM HEPES. Cell cultures were maintained at 37 $^{\circ}$ C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and pH 7.4.

MCF-7 cell proliferation assay

The cell proliferation assay as reported previously [19] was performed on MCF-7 cells. This study determined the estrogenic/antiestrogenic effects of compounds by measuring the ability of MCF-7 to proliferate. To do this, the cells were conditioned with trypsin and spread in 24-well plates at a concentration of 50,000 cells/well. After 24 h, the cells were washed with PBS, and Serum Replacement 2 (0.5 \times) supplemented phenol red-free RPMI was used as substitute for the seeding medium. *Anthonotha macrophylla* extract was subsequently introduced at concentrations of 0.1–200 μ g/mL. With respect to the evaluation of antiestrogenic activity, before incubation, 1×10^{-8} M 17 β -estradiol was introduced into the wells. The experimental steroid-free medium served as a negative control, whereas the cells treated with 17 β -estradiol were used a positive control and quercetin (5×10^{-8} M) was used as phytoestrogen control. The test lasted for about 144 h. Briefly, the cells were treated with trichloroacetic acid, incubated at 4 $^{\circ}$ C for 1 h, thereafter washed and dried, and finally stained with SRB dissolved in 1% acetic acid. Absorbance was read in a Biotek EL800 Multiscan device at 510 nm.

The results obtained on the estrogenic effects were expressed as the average \pm standard error on the mean (SEM) of the proliferative effect (PE). This parameter was calculated [20] as follows: PE = (maximum number

of cells in the sample)/(number of cells in the control). The estrogenic activity of the sample was calculated as relative PE (RPE%) as follows: $RPE\% = [(PE \text{ for sample}) / (PE \text{ for } 17\beta\text{-estradiol})] \times 100$ [21].

In vivo study

Female rats

Female Wistar rats (10–12 weeks; 150 g) were used for this study. Rats were housed in plastic cages and maintained at room temperature at the Laboratory of Animal Physiology, University of Yaoundé I (Cameroon). The animals were submitted to a standard diet established by the Laboratory of Animal Physiology and water.

Estimation of doses

Animal treatment was done based on three therapeutic doses: 75, 150, and 300 mg/kg body weight (BW). The dose of 150 mg/kg BW was calculated according to the indications of the traditional healer recommendations. This extrapolated dose (150 mg/kg BW) was framed by a low dose (75 mg/kg BW) and a high dose (300 mg/kg BW).

Uterotrophic test

Twenty-five rats were OVX dorsally. After 14 days, they were divided into five groups of five animals each and treated as follows: the negative control group received distilled water, the positive control group received estradiol (0.75 mg/kg BW), and the other three groups were coadministered with estradiol and *A. macrophylla* aqueous extract at the respective doses of 75, 150, and 300 mg/kg. The treatments were performed orally at a volume of 2 mL/150 g for each substance for 3 days. Afterward, the animals were sacrificed; uterine wet weight, uterine and vaginal epithelial thickness, and mammary glands were assessed as described previously [19].

Acute toxicity test

Oral acute toxicity was carried out in accordance with OECD Guideline 423 [22]. To achieve this, six female rats were divided into two groups of three animals each and treated by gavage (2 mL/150 g). One group received distilled water (control) and another was treated with *A. macrophylla* aqueous extract at 2000 mg/kg (AM 2000). After treatment, each animal was observed for 30 min, then for 2, 4, and 6 h on the first day, and once a day for the rest of the 13 days for any clinical signs of toxicity. Weight gain was recorded throughout the 14 days of the experiment. Animals were sacrificed by decapitation under light anesthesia, and organs (liver, lungs, heart, adrenals, spleen, kidneys, ovaries, vagina, and uterus) were removed, weighed (except for vagina), and fixed in 10% formaldehyde for histological analysis. The experiment was done in duplicate.

Histological analysis

The analysis of mammary gland differentiation and vaginal and uterine epithelium heights was done using 5 μm sections of these tissues that were paraffinized and stained with hematoxylin-eosin. The microphotographs of these sections were taken using an Axioskop 40 microscope connected to a computer and analyzed with MRGrab1.0 and Axio Vision 3.1 software (Zeiss, Hallbergmoos, Germany).

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM for each experimental group and in triplicate for three independent *in vitro* experiments. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test using GraphPad Prism software version 6.0. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Phytochemical analysis

Phytochemical screening showed the presence of proteins, phenols, flavonoids, and flavonols in the extract (Table 1).

Table 1: Quantitative phytochemical analyses.

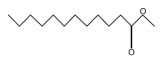
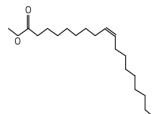
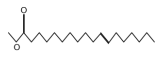
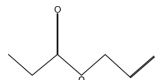
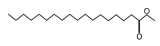
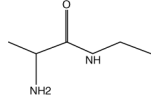
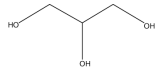
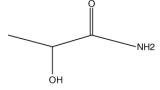
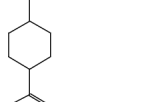
Concentration in <i>A. macrophylla</i> extract of selected phytochemicals	
Total proteins	31.36 ± 1.67 mg Eq BSA
Total phenols	10.24 ± 0.55 mg Eq gallic acid
Flavonoids	9.76 ± 0.99 mg Eq quercetin
Flavonols	3.66 ± 0.25 mg Eq quercetin

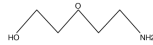

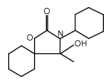
Total proteins concentration is expressed in mg bovine serum albumin (BSA) equivalents. Total phenols concentration is expressed in mg gallic acid equivalents, while Flavonoids and flavonols concentrations are expressed in mg quercetin equivalents.

GC-MS analysis

Twelve compounds were identified among the 62 compounds obtained from the GC profiles and thereafter divided into seven groups. These groups were made up of acetone alcohol (1), aldehyde (1), bicyclic compounds (1), amide (1), acids (6), amine (2), and alkane (1; Table 2). The structures of the major flavo-compounds identified in *A. macrophylla* are depicted in Table 2, whereas the chromatogram of a representative sample is provided in Figure 1.

Table 2: Chemical constituents identified from *A. macrophylla* aqueous extract.

Chemical name	Nature of the compound	Molecular formula	R.T. (s)	Area (%)	Structure
Hexadecanoic acid, methyl ester	Fatty acid methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1319.2	16.729	
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	Unsaturated fatty acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	1419.72	1.7261	
11-Octadecenoic acid, methyl ester	Unsaturated fatty acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	1419.62	1.0011	
Propanoic acid, 2-propenyl ester	Acid ester	C ₆ H ₁₀ O ₂	304.54	0.06412	
Methyl stearate	Saturated fatty acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	1433.32	2.5262	
Carbamic acid, monoammonium salt	Acid	CH ₆ N ₂ O ₂	189.28	5.6397	
Propane-1,2,3-triol	Alcohol	C ₃ H ₈ O ₃	184.78	0.58818	
Propanamide, 2-hydroxy-	Amide	C ₃ H ₇ NO ₂	183.72	1.0107	
Cyclohexane, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, trans	Alkane	C ₁₀ H ₁₈	1416.72	0.49398	

Diglycolamine	Amine	$C_4H_{11}NO_2$	182.96	0.41611	
Ethylenediamine	Amine	$C_2H_8N_2$	194.26	59.287	
1-Oxa-3-azaspiro[4.5]decan-2-one, 3-cyclohexyl-4-hydroxy-4-methyl-	Acetone alcohol	$C_{15}H_{25}NO_3$	1156.1	6.0903	

R.T. = Retention time; s = second.

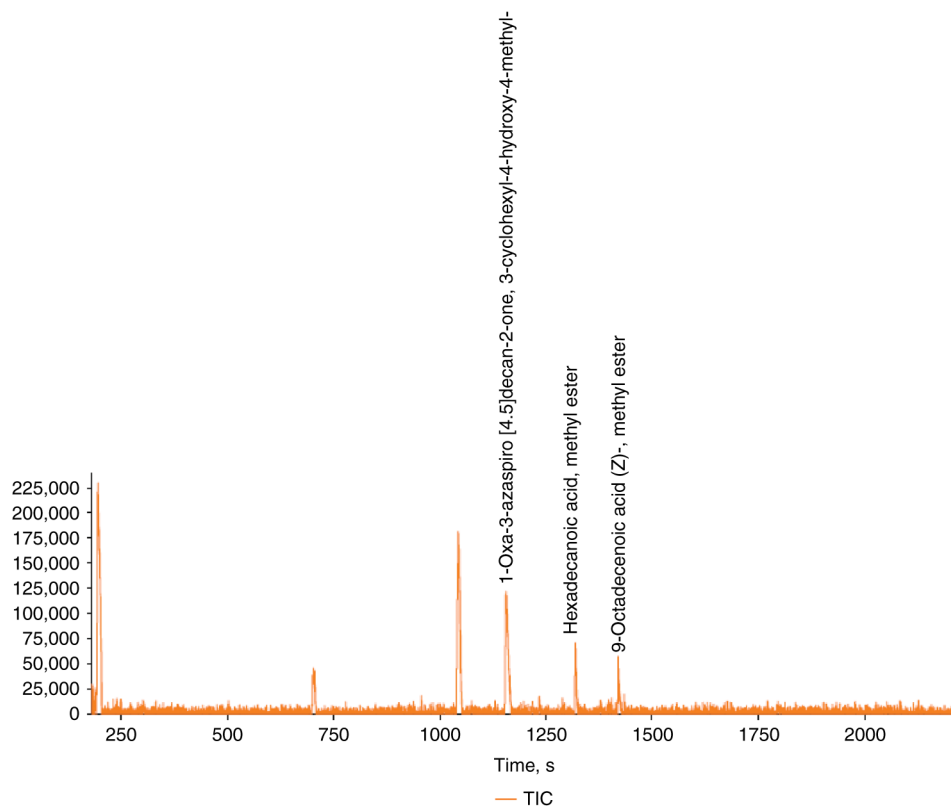


Figure 1: Chromatogram of *A. macrophylla* aqueous extract recorded in GC-MS.

Effects on MCF-7 cells

Estradiol and quercetin promoted MCF-7 cell proliferation and increased it by 100% ($p < 0.001$) compared to the control group (Figure 2). *Anthonotha macrophylla* reversed this effect at all the tested concentrations with significant effects at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (67.36% induction), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (64.88% induction), and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (69.27% induction; $p < 0.05$). MCF-7 cell proliferation remained inhibited when estradiol was coadministered with *A. macrophylla* at all tested concentrations ($p < 0.001$; Figure 2).

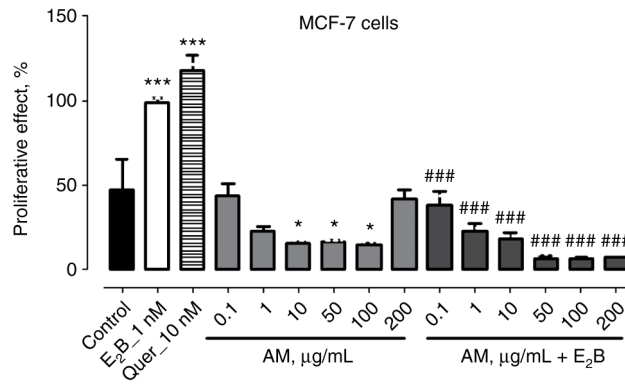
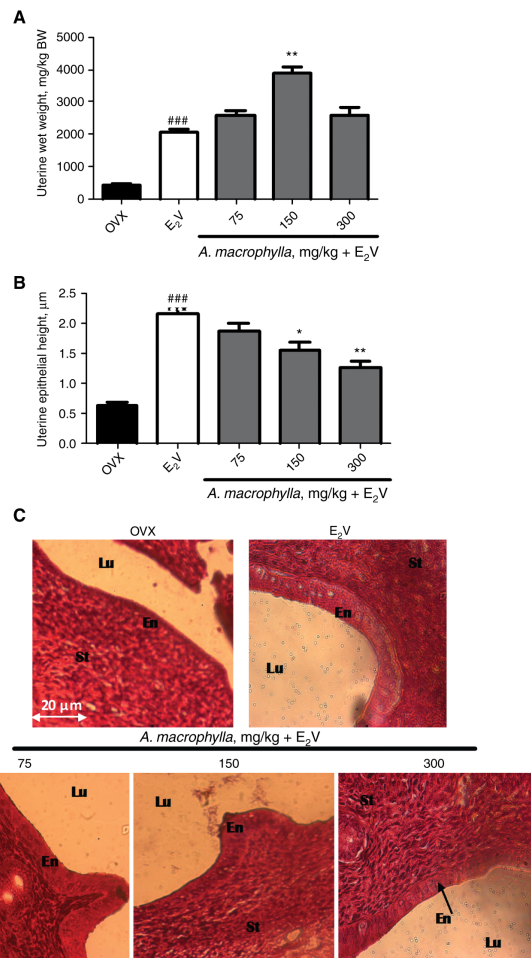


Figure 2: Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on MCF-7 cell proliferation. This effect was investigated by measuring MCF-7 cell proliferation. PE was measured in the presence of DMSO (0.01%), 17β-estradiol (10 nM), quercetin (50 nM), and *A. macrophylla*. PE = (maximum cell number of the sample)/(cell number of DMSO control). *p < 0.05, ***p < 0.001 compared to control; ###p < 0.001 compared to E₂B.

Effects on uterus

Figure 3A shows that *A. macrophylla* potentiated the increase of uterine wet weight induced by estradiol as follows: 24.39% at 75 mg/kg, 88.17% at 150 mg/kg (p < 0.01), and 23.96% at 300 mg/kg. In contrast, a slight dose-dependent decrease of uterine epithelial thickness was observed when E₂V was combined with *A. macrophylla*. We therefore noticed a decrease of 12.71% at 75 mg/kg and 27.98% (p < 0.05) and 40.67% at 300 mg/kg (p < 0.01) compared to E₂V (Figure 3B).



Automatically generated rough PDF by ProofCheck from River Valley Technologies Ltd

Figure 3: Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on uterus.

Representation of wet weight (A), uterine epithelial thickness (B), and microphotographs (hematoxylin-eosin staining, ×40) of uterine section (C) after 3 days of treatment. OVX, animals treated with the vehicle (distilled water); E₂V, animals treated with E₂V; AM + E₂V, animals cotreated with aqueous extract of *A. macrophylla* stem barks at 75, 150, and 300 mg/kg BW and E₂V (0.75 mg/kg BW). Lu, lumen of uterine; En, endometrial; St, stroma. ###p < 0.001 compared to OVX; *p < 0.05, **p < 0.01 compared to E₂V.

Effects on vaginal epithelium

E₂V induced vaginal epithelial cell proliferation and cornification (Figure 4B). This resulted in 100% increase of vaginal epithelial thickness compared to the control group (p < 0.001; Figure 4A). *Anthonotha macrophylla* reduced the effect of E₂V by 18.59% and 11.4% at 75 mg/kg BW (p < 0.01) and 300 mg/kg BW (p < 0.05), respectively, compared to animals treated with E₂V only.

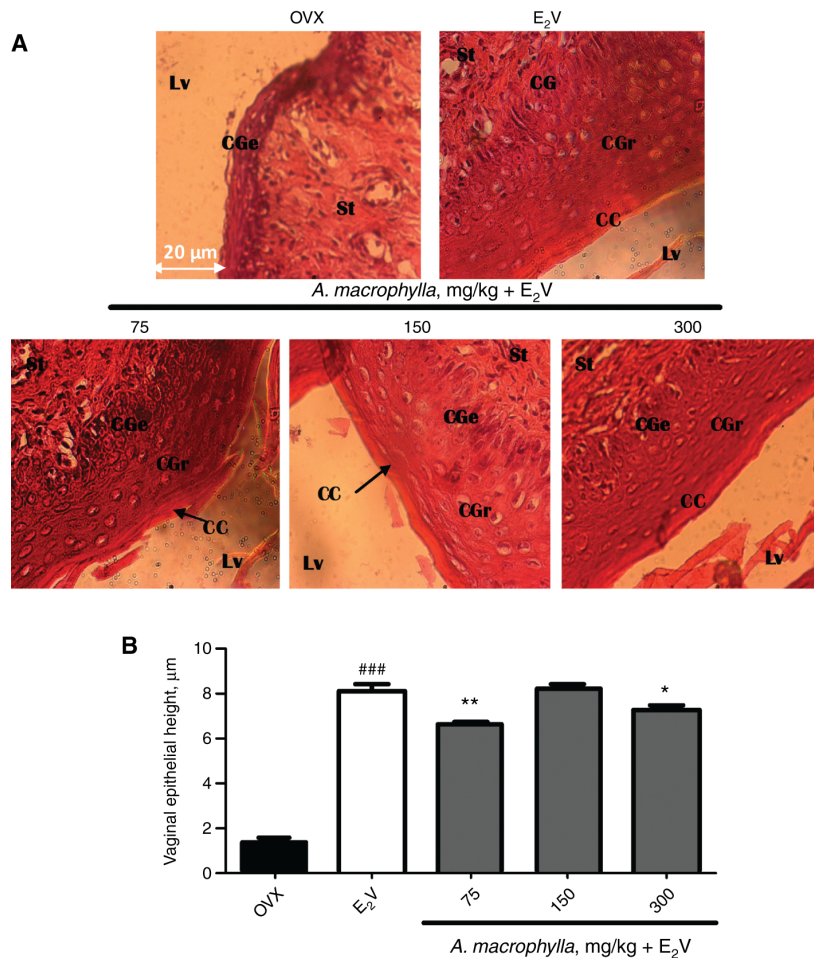


Figure 4: Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on vagina.

Microphotographs (hematoxylin-eosin staining, ×40) of vaginal tissue (A) and representation of vaginal epithelial thickness (B) after 3 days of treatment. CGe, stratum germinativum; CGr, stratum granulosum; CC, stratum corneum; Lv, lumen of vagina. Data are mean ± SEM. ###p < 0.001 compared to OVX; *p < 0.05, **p < 0.01 compared to E₂V.

Effects on mammary gland

Observations of mammary gland sections showed that E₂V increased the diameter and lumen of the alveoli. Furthermore, alveolar lumen was filled with abundant eosinophil secretion after treatment with E₂V. These parameters were found reduced when E₂V was coadministered with *A. macrophylla* at 75 and 150 mg/kg BW (Figure 5).

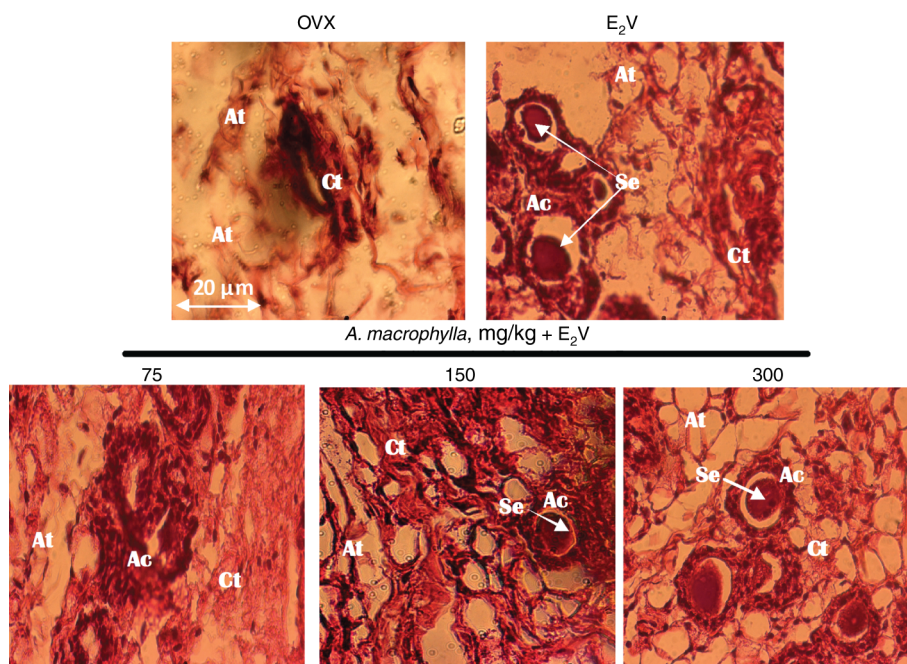


Figure 5: Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on mammary glands. Ac, alveoli epithelium; At, adipose tissue; Se, eosinophil secretion; Ct, conjunctive tissue.

Acute toxicological evaluation

No sign of toxicity was observed after a loading dose of 2000 mg/kg BW *A. macrophylla* aqueous extract until the end of experiment. No change was observed in the BW (Figure 6A) and the relative weight of organs, except for lung wet weight that significantly ($p < 0.01$) increased (Table 3). Furthermore, no sign of alteration was found in the histopathological sections of the major toxicity organs (Figure 6). According to OECD, LD₅₀ was then estimated to be less than 2000 mg/kg.

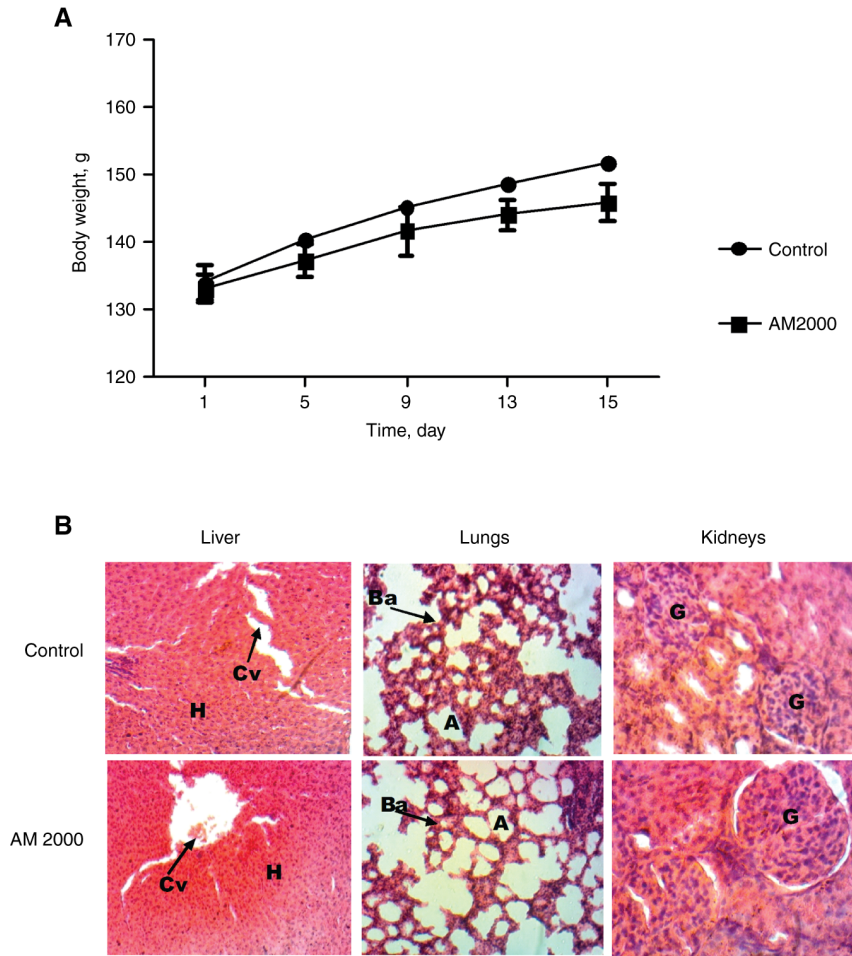


Figure 6: Body weight evaluation (A) and microphotographs of stained sections of kidneys, liver, and lungs (hematoxylin-eosin staining, $\times 250$; B) of rats after a single oral administration of *A. macrophylla* aqueous extract at 2000 mg/kg. Control, animals treated with distilled water; AM 2000, animals treated with *A. macrophylla* aqueous extract at 2000 mg/kg BW. Cv, central vein; H, hepatocyte; A, alveoli; Ba, alveolar bag; G, glomerular. Each point represents mean \pm SEM (n = 3). No significant difference.

Table 3: Relative weight of organs (mg/kg BW) in control and *A. macrophylla* extract groups.

Organs, mg/kg	Control	AM 2000
Uterus	1742.52 \pm 322.17	1199.26 \pm 206.54
Ovary	706.15 \pm 42.01	553.657 \pm 49.46
Liver	33685.50 \pm 2048.61	33,741.81 \pm 1883.67
Lungs	7420.42 \pm 338.85	11,549.23 \pm 428.13 ^a
Spleen	6140.43 \pm 302.65	6565.14 \pm 239.83
Adrenals	551.65 \pm 59.70	467.93 \pm 65.85
Kidneys	6909.32 \pm 370.43	6872.84 \pm 255.22
Heart	3747.87 \pm 190.06	3186.78 \pm 128.07
Stomach	12,417.09 \pm 577.48	11,886.32 \pm 927.82

Control, animals treated with vehicle; AM 2000, animals treated with *A. macrophylla* aqueous extract at 2000 mg/kg BW. Data are mean \pm SEM (n = 3). ^ap < 0.01 compared to control.

Discussion

The purpose of this work was to assess the antiestrogenic effects of *A. macrophylla* aqueous extract *in vitro* and *in vivo*. Many recent *in vitro* studies on human breast cancer have explored compounds extracted from various

medicinal plant species [23], [24]. In this study, we assessed the antiproliferative actions of *A. macrophylla* aqueous extract on MCF-7 cells. From our findings, *A. macrophylla* induced antiestrogenic effects at all the tested concentrations by inhibiting MCF-7 cells. The majority of phytoestrogens have a 10-fold higher affinity for ER_β than for ER_α [25]. This high affinity for ER_β, which is recognized as being involved in the antiestrogenic activities, is of great interest in the fight against estrogen-dependent cancers nowadays [26].

Focusing on *in vitro* antiproliferative activities of *A. macrophylla*, we found it rational to investigate its *in vivo* antiestrogenic potential. As expected, E₂V induced both uterine growth and vaginal proliferation. Moreover, mammary glands of animals treated with E₂V showed normal acini differentiation compared to the control. The effect of E₂V on the relative uterine wet weight was promoted by *A. macrophylla* at 300 mg/kg, suggesting that *A. macrophylla* would have been the course of estradiol-induced water imbibition and uterine cell proliferation. Both events were reported to result in the increase in uterine wet weight [27], [28]. This result further suggests that *A. macrophylla* may possess secondary metabolites endowed with estrogenic properties.

In general, plant extracts contain thousands of secondary metabolites that can have different modes of action and target different tissues. Flavonoids are the most important group of natural phenolic compounds and show excellent estrogen-like effects. This may account for the antiestrogenic activity observed with *A. macrophylla* extract on the uterus, vagina, and mammary glands in this study. However, the same plant inhibited MCF-7 cell proliferation *in vitro* when administered alone or in combination with estradiol. E₂V effects were also inhibited *in vivo* on mammary gland differentiation and uterine and vaginal epithelial thickness. These results suggest that the acute effect of *A. macrophylla* consists of inhibiting estradiol-induced cell proliferation, while cell permeability remains unchanged. Moreover, at concentrations higher than 100–1000 times of estradiol, phytoestrogens compete with endogenous estrogens for ERs and prevent growth in stimulated estrogens of mammals [29]. Many studies have demonstrated that hexadecenoic acid methyl ester and 9-octadecenoic acid (Z) methyl ester are endowed with antiestrogenic and antitumor effects [30], [31]. These same compounds were identified in *A. macrophylla* and so could be responsible for its antiestrogenic and antiproliferative effects. This also indicates that these ingredients would at least have competed with E₂V for ERs and partially prevent E₂V effects.

In conclusion, *A. macrophylla* displayed partial antiestrogenic activities indicated by a promotion of E₂V increase on uterine wet weight, inhibition of E₂V stimulation of MCF-7 cells, and uterine and vaginal epithelial cell proliferation. These findings open room for more studies to explore the potential of *A. macrophylla* to prevent estrogen-dependent cancers.

Acknowledgments

The authors would like to kindly thank Professor Tânia Beatriz Creczynski-Pasa (Federal University of Santa Catarina) for her collaboration. Dr. Stéphane Zingue was a CNPq-TWAS fellow (grant no. 190741/2015-5). The authors would also like to thank the Alexander von Humboldt Foundation for the material support offered to Dieudonné Njamen.

Author contributions: All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

Research funding: None declared.

Competing interests: The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Data availability statement: The data used to support the findings of this study are included within the article.

Ethical approval: All the experiments were carried out in strict accordance with the principles and procedures of the European Union concerning the care of animals (EEC Council 86/609) adopted by the National Institutional Ethics Committee of Cameroon, Ministry of Scientific Research and of Technological Innovation (Reg. No. FWA-IRD 0001954).

References

- [1] Oaoski AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* 2003;17:845–69.
- [2] Sonnenschein C, Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;65:143–50.

- [3] Andersen GD. Phytoestrogens: what they are and how they work. *Dyn Chiropract* 2000;18:21.
- [4] Limer J, Speirs V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res* 2004;6:119–27.
- [5] Cancer report worldwide. In: Bernard W. Stewart, Christopher P. Wild, editor(s). *Crisis of cancer impact worldwide exposed*. Press Release WCD, 2014:17–21. ISBN: 978-92-832-0443-5.
- [6] Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 2003;22:7316–39.
- [7] Kemfang Ngowa JD, Kasia JM, Yomi J, Nana NA, Ngassam A, Domkam I, et al. Breast cancer survival in Cameroon: analysis of a cohort of 404 patients at the Yaoundé General Hospital. *Adv Breast Cancer Res* 2015;4:44–52.
- [8] Poirier D. New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens. *Drug Dev Res* 2008;69:304–18.
- [9] Lazzeroni M, Serrano D, Dunn KB, Heckma-Stoddard MB, Lee O, Khan S, et al. Oral low dose and topical tamoxifen for breast cancer prevention: modern approaches for an old drug. *Breast Cancer Res* 2012;14:214.
- [10] Borowski E, Bontemps-Gracz MM, Piwkowska A. Strategies for overcoming ABC transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol* 2005;52:609–27.
- [11] Suyatmi S, Suselo YH, Jusuf SA. The selective cytotoxicity of ethanolic extract of *Annona muricata* leaf on HeLa cervical cancer cells. In: *International Conference: Research and Application on Traditional Complementary and Alternative Medicine in Health Care*, June 22–23, 2012, Surakarta, Indonesia, 2012.
- [12] Pierangeli G, Vital G, Rivera W. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr Extracts. *J Med Plants Res* 2009;3:511–8.
- [13] Burkill Burkhill HM. A review of Dalziel's. The useful plants of west tropical Africa. *R Bot Garden Kew* 1985;3:800–869.
- [14] Awad AB, Down AC, Fink CS. Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by β -sitosterol treatment of MDAMB-231 human breast cancer cells in culture. *Int J Mol Med* 2000;5:541–54.
- [15] Li JH, Awad AB, Fink CS, Wu YW, Trevisan M, Muti P. Measurement variability of plasma beta-sitosterol and campesterol, two new biomarkers for cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 2001;10:245–9.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [17] Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 1965;16:144–58.
- [18] Chang CC, Yang MH, Wen MH, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 2002;10:178–82.
- [19] Zingue S, Tchoumtchoua J, Ntso DM, Sandjo LP, Cisolotto J, Magne Nde CB, et al. Estrogenic and cytotoxic potentials of compounds isolated from *Milletia macrophylla* Benth. (Fabaceae): towards a better understanding of its underlying mechanisms. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:421.
- [20] Schiliro T, Gorrasi I, Longo A, Coluccia S, Gilli G. Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the E-screen assay in relation to pesticide residues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127:139–46.
- [21] Resende FA, de Oliveira APS, de Camargo MS, Vilegas W, Varanda EA. Evaluation of estrogenic potential of flavonoids using a recombinant yeast strain and MCF7/BUS cell proliferation assay. *PLoS ONE* 2013;8:74881.
- [22] OECD. OECD guidelines for testing of chemicals: acute oral toxicity-acute toxic class method. Test no. 423, adopted 22 Mar 1996. Revised method, adopted 17 Dec 2001. Paris: OEDC, 2001.
- [23] Hsieh C, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor positive human breast cancer (MCF7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998;58:3833–8.
- [24] Prietsch RF, Monte LG, da Silva FA, Beira FT, Del Pino FAB, Campos VF, et al. Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes. *Mol Cell Biochem* 2014;390:235–42.
- [25] Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson BO, Corton JC, Safe SH, van der Saal PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 1998;139:4252–63.
- [26] Russo M, Russo GL, Daglia M, Kasi PD, Ravi S, Nabavi SF, et al. Understanding genistein in cancer: the good and the bad effects. A review. *Food Chem* 2016;196:589–600.
- [27] Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 2003;183:93–115.
- [28] Takahashi O, Oishi S, Yoneyama M, Ogata A, Kamimura H. Antiestrogenic effect of paradichlorobenzene in immature mice and rats. *Arch Toxicol* 2007;81:505–17.
- [29] So FV, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess of estrogen. *Cancer Lett* 1997;112:127–33.
- [30] Syeda FA, Habib-ur-Rahman AM, Choudahry MI, Atta-Ur-Rahman. Gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) analysis of petroleum ether extract (oil) and bio-assays of crude extract of *Iris germanica*. *Int J Genet Mol Biol* 2011;3:95–100.
- [31] Hema R, Kumaravel S, Alagusundaram K. GC/MS Determination of Bioactive Components of *Murraya koenigii*. *J Am Sci* 2011;7:27.



Cytotoxic and cancer chemopreventive potentials of the *Anthonotha macrophylla* P. Beauv aqueous extract on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced breast cancer in rats

Telesphore Nanbo Gueyo¹ · Stéphane Zingue^{2,3} · Marie Alfrede Mvondo⁴ · Edwin Mmutlane³ · Derek Tantoh Ndinteh³ · Constant Anatole Pieme⁵ · Dieudonné Njamen^{1,3}

Received: 24 May 2020 / Accepted: 16 September 2020
© Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences 2020

Abstract

Breast cancer is one of the leading causes of cancer deaths in women worldwide. Many women rely on plants as alternatives to prevent/treat cancer. *Anthonotha macrophylla* (Ceasalpiniaceae) is one of this ethnomedicinal plant used to cure cancer in Cameroon. This study was therefore undertaken to bring scientific evidence to this claim. The in vitro cytotoxicity of *A. macrophylla* aqueous extract was evaluated using resazurin reduction assay in five tumors and two non-tumor cell lines. Moreover, the chemopreventive potential of *A. macrophylla* aqueous extract was evaluated on 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced breast cancer in rats. The research focused on the incidence, burden, volume and histological analysis of breast tumors. In vitro, *A. macrophylla* extract exhibited cytotoxic effect in all tested cell lines with a CC₅₀ ~ 279 and 132 µg/mL in human (MCF-7 and MDA-MB-231) and rodent breast cancer cells, respectively after 24 h. In vivo, the untreated DMBA-rats presented 100% of tumor incidence, while no tumor was detected in normal rats. Interestingly, a seven-month oral administration of *A. macrophylla* extract at the doses of 75 and 150 mg/kg BW resulted in a significant decrease of tumor incidence ($p < 0.01$ and $p < 0.05$), burden (70.01% and 53.28%) and volume ($p < 0.001$ and $p < 0.01$) compared to DMBA rats. The presence of polyphenols in the aqueous extract of *Anthonotha macrophylla*, as well as its antiradical properties, may account for its antitumor effects. These results therefore support the traditional use of *Anthonotha macrophylla* against breast cancer.

Keywords *Anthonotha macrophylla* · Breast cancer cell · Cytotoxicity · DMBA · Resazurin assay

Abbreviation

AM *Anthonotha macrophylla*
AI Atherogenic index

BW Body weight
CC₅₀ Cytotoxic concentration for 50% of the cells
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

✉ Stéphane Zingue
stephanezingue@gmail.com

✉ Dieudonné Njamen
dnjamen@gmail.com

Telesphore Nanbo Gueyo
nanbogueyotelesphore@yahoo.fr

Marie Alfrede Mvondo
mvondo.mariealfrede@yahoo.com

Edwin Mmutlane
edwinm@uj.ac.za

Derek Tantoh Ndinteh
dndinteh@uj.ac.za

Constant Anatole Pieme
conanpieme@gmail.com

¹ Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaounde 1, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

² Department of Life and Earth Sciences, Higher Teachers' Training College, University of Maroua, P.O. Box 55, Maroua, Cameroon

³ Department of Chemical Sciences, Faculty of Science, University of Johannesburg, Doornfontein 2028, South Africa

⁴ Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Dschang, P.O. Box 67, Dschang, Cameroon

⁵ Department of Biochemistry and Physiological Sciences, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaounde 1, P.O. Box 1364, Yaounde, Cameroon

DMBA	7,12 Dimethylbenz(a)anthracene
DMSO	Dimethylsulfoxide
ER	Estrogen receptor
FBS	Fetal bovine serum
GSH	Glutathione
Hb	Hemoglobin
Ht	Hematocrit
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid
MDA	Malondialdehyde
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
NHC	National Herbarium of Cameroon
NOR	Normal control
RBC	Red blood cell
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standard Error of Mean
TAM	Tamoxifen

Background

Breast cancer is the most frequent neoplasia and the second cause of cancer deaths in women worldwide (Siegel et al. 2018). In Cameroon, 2625 new cases of breast cancer are catalogued every year and this incidence is supposed to increase by 2030 (WHO 2014; Kemfang Ngowa et al. 2015). Chemical compounds found in the environment such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are recognized as cancer initiators (Gelboin 1980). These PAHs are metabolized and transformed into DNA that attack electrophiles in the body, producing PAH-DNA adducts that are found in human breast tumors (Leung et al. 2009). Although modern medicine has established treatments for breast cancer, however, there are adverse effects to these therapies. In fact, paclitaxel (an antimicrotubular agent), induces myelosuppression that affects the immune system; doxorubicin (a cytotoxic antibiotic) leads to a serious irreversible cardiotoxicity; while tamoxifen (an antiestrogen) increases the risk of endometrial cancer (Wu 2012; Lazzeroni and DeCensi 2013). The development of more efficient and safe alternatives for the treatment of breast cancer is therefore needed for better management of this malignant tumor. *Anthonotha macrophylla* (Ceasalpiniaceae), is a medicinal plant widely distributed in Tropical Africa including Cameroon and traditionally recommended as a cure for various diseases including cancer, venereal diseases and intestinal worms (Ugoeze et al. 2014). The leaves are used to treat diarrhea, dysentery and skin infections (Burkill 1985). A gas chromatography coupled with mass spectrometry analyses revealed the presence of phytosterols in *A. macrophylla*. Phytosterols, especially campesterol was reported to have anticancer properties (Awad et al. 2000; Li et al. 2001). In

addition, this extract also showed in vitro and in vivo anti-estrogenic effects on ovariectomized Wistar rats (Gueyo et al. 2019). However, this plant has not yet been investigated for its probable anticancer properties. The present study therefore aimed at investigating the in vitro cytotoxicity of the aqueous extract of *A. macrophylla* in a panel of cancerous and non-cancerous cell lines, and its protective effects against 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in female Wistar rats. Breast tumors obtained after exposing prepubescent female rats (~55 days) to the environmental carcinogen DMBA is similar to that of women in their molecular and genetic characteristics, biochemical properties, hormonal reactivity and histology (Russo and Russo 1996).

Methods

Chemicals and reagents

Fetal bovine serum and antibiotics, 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethane sulfonic acid (HEPES), DMBA and Tamoxifen citrate were bought from GIBCO (Grand Island, NY, USA), Ludwig Biotecnologia Ltda (Alvorada, RS, Brasil), Sigma-Aldrich (Stanford, Germany) and Mylan SAS (Saint-Priest, France) respectively. Trypan blue (0,4%), Alamar blue and cell culture mediums were bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Plant material and extraction

The stem barks of *Anthonotha macrophylla* were harvested in August 2015 in Yato, Cameroon Littoral region and the plant was authenticated at the Cameroon National Herbarium (CNH) where a voucher specimen has been deposited under the number 37148 CNH.

Four kilograms of powder from dried stem barks of *A. macrophylla* were boiled in 13 L of potable water for 25 min and then filtered with Wattman paper N⁰4. The filtrate was freeze-dried and a total mass of 80 g (2%) of the crude aqueous extract was obtained.

In vitro antioxidant assay

Antioxidant activity by DPPH radical scavenging assay

Free radical scavenging activity of *A. macrophylla* was measured using DPPH radical scavenging assay (Katalinić et al. 2004). For the assay, 500 μ L of *A. macrophylla* extract at different concentrations (100–300 μ g/mL) were introduced into test tubes and 500 μ L of the freshly prepared solution of 400 μ mol/L DPPH in methanol were then added. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min in the dark and the absorbance was measured at 517 nm using a UV-1605

Shimadzu spectrophotometer and Ferulic acid was used as the positive control. The DPPH radical scavenging effect was calculated using the following formula:

percentage of inhibition (%)

$$= \left\{ \frac{[(\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}) / \text{control absorbance}] \times 100 \right\}$$

ABTS radical scavenging assay for antioxidant activity of the extract

ABTS free radicals scavenging activity was evaluated according to Re et al. (Re et al. 1999). In brief, 1 mL of ABTS reagent was added to 100 μL of *A. macrophylla* extract at different concentrations (100–300 $\mu\text{g/mL}$). The blend was stirred and kept in the dark for 30 min. The absorbance was measured at 734 nm using UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. Ferulic acid was used as the positive control. The ABTS radical scavenging effect was calculated as aforementioned in “Antioxidant activity by DPPH radical scavenging assay” section.

In vitro cytotoxicity assessment

Cell lines and culture

The in vitro anticancer activity was evaluated on five tumor cell lines to evaluate the difference in the sensitivity depending on the tissue of origin where cancer is developed: MCF-7 [human estrogen receptor (ER)-positive breast adenocarcinoma cells], MDA-MB-231 (human ER-negative breast adenocarcinoma cells), SK-MEL-28 (human melanoma cells), 4 T1 (mouse mammary tumor cells), SF-295 (human glioblastoma cells) and two non-tumors: HUVEC (human umbilical vein endothelium cells) and MCR-5 (human fetal lung fibroblast cells) procured from the Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium completed with 10% of FBS, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin and 10 mM HEPES in humidified atmosphere of 37 $^{\circ}\text{C}$ in a 5% CO_2 . The number of viable cells was assessed by the trypan blue method and the count was made in a Neubauer chamber.

Cell viability assay

This assay was done following the method depicted by O'Brien et al. (O'Brien et al. 2000) which assesses the mitochondrial production as a measurement of cell viability. To do this, a density of 1×10^4 cells/well in 100 μL of culture medium was seeded in a 96-well plate and allowed to adhere overnight. After 24 h, cells were exposed to different substances at concentrations ranging between 50 and 500 $\mu\text{g/}$

mL. The fluorescent intensity was determined by a Perkin Elmer LS55 spectrofluorimeter (Becton Dickinson, San Jose, CA) with excitation at 530 nm and emission at 590 nm. The cytotoxic concentration which kill 50% of cells (CC_{50}) was determined by nonlinear regression analysis of the logarithm of concentration in function of the normalized response (percentage of cell viability) using the software GraphPad Prism 6.0. The assay was done in triplicate.

In vivo experiment

Experimental animals

Healthy female Wistar rats aged 30–37 days (49–55 g) were supplied by the production facility of the Animal Physiology Laboratory, University of Yaounde I (Cameroon). Rats were housed in plastic cages and maintained at room temperature in the Laboratory of Animal Physiology, University of Yaounde I (Cameroon). The animals had access to a soy-free diet established by the Laboratory of Animal Physiology and water ad libitum. The composition of animal diet was: corn (36.7%), bone flour (14.5%), wheat (36.6%), fish flour (4.8%), crushed palm kernel (7.3%), sodium chloride (0.3%) and vitamin complex (Olivitazol® - 0.01%).

Ethics and consent to participate

Housing of animals and all experiments were approved by the Cameroon Institutional National Ethic Committee (Ref n $^{\circ}$.Fw-IRb00001954), which adopted all procedures recommended by the European Union on the protection of animals used for scientific purposes (CEE Council 86/609).

Determination of doses

The environmental carcinogen DMBA was used in this study to induce mammary tumors in prepubescent rats at a single oral dose of 70 mg/kg as previously reported by Dias et al. (2000) and Mohamed and Alshaimaa (2016). The doses of *A. macrophylla* extract were acquired based on the preparation method of the extract and the posology recommended by the traditional healer. For the pharmacological dose obtained (150 mg/kg) in rats, a middle dose of 75 mg/kg and a lower dose of 37.5 mg/kg were obtained by dividing the pharmacological dose by a factor of 2 twice. Tamoxifen was administered at the dose of 3.3 mg/kg (Maltoni et al. 1997) and served as the positive control.

Induction of breast tumors in rats

After 15 days of acclimatization, sixty animals were randomized and assigned to six treatment groups ($n = 10$ animals per group) as follows: Group I, normal control (NOR); Group II,

negative control (DMBA); Group III, positive control (Tamox+DMBA); Group IV to VI, animals treated with *A. macrophylla* extract at the doses of 37.5, 75 and 150 mg/kg (AM 37.5 + DMBA, AM 75 + DMBA, AM 150 + DMBA). Breast cancer was induced by a single dose of DMBA (70 mg/kg) dissolved in olive oil and orally given to all experimental animals except normal control. Treatment continued in the same way from the day of cancer induction until the 196th day. After 28 weeks of experimentation, all survivor rats were euthanized after a 12 h overnight non-hydric fasting under diazepam and ketamin anesthesia (respectively 10 mg/kg and 50 mg/kg BW; *i.p.*). Blood was collected with and without anticoagulant tubes for hematological analysis and centrifuged at 3000×g for 15 min for biochemical analysis. Moreover, all tumors were removed, counted and weighed. A 1 mm precision sliding caliper (IGAGING®) was served to measure the size of tumors. Tumor incidence was noticed, and tumor volume was calculated using the following formula: length × weight × height ×π/6 (Faustino-Rocha et al. 2013). Uterus, vagina, mammary glands (estrogen target organs), femur, brain, liver, lungs (metastatic organs of breast cancer), spleen and kidneys (other toxicity organs) were removed and weighed. At last, all these organs were fixed in 10% formalin solution for histological analysis.

Histological analysis

The histological analysis of different organs was done using the techniques described by Cannet (Cannet 2006). An axioskop 40 microscope connected to a computer where the image was transferred using MRGrab1.0 and axio vision 3.1 software (Zeiss, Hallbergmoos, Germany) was used to determine histomorphological changes. Histologic classification of tumors of rat mammary gland from Russo and Russo (Russo and Russo 2000) were used in this study.

Hematological and biochemical analyses

Hematological parameters were assessed using a Mindray BC-2800 Auto Hematology Analyzer. These parameters include white blood cell (WBC), lymphocytes, monocytes, granulocytes, red blood cell (RBC) count, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and platelets.

The determination of Malondialdehyde (MDA) and glutathione reduced (GSH) levels as well as FRAP activity were performed according to the methods of Wilbur et al. (Wilbur et al. 1949), Ellman (Ellman 1959) and Benzie and Strain (Benzie and Strain 1996) respectively.

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard deviation (SD) for each experimental group and each in vitro experiment which were performed in triplicate and repeated three independent times. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test using the Graphpad Prism software version 5.03. the *p* value <0.05 was considered as significant.

Results

Scavenging free radical activities

The concentrations of *A. macrophylla* extract which resulted in 50% of radical scavenging (EC₅₀) were 198.7 µg/mL (DPPH) and 198.4 µg/mL (ABTS) (Table 1).

Cytotoxicity of *A. macrophylla* extract

Cytotoxic activity of *A. macrophylla* extract on cancer cell lines (MCF- 7, MDA-MB-231, 4 T1, SK-MEL-28, and SF-295) and non-tumors cell lines (HUVEC and MRC-5) is presented on Table 2. *A. macrophylla* extract induced a cytotoxic effect on all cancer cell lines with a less pronounced effect in MCF- 7 (CC₅₀ = 300 µg/mL) and MDA-MB-231 (CC₅₀ = 279 µg/mL) cancer cells, while the most important effect (CC₅₀ = 132 µg/mL) was observed in mouse 4 T1 cells. Moreover, *A. macrophylla* exhibited a CC₅₀ of 147 and 155 µg/mL in SF-295 and SK-MEL-28, respectively.

Cancer chemopreventive effects of aqueous extract of *a. macrophylla*

Effects on mammary tumors

Data related to the chemopreventive activity of *A. macrophylla* aqueous extract on mammary tumor incidence, total tumor

Table 1 Scavenging free radical activities of *A. macrophylla* aqueous extract

	EC ₅₀ (µg/mL)	
	DPPH	ABTS
Ferulic acid (control)	3.44 ± 0.46	3.68 ± 0.81
<i>A. macrophylla</i>	198.71 ± 8.92	198.42 ± 11.3

EC₅₀ = concentration of *Anthonotha macrophylla* extract which results in 50% of scavenging. The results are expressed as mean ± SD of at least 3 independent experiments

Table 2 CC₅₀ values of aqueous extract of *Anthonotha macrophylla* in tumoral and non tumoral cell lines

CC ₅₀ (µg/mL)							
MCF-7	MDA-MB-231	HUVEC	MCR-5	4 T1	SK-MEL-28	SF-295	
<i>A. macrophylla</i>	300 ± 31.2	279 ± 16.9	156 ± 18.9	140 ± 12.3	132 ± 30.25	155 ± 12.6	147 ± 11.4
Selectivity index (SI)							
HUVEC/MCF-7	HUVEC/MBA-MB-231		MCR 5/MCF-7		MCR-5 /MDA-MB 231		
0.52	0.56		0.46		0.50		

CC₅₀ = Concentration of *A. macrophylla* aqueous extract which results in 50% of cell viability. The results are expressed as mean ± SD of at least 3 independent experiments. SI = CC₅₀ of *Anthonotha macrophylla* on non-tumoral cell lines (MCR-5 and HUVEC) divided by CC₅₀ determined for cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231 and 4 T1)

burden, average tumor weight and tumor volume after 28 weeks of treatment are presented in Table 3. No tumors were observed in normal animals while animals in the DMBA group presented 100% of mammary tumors with a tumor volume of 1.25 cm³ at the end of experiment. In the tamoxifen group, animals showed a significant ($p < 0.001$) reduction in tumor incidence (25%), tumor volume (0.25 cm³) and an average tumor weight of 72.33% as compared to DMBA group. *A. macrophylla* extract (75 and 150 mg/kg) significantly ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively) reduced the tumor incidence (30% and 50%), the inhibition related to average tumor weight (70% and 53.28%) and tumor volume (0.26 cm³ and 0.59 cm³) as compared to DMBA group.

Effects on oxidative stress status in mammary glands

Oxidative stress status in mammary glands homogenates was evaluated. An increase in MDA levels and a non-significant decrease of GSH level and FRAP activity were observed in mammary glands of DMBA rats as compared to normal animals (Fig. 1). *A. macrophylla* extract significantly ($p < 0.01$) decreased MDA levels in mammary glands at the doses of 37.5 and 150 mg/kg BW. Furthermore, *A. macrophylla* extract

induced a significant increase ($p < 0.05$) in GSH level at the doses of 37.5 and 75 mg/kg and FRAP activity at the dose of 150 mg/kg as compared to DMBA group.

Effect on the Histomorphology of mammary glands

After 7 months of treatment, in situ carcinoma of mammary glands of the DMBA group was observed. This was characterized by a hyperplasia of the lobular units of mammary and the dilated ducts with a diminution of the conjunctive tissue (Fig. 2). No sign of hyperplasia was observed in the mammary glands of animals treated with tamoxifen. Rats treated with *A. macrophylla* extract showed hyperplasia at the dose of 37.5 and 150 mg/kg. However, animals that received *A. macrophylla* extract at the doses of 75 presented quasi-normal histoarchitecture.

Effects of a. macrophylla on relative organ weights

Only tamoxifen and *A. macrophylla* extract at dose of 75 mg/kg (at day 56 and 84) significantly ($p < 0.01$) lowered body weight as compared to the normal control group (data not shown).

Table 3 Breast cancer chemopreventive activity of *A. macrophylla* extract after 28 weeks of treatment

Items	NOR	DMBA	TAMOX + DMBA	<i>A. macrophylla</i> (mg/kg) + DMBA		
				37.5	75	150
N° of rats with tumors/total rats	0/10	10/10	2/10	6/10	3/10	5/10
Tumor incidence (%)	0	100###	20***	60	30**	50*
Average tumor weight (mg/kg)	–	318.3 ± 136.4	88.1 ± 31.5**	298.7 ± 100.2	98.2 ± 49.5.1**	148.7 ± 62.2*
% Inhibition related to tumor weight	–	–	72.3	6.2	70.0	53.3
Total tumor burden (mg)	0	3183.2	880.5	2987.2	981.6	1487
% Inhibition related to tumor burden	–	–	72.34	6.16	70.01	53.28
Tumor volume (cm ³)	–	1.25 ± 0.11	0.25 ± 0.07***	0.86 ± 0.04	0.26 ± 0.09***	0.59 ± 0.18**

NOR = Normal control rats receiving vehicle (distilled water); DMBA = Rats serving as a negative control, receiving vehicle; TAMOX + DMBA = rats serving as a positive control, receiving tamoxifen (3.3 mg/kg BW); *A. macrophylla* + DMBA = Rats receiving the aqueous extract of *A. macrophylla* at doses of 37.5, 75 and 150 mg/kg BW. Data are represented as mean ± SD (n = 10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ as compared to negative control. ### $p < 0.001$ as compared to normal control

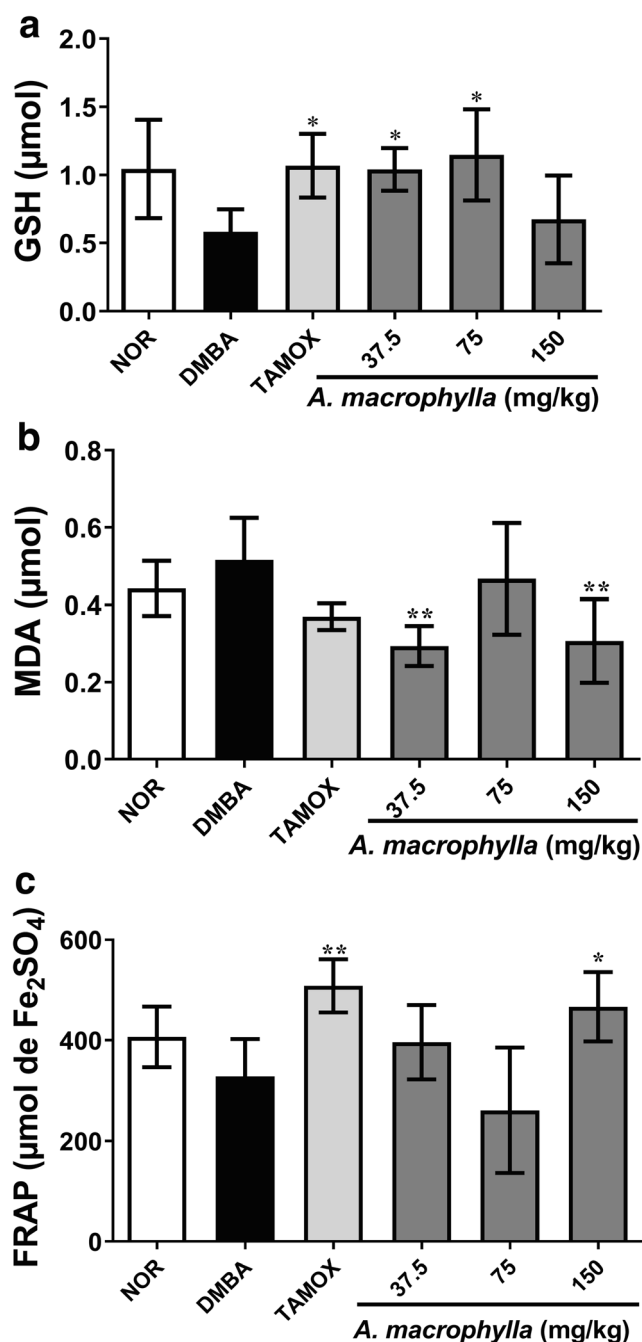


Fig. 1 Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on GSH (a) and MDA (b) levels as well as FRAP (c) activity in mammary glands. NOR = Normal control rats receiving vehicle (distilled water); DMBA = Rats serving as a negative control, receiving vehicle; TAMOX + DMBA = rats serving as a positive control, receiving tamoxifen (3.3 mg/kg BW); *A. macrophylla* + DMBA = Rats receiving the aqueous extract of *A. macrophylla* at doses of 37.5, 75, and 150 mg/kg BW. Data are represented as mean \pm SD ($n = 10$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to negative control

Table 4 presents the relative weights of various organs following 28 weeks of treatment with *A. macrophylla*. No significant difference was observed in the weight of various organs in animals that received DMBA, exception made with

the spleen wet weight which significantly ($p < 0.001$) decreased as compared to normal rats.

Treatment of rats with tamoxifen significantly decreased uterine wet weight ($p < 0.001$) and increased brain ($p < 0.001$), lungs ($p < 0.05$) and spleen ($p < 0.05$) wet weight as compared to DMBA control group. Concerning treatment with *A. macrophylla* extract, it induced a significant ($p < 0.001$) decrease in the uterine wet weight at all tested doses, while the lung weight increased ($p < 0.001$) at the dose of 150 mg/kg.

Effects on toxicological parameters

No statistical significance was observed between the different groups in all measured hematological parameters (Table 5). Exception made for the *A. macrophylla* extract at the dose of 75 mg/kg ($p < 0.05$), which significantly increased hematocrit and hemoglobin as compared to DMBA group. No metastasis and damages were noted in the histoarchitectures of the liver, lungs, kidneys, bone and brain (Fig. 3).

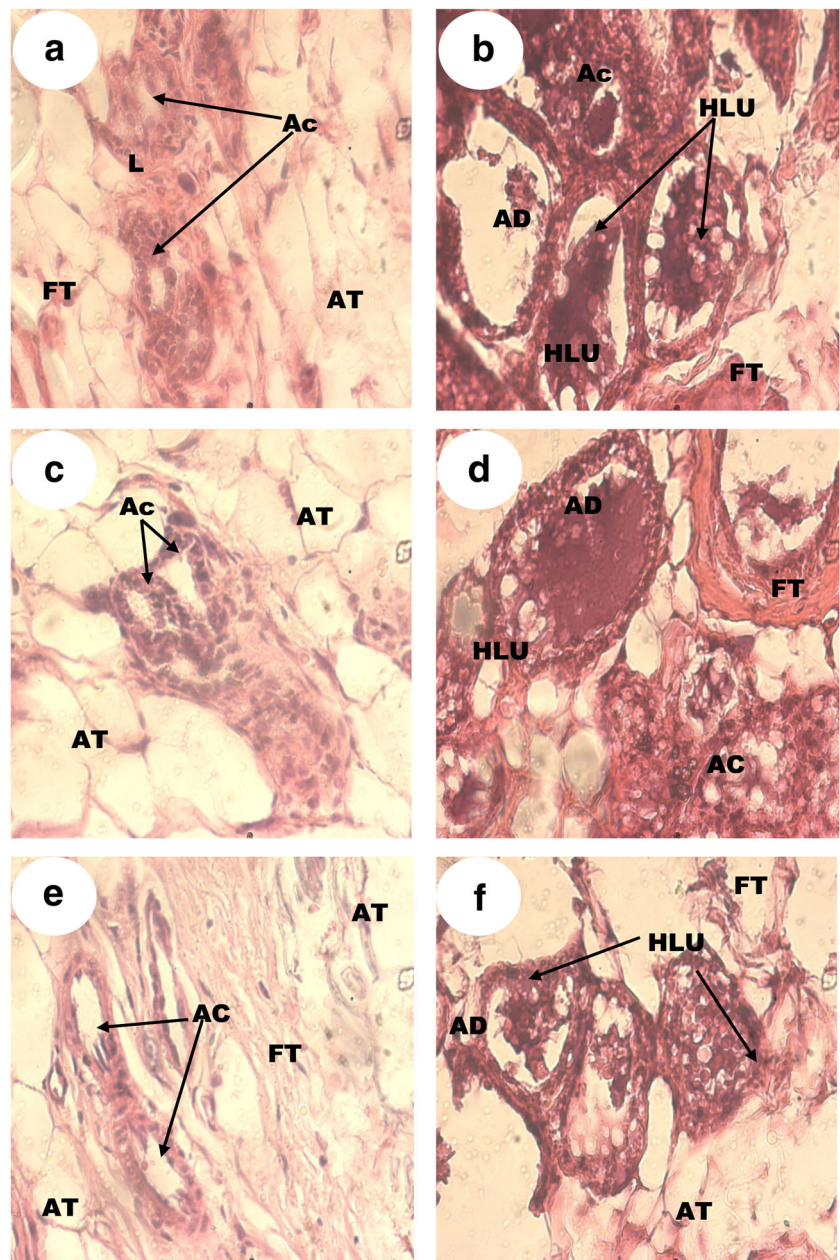
Discussion

New anticancer molecules are continuously being targeted and developed from medicinal plants, which in general are less toxic and have presented effective results on cancer (Burkill 1985). As a contribution to this search, we focused on *Anthonotha macrophylla*, a medicinal plant used in Cameroon to cure cancer. The aqueous extract of *A. macrophylla* exhibited cytotoxic effect on 5 cancer cell lines with a more pronounced effect on mouse mammary tumor cells (4 T1). The fact that *A. macrophylla* extract induced quite similar cytotoxic effect on both ER+ (MCF-7) and ER- (MDA-MB-231) cells suggests that it killed the cells by an estrogen receptor independent pathway. Furthermore, *A. macrophylla* extract was not selective to cancer cells (with a selectivity index < 1), which is a drawback in the research for an alternative therapy for breast cancer. However, the $\text{LD}_{50} > 2000$ mg/kg obtained with *A. macrophylla* extract (Gueyo et al. 2019) encourages in-depth phytochemical study to isolate its bioactive components, which could have better selectivity for cancerous cells (> 3).

Available phytochemical reports on *A. macrophylla* extract shows that it contains flavonoids, particularly flavonols, which might account for its cytotoxicity; given that quercetin the most abundant flavonol in plants has been described to be cytotoxic in vitro (Murakami et al. 2008; Gibellini et al. 2011).

DMBA, an organic environmental pollutant was used in this study to induce cancer in rats. It is highly lipophilic and requires metabolic activation for its carcinogenicity. Several tissues, including the mammary glands are capable of activating DMBA. In the breast, DMBA is converted to epoxides;

Fig. 2 Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on the microarchitectures of mammary glands. **a** Normal control rats receiving vehicle (distilled water); **b** Rats serving as a negative control, receiving vehicle; **c** rats serving as a positive control, receiving tamoxifen (3.3 mg/kg BW); **d, e** and **f** Rats receiving the aqueous extract of *A. macrophylla* at doses of 37.5, 75, and 150 mg/kg BW, respectively. Ac = Acinus; AT = Adipose tissue; FT = Fibrous tissue; L = Lobule; AD = Atypical duct; HLU = Hyperplastic lobular unit



active metabolites with the capacity to damage DNA molecules and this is the main event in carcinogenicity initiation (Clarke 1997; Balogh et al. 2003). In this study, DMBA was administrated at a single dose of 70 mg/kg BW by gavage to Wistar rats to induce mammary tumors. Due to the active proliferation of the terminal ducts in breast tissue of rats in this age range (45 to 60 days), they become very susceptible to carcinogens and tumor development (Ariazi et al. 2005). After 28 weeks of treatment, it was observed that DMBA induced 100% tumors in the experimental animals that only received DMBA whereas animals in the normal group did not exhibit tumors. This result is in accord with the study of Zingue et al. (2016) who also reported 100% tumors with DMBA in female

Wistar rats. The significant reduction in tumor volume and average tumor weight observed with *A. macrophylla* extract at the doses of 75 and 150 mg/kg BW suggests protective effects of this extract on the mammary tumorigenesis. These effects could be explained by the ability of compounds of *A. macrophylla* extract to kill cancer cells, as observed in vitro in this study. These results suggest that the acute effect of *A. macrophylla* involves inhibition of cell proliferation. Flavonols detected in *A. macrophylla* extract, might have counteracted the estrogen activity in vitro and in vivo via ER-binding to inhibit tumor growth. This is in line with the lately reported antiestrogenic effects of *A. macrophylla* aqueous extract (Gueyo et al. 2019). Histopathological

Table 4 Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on relative weights of organs after 28 weeks of treatment

Organs (mg/kg)	NOR	DMBA	TAMOX + DMBA	<i>A. macrophylla</i> (mg/kg) + DMBA		
				37.5	75	150
Uterus	2510.8 ± 392.7	3119.4 ± 562.5	860.7 ± 151.6***	1995.6 ± 474.9**	1918.3 ± 580.1***	1886.6 ± 292.2***
Ovary	515.7 ± 72.3	553.0 ± 84.1	271.3 ± 34.5***	508.1 ± 126.7	633.1 ± 86.7	560.67 ± 96.2
Liver	32,180.8 ± 2415.8	33,445.9 ± 2448.38	32,885.5 ± 1403.2	32,666.7 ± 2733.3	31,340.7 ± 1222.1	32,650.9 ± 2642.6
Lungs	7519.7 ± 711.4	7438.2 ± 710.2	8683.4 ± 694.1*	7829.4 ± 718.7	7072.6 ± 412.5	9722.9 ± 577.9***
Spleen	4494.1 ± 925.5	2432.2 ± 435.4####	3589.4 ± 1150.2*	2796.9 ± 363.4	3430.7 ± 492.14	3308.5 ± 203.7
Adrenals	287.1 ± 69.1	304.5 ± 52.2	278.1 ± 27.7	312.3 ± 45.5	315.7 ± 53.5	308.5 ± 68.9
Kidneys	5762.8 ± 217.14	5336.3 ± 417.8	5831.2 ± 317.9	5482.3 ± 504.7	5644.4 ± 396.4	6236.3 ± 279.6
Femur	2889.8 ± 296.78	2569.7 ± 215.2	2776.2 ± 354.4	2574.5 ± 171.6	2710.9 ± 200.6	2459.4 ± 186.2
Brain	7996.2 ± 456.3	8137.3 ± 271.5	9335.1 ± 350.7***	8016.7 ± 606.9	8158.2 ± 324.1	7877.8 ± 295.5

NOR = Normal control rats receiving vehicle (distilled water); DMBA = Rats serving as a negative control, receiving vehicle; TAMOX + DMBA = rats serving as a positive control, receiving tamoxifen (3.3 mg/kg BW); *A. macrophylla* + DMBA = Rats receiving the aqueous extract of *A. macrophylla* at doses of 37.5, 75 and 150 mg/kg BW. Data are represented as mean ± SD ($n = 10$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ as compared to negative control. #### $p < 0.001$ as compared to normal control

examination of the mammary gland sections revealed in-situ carcinoma in DMBA control animals as compared to the normal group that exhibited quite-normal histological sections. This result is in accordance with several studies (Russo et al. 1982; Silihe et al. 2017). Tamoxifen and *A. macrophylla* extract at the doses of 75 and 150 mg/kg protected the mammary gland against DMBA-induced histological alterations. Based on the fact that the extract of *A. Macrophylla* was administered for a long time (7 months), its impact on body weight and relative organ weight was assessed. These are indicators of toxic effects when testing substances (Michael et al. 2007), and the fact that no changes were seen at this level, suggest that the aqueous extract of *A. Macrophylla* is not toxic.

The antioxidant activity of *A. macrophylla* extract could be due to the presence of the analogues of quercetin, given that its chemopreventive properties have been linked to its antioxidant properties (Murakami et al. 2008; Gibellini et al. 2011). Antioxidant-based drug formulations are used for the prevention and treatment of complex diseases including cancer (Khalaf et al. 2008). It is worth noting that DMBA metabolites are toxic and cause oxidative stress, leading to cell structural damage and possibly cell necrosis (Patri and Padmini 2009). In this study, MDA level increased following DMBA exposure in mammary glands, while, GSH level and FRAP activity decreased. *A. macrophylla* extract significantly decreased MDA levels in mammary glands at the doses of 37.5 and 150 mg/kg and induced a significant

Table 5 Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on hematological parameters after 28 weeks of treatment

Items	Control	DMBA	TAMOX + DMBA	<i>A. macrophylla</i> (mg/kg) + DMBA		
				37.5	75	150
WBC ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	5.41 ± 0.68	6.62 ± 1.13	6.37 ± 0.98	7.48 ± 1.01	7.74 ± 0.81	8.42 ± 1.21
Lymphocytes (%)	78.18 ± 5.95	71.00 ± 1.74	66.77 ± 2.38	68.70 ± 2.25	74.18 ± 1.91	67.04 ± 1.76
Monocytes (%)	5.88 ± 1.07	7.66 ± 0.74	6.55 ± 0.55	7.44 ± 0.72	7.40 ± 0.70	8.10 ± 0.68
Granulocytes (%)	24.03 ± 0.92	21.34 ± 2.29	26.67 ± 2.32	23.86 ± 1.70	18.42 ± 1.62	24.86 ± 2.20
RBC ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	5.68 ± 0.40	5.76 ± 0.27	6.35 ± 0.15	6.28 ± 0.61	7.01 ± 0.24	7.05 ± 0.31
Hematocrit (%)	32.48 ± 2.73	32.46 ± 2.10	36.85 ± 0.74	39.26 ± 1.87	41.5 ± 1.29*	40.18 ± 1.62
MCV (fL)	57.82 ± 2.17	56.20 ± 1.02	58.10 ± 1.14	58.54 ± 0.66	59.30 ± 0.22	57.12 ± 0.78
Platelets ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	307.75 ± 13.57	320.60 ± 33.83	349.40 ± 40.13	402.60 ± 57.25	421.20 ± 31.13	383 ± 17.78
MCH (pg)	18.66 ± 0.90	18.14 ± 0.66	18.82 ± 0.46	18.32 ± 0.87	19.20 ± 0.31	18.40 ± 0.28
Hemoglobin (g/dL)	10.75 ± 0.99	10.54 ± 0.83	11.97 ± 0.32	12.73 ± 0.57	13.48 ± 0.46*	13 ± 0.54
MCHC (g/dL)	32.42 ± 1.15	32.32 ± 0.74	32.45 ± 0.31	31.38 ± 1.28	32.44 ± 0.53	32.44 ± 0.53

NOR = Normal control rats receiving vehicle (2% ethanol); DMBA = Rats serving as a negative control, receiving vehicle; TAMOX + DMBA = rats serving as a positive control, receiving tamoxifen (3.3 mg/kg BW); *A. macrophylla* + DMBA = Rats receiving the aqueous extract of *A. macrophylla* at doses of 75, 150 and 300 mg/kg BW. Data are represented as mean ± SEM ($n = 10$). * $p < 0.05$ as compared to negative control

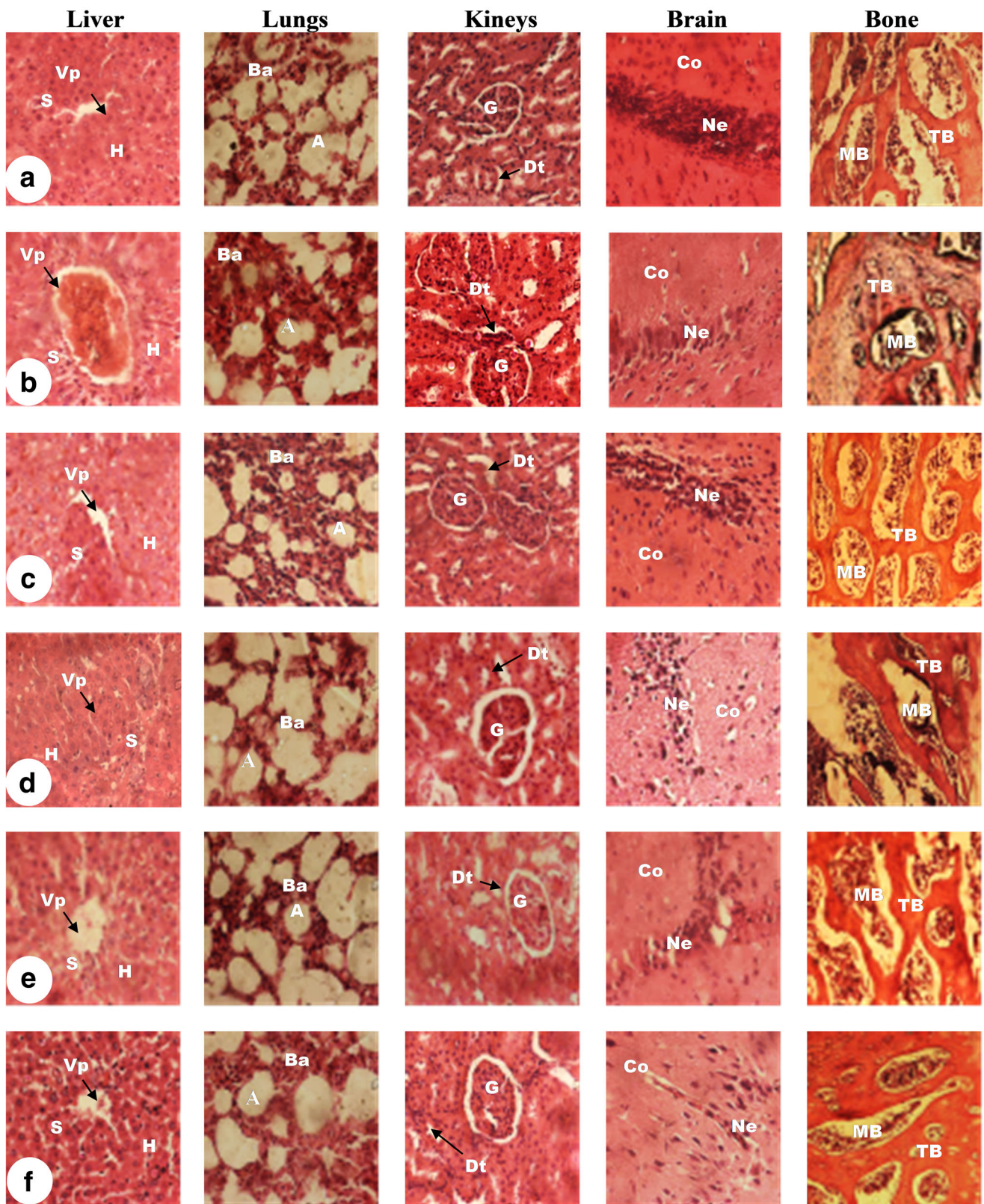


Fig. 3 Effects of *A. macrophylla* aqueous extract on microphotographs (H&E, $\times 400$) of liver, lungs, kidneys, brain and bone after 28 weeks of treatment. **a** Normal control rats receiving vehicle (distilled water); **b** Rats serving as a negative control, receiving vehicle; **c** rats serving as a positive control, receiving tamoxifen (3.3 mg/kg BW); **d**, **e** and **f** Rats receiving

the aqueous extract of *A. macrophylla* at doses of 37.5, 75, and 150 mg/kg BW mg/kg BW, respectively. Vp = portal vein; H = hepatocyte; S = sinusoids; A = alveoli; Ba = aveolar bag; G = glomerulus; Dt = distal tube; Ne = neuron; Co = cortex; TB = Trabecular bone; MB = marrow bone

increase in GSH (75 mg/kg) and FRAP (150 mg/kg). Since flavonoids are well known natural antioxidant compounds, the effects of this extract could be due to the ability of its flavonoids to reduce oxidative stress and free-radical formation. The *in vitro* study showed that the concentrations of *A. macrophylla* extract which resulted in 50% of radical scavenging (EC₅₀) were 198.7 µg/mL (DPPH) and 198.4 µg/mL (ABTS).

Conclusion

In summary, the aqueous extract of *A. macrophylla* induced cytotoxicity in a panel of cell lines with a CC₅₀ ~ 132 µg/mL in rodent breast tumor 4 T1 cells. Moreover, *A. macrophylla* extract inhibits the DMBA-induced mammary glands hyperplasia in female rats at the dose of 75 and 150 mg/kg. These antitumor effects might be attributed partly to its flavonoids and to its ability to exert both antioxidant and antiestrogenic activities. Taken altogether, these results support traditional use of the aqueous extract of *Anthonotha macrophylla* to fight against breast cancer.

Acknowledgments The authors would like to kindly thank Professor Tânia Beatriz Creczynski-Pasa (Federal University of Santa Catarina) for her collaboration. Prof. Dr. Stephane Zingue was CNPq -TWAS fellow (Grant no. 190741/2015-5). The authors would also like to thank Alexander von Humboldt Foundation for the material support offered to Dieudonné Njamen.

Author contributions TNG, ZS, MMA and DN designed the experiments. ZS, CAP and TNG performed the *in vitro* experiment. TNG, ZS and MMA performed the *in vivo* experiment. ZS, DTN, EM and MMA analyzed the data. TNG and ZS wrote the first draft and EM, DTN MMA and ND reviewed the manuscript with editing. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Data availability The data and materials used in this study are available upon request from the authors. Please contact Prof. Dr. Stephane Zingue (stephanezingue@gmail.com).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Ethics approval and consent to participate Housing of animals and all experiments were approved by the Cameroon Institutional National Ethic Committee (Ref n°. Fw-IRb00001954), which adopted all procedures recommended by the European Union on the protection of animals used for scientific purposes (CEE Council 86/609).

Consent for publication Not applicable.

References

- Ariazi JL, Haag JD, Lindstrom MJ, Gould MN (2005) Mammary glands of sexually immature rats are more susceptible than those of mature rats to the carcinogenic, lethal, and mutagenic effects of N-nitroso-N-methylurea. *Mol Carcinog* 43:155–164. <https://doi.org/10.1002/mc.20104>
- Awad AB, Down AC, Fink CS (2000) Inhibition of growth and stimulator of apoptosis by β sitosterol treatment of MDAMB-231 human breast cancer cells in culture. *Int J Mol Med* 5:541–554. <https://doi.org/10.3892/ijmm.5.5.541>
- Balogh GA, Russo IH, Russo J (2003) Mutations in mismatch repairs genes are involved in to neoplastic transformation of human breast epithelial cells. *Int J Oncol* 23:411–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.23.2.411>
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Burkill HM (1985) A review of Dalziel's. The useful plants of west tropical Africa Royal Botanical Garden Kew 3
- Cannet C (2006) Artéfacts: les difficultés de la technique histologique de la circulation à la coupe. *R FH* 19:71–84
- Clarke R (1997) Issues in experimental design and end point analysis in the study of experimental cytotoxic agents *in vivo* in breast cancer and other models. *Breast Cancer Res Treat* 46:255–278. <https://doi.org/10.1023/a:1005938428456>
- Dias MF, Sousa E, Cabrita S, Patrício J, Oliveira CF (2000) Chemoprevention of DMBA induced mammary tumors in rats by a combined regimen of alpha-Tocopherol, selenium, and ascorbic acid. *Breast J* 6:14–19. <https://doi.org/10.1046/j.15244741.2000.98071>
- Ellman GL (1959) Arch tissue sulfhydryl groups. *Biochem Biophys* 82: 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Faustino-Rocha A, Oliveira PA, Pinho-Oliveira Teixeira-Guedes C, Soares-Maia R, da Costa RG, Colaço B, Pires MJ, Colaço J, Ferreira R, Ginja M (2013) Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim* 42:217–224. <https://doi.org/10.1038/lablan.254>
- Gelboin HV (1980) Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 60(1107):1166. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.4.1107>
- Gibellini L, Pinti M, Nasi M (2011) Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-Based Complemen Altern Med*. Article ID 591356, 15 pages. <https://doi.org/10.1093/ecam/neaq053>
- Gueyo TN, Mvondo MA, Zingue S, Sipping MTK, Kenmogne LV, Ndinteh TD, Njamen D (2019) *Anthonotha macrophylla* P Beauv (Caesalpinaceae) aqueous extract exhibits antiestrogenic effects *in vitro* and *in vivo*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0032>
- Katalinić V, Milos M, Modun D, Musić I, Boban M (2004) Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem* 86:593–600. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.007>
- Kemfng Ngowa JD, Kasia JM, Yomi J, Nana NA, Ngassam A, Domkam I, Sando Z, Ndom P (2015) Breast Cancer survival in Cameroon: analysis of a cohort of 404 patients at the Yaoundé general hospital. *Adv Breast Cancer Res* 4:44–52. <https://doi.org/10.4236/abcr.2015.42005>
- Khalaf NA, Shakya AK, Al-Othman A, El-Agbar Z, Farah H (2008) Antioxidant activity of some common plants. *Turk J Biol* 32:51–55
- Lazzeroni M, DeCensi A (2013) Breast cancer prevention by antihormones and other drugs. Where do we stand? *Hematol Oncol Clin North Am* 27:657–672. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.05.009>
- Leung HY, Yung LH, Poon CH, Shi G, Lu AL, Leung LK (2009) Genistein protects against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced oxidative DNA damage in non-cancerous breast cells MCF-10A. *Br J Nutr* 101:257–262. <https://doi.org/10.1017/S0007114508998457>

- Li JH, Awad AB, Fink CS, Wu YW, Trevisan M, Muti P (2001) Measurement variability of plasma beta -sitosterol and campesterol, two new biomarkers for cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 10: 245–249. <https://doi.org/10.1097/00008469-200106000-00007>
- Maltoni C, Minardi F, Pinto C, Belpoggi F, Bua L (1997) Results of three life-span experimental carcinogenicity and Anticarcinogenicity studies on Tamoxifen in rats. *Ann N Y Acad Sci* 837:469–512. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb56895.x>
- Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Roome N, Johnson JK, Schafer K (2007) Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicol Pathol* 35:742–750. <https://doi.org/10.1080/01926230701595292>
- Mohamed MS, Alshaimaa MSE (2016) Studies on the biochemical and molecular effects of some natural herbs on experimental-induced breast cancer in Wistar rats. *Int J Physiol Pharm Pharm* 6:349–358. <https://doi.org/10.5455/njppp.2016.6.200220160428002>
- Murakami A, Ashida H, Terao J (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 269:315–325. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.046>
- O'Brien J, Wilson O, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267:5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- Patri M, Padmini P (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their neurotoxic potency in association with oxidative stress: a brief perspective. *Ann Neurosci* 16:340–349. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.2009.160109>
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Russo IH, Russo J (1996) Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ. Health Perspect* 104:938–967. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104938>
- Russo J, Russo IH (2000) Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 5:187–200. <https://doi.org/10.1023/a:1026443305758>
- Russo J, Tay LK, Russo IH (1982) Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2:5–73. <https://doi.org/10.1007/BF01805718>
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2018) Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68:7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Silihe KK, Zingue S, Winter E, Awounfack CF, Bishayee A, Nishil ND, Leônidas MJ, Thomas M, Nzufu FT, Ndinteh DT, Riwoom SH, Njamen D, Creczynski-Pasa TB (2017) *Ficus umbellata* vahl (moraceae) stem bark extracts exert antitumor activities in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci* 18:article no 1073. <https://doi.org/10.3390/ijms18061073>
- Ugoeze KC, Ehianeta T, Alaribe C, Anyakora C (2014) Analysis and identification of oils from seed extract of *Anthothona macrophylla* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). *Afr J Biotechnol* 13:2260–2264. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13192>
- Wilbur KM, Bemheim F, Shapiro OW (1949) Determination of lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 24:305–310. <https://doi.org/10.1038/2001098a0>
- World Health Organization (WHO) (2014) Cancer profiles of countries. <https://www.who.int/cancer/country-profiles/en/>. Accessed 20 Jun 2019
- Wu X (2012) Effect of catalpol on doxorubicin-induced cytotoxicity in H9c2 cells. *J Med Plant Res* 6:849–854. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1493>
- Zingue S, Cisolotto J, Tueche AB, Bishayee A, Mefegue FA, Sandjo LP, Magne Nde CB, Winter E, Michel T, Ndinteh DT, Awounfack CF, Silehe KK, Melachio Tanekou TT, Creczynski-Pasa TB, Njamen D (2016) *Crateva adansonii* DC, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity in vitro and prevents experimental mammary tumorigenesis *in vivo*. *J Ethnopharmacol* 190:183–199. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.004>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.