

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE EN SCIENCES DE
LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

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

DOCTORATE TRAINING OF LIFE
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE NUTRITION ET DE BIOCHIMIE NUTRITIONNELLE
LABORATORY OF NUTRITION AND NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY

Propriétés anticancéreuses des graines d'*Aframomum angustifolium* (Zingibéracée) dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

Thèse

Rédigée comme requis partiel en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat *Ph.D*
en Biochimie

Option : Science des Aliments et Nutrition

Par :

MAKAMWE Inelle

17U4031

Master-ès Sciences



Sous la Codirection de :

KENGNE NOUEMSI Anne Pascale
Maitre de Conférences
Université de Yaoundé I

OBEN Julius ENYONG
Professeur
Université de Yaoundé I

Année : 2025

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

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

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

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

POST-GRADUATE AND TRAINING
UNIT OF LIFE SCIENCES-HEALTH

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE LA THESE DE DOCTORAT PH. D
CERTIFICATE OF CORRECTION OF THE PH. D THESIS

Nous, soussignés, membres du jury de la thèse de Ph. D en Biochimie intitulée : « Propriétés anticancéreuses des graines d'*Aframomum angustifolium* (Zingibéracées) dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer » soutenue le Mardi 18 Février 2025 à 10 h dans la salle Multimédia de la Faculté des Sciences par Madame MAKAMWE Inelle, Matricule 17U4031, certifions par la présente que la candidate a effectué les corrections de la thèse susmentionnée telles que demandées par les examinateurs.

Nous sommes satisfaits des corrections apportées et recommandons que le doctorat/Ph/D soit décerné au candidat.

Yaoundé, le 16/06/2025

Superviseurs

Examineurs

Président du Jury

Chef de département

KENGNE NOUEMSI Anne P.

NJAYOU Frédéric Nico

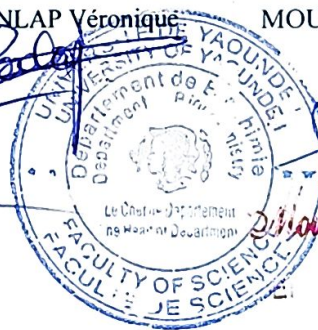
PENLAP Véronique

MOUNDIPA FEWOU Paul

OBEN Julius ENYONG

AGBOR Gabriel AGBOR

PIEME Constant Anatole



Moundipa Fewou Paul
Professeur
Toxicologie - Toxicologie

PIEME Constant Anatole
Professeur de Biochimie
FMSB UYI

LISTE PROTOCOLAIRE

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 2024/2025

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 09 JANVIER 2025

ADMINISTRATION

DOYEN : OWONO OWONO Luc Calvin, *Professeur*

VICE-DOYEN / DPSAA: NDJIGUI Paul-Désiré, *Professeur*

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

VICE-DOYEN / DRC : NOUNDJEU Pierre, *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 Sclolarité DAARS :
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (44)

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.	AKINDEH MBUH NJI	Maître de Conférences	En poste
11.	ATOCHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

12.	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
13.	BEBEE Fadimatou	Maître de Conférences	En poste
14.	BEBOY EDJENGUELE Sara N.	Maître de Conférences	En poste
15.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
16.	DAKOLE DABOY Charles	Maître de Conférences	En poste
17.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Maître de Conférences	En poste
18.	DJUIDJE NGOUNOU Marceline	Maître de Conférences	En poste
19.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
20.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
21.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
22.	FONKOUA Martin	Maître de Conférences	En poste
23.	KENGNE NOUEMSI Anne Pascale	Maître de Conférences	En poste
24.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
25.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
26.	MANANGA Marlyse Joséphine	Maître de Conférences	En poste
27.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
28.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
29.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
30.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
31.	Palmer MASUMBE NETONGO	Maître de Conférences	En poste
32.	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Maître de Conférences	En poste
33.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
34.	FOUPOUPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
35.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
36.	MBOUCHE FANMOE Marceline J.	Chargé de Cours	En poste
37.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
38.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste
39.	BAKWU BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
40.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
41.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
42.	MADIESSE KEMGNE Eugénie Aimée	Assistant	En Poste
43.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
44.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (50)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
4.	DZEUFET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
5.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
6.	KEKEUNOU Sévior	Professeur	<i>Chef de Département</i>
7.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
8.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
10.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
11.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
12.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
13.	ATSAMO Albert Donatien	Maître de Conférences	En poste
14.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

15.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
17.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Maître de Conférences	En poste
19.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
23.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
24.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
25.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
26.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	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.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	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 YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	FOSSI TANKOUA Olivia Epse DJEUTCHOUANG SAYANG	Chargé de Cours	En poste (transfert Uté de Dla)
37.	GONWOUE NONO Legrand	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 NSANGOU Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOU MO	Chargé de Cours	En poste
42.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
43.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
44.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
45.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
46.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
48.	KODJOM WANHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
49.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
50.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)

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.	NDONGO BEKOLO	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

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	DAAC /UDla
12.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
13.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	CT / MINRESI
14.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste
17.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargé de Cours	En poste
19.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20.	MANGA NDJAGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
21.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
22.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
23.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	En détachement/UNESCO MALI
24.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
25.	KABELONG BANAHO Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
26.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
27.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
28.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
29.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
30.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
31.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
32.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (27)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	Ministre Chargé de Mission PR
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	Vice Chancellor/UB
6.	NJOMOU C. épse DJANGANG	Professeur	En poste
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste
8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUNBI 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	Chef de Département
15.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	Sénatrice/SENAT

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

16.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
17.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
18.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
19.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
20.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
21.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste
22.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
23.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
24.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
25.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
26.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
27.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

6- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (33)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>DEPE/Univ. Bertoua</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>Recteur UBertoua/ Chef de Département</i>
5.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
6.	MKOUNGA Pierre	Professeur	En poste
1.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
2.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
3.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
4.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
5.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
6.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
7.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
8.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
9.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>Dir ENS/Uté Bertoua</i>
10.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
11.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
12.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
13.	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Maître de Conférences	En poste
14.	ZONDEGOUNBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
15.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
16.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Chargé de Cours	En poste
17.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
18.	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
19.	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
20.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
21.	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
22.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
23.	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste

24.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
25.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
26.	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste
27.	NGUEMDJO CHIMEZE Valery Wilfried	Assistant	En poste

6- DEPARTEMENT DES ENERGIES RENOUVELABLES (ER) (1)

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

1.	BODO Bertrand	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division des SI/ MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général Académique/ MINESUP</i>
3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste
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.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Chargé de Cours	En poste
11.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
12.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
13.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
14.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
15.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
16.	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
17.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
18.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur Adjoint ENSET Ebolowa</i>
19.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
20.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
21.	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	<i>Directeur CUTI</i>
22.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (34)

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	<i>Chef de Division/ENSPY</i>
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	<i>Chef de Département de modélisation et applications</i>

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

			<i>industrielles/ENSPY</i>
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>VDRC/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.	TCHOUNDA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
10	AGHOUEKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12	BITYE MVONDO Esther Claudine	Chargé de Cours	En poste
13	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14	DJIADU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
15	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	KOKOMO AYISSI Eric Brice	Chargé de Cours	En poste(transfert de l'université de Douala)
18	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
19	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
20	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
21	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
22	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
23	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
24	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
25	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
26	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
27	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Chargé de Cours	En poste
28	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
29	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste
30	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
31	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
32	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
33	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
34	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste

9- 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.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Professeur	En poste
4.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6.	KOITCHOU MABEKE Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	MUNE MUNE Martin Alain	Maître de Conférences	En poste
8.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
10	TCHIKOUA Roger	Maître de Conférences	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

11.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
13.	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
14.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste
15.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
16.	NKOUÉ TONG Abraham	Chargé de Cours	En poste
17.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
18.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Chargé de Cours	En poste
19.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste
20.	EZO'O MENGOU Fabrice Télésfor	Assistant	En poste
21.	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23.	NGOUENAM Romial Joël	Assistant	En poste
24.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

10. DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PHY) (42)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	BIYA MOTTO Frédéric	Professeur	DG/HYDRO Mekin
3.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
4.	EKOBENA FOUDA Henri Paul	Professeur	Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré
5.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
6.	EYEBE FOUDA Jean sire	Professeur	En poste
7.	HONA Jacques	Professeur	En poste
8.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
9.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
10.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
11.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
12.	SAIDOU	Professeur	Chef de centre/IRGM/MINRESI
13.	SIMO Elie	Professeur	En poste
14.	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FSUniv/Bda
15.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
16.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
17.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
18.	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	Chef de Division de la formation continue et à distance/ENSPY
19.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
20.	FOUEJIO David	Maître de Conférences	Chef Cell/ MINADER
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.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

28	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	Directeur/ENS/UYI
29	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférences	En stage depuis février 2023
30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
33	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
34	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
35	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
36	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
37	NGA ONGODO Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
38	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	Directeur Unité de production des réactifs/IMPM
39	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
40	TOGUEU MOTCHEYO Alain Bertrand	Chargé de Cours	En poste
41	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

11- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (34)

1.	EKOMANE Emile	Professeur	Chef Div./Uté Ebolowa
2.	GANNO Sylvestre	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	Vice-Doyen /DPSAA
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	Chef de Département/Uté. Eb.
7.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	Chef Div. /MINTP
8.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	Chef de Département
9.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
10.	EYONG John TAKEM	Maître de Conférences	En poste
11.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	Sec. D'Etat/MINMIDT(ai)
12.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste
13.	MBESSE Cécile Olive	Maitre de Conférences	En poste
14.	METANG Victor	Maître de Conférences	En poste
15.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
17.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître de Conférences	Chef. Cell /MINRESI
19.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

20.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
21.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	DG/ART

22.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
23.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
24.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
25.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
26.	NGO'O ZE ARNAUD	Chargé de Cours	En poste
27.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
28.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
29.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
30.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
31.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
32.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
33.	KOAH NA LEBOGO Serge P.	Assistant	En poste
34.	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	08 (01)	25 (15)	05 (01)	06 (04)	44 (20)
BPA	11 (01)	19 (09)	16 (05)	03 (01)	49 (16)
BPV	06 (01)	10 (02)	14 (07)	02 (00)	32 (10)
CI	07 (01)	14 (03)	05 (01)	01 (00)	27 (05)
CO	06 (01)	14 (05)	11 (03)	02 (00)	33 (09)
ER	01 (00)		/	/	01 (0)
IN	02 (00)	02 (00)	15 (01)	03 (00)	22 (01)
MAT	01 (00)	08 (00)	20 (01)	05 (01)	34 (02)
MIB	03 (01)	07 (03)	09 (05)	05 (02)	24 (11)
PHY	17 (01)	12 (04)	12 (01)	01 (00)	42 (06)
ST	07 (00)	14 (03)	11 (03)	02 (01)	34 (07)
Total	69 (07)	122 (42)	121 (30)	30 (09)	342 (88)

Soit un total de

342 (88) dont :

- Professeurs **69 (07)**
- Maîtres de Conférences **126 (43)**
- Chargés de Cours **117 (28)**
- Assistants **30 (09)**

() = Nombre de Femmes

88

DEDICACE

A

MES PARENTS :

DJEUGUE

et

MAKAM Christine Mélanie

REMERCIEMENTS

Je ne saurai m'attribuer entièrement le mérite de ce travail dont la réalisation n'aurait été possible sans l'aide de plusieurs personnes à qui je témoigne mes sincères remerciements. Ces remerciements vont particulièrement à l'endroit de :

Pr OBEN Julius ENYONG, mon Directeur de Thèse et Chef du Laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle (LNNB) qui a accepté d'encadrer ce travail, a su mettre à ma disposition le nécessaire pour que mes travaux ne soient confrontés à aucune difficulté. A vous je témoigne toute ma gratitude ;

Pr KENGNE NOUEMSI Anne Pascale, la Codirectrice de cette Thèse à qui je dois mon enrôlement en cycle Doctorat. Vous avez cru en moi en m'offrant cette opportunité. Je vous témoigne toute ma reconnaissance ;

L'équipe d'encadrement du LNNB et particulièrement Pr MBONG ANGIE Mary-Ann, et Pr NTENTIE Françoise Raïssa qui ont suivi de près les différentes étapes de ce travail. Grandement merci !

Pr NZINGUE Stéphane et à travers lui l'Unité de Recherche Fondamentale et Clinique sur le Cancer du Département de Biologie et Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I pour mon initiation dans ce domaine de recherche et l'accompagnement technique ;

La Fondation J&A Oben pour son appui financier ;

Le Laboratoire Substances Naturelles d'Intérêt Thérapeutique et de Synthèse Organique de l'Ecole Normale Supérieure de l'UYI pour l'appui dans l'identification des composé bioactifs de l'extrait ;

Le Laboratoire d'Immunologie de la *Yale University School of Medecine* pour l'appui dans la réalisation des tests sur culture cellulaire ;

Le Laboratoire d'Histopathologie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales pour la réalisation des coupes histologiques ;

L'hôpital central de Yaoundé pour La réalisation des tests hématologiques ;

Le Chef de Département de Biochimie et à travers lui, à tous les enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour leurs enseignements ;

Au jury qui a pris de son temps pour évaluer ce travail et y apporter des critiques constructives, contribuant à l'amélioration de sa qualité scientifique

Mes frères et Sœurs, beaux-frères et belles-sœurs SIKADI Chamberline, NTAMBA Louis, TAKOU Arnaud, MADJOUE Gladys, TATSINKOU Dany, FOTSE Henri, TSOPMENE Arnaud, NGUELA Carine, NGOUNOU Phalone et MAKUCHOU Liliane pour votre entière confiance en la petite dernière que je suis, et pour votre soutien tant financier que moral ;

Maman SIKADI Odette pour tout l'amour et le soutien multiforme que tu m'as toujours apporté ;

Les familles KOLLA et KAKABI pour vos encouragements et pour cette chaleur familiale que vous m'avez offert depuis mon arrivée dans cette ville ;

Mes aînés de Laboratoire et promotionnaires pour votre accompagnement tant technique que moral ;

Mes amis, plus particulièrement MOGUEU Jennifer, MAÏDADI Martin, DONGMO Baudouin, LONTSI Elodie, LOWE Danielle, TIENOUE Huiny, MEKOUIN Léonelle, GUEABO'O Melaine, MESSA Saurelle, FOTIO Christelle, KOUAM Leroy, Drs SADEU et NJAPNDOUNKE vous avez constitué un véritable *fans club*, en boostant ma capacité de résilience et ma confiance en soi.

A tous ceux qui n'ont pas été nommément mentionnés, veuillez accepter mes sincères excuses et remerciements car votre contribution n'en demeure pas moins importante.

TABLE DES MATIERES

LISTE PROTOCOLAIRE	i
DEDICACE.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
TABLE DES MATIERES	xiv
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES.....	xviii
LISTE DES FIGURES.....	xxii
LISTE DES TABLEAUX	xxv
RESUME.....	xxvi
ABSTRACT	xxvii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
I.1 Généralités sur le cancer	4
I.1.1 Définition	4
I.1.2 Caractéristiques des cellules cancéreuses	4
I.1.2.1 Echappement aux facteurs suppresseurs de croissance et prolifération chronique	4
I.1.2.2 Perte de contrôle du cycle de croissance cellulaire	5
I.1.2.3 Résistance à la mort cellulaire.....	6
I.1.2.4 Instabilité génomique : réplication illimitée.....	10
I.1.2.5 Echappement au système immunitaire et inflammation	11
I.1.2.6 Induction de l'angiogenèse.....	12
I.1.2.7 Reprogrammation du métabolisme énergétique.....	13
I.1.2.8 Activation de l'invasion et des métastases	14
I.1.3 Etapes de développement du cancer	15
I.1.4 Prévalences	16
I.2 Le cancer du sein	17
I.2.1 Anatomie du sein et de la glande mammaire	17
I.2.1.1 Composition tissulaire du sein	18

I.2.1.2 Mammogenèse	19
I.2.2 Facteurs de risque du cancer du sein.....	20
I.2.2.1 Facteurs de risques liés à la reproduction et aux hormones stéroïdiennes	20
I.2.2.2 Facteurs de risque génétiques et antécédents familiaux.....	21
I.2.2.3 Facteurs de risques liés à l'alimentation et au mode de vie	21
I.2.3 Physiopathologie du cancer du sein.....	23
I.2.3.1 Modifications structurales associées à la physiopathologie du cancer du sein.	23
I.2.3.2 Altérations moléculaires dans le cancer du sein.....	24
I.2.4 Diagnostic du cancer du sein et classification des tumeurs mammaires.....	29
I.2.4.1 Manifestations cliniques.....	29
I.2.4.2 Examens d'imagerie médicale	30
I.2.4.3 Analyse histopathologique et diagnostic moléculaire	31
I.2.4.4 Typologie des tumeurs mammaires.....	32
I.3 Modèles expérimentaux d'étude du cancer du	35
I.3.1 Modèles cellulaires	35
I.3.2 Modèles animaux	36
I.3.2.1 Modèle transgénique	36
I.3.2.2 Modèles transplantés	37
I.3.2.3 Modèles chimiques.....	37
I.4 Prise en charge du cancer du sein	39
I.4.1 Stratégie de prise en charge du cancer de sein précoce.....	39
I.4.2 Stratégie de prise en charge des cancers avancés du sein	40
I.5 Généralités sur le tamoxifène	44
I.5.1 Pharmacocinétique du tamoxifène	45
I.5.1.1 Administration et absorption.....	45
I.5.1.2 Distribution.....	45
I.5.1.3 Métabolisme du tamoxifène	45
I.5.1.4 Excrétion	46
I.5.2 Mécanisme d'action antitumorale du tamoxifène	46

1.5.3 Effet indésirables associés à la prise du tamoxifène	47
1.5.3.1 Induction du cancer de l'endomètre	47
1.5.3.2 Hépto-toxicité et Néphro-toxicité du tamoxifène.....	47
1.6 Traitement alternatif et complémentaire dans la prise en charge du cancer du sein : la phytothérapie.....	48
1.6.1 Mécanismes d'action des composés bioactifs dans la lutte antitumorale	48
1.6.2 phytothérapie et prise en charge complémentaire du cancer du sein.....	49
1.7 Généralités sur la plante d'intérêt : <i>Aframomum angustifolium</i>	50
1.7.1 Classification botanique d' <i>A. angustifolium</i>	50
1.7.2 Description botanique d' <i>A. angustifolium</i>	51
1.7.3 Utilisations traditionnelles d' <i>Aframomum angustifolium</i>	51
1.7.4 Synthèse des travaux antérieurs effectués sur <i>Aframomum angustifolium</i>	52
1.7.4.1 Valeur nutritive d' <i>A. angustifolium</i>	53
1.7.4.2 Criblage phytochimique et toxicité	53
1.5.4.3 Propriétés pharmacologiques d' <i>A. angustifolium</i>	53
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	54
II.1 Matériel	54
II.1.1 Matériel végétal	54
II.1.2 Matériel animal.....	54
II.1.2.1 Lignées cellulaires	54
II.1.2.2 Animaux expérimentaux.....	55
II.1.3 Appareils, instruments et consommables	55
II.2 Méthodes	56
II.2.1 Caractérisation phytochimique et détermination des voies d'action antiprolifératives de l'extrait éthanolique de graines d' <i>Aframomum angustifolium</i>	56
II.2.1.1 Détermination de la teneur en composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A. angustifolium</i>	56
II.2.1.2.1 Mesure du potentiel anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A. angustifolium</i>	60

II.2.1.3 Détermination des potentielles voies d'action antiprolifératives de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A. angustifolium</i>	64
II.2.2 Exploration du potentiel antiprolifératif, des activités antitumorales et immunomodulatrice de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A angustifolium</i> chez des modèles expérimentaux de cancer du sein	74
II.2.2.1 Détermination du potentiel antiprolifératif de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A angustifolium</i> sur la lignée cancéreuse MCF-7	Erreur ! Signet non défini.
II.2.2.2 Evaluation des activités antitumorale et immunomodulatrice de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A angustifolium</i> chez un modèle animal de cancer du sein induit au DMBA	Erreur ! Signet non défini.
II.2.3 Exploration de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A angustifolium</i> contre les effets toxiques associés à l'administration du tamoxifène à des rats Wistar souffrant de cancer du sein	83
II.2.3.2 Evaluation de l'effet de l'extrait sur le développement d'une hyperplasie utérine induite par le tamoxifène	84
II.2.3.3 Evaluation de l'effet du traitement sur le statut métabolique	84
II.2.3.4. Evaluation de l'effet du traitement sur l'intégrité du foie et des reins.....	86
II.2.4 Traitement des données et analyse statistique	92
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	93
Partie I : Composition phytochimique, potentiel antioxydant et voies d'action antiproliférative de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A angustifolium</i>	93
Partie II : Activités antiproliférative, antitumorale et immuno-modulatrice de l'extrait éthanolique des graines d' <i>A angustifolium</i>	112
Partie III : Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d' <i>A angustifolium</i> contre quelques effets indésirables associés à la prise du tamoxifène chez un modèle animal de cancer du sein	128
CONCLUSION.....	144
PERSPECTIVES.....	145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	146
ANNEXE	a

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

AAANE : Acides Aminés Non Essentiels
ADN: Acide désoxyribonucléique
AKT : Protéine Kinase B
ALAT: Alanine Aminotransférase
APAF1: Apoptotic Protease Activating Factor 1
ARN: Acide ribonucléique
ASAT: Aspartate aminotransférase
ATM: ataxia telangiectasia mutated
ATP: Adenosine Triphosphate
ATR: AMT and Rad3-related
Bcl-2/3/6: B-cell Lymphoma 2/3/6
bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor
BRCA 1/2: Breast Cancer 1/2
CAT: Capacité Antioxydante Totale
CDK4/6: Cyclin dependant Kinase 4/6
CI50: Concentration Inhibitrice 50
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX-2 : Cyclooxygénase 2
CSC : Cellules Souches Cancéreuse
CT: Cholestérol Total
CYP2D6 / CYP3A: Cytochrome P450 D6/3A
CYP450: Cytochrome P 450
DDB: Double Strand DNA
DISC: Death-inducing signaling complex
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
DMBA 7,12-diméthylbenz(a)anthracène
DMSO: Diméthyl sulfoxyde
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil
DR3: Death receptor 3

DRP-1: Dynamin-Related Protein 1

E2F1/2: Eucaryote transcriptional Factor 1/2

EDTA: Ethylen-Diamanie Tetraacetic Acid

EEAa: Extrait Ethanolique de grains d'Aframomum angustifolium

EGF: epidermal growth factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMEM: Eagle Minimal Essential Medium

eNOS : endothelial Nitric Oxide synthase

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FADD: Fas-associated death domain

FasL: Fas ligand

FasR: Fas Receptor

FSH: Follicle-Stimulating Hormone

GLUT 1: Glucose Transporter 1

GnRH: Gonadotrophin Releasing Hormone

GOD: glucose-oxydase

GPX4: glutathion peroxydase 4

GSH: glutathion réduit

H&E : Hématoxyline et Eosine

HAPs: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HEPES: acide 4(2-Hydroxyéthyl)-1-Pyperazine Ethane Sulfonique

HER-2: Human Epidermal growth factor Receptor

HIF: Hypoxia-Inducible Transcription Factor

HNC; Herbier National du Cameroun

HRE: Hypoxia Response Element

IFNR; Interferon receptor

IGF 1/2: Insulin6liked Growth Factor 1/2

IGFBP 2: Insulin-linked Growth Factor binding protein 2

IL-10, IL-8 IL-1 β , IL-6 : Interleukine 10, Interleukine 8 Interleukine 6, Interleukine1 β

ILK : Integrin-Linked Kinase

INCa: Insitut National du Cancer

INF γ : Interféron gamma

LDL: *Lower Density Lipoproteins*

LH: *luteinizing hormone*

LT: Lymphocytes T

MAPK: *Mitogen Activating Protein Kinase*

MAT: Macrophages Associés à la Tumeur

MCF-7: *Michigan Cancer Foundation 7*

MLKL: *Mix Lineage Kinase Liked-domain*

MMP: *Matrice metaloprotease*

MNT: Maladies Non transmissibles

mtNOS: *mitochondrial Nitric Oxide synthase*

mTOR: *Mammalian Target Of Rapamicyn*

MTT: 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide

NED: Naphtlyéthylene diamine

NF κ B: *Nuclear Factor Kappa-B*

NO; *Nitric Oxide*

PAL: Phosphatase Alcaline

Pc: Poids corporel

PC: Point de Coupure

PD-1 : *Program Death receptor 1*

PDGF: *platelets-derived Growth Factor*

PD-L1: *Program Death Ligand 1*

PGE2: Prostaglandine E2

PGAM-5 : *Phosphatase PhosphoGlycerate Mutase 5*

PI3K: Phosphatidylinositol 3 Kinase

PKA/C: protéine kinase A/C

PMLKL: *Phosphorylated Mix Lineage Kinase Liked-domain*

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

PVDF: Polyvinylidene Difluoride

Rb: *Retinoblastoma protein*

RE: Récepteurs Ostrogéniques

RIPKI/3: Receptor Interactinf Protein Kinase 1/3

RP: Récepteurs à Progestérones

RSL 3: Ras Selective Lethal molecule

R-Smads : Receptor-regulated Smads

RT-PCR; Reverse Transcript Polymerase Chain Reaction

SDF-1: Stromal Cell-Derived Factor-1

SFB : Sérum Fœtal de Bovin

SSDNA: Simple Strand DNA

STAT 3/5: Signal Transducer and Activator of Transcription 3/5

TAM: Tamoxifène

TBARS: Thiobarbityric reactive substances

TBS: Tris Buffer Saline

TCR: T-cell receptors

TEM: Transition Epithélial-Mésenchymateuse

TG: Triglycérides

TGF- α/β : Transforming Growth Factor Alpha/ Beta

TLR: Toll-Liked receptor

TNFR1: Tumour necrosis factor Receptor 1

TNF- α : Tumour necrosis factor alpha

TNM: tumour-Node-Metastasis

TRADD: TNFR1-associated death domain

uPA: urokinase plasminogen activator

VGEF: Vascular Endothélial Growth Factor

VHL: Von Hippel-Lindau

YUMM1.7: Yale University Mouse Melanoma 1.7

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Voies de signalisation proliférative des récepteurs à tyrosine kinase.....	5
Figure 2: Phases du cycle cellulaire	6
Figure 3: Voies d'induction de l'apoptose	7
Figure 4: Mécanisme de nécroptose.....	9
Figure 5: Mécanisme moléculaire de la ferroptose	10
Figure 6: Mécanisme d'échappement au système immunitaire	12
Figure 7: Etapes de l'angiogenèse.....	13
Figure 8: Reprogrammation du métabolisme énergétique chez la cellule cancéreuse et détournement des métabolites intermédiaires	14
Figure 9: Etapes de formation des métastases.....	15
Figure 10: Etapes de la cancérogenèse.....	16
Figure 11: Anatomie du sein et de la glande mammaire.....	19
Figure 12: Métabolisme oxydatif de l'estradiol	21
Figure 13: Modifications structurales au cours de la cancérogenèse mammaire Etapes d'évolution du cancer du sein	24
Figure 14: Altération moléculaires dans le cancer du sein du signal dans le cancer du sein	29
Figure 15: Classification histologique des tumeurs du sein.....	33
Figure 16: Classification moléculaire du cancer du sein.....	34
Figure 17 : Métabolisme du DMBA (A) et induction de la tumorigenèse mammaire (B)	38
Figure 18: Mécanismes d'action des médicaments de chimiothérapie	40
Figure 19: Stratégies thérapeutiques en thérapie ciblée	42
Figure 20: Mécanismes d'action des modulateurs de l'immunité.....	43
Figure 21: Mécanisme d'action des médicaments utilisés en hormonothérapie.....	44
Figure 22: Métabolisme du tamoxifène	46
Figure 23: Inhibition de la progression tumorale par les composés bioactifs de plantes.....	48
Figure 24: Mécanisme d'action antiproliférative des composés bioactifs adapté.....	49
Figure 25: Photographie d'un plant (A), des fruits (B) et des graines (C) d' <i>A angustifolium</i>	

Figure 26: Schéma de principe d'ELISA multiplex	78
Figure 27: Chromatogrammes de l'EEAa en mode ESI positif	94
Figure 28: Piégeage du radical DPPH par l'EEAa à différentes concentrations	96
Figure 29: Piégeage du radical ABTS ⁺ par l'EEAa à différentes concentrations	96
Figure 30 : Piégeage du radical NO par l'EEAa à différentes concentrations	97
Figure 31: Réduction du Fe ³⁺ par l'EEAa à différentes concentrations	97
Figure 32: Capacité antioxydante totale de l'EEAa à différentes concentrations	98
Figure 33: Effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires CT-2A, B16-F1, GL261 et YUMM 1.7 après 24H d'exposition	99
Figure 34: Effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires CT-2A, B16-F1, GL261 et YUMM 1.7 après 48H d'exposition	100
Figure 35: Effet de l'EEAa sur la peroxydation lipidique induite par el RSL-3 chez les cellules YUMM 1.7	101
Figure 36: Effet stimulateur de la caspase-3 active par l'EEAa chez les cellules YUMM1.7.....	102
Figure 37: Effet inhibiteur de pMLKL (b) par l'EEAa chez les cellules YUMM1.7	103
Figure 38: Effet inhibiteur de l'EEAa sur les contrôleurs du cycle cellulaire chez les cellules YUMM 1.7	104
Figure 39: Effet modulateur de l'EEAa sur l'expression des cytokines chez les cellules YUMM 1.7.....	105
Figure 40: Répression des facteurs de croissance relatifs à l'angiogenèse PDGFR, VEGF et IGF-1 par l'EEAa chez les cellules YUMM 1.7	106
Figure 41: Effet de l'EEAa sur la prolifération des cellules MCF-7 à différents temps et à différentes concentrations	113
Figure 42: Effet inhibiteur de l'EEAa sur le taux sérique d'EGF	115
Figure 43 : Effet inhibiteur de l'EEAa sur le taux d'estradiol sérique.....	116
Figure 44 : Effet de l'EEAa sur le taux de glucose mammaire.....	117
Figure 45: Effet de l'EEAa, du poumon, du foie et des reins	118
Figure 46: Effet de l'EEAa sur les taux sériques de TNF- α	120
Figure 47: Effet de l'EEAa sur les taux sériques d'INF- γ	121

Figure 9: Effet de l'EEAa sur les taux plasmatiques et mammaires de NO**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 49: Effet de l'EEAa sur la microarchitecture de la rate (H&E $\times$ 100) et du thymus (H&E $\times$ 40) 122

Figure 50: Effet de l'EEAa sur le taux d'estradiol sérique chez les rats traités au TAM 128

Figure 51: Effet de l'EEAa sur la microarchitecture de l'endomètre utérin chez les rats traités au TAM 129

Figure 52: Effet de l'EEAa sur l'épaisseur de l'épithélium de l'endomètre utérin chez les rats traités au TAM 129

Figure 53: Effet de l'EEAa sur la variation du poids des rats traités au TAM 130

Figure 54 : Effet de l'EEAa sur la cholestérolémie et la triglycéridémie des rats traité au TAM 131

Figure 55: Effet de l'EEAa sur l'activité plasmatique des transaminases chez les rats traités au TAM 132

Figure 56: Effet de l'EEAa sur l'activité plasmatique de la phosphatase alcaline chez les rats traités au TAM 133

Figure 57: Effet de l'EEAa sur le taux plasmatique d'acide urique chez les rats traités au TAM 134

Figure 58: Effet de l'EEAa sur le taux plasmatique de créatinine chez les rats traités au TAM . 135

Figure 59: Effet de l'EEAa sur les microarchitectures du foie et des reins à l'histologie H&E ($\times$ 200) 136

Figure 60: Effet de l'EEAa sur l'activité érythrocytaire, hépatique et rénale de la catalase chez les rats traités au TAM 137

Figure 61: Effet de l'EEAa sur le taux plasmatique, hépatique et rénal des TBARS chez les rats traités au TAM 138

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Classification TNM des tumeurs mammaires	35
Tableau II: Lignées cellulaires de cancer du sein et leurs caractéristiques	36
Tableau III: Classification botanique d'A. angustifolium.....	50
Tableau IV: Utilisation ethnopharmacologique d'A. angustifolium.....	52
Tableau V Teneur de l'EEAa en quelques composés phytochimiques.....	93
Tableau VI: Caractéristiques spectrales de quelques composés identifiés dans l'EEAa	95
Tableau VII: CI ₅₀ de l'EEAa vis à vis des différentes lignées cellulaires après 24H et 48H d'exposition.....	100
Tableau VIII: CI ₅₀ de l'EEAa vis-à-vis des cellules MCF-7 aux différents temps	113
Tableau IX: Effet régressif de l'EEAa sur les paramètres tumoraux	114
Tableau X: Effet de l'EEAa sur l'histologie de la glande mammaire	118
Tableau XI: Effet de l'EEAa sur les paramètres hématologiques	119

RESUME

Plus du quart des cancers diagnostiqués au Cameroun depuis 2015 sont des cancers mammaires et environ 16% des patients décèdent peu après le début de leur prise en charge. Environ 70% des tumeurs surexpriment les récepteurs ostrogéniques, nécessitant en première ligne une hormonothérapie comme le tamoxifène (TAM). Du fait de son utilisation à long terme, il présente un risque d'effets indésirables non favorables à l'amélioration de l'état de santé des patients. Face à cela, les patients ont recours aux thérapies alternatives et complémentaires telle que la phytothérapie dont les études scientifiques témoignent de son efficacité. L'une des familles botaniques les plus explorées est celle des zingibéracées du fait de leur vaste répartition géographique et leur efficacité. *Aframomum angustifolium* est une plante de cette famille, riche en métabolites secondaires, doués d'activités biologiques exploitables en oncologie. La présente étude a ainsi été envisagée dans le but d'évaluer les activités biologiques de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* (EEAa) exploitables dans la prise en charge alternative et complémentaire du cancer du sein hormonodépendant. Premièrement, une caractérisation phytochimique de l'EEAa a été effectuée à travers la détermination de la teneur en composés bioactifs, l'identification par LC-MS de quelques composés d'intérêt et la mesure de son potentiel antioxydant *in vitro*. Après sélection d'une lignée cellulaire sensible à l'extrait à l'aide du test au MTT, les mécanismes d'action antiproliférative de l'EEAa ont été explorés par les techniques de qPCR et Western blot. Puis, une étude expérimentale a été réalisée chez un modèle de cancer du sein induit au 7,12-diméthylbenz-(a)-anthracène (DMBA) chez les rates *Wistar*. En effet, 3 mois après l'administration sous-cutanée d'une dose unique de 50 mg/Kg, Pc de DMBA chez les rates, elles ont été randomisées et traitées ou non avec l'EEAa aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, Pc ou du TAM à 3,3mg/Kg, Pc pendant 28 jours. Puis, elles ont été sacrifiées et les échantillons biologiques collectées pour le dosage des promoteurs de la croissance tumorale, la numération formule sanguine, le dosage des cytokines pro- et anti-inflammatoires et les analyses histologiques. Enfin, une expérimentation similaire a été faite avec pour différence que, les groupes extrait recevaient une heure plus tard le TAM dans le but d'évaluer l'effet protecteur de l'EEAa contre une hyperplasie de l'endomètre, la perte de poids, l'hypertriglycémie et les atteintes hépatiques causées par le TAM. A la suite des analyses effectuées, il ressort que, cet extrait contient des composés phénoliques (6-gingérol, 6-paradol), alcaloïdes (Pipérine, Isoprinosine) et terpenoïdes (α -pinène ; β -caryophyllène). Il a inhibé la prolifération des cellules cancéreuses YUMM1.7 (CI50 : 31 μ g/mL) en induisant un arrêt G1/S du cycle cellulaire, inhibant l'angiogenèse et promouvant la mort par voie intrinsèque de l'apoptose. Chez le modèle cellulaire MCF-7 du cancer du sein, l'extrait s'est montré modérément antiprolifératif (CI50 : 9,16 μ g/mL). *In vivo*, L'extrait a entraîné un ralentissement de la progression tumorale mammaire induite par le DMBA, aboutissant à un carcinome canalaire (150 mg/Kg Pc) et un fibrosarcome (300 mg/Kg, Pc) de bas grades et de petites tailles. Au niveau moléculaire, ceci a été marqué par une augmentation de 19,13% (150 mg/Kg Pc) le taux de lymphocyte, de 80,11% (300 mg/Kg Pc) du nombre de monocytes, de 49,66% (150 mg/Kg Pc) le taux sérique d'interféron gamma et une réduction de 21,62% (300 mg/Kg Pc) du taux de TNF- α , de 22,43% du taux d'estradiol, de 21,54% et 20,04% (150 et 300 mg/Kg, Pc respectivement) du taux d'EGF. Co-administré avec le TAM, l'EEAa a prévenu d'une hyperplasie de l'endomètre en réduisant de 13,16% son épaisseur à la dose de 300 mg/Kg Pc. Il a ralenti la perte de poids de 73,68% (150 mg/Kg) en fin de traitement, empêché l'hypercholestérolémie (de 18,54% et 23,02%) et l'hypertriglycémie (de 26,50% et 35,47%). Il a également protégé d'une toxicité hépatique en augmentant l'activité hépatique de la catalase de 99,73% (150 mg/Kg); réduisant les taux hépatiques de substances réactives à l'acide thiobarbiturique de 33,70% et 51,50% respectivement, avec pour conséquence une baisse de l'activité plasmatique des transaminases. Au vu de ces résultats, l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* se veut comme potentiel allié pour la prise en charge alternative et complémentaire du cancer du sein hormonodépendant.

Mots clés : Cancer du sein, *Aframomum angustifolium*, Anticancéreux, Tamoxifène, , *in vitro*, *in vivo*

ABSTRACT

Breast cancer accounts for over a quarter of cancer diagnoses in Cameroon since 2015, with approximately 16% of patients dying shortly after treatment initiation. Around 70% of tumors overexpress estrogen receptors, necessitating first-line hormonal therapy such as tamoxifen (TAM). However, long-term use of TAM poses risks of adverse effects, compromising patient health. Consequently, many patients turn to complementary and alternative therapies, including phytotherapy, which has demonstrated efficacy in scientific studies. Among the most explored botanical families are the Zingiberaceae, known for their wide geographic distribution and therapeutic potential. *Aframomum angustifolium*, a member of this family, is rich in bioactive secondary metabolites with potential applications in oncology. The present study aimed to evaluate the biological activities of ethanol extract from *A. angustifolium* seeds (EEAa) for complementary and alternative management of hormone-dependent breast cancer. First, a phytochemical characterization of EEAa was performed through determination of phenolic, alkaloid and terpenoid content, identification by LC-MS of certain compounds of interest, and measurement of its anti-radical and reducing potential. After selecting a cell line sensitive to the extract using the MTT test, the antiproliferative mechanisms of EEAa were explored using qPCR and Western blot techniques. Then, after determining the antiproliferative potential of EEAa on MCF-7 breast cancer cell line, an experimental study was conducted on a 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer model in Wistar rats. Specifically, three months after subcutaneous administration of a single 50 mg/kg body weight dose of DMBA to the rats, they were randomized and treated or not with EEAa at respective doses of 150 and 300 mg/kg bw or with TAM at 3.3 mg/kg bw for 28 days. They were then sacrificed and biological samples collected for tumor growth promoter assays, complete blood count, pro- and anti-inflammatory cytokine assays, and histological analyses. Finally, a similar experiment was conducted with the difference that extract groups received TAM one hour later, in order to evaluate the protective effect of EEAa against endometrial hyperplasia, weight loss, hyperlipidemia and hepatic damage caused by TAM. As result; phytochemical characterization revealed phenolic compounds (6-gingerol, 6-paradol), alkaloids (piperine, isoprinosine), and terpenoids (α -pinene, β -caryophyllene). *In vitro*, EEAa inhibited YUMM1.7 cancer cell proliferation (IC₅₀: 31 μ g/mL) by inducing G1/S cell cycle arrest, suppressing angiogenesis, and promoting intrinsic apoptosis. In MCF-7 breast cancer cells, it showed moderate antiproliferative effects (IC₅₀: 9.16 μ g/mL). *In vivo*, EEAa slowed tumor progression, resulting in low-grade ductal carcinoma (150 mg/kg, bw) and fibrosarcoma (300 mg/kg, bw). Mechanistically, it increased lymphocyte (by 19.13% at 150 mg/kg, bw) and monocyte (by 80.11% at 300 mg/kg, bw) counts, elevated serum interferon-gamma (49.66% and 42.48%), and reduced circulating TNF- α (21.62% at 150 mg/kg, bw), serum estradiol (by 22.43% at 300 mg/kg, bw), and EGF levels (21.54% and 20.04%). When co-administered with TAM, EEAa mitigated adverse effects. Indeed, it protected against endometrial hyperplasia through the decreasing of its thickness by 13.16% at 300 mg/kg bw. EEAa, Attenuated weight loss (73.68% reduction) at 150 mg/kg bw. At both tested doses it prevented hypercholesterolemia (18.54 and 23.02% respectively) and hypertriglyceridemia (26.50 and 35.47% respectively). it also protected against hepatotoxicity by increasing hepatic catalase activity (99.73%) at 150 mg/kg bw and reducing thiobarbituric acid-reactive substances (33.70 and 51.50%), leading to lower plasma transaminase levels. So, the ethanol extract of *A. angustifolium* seeds demonstrates promising potential as a complementary and alternative therapeutic agent for hormone-dependent breast cancer, offering antiproliferative, immunomodulatory, and protective effects against TAM-induced toxicity.

Keywords: Breast cancer, *Aframomum angustifolium*, Anticancer, Tamoxifen, *in vitro*, *in vivo*

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cycle de croissance cellulaire est un processus ordonné, multiphasique et initié par les facteurs de croissance, au cours duquel l'ADN d'une cellule est répliqué et redistribué entre des cellules filles, de façon à maintenir son intégrité. Une régulation normale du cycle cellulaire joue un rôle important dans la réparation tissulaire et l'inflammation (**Yang et Sheridan, 2014**). Ainsi, une mutation des gènes compromettant ces processus de réparation peut causer une instabilité génomique, une absence de réponse aux signaux anti mitotique, occasionnant une prolifération cellulaire continue, responsable des pathologies comme le cancer (**Fouad et Aanei, 2017 ; Hanahan et Weinberg, 2011**). En 2022, environ 19 976 499 nouveaux cas de cancers ont été répertoriés dans le monde avec 9,7 millions de décès. Les plus prépondérants étaient ceux du poumon (12.4%), du sein (11,5%), le cancer colorectal (9.6%), de la prostate (7.3%) et de l'estomac (4.9%). En Afrique, les cancers gynécologiques sont les plus à craindre ; notamment les cancers du sein, de la prostate et celui du col de l'utérus. Au Cameroun, le cancer du sein occupait la première place avec 21,5% de cas (**Ferley et al., 2024**). Entre 2020 et 2022, on a noté une augmentation de sa prévalence de 2,3% et de décès à lui imputé de 1,9% chez la femme (**Ferley et al., 2024 ; Ferley et al., 2021**). Les femmes en âge de procréer étant les plus atteintes et le carcinome invasif le plus répandu (**Engbang et al., 2015**), il devient plus que nécessaire d'en faire un problème de santé public.

Les facteurs de risque entrant dans la pathogénèse du cancer du sein peuvent être d'origine génétique, rayonnante, hormonale ou chimique (**INCa, 2016 ; Basset, 2014**). Ces différents carcinogènes causent des altérations moléculaires des gènes qui contrôlent le cycle cellulaire soit par suppression (P53,) ou par activation (cycline D1), entraînant la progression proliférative par inactivation de l'apoptose (**Harbeck et al., 2019**). Par ailleurs, Le microenvironnement tumoral bondé de cellules immunitaires génère un statut inflammatoire, qui promeut l'angiogenèse tumoral et la survie cellulaire (**Chew et al., 2024**). En effet, l'oxyde nitrique produit par les macrophages est capable de stimuler l'hyper expression des facteurs de croissances pro-angiogéniques tels que la *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (**Yamamoto et al., 2020**). De même, les cytokines produites par ces dernières ont la capacité d'activer des voies de transduction du signal impliquées dans l'expression des gènes favorables à la survie, la croissance et la prolifération cellulaire (**Crespi et al., 2016 ; Hecht et al., 2016**).

La multiplicité des voies d'initiation fait du cancer du sein une maladie hétérogène dont l'un des principaux critères pour la prise en charge est la caractéristique moléculaire de la tumeur. Les statistiques font état d'environ 70% de cas sur-exprimant les récepteurs à estrogènes (RE) (Malhotra *et al.*, 2010), et donc nécessitent en première ligne une hormonothérapie (Pagani *et al.*, 2014). Les modulateurs sélectifs des RE comme le tamoxifène sont l'un des plus prescrits (Adikwu *et al.*, 2020 ; Schuurman *et al.*, 2019). Ils sont généralement pris sur une période de 5-10 ans, occasionnant au passage une augmentation du taux circulant d'estrogènes et un stress oxydant (Mvondo *et al.*, 2020 ; Miyamura *et al.*, 2016). Ceci pouvant avoir pour conséquence un cancer de l'endomètre, une cardiotoxicité, une stéatose hépatique et une néphrotoxicité (Liu *et al.*, 2018).

Le contexte socio-économique des populations d'Afrique subsaharienne n'étant pas favorable au diagnostic précoce du cancer, le pronostic vital des patients se voit réduit (Mvondo *et al.*, 2021) et 30% décèdent peu après le début de leur prise en charge (MINSANTE, 2020). En effet, la multi-thérapie appliquée dans la prise en charge des cancers est à l'origine de la multiplicité et de l'accumulation des effets indésirables, concourant à la dégradation de l'état de santé des patients (Sun *et al.*, 2016). Face à ceci, il a été constaté que les patients avaient recours à des thérapies complémentaire *et alternatives* telle que la phytothérapie (Hall *et al.*, 2021). Des recherches menées sur cette base ont montré que, les extraits de plante prévenaient le stress oxydant et les troubles métaboliques associés à la prise de certains anticancéreux chez le rat (Mbong *et al.*, 2020 ; Mvondo *et al.*, 2020). Par ailleurs, les métabolites secondaires des plantes, se sont révélés capables d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses à travers des mécanismes variés (Dhyani *et al.* 2022 ; Kamran *et al.*, 2022 ; Siraj *et al.*, 2021). Pour donc satisfaire aux besoins de notre société, il serait important d'orienter les recherches vers celles des substances naturelles à potentiel antiprolifératif, capables de limiter les effets toxiques liés aux anticancéreux conventionnels.

Du fait de sa vaste distribution géographique, *Aframomum* est l'un des genres botaniques les plus étudiés en recherche. Plusieurs plantes de ce genre ont déjà prouvé leur potentiel anticancéreux, antiinflammatoire, antioestrogénique et antioxydant (Amadi *et al.*, 2016). *Aframomum angustifolium* dont les fruits sont utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement de l'ascite (Inkito *et al.*, 2021) est une plante de ce genre peu explorée. Les huiles essentielles de ses graines contiendraient des terpenoïdes aux potentiels antiprolifératifs connus (Ye *et al.*, 2020). L'extrait éthanolique de ses graines régulerait les défenses antioxydantes, et les gènes liés au renouvellement épidermique (Bonnet-Duquenoy *et al.*, 2007). De plus, cet extrait accélérerait *in vivo* la réparation de la toxicité rénale et hépatique

induite par le bromure de potassium chez les rats (**Ebhohimen et al., 2020**) et serait non toxique en administration sub-aigüe à des doses inférieures à 1000 mg/Kg de poids corporel (**Ebhohimen et Okolie, 2021**). L'ensemble de ces études permettrait de projeter cet extrait comme potentiel candidat pour la prise en charge alternative et complémentaire du cancer du sein. Ce travail donc a été envisagé dans le cadre de la valorisation des fruits de la flore camerounaise en occurrence *A angustifolium* dans la prise en charge des cancers en général et celui du sein en particulier.

Questions de recherche

- Par quels mécanismes l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* est-il capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses ?
- L'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* est-il capable de réduire le grade histologique des tumeurs mammaires, les taux circulants des promoteurs de la croissance tumorale et de stimuler la défense immunitaire systémique dans un modèle animal de cancer du sein induit au 7,12-diméthylbenz(a)-anthracène (DMBA) chez le rat ?
- L'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* peut-il prévenir d'une hyperplasie de l'endomètre, d'une perte de poids, d'une hyperlipidémie et d'une toxicité hépatique et rénale induites par le tamoxifène dans un modèle animal de cancer du sein induit au DMBA chez le rat?

Hypothèse de recherche

Les graines d'*Aframomum angustifolium* possèdent des composés bioactifs qui lui confèrent des aptitudes anticancéreuses exploitables dans la prise en charge alternative et complémentaire du cancer du sein.

Objectif général

Évaluer les propriétés antiprolifératives et antitumorales de l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* ainsi que son effet protecteur contre les effets indésirables associés à une hormonothérapie chez un modèle animal de cancer du sein.

Objectifs spécifiques

- Déterminer les teneurs en composés phénoliques, alcaloïdes et terpenoïdes, les potentiels antiradicalaires et réducteur et les mécanismes d'action antiproliférative de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* ;

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

- Etudier les effets de l'extrait éthanolique de graines *d'Aframomum angustifolium* sur la prolifération des cellules MCF-7 *in vitro*, sur la formule leucocytaire, les taux sériques de TNF- α , Interferon gamma, d'estradiol et d'EGF ainsi que sur la microarchitecture des tumeurs mammaires dans un modèle de cancer du sein induit chez le rat par le DMBA ;
- Déterminer l'effet de l'extrait éthanolique de graines *d'Aframomum angustifolium* sur l'épaisseur de l'endomètre, le taux d'estradiol, la variation de poids corporel, les taux de triglycérides et cholestérol total, d'acide urique, de créatine, l'activité plasmatique des transaminases et les niveaux plasmatique et hépatique de MDA et catalase dans un modèle de cancer du sein induit chez le rat par le DMBA et traité au tamoxifène.

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1 Généralités sur le cancer

I.1.1 Définition

Etymologiquement selon Hypocrate, le terme cancer vient du mot grec *karkinoma*, qui signifie crabe. Ce mot était utilisé pour désigner les ulcères et les excroissances qui semblaient être des tumeurs malignes (**Faguet, 2014**). Scientifiquement, le cancer est un groupe de maladies caractérisées par une croissance incontrôlée de cellules anormales, conduisant à la formation d'une masse nommée tumeur maligne ou cancéreuse (**Patel, 2020**). Ces cellules sont capables de s'évader et envahir les tissus environnants (**Sun et al., 2020**). Les cancers résultent de la transformation de cellules normales suite à l'accumulation de 5 à 10 mutations sur leur ADN (**Alhmoud et al., 2021**). En effet, Lorsqu'une anomalie est repérée au cours du cycle cellulaire, ce dernier est stoppé, laissant le temps à sa réparation. Si les dommages sont graves, la cellule programme sa mort par le mécanisme appelé apoptose (**Morana et al., 2022**). Cependant, les cellules endommagées peuvent échapper à cette mort programmée, par conséquent se développer, se multiplier et ainsi former un foyer précancéreux (**Matthews et al., 2022 ; Mishra et al., 2018**).

I.1.2 Caractéristiques des cellules cancéreuses

En tenant compte du comportement de divers types de tumeurs humaines, des principes de base ont été établis pour faciliter la compréhension des maladies néoplasiques. Il s'agit de huit capacités biologiques qu'acquièrent les cellules cancéreuses tout au long du développement des tumeurs humaines. Ce sont entre autres l'instabilité génomique, l'insensibilité aux signaux de non-prolifération, une résistance à l'apoptose, l'induction de l'angiogenèse, l'activation de l'invasion et la diffusion métastatique, la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire antitumoral (**Fouad et Aanei, 2017 ; Hanahan et Weinberg, 2011**).

I.1.2.1 Echappement aux facteurs suppresseurs de croissance et prolifération chronique

Il s'agit de la caractéristique fondamentale des cellules cancéreuses. Les tissus normaux contrôlent soigneusement la production et la libération de signaux qui commandent l'entrée des cellules dans le cycle de croissance et de division cellulaire et leur progression (**Witsch et al., 2010**). Les signaux d'activation sont transmis en grande partie par des facteurs de croissance (facteur de croissance épidermique, facteur de croissance transformant...) qui se

lient aux récepteurs de la surface cellulaire. Ces derniers possèdent généralement des domaines tyrosine kinase intracellulaires, permettant l'activation des voies de signalisation intracellulaires ramifiées (Pi3K/AKT/mTor, ras/MAPK), qui régulent la progression du cycle cellulaire ainsi que la croissance cellulaire (Laurent-Puig, 2009) tel que décrit la Figure 1 ci-dessous. Cependant, les cellules cancéreuses présentent généralement des altérations affectant les ligands, leurs récepteurs ou les messagers intracellulaires, conduisant à une hyperactivation de ces voies de signalisation (Fouad et Aanei, 2017 ; Vogelstein *et al.*, 2013).

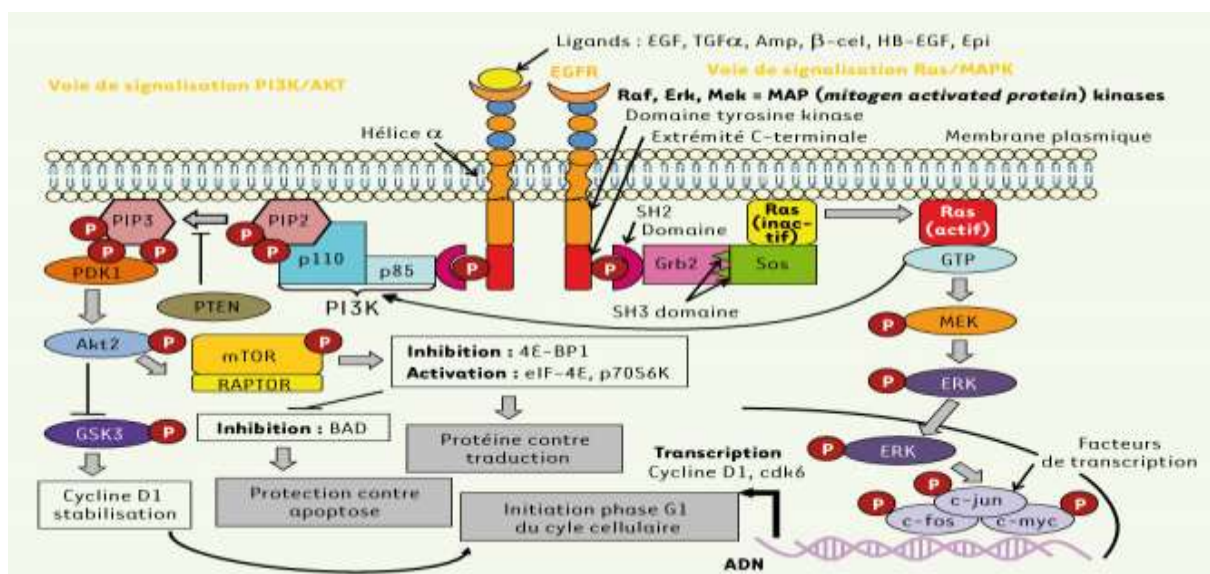


Figure 1: Voies de signalisation proliférative des récepteurs à tyrosine kinase (Laurent-Puig, 2009)

1.1.2.2 Perte de contrôle du cycle de croissance cellulaire

Même en présence de signaux de croissance, une régulation étroite du cycle cellulaire par des protéines régulatrices permet de contrôler les cycles de division qui est également altéré chez les cellules cancéreuses (Fouad et Aanei, 2017). L'un des régulateurs clés est la protéine du rétinoblastome (Rb), couramment inactivée dans une multitude de tumeurs malignes (Dick et Rubin, 2013). Elle intervient à la première phase de croissance du cycle cellulaire (G1) (Figure 2) où, elle maintient inactives les facteurs de transcription E2F1/E2F2. Lorsqu'elles sont libérées suite à l'inactivation par phosphorylation des Rb, ces facteurs de transcription initient la transcription des molécules nécessaires à la transition G1/S du cycle cellulaire (cycline D, cycline E) (Vantura et Giordano, 2019). A côté d'elle, il y'a la protéine p53, dont le gène est le plus fréquemment muté dans plus de 50 % des tumeurs

séquencées (Kim *et al.*, 2015). Elle agit en réponse au stress notamment, le stress génotoxique, une signalisation excessive, la privation de nutriments et l'hypoxie. En arrêtant la prolifération, p53 est alors impliqué dans l'initiation des mécanismes de réparation ou d'induction de la mort (Haupt *et al.*, 2016).

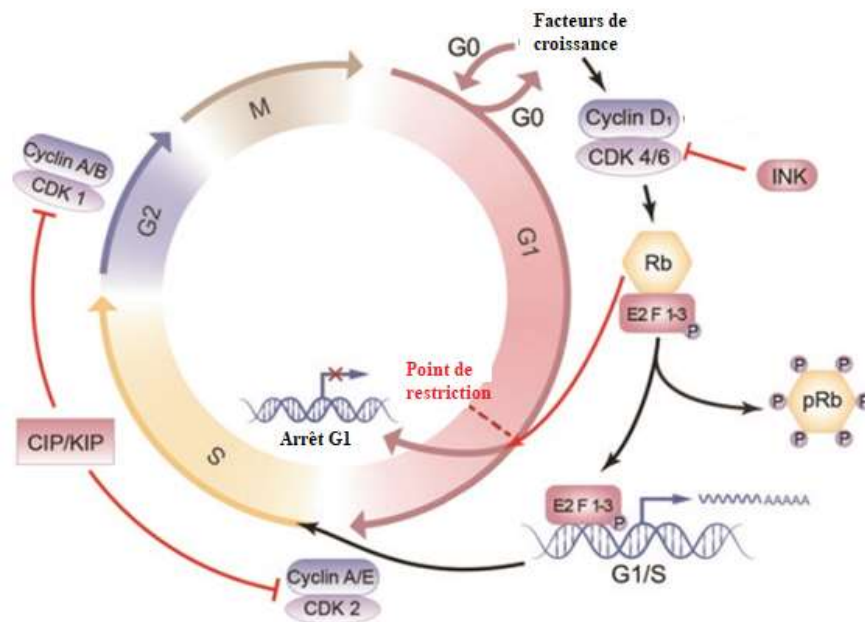


Figure 2: Phases du cycle cellulaire (Song et Hu, 2017)

I.1.2.3 Résistance à la mort cellulaire

Chez les cellules normales, les régulateurs de la réponse apoptotique sont divisés en deux circuits principaux, l'un recevant les signaux extracellulaires induisant la mort (voie extrinsèque) et l'autre qui détecte et intègre une variété de signaux d'origine intracellulaire (voie intrinsèque) (Mishra *et al.*, 2018). Chacun de ces circuits aboutit à l'activation d'une protéase normalement latente (caspase-8 ou 9, respectivement), qui vont à leur tour activer les caspases effectrices (caspase-3, 6 et 7) responsables de la phase d'exécution de ces mécanismes de mort cellulaire (Figure 3). Au cours de cette phase finale, la cellule apoptotique est progressivement désassemblée puis consommée tant par ses voisines ou par des cellules phagocytaires (Lopez et Tait, 2015).

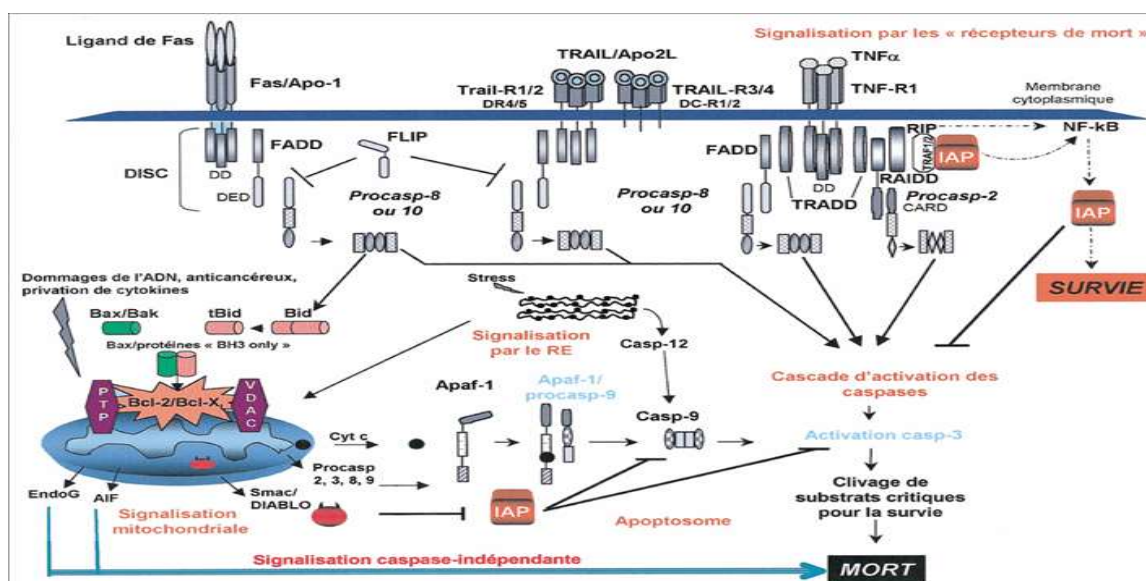


Figure 3: Voies d'induction de l'apoptose (Mishra *et al.*, 2018)

a) La voie extrinsèque d'induction de l'apoptose

Cette voie est déclenchée par les interactions entre les récepteurs de la mort (famille des récepteurs du *tumour necrosis factor* ou *TNF*) et les ligands correspondant. Il peut s'agir des interactions *Fas ligand*/récepteur *Fas* (FasL)/FasR), *Tumour necrosis factor* (TNF)-α / *TNF receptor* (TNFR1) Apo3L/*Death receptor 3* (DR3), Apo2L/DR4, ou Apo2L/DR5 (Von *et al.*, 2017 ; Fleten *et al.*, 2016). Cette interaction conduit au recrutement des protéines adaptatrices que sont *Fas-associated death domain* (FADD) et *TNFR1-associated death domain* (TRADD), pour former du complexe de signalisation induisant la mort (*Death-inducing signaling complex*, DISC) ou complexe 1 qui activera la caspase-8, et qui en retour clivera la caspase-3 pour l'activer (Fu *et al.*, 2016)

b) Voie intrinsèque d'induction de l'apoptose

Elle est la principale voie d'exécution de l'apoptose chez les mammifères et est contrôlée par les protéines de la famille des *B-cell lymphoma 2* (*Bcl-2*) (Tait et Green 2010). Il s'agit d'un groupe de protéines initiateurs ou pro-apoptotiques (Bax et Bak, Bid, Bim) et inhibitrices ou anti-apoptotiques (*Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *Mcl-1*, *A1*) liées entre elles (Campbell et Tait, 2018). Cette voie est initiée par les signaux intracellulaires tels que les dommages à l'ADN qui agissent par l'intermédiaire du suppresseur de tumeur TP53, une signalisation insuffisante des facteurs de survie ou une signalisation hyperactive de certaines onco-protéines, telle que *Myc* (Green, 2011). Ces signaux régulent à la hausse l'expression de la protéine pro-apoptotique, qui à leur tour perturbent l'intégrité de la membrane mitochondriale externe, provoquant la libération dans le cytosol du cytochrome C. Ce dernier

va avec la protéine adaptative *apoptotic protease activating factor 1* (APAF1) et la procaspase-9 pour former l'apoptosome, avec activation de la caspase-9 qui, en retour va activer les caspases effectrices (Li *et al.*, 2017).

c) Voie extrinsèque annexe d'induction de la mort cellulaire : la nécroptose

Divers stimuli, dont les dommages à l'ADN, l'activation des récepteurs transmembranaires tels que *T-cell Receptors* (TCR), *Toll-Like Receptor* (TLR), *Interferon Receptor* (IFNR) ou *TNFR*, conduisent à la formation de complexes de signalisation divergents, aboutissant éventuellement à l'activation de la voie de signalisation du facteur *NF- κ B*, de l'apoptose ou de la nécroptose (Mishra *et al.*, 2018). En effet, la liaison des ligands aux récepteurs conduit à la formation du complexe I contenant *Receptor Interacting Protein Kinase 1* (RIPK1). La polyubiquitination de ce dernier par la *cellular inhibitor of apoptosis proteins* (cIAP) ligase, entraîne la survie cellulaire par l'activation de *NF- κ B* et des *Mitogen activating protein kinase* (MAPK) (Maelfait *et al.*, 2017). Cependant, La désubiquitination de RIPK 1 par l'enzyme cylindromatose (CYLD) ou l'inhibition des protéines cIAP conduit à la conversion du complexe I en complexe IIa contenant RIPK I, la caspase 8 et les protéines adaptatrices *FADD* ou *TRADD* (Mishra *et al.*, 2018). Si la caspase-8 est inactive ou réprimé, alors RIPK 1 et RIPK 3 s'associent pour former le complexe IIb ou nécrosome dans lequel l'activité kinase de RIPK 1 est activé par autophosphorylation (Figure 4). Ce dernier va transphosphoryler RIPK 3, qui va en retour activer la protéine *Mix Lineage Kinase Like-domain* (MLKL) par phosphorylation. Il va s'en suivre une translocation de l'oligomère pMLKL vers la membrane plasmique où il provoque sa lyse (Murphy *et al.*, 2013). Par ailleurs, le nécrosome peut se transloquer vers la membrane du réticulum endoplasmique associé aux mitochondries où RIPK3 va activer la *Phosphatase PhosphoGlycerate Mutase 5* (PGAM-5). Cette dernière en retour va activer par déphosphorylation la protéine *DRP-1* (*Dynamin-Related Protein 1*), entraînant ainsi une fission mitochondriale importante, la production de espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la nécroptose (Lu *et al.*, 2016).

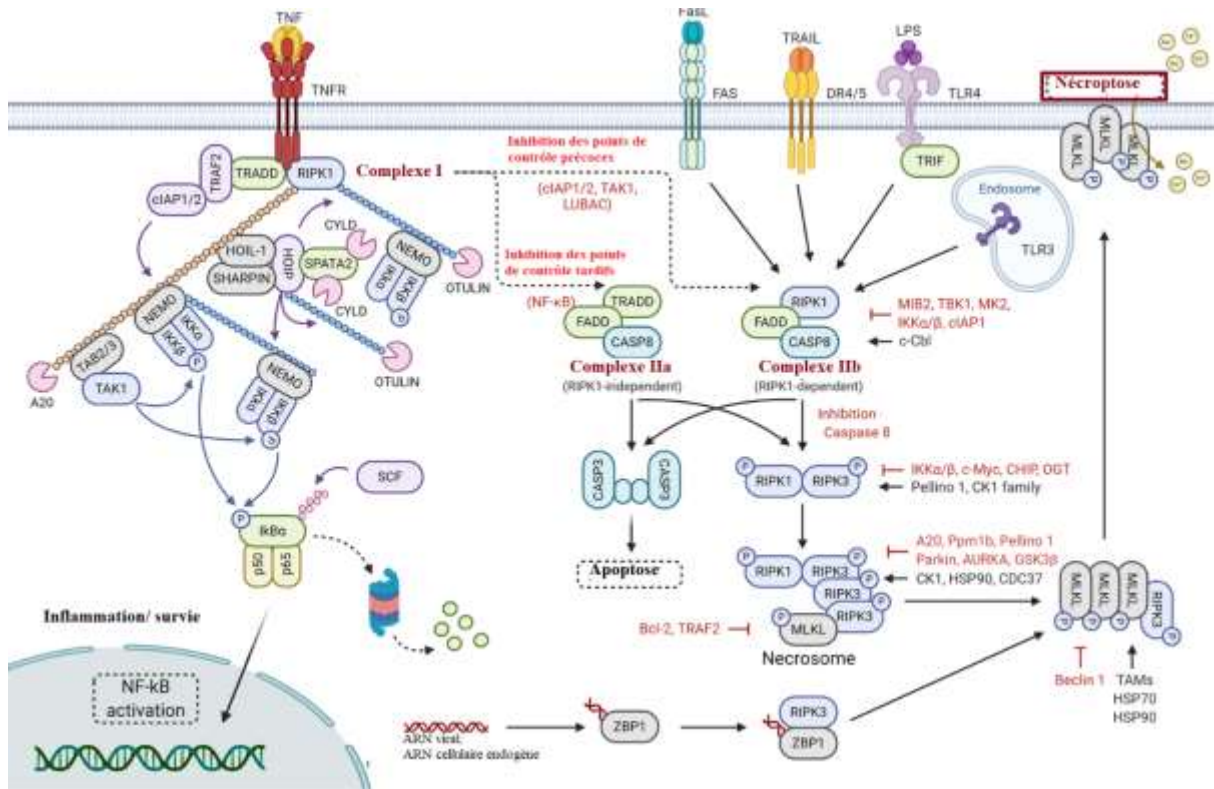


Figure 4: Mécanisme de nécroptose (Mishra *et al.*, 2018)

d) Mort cellulaire indépendante des caspases et du nécrosome : La ferroptose

Il s'agit d'une mort cellulaire initiée par des perturbations oxydatives du microenvironnement intracellulaire (Galluzzi *et al.*, 2018). Ces perturbateurs peuvent être des inhibiteurs de xCT, un antiporteur de cystine-glutamate codé par le gène SLC7A11, de la sous-unité spécifique au substrat du système X_c^- (Dixon *et al.*, 2012). Ce système est nécessaire pour l'importation de la cystine extracellulaire dans les cellules humaines en prélude à leur utilisation par la glutathion peroxydase 4 (GPX4) pour réparer la peroxydation lipidique (Chen *et al.*, 2019). La protéine P53, l'éristine, la sulfasalazine, l'artémisinine et ses dérivées font partie de cette classe d'inducteurs (Figure 5). L'autre classe inclue les inhibiteurs de la GPX4 tel que *ras small lethal molecule* (RSL). Cette inhibition conduit à l'accumulation des peroxydes lipidiques sans baisse de la GSH (Yang *et al.*, 2014). En effet, l'autophagie de la ferritine médiée par le co-activateur du récepteur nucléaire 4 (NCOA4), dégrade la ferritine, augmentant ainsi le nombre de ferritine. Ceci a pour effet d'augmenter la taille du pool de fer instable dans le cytoplasme (Latunde-Dada, 2017). Le Fe^{2+} accumulé réduit l'oxygène pour former des radicaux superoxydes, qui provoquent la peroxydation des lipides et induisent la ferroptose dans les cellules (Ng *et al.*, 2019).

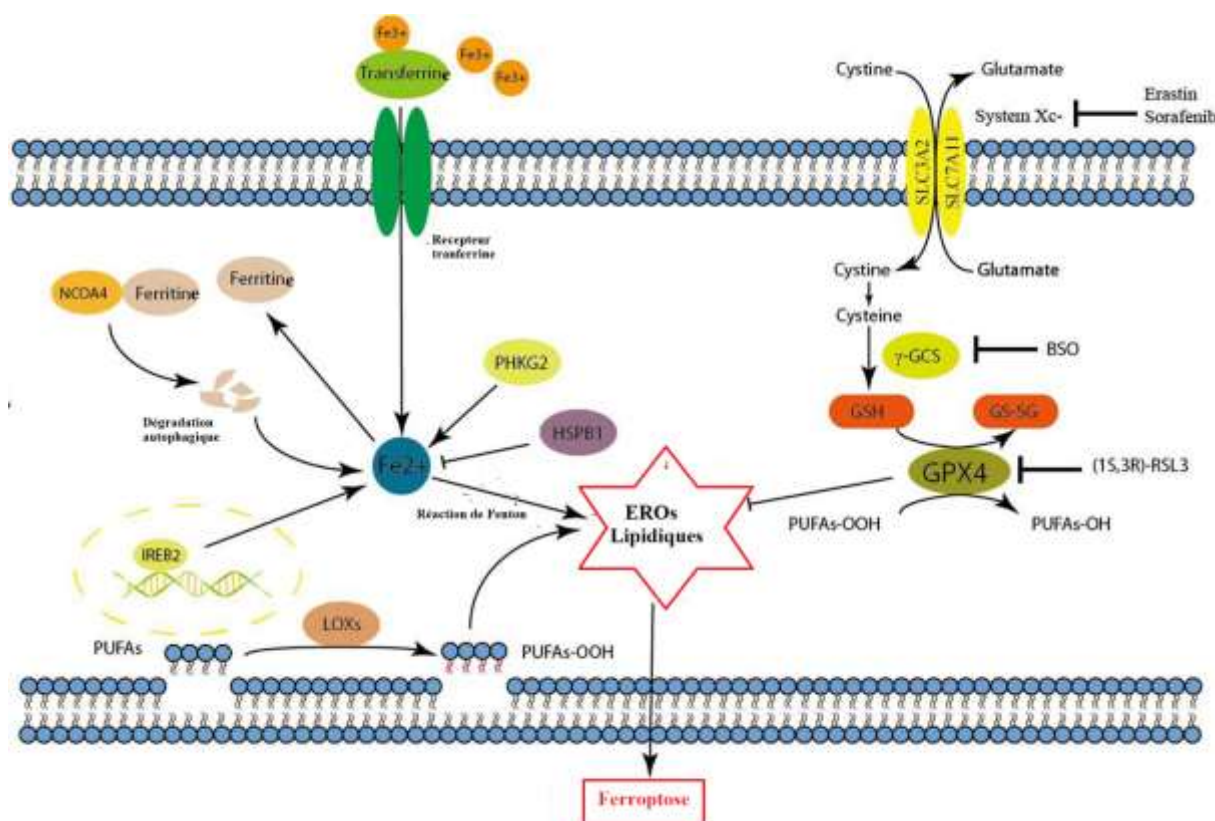


Figure 5: Mécanisme moléculaire de la ferroptose (Zhang *et al.*, 2022)

Les cellules tumorales développent une variété de stratégies pour limiter ou contourner les mécanismes de mort cellulaire. La plus courante est la perte de la fonction du suppresseur de tumeur TP53 qui élimine ce capteur de dommages critique du circuit d'induction de l'apoptose ou la ferroptose. Les tumeurs peuvent également parvenir à des fins similaires en augmentant l'expression des régulateurs anti-apoptotiques et de signaux de survie (IGF 1 et 2) et en régulant à la baisse les facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bim, *cIAP*) (Koff *et al.*, 2015). La multiplicité des mécanismes d'évitement de la mort reflète vraisemblablement la diversité des signaux induisant l'apoptose, que les populations de cellules cancéreuses rencontrent au cours de leur évolution à partir du stade normal à l'état néoplasique (Davita *et al.*, 2019).

1.1.2.4 Instabilité génomique : réplication illimitée

Cette caractéristique est associée au raccourcissement des télomères. Il s'agit d'un réseau double brin de répétitions TTAGGG liées par les six sous-unités du complexe *shelterin* aux extrémités 3' des chromosomes. Le raccourcissement des télomères peut d'une part exercer un effet suppresseur de tumeur par l'arrêt de la prolifération induit par l'activation des kinases ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*ATM and Rad3-related*) (Maciejowski et Lange, 2017). D'autre part, la perte de protection des télomères peut conduire à une crise

des télomères, qui est un état de grande instabilité du génome pouvant favoriser la progression du cancer. Les télomères sont ajoutés par la télomérase, qui est une transcriptase inverse synthétisant l'ADN télomérique de *ново* en utilisant l'ARN intégral comme modèle et l'extrémité 3' du chromosome comme matrice (Shay *et al.*, 2019). Cependant, comme chez les cellules normales des tissus en croissances (embryons, moelle osseuse) une régulation à la hausse de l'expression de la télomérase est observée chez les cellules cancéreuses pour assurer leur immortalisation (Dalgård *et al.*, 2015; Hiyama et Hiyama, 2007).

I.1.2.5 Echappement au système immunitaire et inflammation

Les cellules tumorales peuvent adapter l'immunité de l'hôte en régulant à la hausse l'expression de molécules telles que le ligand de mort programmée 1 (*PD-L1*) et en régulant à la baisse d'autres molécules, notamment le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (Kuol *et al.*, 2017). Les cellules T expriment le récepteur *PD-1* et, lors de l'interaction avec *PD-L1* (B7-H1) tumoral, des signaux inhibiteurs sont déclenchés, entraînant l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques (LTC), cellules T CD8+ (Barsoum *et al.*, 2014 ; Karwacz *et al.*, 2011). Le *PD-L1* sert ainsi de facteur anti-apoptotique sur les cellules tumorales, entraînant leur résistance à la cytolyse par les LTC ainsi qu'à l'apoptose induite par les médicaments (Azuma *et al.*, 2008). Par ailleurs, sous l'influence de la phosphatidylsérine (PS) soluble et le sFasL soluble tumoraux, les cellules immunitaires associées à la tumeur (neutrophiles, fibroblastes, macrophages, Tregs, MDSCs) produisent les immunosuppresseurs tels que l'IL-10, le facteur de croissance tumorale bêta (TGF- β), la prostaglandine E2 (PGE2) et la cyclooxygénase 2 (COX-2) qui stimulent de l'expression de *PD-L1* (Wei *et al.*, 2015). De même, dans des conditions hypoxiques ou de privation de glucose, les macrophages sont oxydés en présence du *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1), ce qui favorise l'angiogenèse tumorale via l'expression de VEGF. Ce dernier tout comme l'activation de TLR1 induisent une expression de *PD-L1*. De même, la signalisation PTEN/PI3K induit une régulation protranscriptionnelle de *PD-L1* (Kuol *et al.*, 2017). La Figure 6 ci-dessous décrit quelques processus d'échappement au système immunitaire

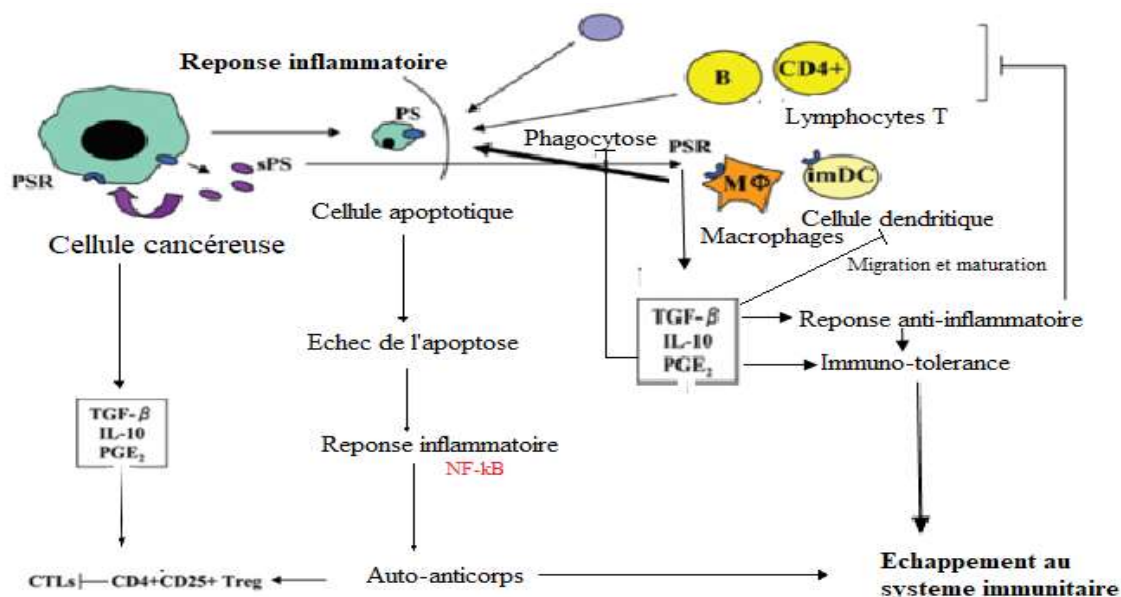


Figure 6: Mécanisme d'échappement au système immunitaire (Kim *et al.*, 2005)

1.1.2.6 Induction de l'angiogenèse

Comme les tissus normaux, les tumeurs ont besoin de nutriments et d'oxygène ainsi que de évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. Par ailleurs, la vascularisation est nécessaire pour qu'une masse tumorale dépasse un diamètre de 1 à 2 mm³. La synthèse et la sécrétion de facteurs angiogéniques jouent un rôle essentiel dans l'établissement d'un réseau vasculaire au sein du tissu hôte environnant (Thakur et Rao, 2016). Les cellules cancéreuses expriment de ce fait un ensemble de signaux angiogéniques que sont *Fibroblast basic growth factor* (bFGF), *Transforming growth factor alpha* (TGF-α), le *TNF-α*, le facteur de croissance épidermique (EGF pour *epidermal growth factor*), *platelete-derived growth factor* le (PDGF) et le plus important VEGF (Cimpean *et al.*, 2017). De nombreux facteurs contrôlent l'expression du VEGF comme l'hypoxie. Les cellules vasculaires expriment des capteurs d'oxygène qui sont de la famille des facteurs de transcription HIF (*hypoxia-inducible transcription factor*). En effet, en cas d'hypoxie, la sous unité de la protéine VHL (*Von Hippel-Lindau*) normalement responsable de la dégradation de la sous unité HIF-1α est inactive, ce qui entraîne la stabilisation de cette dernière. Elle est donc transloquée dans le noyau où son interaction avec la sous unité HIF-1β entraînera l'activation de la transcription du VEGF par fixation à l'élément de réponse HRE (*Hypoxia Response Element*) (Brown, 2014). Une fois traduit, VEGF va se fixer sur son récepteur situé sur les cellules endothéliales, et entraîner la dimérisation, l'autophosphorylation et l'activation des voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*) et

PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase) impliquées dans la perméabilisation membranaire, la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales (Zuazo-Gaztelu et Casanovas, 2018 ; Koch et Distler 2007). La figure 7 illustre les étapes de formation des nouveaux vaisseaux sanguins

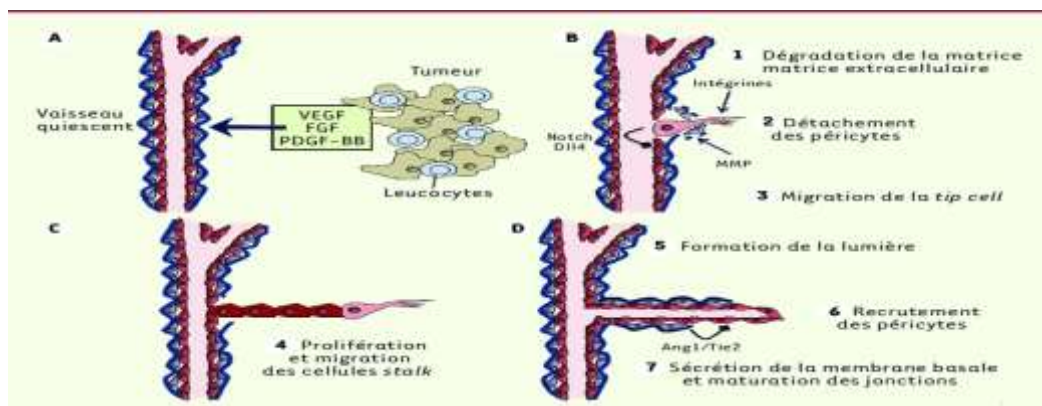


Figure 7: Etapes de l'angiogenèse (Mehdi et Shaker, 2017)

1.1.2.7 Reprogrammation du métabolisme énergétique

Un métabolisme modifié offre un avantage sélectif unique lors de l'initiation et de la progression des tumeurs (Fouad et Aanei, 2017). Les principaux nutriments essentiels à la nutrition des cellules cancéreuses sont le glucose et la glutamine, qui produisent un pool d'intermédiaires carbonés pour la synthèse des macromolécules et la production d'énergie (Martino *et al.*, 2023). La glutamine est utilisée comme donneur d'azote pour la synthèse des acides aminés et les acides nucléiques. Grace aux mutations inhibitrices de Rb et activatrices de Myc, Les cellules cancéreuses surexpriment les récepteurs à glutamine et leur utilisation (Altman *et al.*, 2016). Par ailleurs, Un niveau élevé de protéines transporteuses de glucose (GLUT) est observé dans de nombreux cancers, favorisant l'entrée du glucose dans les cellules (Szablewski, 2013). L'activation de HIF, la signalisation aberrante de PI3K/Akt/mTOR et les signaux oncogènes KRAS, BRAF et C-myc sont à l'origine de la surexpression de GLUT 1, de l'hexokinase 2, de la phosphofructokinase, de la lactate déshydrogénase A et la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (Schiliro et Firestein, 2021 ; Hay, 2016 ;). Une fois dans la cellule cancéreuse, le glucose est principalement dirigé vers la glycolyse car elle fournit des moyens de dévier continuellement le glucose vers les voies intermédiaires, produisant des précurseurs ou des équivalents réducteurs indispensables à la cellule tumorale (Deberardinis et Chandel, 2016). De plus les produits de dégradation du glucose et de la glutamine sont en partie bien qu'infime, dirigé vers le cycle de Krebs, servant

à générer en plus un stress modéré, favorable à la prolifération cellulaire (**Martino et al., 2023 ; Ohshima et Eiichi, 2021**).

En absence de nutriments dans le milieu environnant, les cellules cancéreuses procèdent également par macropinocytose de protéines extracellulaires, englobissement et digestion de cellules vivantes (" entose ") ou par la phagocytose de cellules voisines apoptotiques (**Pavlova et Thompson, 2016**). Le devenir du glucose au sein des cellules cancéreuses est décrit sur la Figure 8 ci-après.

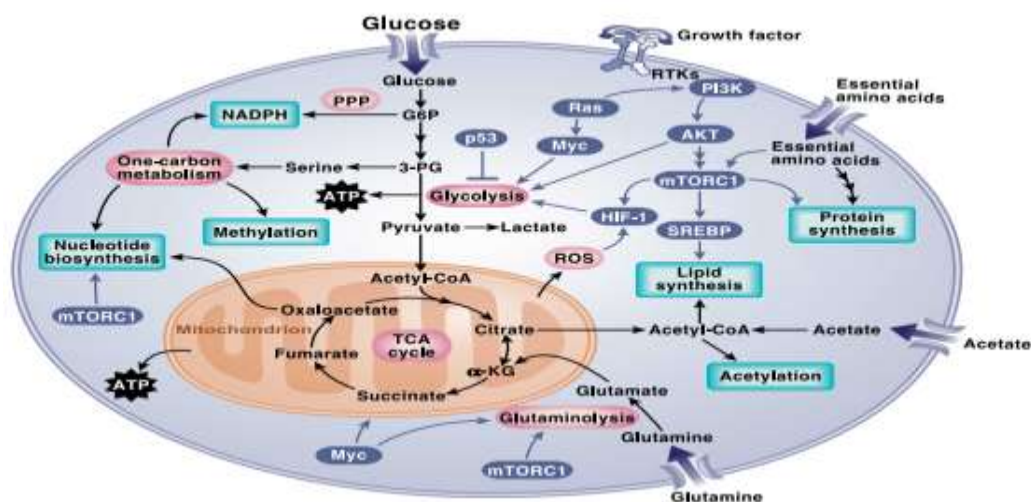


Figure 8: Reprogrammation du métabolisme énergétique chez la cellule cancéreuse et détournement des métabolites intermédiaires (**DeBerardinis et Chandel, 2016**)

I.1.2.8 Activation de l'invasion et des métastases

Il s'agit de la capacité des cellules cancéreuses à infiltrer les tissus avoisinant par la voie lymphatique et à développer de nouveaux foyers cancéreux. L'acquisition de l'aptitude invasive par les cellules cancéreuses nécessite une reprogrammation épigénétique des cellules cancéreuses conduisant à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Il s'agit d'un processus embryonnaire au cours duquel les cellules épithéliales perdent leur cohésion (perte de l'expression d'E-Cadherine), modulent leur polarité et réorganisent la structure de leur cytosquelette. Elles s'individualisent, deviennent mobiles et acquièrent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de cellules mésenchymateuses (**Hubert et Abastado, 2014**). Grâce aux intégrines qu'elles expriment, les cellules mésenchymateuses ainsi formées s'attachent à la membrane extracellulaire basale en se liant aux molécules telles que la fibronectine et le collagène qui s'y trouvent. Puis sous l'action du TGF- α , de PDGF et du stress oxydatif associé, les adipocytes et des fibroblastes résidents vont être activés (**Teillaud, 2014**). Ces derniers vont produire les protéases de types métalloprotéines de la matrice (MMP) ou uPA (urokinase plasminogen activator), qui vont dégrader la matrice

extracellulaire, assurant l'intravasation des cellules invasives (**Massagué et Obenauf, 2016**). Une fois dans les capillaires, elles formeront des agrégats avec les plaquettes pour assurer leur survie et leur migration (**Stegner et al., 2014**). Les cellules cancéreuses pourront également bloquer la circulation, s'attacher à la membrane endothéliale, développer une microvascularisation pour assurer leur extravasation dans le nouveau site (**Alix-Panabières et Pantel, 2016; Lorusso et Rüegg, 2012**). les cellules extravasées retrouveront leur caractéristiques épithéliales favorables à la formation du nouveau foyer cancéreux par micro et macro métastase respectivement, ceci sous l'action des facteurs de croissances produits par l'hôte (**Peinado et al., 2012**).

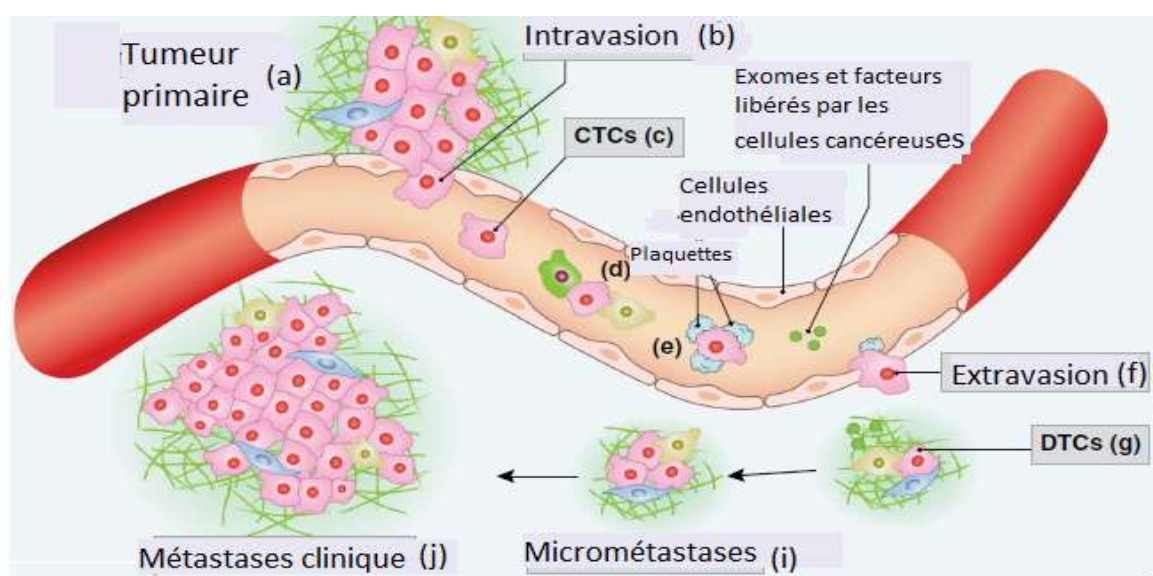


Figure 9: Etapes de formation des métastases (**Martino et al., 2023**)

I.1.3 Etapes de développement du cancer

La maladie évolue le plus souvent lentement et progressivement, parfois à partir d'une lésion précancéreuse vers une tumeur maligne infiltrante, d'abord localisée après une phase occulte parfois longue. La tumeur envahit l'organe qui lui a donné naissance puis les organes de voisinage. Peuvent survenir des métastases via un essaimage à distance par voies lymphatique ou sanguine, celles-ci étant la principale cause de décès par cancer (**His, 2016**). De manière générale, l'acquisition de nouvelles caractéristiques par les cellules cancéreuses se fait en 3 étapes résumées par la Figure 10 ci-dessous :

- **L'initiation** marquée par des altérations irréversibles de l'ADN en réponse à un ou plusieurs agent(s) mutagène(s) (polluants chimiques, radiations ionisantes...). Ces altérations affectent pour la plupart les proto-oncogènes par activation et les gènes suppresseurs par inhibition (**Lemaire et al., 2020**).

- **La promotion** pendant laquelle la cellule initiée va proliférer de manière incontrôlée à la suite d'altérations épigénétiques et sous le contrôle des facteurs de croissance pour former des foyers pré-cancéreux ;
- **La progression** au cours de laquelle la prolifération est continue, les gènes suppresseurs de tumeurs perdent complètement leur activité. Par ailleurs, il se produit une sur-activation des métallo-protéases permettant le remodelage de la matrice extracellulaire (Gialeli *et al.*, 2011). Ceci permet donc à la tumeur néoformée de se développer un réseau vasculaire pour satisfaire le besoin en oxygène et en nutriments de ses cellules, et d'être capable d'envahir les tissus environnants pour former de nouveaux foyers (Basu, 2018).



Figure 10: Etapes de la cancérogenèse (Gialeli *et al.*, 2011)

I.1.4 Prévalences

Parmi les maladies non transmissibles (MNT), la charge globale des cancers a grandement augmenté ces dernières années, les plaçant en deuxième position après les maladies cardiovasculaires (Chanika *et al.*, 2020). Le Cancer est responsable d'environ 30% des décès prématurés liés aux MNT chez les adultes de 30-69 ans. En 2022 dans le monde, les statistiques GLOBOCAN estiment à 19 976 499 le nombre de nouveaux cas de cancers (Ferley *et al.*, 2024), soit 1,9 millions de plus d'en 2018 (Bray *et al.*, 2018). 9 664 889 des cas étaient diagnostiqués chez les femmes contre 10 311 610 chez les hommes. Les types les plus répertoriés étaient les cancers du poumon (12,4%), du sein (11,5%) et le cancer colorectal (9,6%). Sur 9.958.133 cas de décès causés par les cancers, celui du poumon (18,7%) est reconnu comme la principale cause ; puis viennent les cancers colorectal (9,3%), hépatique (7,8%) et mammaires (6,8%). Les prévision estiment environ 35 millions de nouveaux cas d'ici 2050 (Ferley *et al.*, 2024).

En Afrique, 1 185 216 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués. Les cancers gynécologiques étant les plus répertoriés ; notamment les cancers du sein (16,8%), de col de

l'utérus (10,6%) et de la prostate (8,7%). En termes de décès, environ 29% des patients sont décédés ces 5 dernières années. Le cancer du sein a fait plus ravages avec suivit des cancers de la prostate et du foie (**Ferley et al., 2024**).

Le Cameroun a présenté les mêmes tendances que l'Afrique en générale. Cependant, une baisse du nombre de nouveaux cas de 1181 a été noté entre 2020 et 2022 (**Ferley et al., 2024 ; 2021**).

Au regard de ces statistiques, fort est de constater que les cancers gynécologiques (cancer du sein en particulier) sont les plus à craindre en Afrique et au Cameroun en particulier; d'où la nécessité d'y accorder un intérêt particulier.

I.2 Le cancer du sein

La glande mammaire est une glande exocrine qui se développe chez la femme du stade fœtal jusqu'à sa ménopause. Tout au long de la vie, l'évolution de la glande est déterminée par des cycles de croissance et de différenciation de ses cellules épithéliales. Ceci augmente le risque que celles-ci accumulent des erreurs lors de la réplication des chromosomes. Une accumulation de ces erreurs peut être à l'origine des pathologies dont le cancer du sein qui est la plus à craindre (**Feng et al., 2018**).

En 2022, le cancer du sein occupait le premier rang avec environ 11% de cas sur le nombre total de cancers diagnostiqués dans le monde, soit 2.480.675 nouveaux cas (**Ferley et al., 2024**). Au Cameroun, il représente plus du tiers des cancers diagnostiqués chez la femme depuis 2020. Sa prévalence a augmenté de 2,3% et le nombre de décès de 1,9% entre 2020 et 2022 (**Ferley et al., 2024 ; 2021**). Les études menées par **Engbang et al. (2015)** dans quelques régions du pays avaient révélé que le carcinome invasif était la forme la plus rependue de la maladie et les femmes en âge de procréer les plus atteintes.

I.2.1 Anatomie du sein et de la glande mammaire

Le sein est un organe pair qui se développe davantage chez la femme dès l'âge pubère, et se présente sous forme atrophié chez l'homme. Il est situé sur la partie supérieure du corps et repose sur le muscle pectoral entre la 2^e et la 6^e côte (**Bistoni et Farhadin 2015**).

I.2.1.1 Composition tissulaire du sein

De l'extérieure vers l'intérieure, le sein est constitué de la peau (dont le derme est lié au fascia superficiel) ; du parenchyme mammaire, du complexe mamelon-auréole et du fascia profond.

Le parenchyme mammaire est constitué de 3 tissus principaux que sont l'épithélium glandulaire, le stroma fibreux et le tissu conjonctif de soutien auxquels s'ajoute la graisse. Le tissu épithélial est constitué de 15 à 20 lobes, eux même contenant 20 à 40 lobules. Ces dernières contiennent chacune 10 à 100 acini (petits conduits terminaux) qui sont le siège de production du lait. Le conduit épithélial est constitué de cellules myoépithéliales qui sont chargées de transporter le lait tout au long du conduit. Au niveau du complexe mamelon-auréole, les conduits s'élargissent pour former les sinus lactifères, et le lait est excrété à travers les orifices mamelonnaires (10 à 15). La glande mammaire est ainsi constituée d'un réseau interconnecté entre les lobules et les canaux (**Bazira et al., 2024 ; Javed et Lteif, 2013**). Les 2 autres tissus forment le ligament de Cooper qui est un ensemble de fibres traversant la glande mammaire et s'insérant dans le derme pour la soutenir (**Bistoni et Farhadi, 2015**).

De plus, des structures neuro-vasculaires traversent le sein. Ils sont constitués des artères, des veines, des neurones (sensitifs) et des vaisseaux lymphatiques. Ces structures se rejoignent dans les ganglions axillaires, qui sont des structures contigües au sein (**Bazira et al., 2024**).

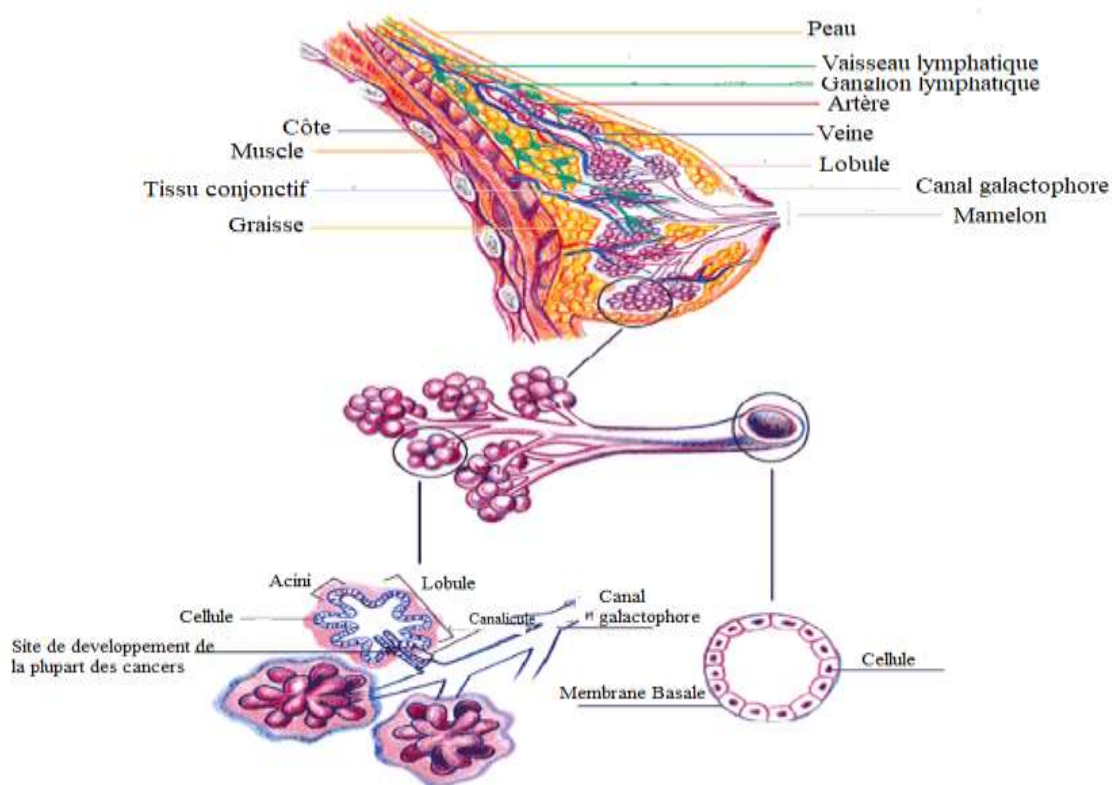


Figure 11: Anatomie du sein et de la glande mammaire (Bistoni et Farhadi, 2015)

1.2.1.2 Mammogenèse

Le développement de la glande mammaire est un processus qui commence au stade fœtal et est modifié selon le stade gynécologique de la femme. Avant la puberté, le système excréteur de la glande mammaire ne contient pas d'acinus. A la puberté, le développement de la glande mammaire est sous l'influence des estrogènes et de la progestérone. En effet, à cette période, l'axe hypothalamo-hypophysaire devient peu sensible au rétrocontrôle négatif des estrogènes. Ceci concourt à une augmentation de la libération de l'hormone de libération des gonadotrophines *GnRH* (*gonadotrophine releasing hormone*) par l'hypothalamus. Il s'en suit une libération des gonadotrophines *FSH* (*folicle-stimulating hormone*) et *LH* (*luteinizing hormone*) par l'antéhypophyse. Ces dernières en se fixant sur leurs récepteurs ovariens vont stimuler la libération des estrogènes et de la progestérone. Au niveau de la glande mammaire, la progestérone va stimuler le développement lobulaire et la différenciation épithéliale tandis que les estrogènes vont stimuler le développement canalaire (Bistoni et Farhadi, 2015). Pendant la grossesse et la lactation, la prolactine est en majeure partie responsable de la régulation à la hausse des récepteurs hormonaux, le développement épithélial et la galactogénèse (Brunicardi et al., 2005).

En dehors des estrogènes, la progestérone et la prolactine, d'autres facteurs de croissance agissent également sur le développement de l'épithélium mammaire. L'IGF (*insuline-like growth factor*) est produit par les cellules mammaires elles-mêmes et agit sur leur croissance (Neville *et al.*, 2013). L'EGF (*epidermal growth factor*) et le TGF- α (*transforming growth factor alpha*) quant à eux se fixent sur les récepteurs ERB2 ou NEU, stimulant la prolifération épithéliale, la synthèse de la lame basale et inhibant la production du lait (Hynes et Watson, 2010).

La différenciation des cellules mammaires à partir de la puberté est accompagnée d'une multiplication rapide de ces dernières, augmentant pour elles le risque d'accumuler des mutations. La perpétuation de ces mutations peut conduire à l'âge adulte au développement d'un cancer du sein.

I.2.2 Facteurs de risque du cancer du sein

Plusieurs facteurs de risque entrent dans l'étiologie du cancer du sein. Les plus incriminés semblent être les facteurs liés à la reproduction et aux hormones stéroïdiennes (Basset, 2014 ; Davidson, 2013). A côté de ceux-là, on note d'autres facteurs de risques tels que la prédisposition génétique, l'adiposité, la nutrition, l'exposition aux radiations ionisantes, l'exposition aux toxines chimiques etc. (Gurer-Orhan *et al.*, 2017; Basset, 2014).

I.2.2.1 Facteurs de risques liés à la reproduction et aux hormones stéroïdiennes

L'un des facteurs de risque les plus établis du cancer du sein est l'exposition de la femme pendant toute sa vie aux oestrogènes (Davidson, 2013). Ceci implique donc la nulliparité, la puberté précoce (< 12 ans), le premier accouchement à un âge tardif (≥ 30 ans) et la ménopause tardive (> 55 ans) (Gurer-Orhan *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'utilisation des contraceptifs oraux et des traitements substitutifs hormonaux semblent également jouer un rôle dans la carcinogenèse mammaire. En effet, l'estradiol est un facteur de croissance pour les cellules mammaires ; par ailleurs, son métabolisme génère des espèces oxygénées réactives, susceptible d'induire des dommages à l'ADN selon le mécanisme illustré par la figure 12.

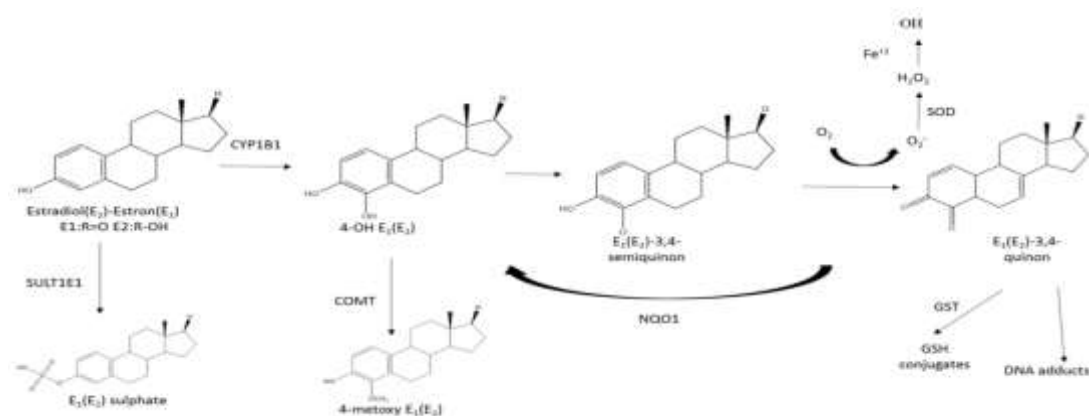


Figure 12: Métabolisme oxydatif de l'estradiol (Gurer-Orhan *et al.*, 2017)

I.2.2.2 Facteurs de risque génétiques et antécédents familiaux

Les études portant sur les antécédents familiaux et sur les jumeaux montrent l'implication importante de la susceptibilité génétique dans le développement des carcinomes mammaires. Bien que 20 à 25% des patients atteints de cancer du sein aient des antécédents familiaux positifs, seuls 5 à 10% des cas démontrent une dominance autosomale héritée (Bayraktar et Arun 2019). Les mutations les plus importantes en clinique sont associées aux gènes BRCA-1 (BRCA1), BRCA2 et de TP53 (Nunes *et al.*, 2019). Ils sont hérités de façon autosomique dominante, et plus de 50% des cas proviennent du syndrome BRCA-1 et BRCA-2. Les gènes sont en temps normal impliqués dans la réparation des lésions cellulaires dans le sein et les ovaires. Les mutations TP53 quant à elles se caractérisent principalement par la survenue de sarcomes, de carcinomes mammaires, de tumeurs cérébrales et de la surrénale. Son incidence mondiale est de 0.02 % à 0,005% (Lakhani *et al.*, 2012). A côté de ces 2 gènes, on a également une mutation des gènes PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) concourant au syndrome de Cowden, STK11 causant le syndrome de Peutz-Jegher, la neurobromatose (NF1), et l'E-cadherin (CDH-1) (Davidson, 2013).

I.2.2.3 Facteurs de risques liés à l'alimentation et au mode de vie

Il s'agit de l'alimentation, le syndrome métabolique, l'activité physique, l'alcoolisme, l'exposition aux polluants environnementaux et aux radiations ionisantes.

- L'alimentation

La consommation d'aliments riches en graisse, de viande rouge, surtout grillée a été associée à un risque accru de carcinomes mammaires (Kabat *et al.*, 2009). Par contre, le régime à base de fruits et de légumes n'est pas associé aux risques de carcinomes mammaires (Ronco *et al.*,

2010). De même, les régimes alimentaires riches en phyto-œstrogènes (présents dans de nombreux végétaux comme les fèves de soja), qui partagent des similitudes de structure avec les œstrogènes sont inversement liés à l'incidence du cancer du sein (**Mense et al., 2008**)

- **Le syndrome métabolique et l'activité physique**

Chez les femmes pré-ménopausées l'augmentation de la masse adipeuse s'associe à des cycles anovulatoires plus fréquents et donc à une exposition hormonale endogène plus faible. Cependant, le surpoids et l'obésité ont été incriminés dans 10% des cas de carcinomes mammaires chez la femme ménopausée aux Etats Unis (**Lakhani, 2012**). Les graisses viscérales sont riches en aromatase, enzyme qui converti la testostérone en estrone. Ce dernier stimule la prolifération des cellules canalaire (Tian et al., 2007). Les graisses intra abdominales quant à elles en plus de leur richesse en acides gras libres et d'adiponectine, sont une source de facteurs promoteurs de tumeurs comme le *TNF- α* , *IL-1*, *IL-6* et *IAP-1*. Par ailleurs un indice de masse corporel élevé est associé à une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie chronique, conduisant à une baisse du taux de protéine *IGF binding protein 2 (IGFBP 2)* et donc une augmentation de la biodisponibilité de l'*IGF-1* (**Capasso et al., 2010**) impliqué dans la progression tumorale.

L'activité physique impactant sur le poids corporel, un niveau d'activité physique modéré ou élevé serait corrélé à une réduction du risque de cancer du sein 15% à 20% (**Desnoyers et al., 2017**).

- **Exposition aux polluants environnementaux**

Il s'agit des agents ayant une origine chimique, notamment les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), les résidus de pesticides et le tabagisme. Ces contaminants environnementaux peuvent induire la formation de cancers en modulant les récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, particulièrement les récepteurs EGFR et erbB2. Ils peuvent également moduler des médiateurs intracellulaires tels que la protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB, la *Integrin-Linked Kinase (ILK)* et la E-cadhérine impliquées dans la communication cellulaire (**Girard, 2015**). Ces messagers secondaires ont une influence directe sur la différenciation, la prolifération, la communication et l'invasion cellulaire. Au cours du métabolisme des HAPs tel que le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA), le cycle redox des o-quinones et, dans une moindre mesure, l'activité catalytique des CYP450 peuvent induire des quantités trop importantes d'ERO (**Keyte et al., 2013**) et ainsi faciliter la création d'adduits covalents entre ADN et ces métabolites, l'induction d'un stress oxydant et une immunotoxicité (**Liamin, 2019**).

- L'alcoolisme

Le risque relatif de carcinome mammaire augmente de 7,1% pour chaque 10g d'alcool ingéré par jour. En 2020, le cancer du sein occupait la 3^{ème} place parmi les cancers causés par l'alcool avec 98300 cas (**Rumgay et al., 2021** ; Basset, 2014). Ce risque s'est avéré associé aux cancers positifs aux récepteurs hormonaux (**Clinton et al., 2020** ; **Sun et al., 2020**). Des évidences scientifiques soutiennent que, la carcinogenèse mammaire induite par l'éthanol passerait par son métabolisme oxydatif. En effet, L'acétaldéhyde issue de l'action de l'alcool déshydrogénase est capable de former des adduits avec la molécule d'ADN (**Nakamura et al., 2003**) et d'inhiber la O-méthyl-guanine transférase, enzyme responsable de la réparation de l'ADN (**Dumitrescu et Shields, 2005**). Par ailleurs, la consommation d'alcool modifie le cycle menstruel en le rallongeant et entraîne une augmentation du taux urinaire et plasmatique des métabolites estrogéniques (**Seitz et al., 2012**).

I.2.3 Physiopathologie du cancer du sein

Comme tous les types de cancers, celui de sein s'installe en 3 phases avec des modifications structurales, génétiques et moléculaires définies.

I.2.3.1 Modifications structurales associées à la physiopathologie du cancer du sein.

Après initiation de la cancérogenèse du sein sous l'influence des agents mutagènes tels que les radiations ionisantes, les polluants environnementaux et les métabolites oxydatifs, survient la promotion. Elle donne naissance au cancer du sein précoce caractérisée par une hyperplasie atypique. Elle est représentée par de lésions bénignes prolifératives et est réversible. C'est lors de l'étape de progression que les lésions malignes proprement dites s'installent. On passe ainsi à la phase intermédiaire, caractérisée par le développement d'un carcinome *in situ*, en passant par une dysplasie. Puis survient la phase finale au cours de laquelle, les cellules cancéreuses épithéliales acquièrent des propriétés invasives donnant place à un carcinome invasif ; ce dernier pouvant par la suite se disséminer dans l'organisme et former des foyers métastatiques (**Moyret-Lalle et al., 2016** ; **Kahia, 2012**). La figure 13 ci-dessous présente les modifications structurales survenant lors du développement des cancers mammaires.

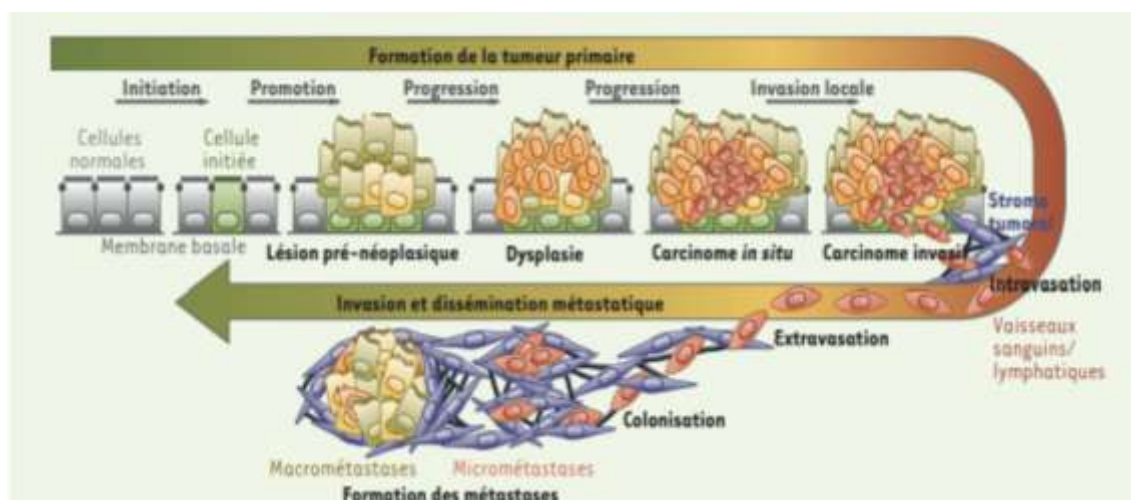


Figure 13: Modifications structurales au cours de la cancérogenèse mammaire Etapes d'évolution du cancer du sein (Moyret-Lalle *et al.*, 2016)

I.2.3.2 Altérations moléculaires dans le cancer du sein

Les altérations moléculaires dans le cancer peuvent être d'ordre génétique, épigénétique ou protéique.

I.2.3.2.1 Altérations génétiques dans le cancer du sein

Les gènes les plus fréquemment mutés et/ou amplifiés dans les cellules tumorales sont TP53 (41% des tumeurs), PIK3CA (30%), MYC (20%), PTEN (16%), CCND1 (16%), ERBB2 (13%), FGFR1 (11%) et GATA3 (10%) tel que relevé dans une série de cancers du sein précoces (Nik-Zainal *et al.*, 2016). Ces gènes codent pour des modulateurs du cycle cellulaire qui sont soit réprimés (p53) ou activés (cycline D1). Ces mutations soutiennent la prolifération et/ou inhibent l'apoptose, en activant les voies oncogènes (MYC, HER2 et FGFR1) ou en inhibant des éléments qui ne sont plus réprimés (PTEN). La plupart des cancers du sein sont causés par de multiples mutations à faible pénétration qui agissent de manière cumulative (Harbeck *et al.*, 2019).

I.2.3.2.2 Altérations épigénétiques dans le cancer du sein

Il s'agit généralement d'une hypométhylation globale, qui entraîne l'activation des gènes, la régulation positive d'oncogènes et l'instabilité chromosomique. Dans de rares cas, on assiste à une hyperméthylation de façon focale (locus spécifique), entraînant la répression des gènes et l'instabilité génétique due à la mise sous silence des gènes de réparation de l'ADN. D'autres mécanismes épigénétiques impliquent des modifications de la queue des histones par méthylation de l'ADN, induisant des modifications de la structure de la chromatine, mettant

sous silence l'expression des gènes et le remodelage nucléosomal. Ces modifications sont réversibles, médiées par des enzymes et potentiellement ciblables (Heitzer *et al.*, 2019).

1.2.3.2.3 Altérations protéiques dans le cancer du sein

Ceci concerne essentiellement les récepteurs de facteurs de croissance (récepteurs à œstrogènes, récepteurs de facteurs de croissance), les transducteurs du signal intracellulaires et les régulateurs du cycle cellulaire.

a) Altération de la voie des récepteurs à œstrogènes

Les récepteurs à œstrogènes (RE) sont surexprimés dans environ 60 % des cancers du sein invasifs (Malhotra *et al.*, 2010). Il en existe les isoformes α (RE α) et β (RE β) ; les RE α sont impliqués dans les processus de prolifération associé au cancer du sein, tandis que les RE β exercent un effet contraire (Fuentes *et al.*, 2019). Ce sont des facteurs de transcription nucléaires détectables dans la membrane plasmique, le cytoplasme et le noyau.

➤ Voie génomique d'action des récepteurs à œstradiol

L'action génomique ou classique du RE α a lieu dans le noyau. Après activation des RE α cytosolique par son ligand, le RE α se lie de manière coordonnée avec un certain nombre de protéines co-régulatrices aux éléments de réponse aux œstrogènes dans la région promotrice des gènes sensibles aux œstrogènes. Ceci dirige à son tour la transcription ou la répression de nombreux gènes favorisant la croissance (Williams et Lin, 2013). Ainsi, au niveau du noyau, le RE α peut activer l'action transcriptionnelle de *Stimulating protein-1* (Sp-1), aboutissant à l'expression des récepteurs à *Low Density Lipoprotein* (LDL), les récepteurs B à progestérone, l'oxyde nitrique synthase endothéliale et *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT 5). Le RE peut également se fixer à la sous-unité c-rel de NF- κ B, inhibant ainsi son action transcriptionnelle. Il peut aussi interagir avec les modulateurs transcriptionnels tels que *activating transcription factor* (ATF)-2, *c-jun*, ATF-1/cAMP response element binding protein (ATF-1/CREB), et le *nuclear transcription factor-Y* (NF-Y) (O'Lone *et al.*, 2004). Par ailleurs, Le RE α peut induire l'expression des gènes contenant les sites pour le facteur de transcription *activator protein-1* (AP-1). Ce dernier étant impliqué dans la régulation des processus tels que la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Fuentes *et al.*, 2019). Ainsi, l'AP-1 peut induire l'expression de l'IGF-1 et son récepteur, la collagénase, ovalbumine et la cycline D1.

➤ Voie non génomique d'action des récepteurs à œstradiol

L'action non génomique des RE est extrêmement rapide après l'exposition des RE membranaire aux œstrogènes. Au niveau de la membrane plasmique, il existe des RE 1

couplés à la protéine G (REPG1) qui agissent par activation des voies de transduction intracellulaire du signal (**Prossnitz et Barton, 2011**). Ces voies concourent à la production des seconds messagers, la régulation de l'AMPc, l'activation des protéines kinases via les cascades de signalisation (**Lösel & Wehling, 2003**). Cette dernière peut se faire à travers la voie de la protéine kinase C (PKC), la cascade Ras/Raf/MAPK, la cascade PI3K/Akt ou la voie AMPc/PKA (**Fuentes et al., 2019**). Par ailleurs les REGP1 peuvent promouvoir l'activation dépendante des estrogènes de l'adenylate cyclase et de l'EGFR ; ceci conduisant à une phosphorylation activatrice des voies de signalisation susmentionnées avec pour point culminant, l'activation des facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes cibles (**Arnal et al., 2017 ; Levin, et Pietras, 2008**). Ces facteurs de transcription peuvent être *Elk-1*, CREB, *CCAAT-enhancer-binding protein beta* (C/EBP β), le complexe *NF- κ B* et la famille des *STAT* (**Cavalcanti, et Porto, 2015; Furth, 2014; Laliotis et al., 2013 ; Kousteni et al., 2003**).

b) Altération de la voie des récepteurs de facteur de croissance

Le gène des récepteurs du facteur de croissance épidermique est muté dans certains cancers mammaires. Il s'agit d'une famille des 4 récepteurs transmembranaires étroitement liés EGFR/ErbB1, HER2, HER3/ErbB3, et HER4/ErbB4, structurés par deux domaines extracellulaires riches en cystéine et un domaine transmembranaire de liaison au ligand (**Hynes et MacDonald, 2009**). Parmi ces récepteurs, le gène HER2/ErbB2/neu est amplifié et/ou sa protéine surexprimée dans 13-15% de tous les cancers du sein invasifs primaires (**Harbeck et al., 2019**). Ces récepteurs sont spécifiques à une large gamme de ligands dont l'EGF et le TGF- α . L'interaction ligand-HER2 conduit à des changements conformationnels, associé à une homo ou hétéro-dimérisation (**O'Donovan et al., 2011**). Il s'en suit une transphosphorylation des résidus tyrosine situés sur les domaines intracellulaires. Les tyrosines phosphorylées vont recruter de nombreux transducteurs de signaux tels que la protéine RAS. Elles pourront activer une multitude de voies de signalisation en aval à travers MAPK et PI3K pour assurer la survie prolongée des cellules, la prolifération, la motilité accrue, l'invasion et les métastases (**Song et Hu, 2017 ; Hynes et MacDonald, 2009**)

c) Les voies de second messenger

Les évidences scientifiques suggèrent que les voies PI3K/AKT et Ras-MAPK sont particulièrement importantes dans le cancer du sein en raison de la fréquence des mutations, de l'amplification et/ou de l'activation de ces voies.

- **Mutation de la voie PI3K-AKT/mTOR**

PI3K-AKT/mTOR est une voie de signalisation centrale en aval de nombreuses tyrosine kinases réceptrices, ou des récepteurs couplés aux protéines G, qui régule le métabolisme, la croissance, la prolifération cellulaires et l'angiogenèse (Miricescu et al., 2020). Les mutations activatrices de la famille des gènes AKT (protéine kinase B) sont observées dans 2 à 4 % des cancers du sein. Plus particulièrement, environ 80% des cancers du sein hormonaux présente des mutations de cette voie, 39% des cancers positifs aux récepteur HER2 et 8–25% des cancers triples négatifs (Prever et al., 2021). L'hyperactivation de AKT est d'une part due à la mutation de PTEN, responsable de son inactivation par déphosphorylation, ou de la mutation de sa sous unité catalytique p110 α . Cette dernière conduit à l'activation de la voie PI3K, concourant à l'activation par la kinase 3-phosphoinositide-dépendante, de plusieurs kinases connues, notamment les protéines kinases B (AKT1, AKT2 et AKT3). Les AKT activées vont faire perdre aux protéines membranaire leur connexion avec la membrane cellulaire ; il va s'en suivre leur relargage dans le cytosol où elles vont phosphoryler les protéines cytosoliques et celles de la membrane nucléaire ; stimulant ainsi la survie et la croissance cellulaire (Miricescu et al., 2020).

Par ailleurs, les effecteurs prolifératifs en aval de la voie PI3K comprennent *Forkhead box other 1* (*Foxo 1*), le complexe *mTOR* composé de mTOR, raptor et *mamalian lethal with SEC13 protein* (mLST8) (Miricescu et al., 2020 ; Lien et al., 2016). Ce complexe active la S6-kinase 1 (activateur de la protéine S6 ribosomale) et la suppression de 4E-BP1, un inhibiteur de la traduction cap-dépendante. Il s'en suit une surproduction des ribosomes et une synthèse des protéines favorisant la croissance cellulaire. *Foxo 1* quant à lui est impliqué dans la synthèse des enzymes de la neoglucogenèse, l'inhibition de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphate et de la formation des triacylglycérols (Lien et al., 2016).

- **Mutation de la voie Ras-MAPK**

Bien que seulement 2 % des cancers du sein humains présentent des mutations *RAS*, plusieurs RTK associés au cancer du sein tels que l'*EGFR*, l'*IGF-1R*, et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (*PDGFR*) peuvent maintenir *RAS* dans un état d'activation favorisant la progression néoplasique (Saini et Piccart-Gebhart, 2013). Encore appelée GTPase car liée au guanosine diphosphate (GDP) dans leur forme actives, les petites protéines *RAS* conduisent une série de phosphorylation en allant de Raf à *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (*ERK*), en passant par *Mitogen-Activated, Extracellular-Signal Regulated Kinase* (*MEK*). Après activation, les kinases *ERK1/2* catalysent la phosphorylation de nombreux substrats dont certains sont localisés dans le cytoplasme, au niveau d'organites

intracellulaires et d'autres dans le noyau après translocation de ERK1/2. Il active de ce fait certains facteurs de transcription comme *Ets1/2*, *c-Myc*, *c-Jun* qui sont impliqués dans l'initiation et la régulation de la prolifération et dans la transformation oncogénique (Chauvin, 2015 ; Shaul & Seger, 2007). Une signalisation aberrante de la voie RAS se produit dans environ 50 % des tumeurs mammaires en raison d'une signalisation constitutive en amont (comme dans le cas de la surexpression de HER) (Nolan *et al.*, 2023).

d) Dérégulation du cycle cellulaire

L'axe cycline D1-CDK4/6-RB est le régulateur clé de la transition G1-S du cycle cellulaire. Plusieurs voies mitogènes pertinentes pour le cancer du sein, y compris les voies de signalisation des œstrogènes et HER2-PI3K, augmentent l'activité de CDK4/6 par une régulation transcriptionnelle à la hausse de CCND1 (qui code pour la cycline D1) ou par la stabilisation post-traductionnelle de cette cycline. De plus, l'amplification de CCND1 et de CDK4 est fréquemment observée dans les cancers du sein luminal B (80 %) et HER2+ (60 %) (Nolan *et al.*, 2023). Contrairement aux cancers luminal, l'activation du cycle cellulaire dans les tumeurs de type *basal-like* se fait par perte de RB1 (TCGA, 2012), les rendant ainsi non sensibles aux inhibiteurs de CDK4/6. En effet, la liaison physique des cyclines de type D (D1, D2 ou D3) à la CDK4 ou à son homologue CDK6, entraîne une activation enzymatique de CDK4/6, qui phosphoryle ensuite la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (Rb). Ceci entraîne l'inactivation de la fonction antiproliférative de Rb à la fin de la phase G, et la libération des protéines prolifératives que sont les facteurs de transcription E2F. Non seulement les protéines Rb sont mutées dans le cancer du sein, mais la signalisation par le réticulum endoplasmique augmente l'expression de la cycline D1, activant les CDK et phosphorylant Rb, favorisant ainsi la prolifération tumorale (Lim et Kaldis, 2013 ; Roy *et al.*, 2010). La résistance aux inhibiteurs de CDK4/6 survient par des mécanismes pléiotropes incluant la perte de RB, l'activation de cycline E-CDK2, la cooptation d'autres CDK comme CDK7, et l'activation d'autres voies oncogéniques, y compris RAS/MAPK et PI3K/AKT (Goel *et al.*, 2022).

La figure 14 ci-dessous résume les différentes aberrations moléculaires survenant dans la cancérogenèse mammaire.

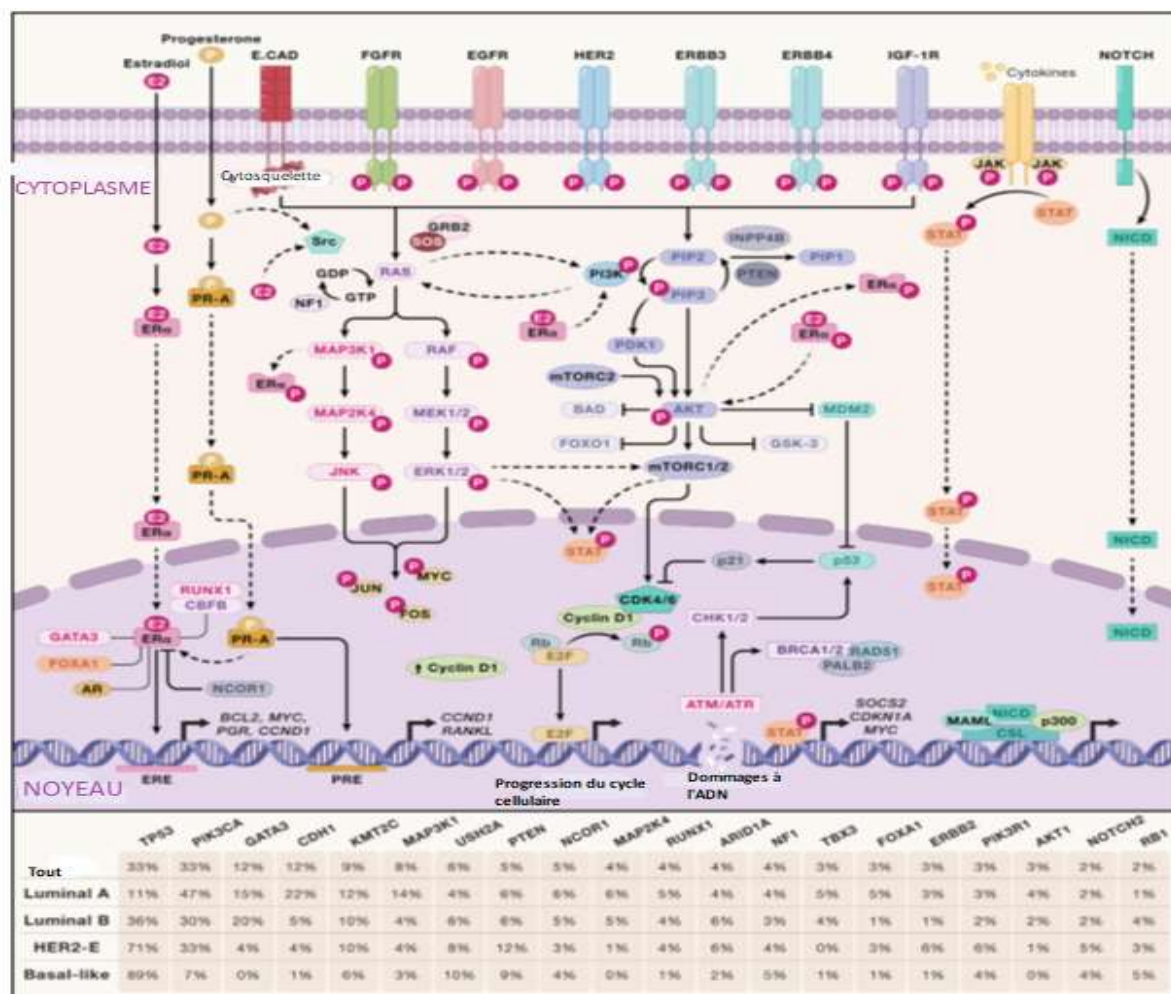


Figure 14: Altération moléculaires dans le cancer du sein du signal dans le cancer du sein (Nolan *et al.*, 2023)

I.2.4 Diagnostic du cancer du sein et classification des tumeurs mammaires

Le diagnostic du cancer du sein part de l'observation des signes cliniques généralement fait par le patient lui-même, aux examens histopathologiques, en passant par les examens d'imagerie médicale.

I.2.4.1 Manifestations cliniques

Le cancer du sein ne présente généralement aucun symptôme lorsque la tumeur est petite. Une fois que la tumeur a atteint une taille qui peut être ressentie, une bosse indolore est le signe physique le plus courant (Farhadihosseinabadi *et al.*, 2018). Peu à peu, d'autres symptômes peuvent se ressentir telles que (Davidson *et al.*, 2013) :

- Une anomalie de la peau se présentant sous forme de peau d'orange ;

- Une inflammation qui se matérialise par la rougeur, la chaleur et l'œdème, reflétant souvent une infiltration cellulaire tumorale des vaisseaux lymphatiques dermiques du sein ;
- Un écoulement du mamelon qui peut être d'aspect laiteux (Rarement malin), clair ou sanguinolent.

Ces différents symptômes sont généralement constatés par le patient même lors de l'examen physique d'autopalpation. Ces signaux d'alerte poussent le clinicien à prescrire des examens plus poussés tel que la mammographie. A cette dernière, est souvent ajoutée une biopsie exérèse de toute zone suspecte. Si les résultats sont normaux, une échographie ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) pourront exclure la faible probabilité de tumeur maligne.

1.2.4.2 Examens d'imagerie médicale

Les examens d'imagerie médicale incluent la mammographie, l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique.

a) Mammographie

Il s'agit de l'examen radiologique du sein. Elle est utilisée sur une patiente présentant des signes cliniques ou des symptômes de maladie du sein et sur une personne pour laquelle une évaluation plus approfondie a été demandée en raison d'un dépistage anormal ou pour le suivi de résultats d'imagerie antérieurs (**American College of Radiology, 2014**). Par ailleurs les femmes ayant des antécédents personnels de cancer du sein et traitées par conservation du sein peuvent choisir de subir une mammographie de diagnostic. Puisque l'apparence du tissu mammaire normal varie sur la mammographie, la comparaison avec des mammographies antérieures est extrêmement précieuse et peut permettre au radiologue de détecter une malignité subtile en développement. En outre, des vues mammographiques supplémentaires notamment les vues latérales vraies, les vues cranio-caudale roulées, les vues cranio-caudales exagérées, les vues tangentielles et les vues de clivage sont nécessaires pour permettent de mieux caractériser la lésion et son emplacement (**Ganott et al., 2019**).

b) Echographie

Il s'agit d'une technique d'analyse qui utilise des ultrasons et permet de générer des images plus précises de la partie interne des seins et des ganglions. Elle est essentielle pour l'imagerie des anomalies non visibles à la mammographie (**Gharekhanloo et al., 2018**). Elle est précieuse pour guider les biopsies à l'aiguille des lésions suspectes et aspirer les

collections de liquide. Elle peut également être utilisée pour suivre les lésions peu suspectes et pour évaluer la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. En plus de cela, l'élastographie et la sonographie Doppler sont des outils connexes permettant une caractérisation plus poussée, afin de pouvoir classer correctement une lésion en fonction de sa rigidité et de sa vascularisation **Ganott et al., 2019**).

c) Imagerie par résonance magnétique

Le Collège Américain de Radiologie (**ACR, 2014**) recommande un dépistage annuel par IRM en complément de la mammographie pour les patientes présentant une mutation connue du gène BRCA, les patientes non testées dont un parent au premier degré est porteur d'une mutation BRCA, Les patientes considérées comme à haut risque avec un risque calculé de 20 % ou plus sur la durée de vie, celles qui ont des antécédents d'irradiation thoracique avant l'âge de 30 ans, ainsi que les patientes présentant les gènes Li-Fraumeni, Cowden et Bannayan-Riley-Ruvalcaba et leurs parents au premier degré (**National Comprehensive Cancer Network, 2017**). L'IRM est également employée pour guider l'aiguille à la biopsie des lésions uniquement détectables par résonance magnétique (**Ganott et al., 2019**).

I.2.4.3 Analyse histopathologique et diagnostic moléculaire

Elle va de l'observation des cellules colorées à l'hématoxyline/éosine, à l'analyse des marqueurs moléculaire par immunohistochimie pour déterminer le type moléculaire. D'autres méthodes consistent en la culture des fragments tissulaire, suivit de la mesure des taux d'expression des gènes par RT-PCR (**Cao et al., 2016**). L'interprétation des résultats de cette analyse devrait s'inspirer de la classification des tumeurs mammaires établie par l'OMS.

a) Histologie à l'hématoxyline et éosine (H&E)

Ces colorants histologiques permettent de mettre en évidence le cytoplasme (éosine), le réticulum endoplasmique granuleux et le noyau (Hématoxyline). Ce test est fait sur de fines couches de tissu mammaire sous paraffine et permet de renseigner sur le type de lésion pathologique du sein (**Nengtai et Lin, 2016**).

b) Analyse immunohistochimique

Cette analyse a permis de mettre en évidence des types moléculaires de cancers du sein. Elle est basée sur la recherche des marqueurs moléculaires tels que les récepteurs à estrogènes (RE), les récepteurs à progestérone (RP), le récepteur du facteur de croissance épidermique humain (HER-2) et les marqueurs de prolifération telle que la cytokératine, Ki-67 (**Prat et Perou, 2011**). A côté de ces marqueurs, l'antigène cancéreux 15-3 (CA 15-3),

l'antigène carcino-embryonnaire, l'activateur de l'urokinase plasminogène et ses inhibiteurs sont également analysés comme marqueurs tissulaires pronostic (He *et al.*, 2020).

I.2.4.4 Typologie des tumeurs mammaires

La classification des cancers du sein a évolué au fil des années, les unes et les autres se complétant. On distingue de ce fait une classification histologique, moléculaire et fonctionnelle du cancer du sein.

a) Types histologiques des tumeurs mammaires et grades

La classification histologique des tumeurs mammaires est en première ligne basée sur son niveau d'expansion et le type de cellules impliquées. On distingue dans ce cas les tumeurs in-situ (localisée) des tumeurs infiltrantes ou invasives, et les tumeurs lobulaires des tumeurs canalaire (Malhotra *et al.*, 2010). En fonction de l'architecture cytologique à l'histologie des tumeurs canalaire *in-situ*, des sous-types ont également été répertoriés (Figure 15).

Les grades histologiques basé sur le niveau de différenciation, sont généralement appliqués aux carcinomes invasifs de tout type. Trois caractéristiques tumorales sont évaluées : la formation de tubules comme expression de la différenciation glandulaire, le pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses. Un système de notation numérique de 1 à 3 est utilisé

- Lors de l'évaluation des tubules et des acini glandulaires, seules les structures présentant des luminescences centrales claires entourées de cellules néoplasiques polarisées sont comptées ; les points de coupure (PC) de 75% et 10% de la surface glandulaire/tumorale sont utilisés pour attribuer le score ($PC > 75\% = 1$, $10\% \leq PC \leq 75\% = 2$, $PC < 10\% = 3$) ; (Tavassoli et Devilee, 2003)

Le pléomorphisme nucléaire est quant à lui évalué pour la zone présentant le plus mauvais degré de pléomorphisme. Il est évalué par rapport à la régularité de la taille et la forme des noyaux des cellules épithéliales normales dans le tissu mammaire adjacent. Les noyaux de score 1 ont une taille très similaire ($< 1,5$) à celle des cellules épithéliales bénignes préexistantes et présentent un pléomorphisme minimal. Les noyaux de score 2 sont 1,5-2 fois la taille des noyaux des cellules épithéliales bénignes, avec un pléomorphisme léger à modéré et des nucléoles visibles. Le score 3 correspond aux noyaux de taille plus de 2 fois supérieure à celle des cellules épithéliales bénignes, avec une chromatine vésiculaire ; (Cioroboreanu et Lazăr 2012).

- Enfin, le comptage mitotique est effectué pour la zone présentant le plus de prolifération. Seules les figures mitotiques définies excluant les noyaux hyperchromatiques et pyknotiques seront comptées. La sélection du champ pour le comptage des mitoses doit se faire à partir du bord périphérique de la tumeur afin de trouver la zone avec la plus grande activité mitotique, et seuls les champs présentant une charge en cellules tumorales représentative doivent être évalués (Ellis et Elston, 2006).

La somme des scores issus des 3 paramètres permettra de définir 3 grades tumoraux dont le grade I (2-5 points) bien différencié, le grade II (6-7 points) modérément différencié et le grade III (8-9 points) faiblement différencié (Cioroboreanu et Lazăr 2012).

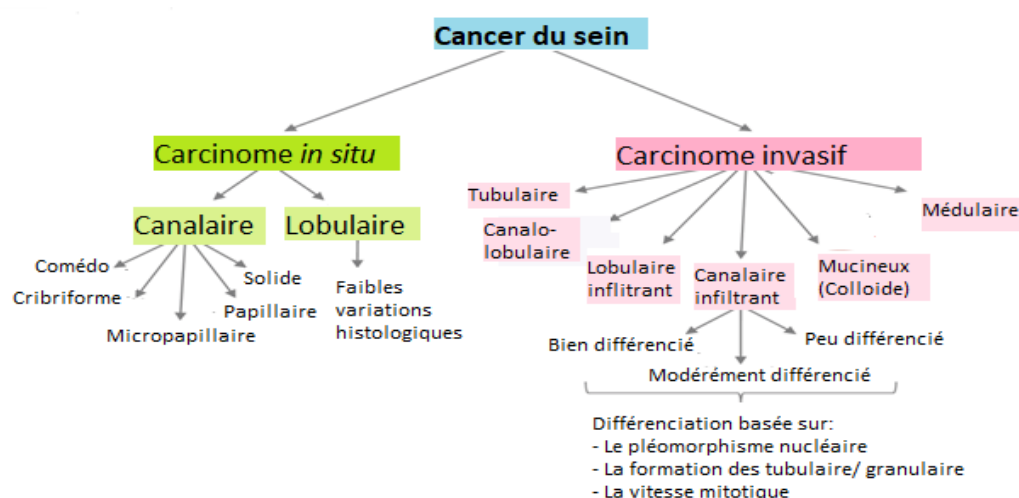


Figure 15: Classification histologique des tumeurs du sein (Malhotra et al., 2010)

b) Types moléculaires des tumeurs mammaires

Dans l'optique d'affiner les pronostics de réponses aux traitements, l'association des marqueurs moléculaires à l'histologie (immunohistochimie) a fait naître une autre classification des carcinomes mammaires (Figure 16). Elle tient en compte en première ligne le niveau d'expression des récepteurs à estrogènes (RE), les récepteurs à progestérone (RP), et *human epidermal growth factor receptor* (HER). A côté de ceux-là, il y'a des marqueurs émergents tel que le taux de claudine, et les marqueurs de la prolifération tel que Ki-67 (McDonald et al., 2016). Statistiquement, environ 70% des cancers mammaires sont RE+ (Nolan et al., 2023).

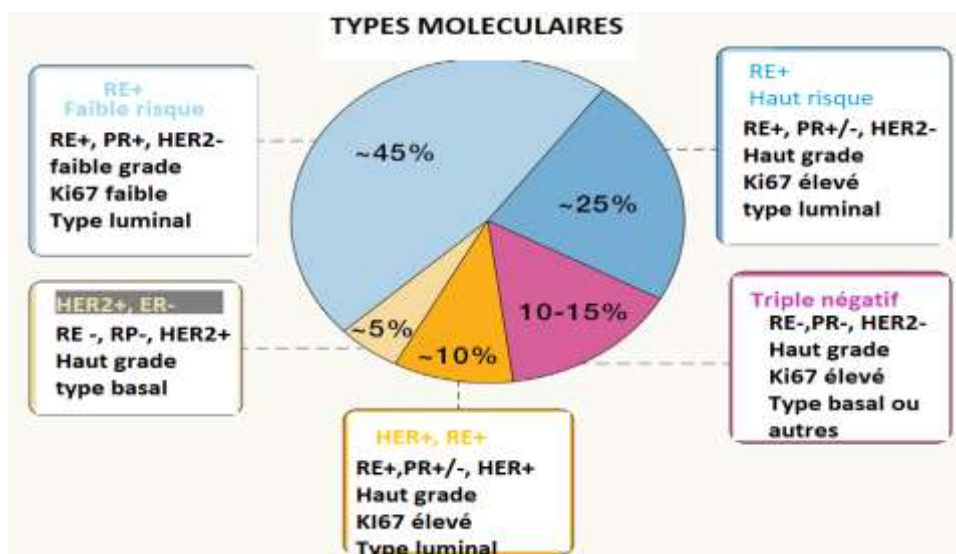


Figure 16: Classification moléculaire du cancer du sein (Nolan *et al.*, 2023).

c) Classification fonctionnelle du cancer du sein

Cette classification est basée sur l'origine des cellules responsables de l'initiation et la progression tumorale, appelées cellules souches cancéreuse (CSC). Elles sont discriminées des autres cellules cancéreuses ayant un potentiel tumorigène plus faible. 2 hypothèses ont donc été prise en considération ; l'une stipulant que, les CSC responsables des différent sous-types moléculaires du cancer du sein proviennent des cellules normales dans la hiérarchie des cellules souches, tandis que l'autre soutient que ces CSC proviennent d'une cellule souche commune (Malhotra *et al.*, 2010).

d) Les phases d'évolution de la maladie

Dans le but d'assurer une meilleure politique de prise en charge, le stade de la maladie est défini en tenant compte de la taille de la tumeur (T), la présence des nodules ganglionnaires (N) et les métastases (M). Ces paramètres ont donc permis de stratifier les tumeurs mammaires en 8 stades (Farhadihosseinabadi *et al.*, 2018; Davidson, 2013).

Tableau I: phases d'évolution selon le critère Taille de la tumeur, présence des nodules et Métastases

Stades	Catégorie TNM
0	TisN0M0 Tis : carcinome canalaire/ lobulaire invasif ou maladie de Paget
I	T1N0M0 , T1 : tumeur de plus grande dimension < 2 cm T0N1miM0/ T1N1miM0 N1 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux et non mobilisable
IIA	T1N1M0 N1 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux et mobilisables T0N1M0/ T2N0M0 , T2 : Tumeur > 20 mm mais ≤ 50 mm dans sa plus grande dimension
IIB	T2 N1M0 T3N0M0 , T3 : Tumeur > 50 mm dans sa plus grande dimension
IIIA	T0/ T1/T2N2M0 ou T3N1/N2M0 , N2 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux qui sont non mobilisables et agrégés
IIIB	T4N0 ou N1 ou N2M0 , T4 : Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau (y compris le carcinome inflammatoire)
IIIC	Tout T, N3M0 , N3 : Métastases dans les ganglions sous-claviculaires homolatéraux (niveau axillaire III) avec ou sans implication ganglionnaire axillaire de niveaux I, II
IV	Tout T, tout NM1 , M1 : Métastases à distance décelables et/ou prouvées histologiquement, et de taille supérieure à 0,2 mm

T : taille de la tumeur ; N : présence des nodules nodules ; M : présence des métastases

I.3 Modèles expérimentaux d'étude du cancer du

Trois grands modèles expérimentaux d'étude du cancer en général et celui du sein en particulier ont été développés par la communauté scientifique. Il d'agit des modèles cellulaires, les modèles *in-silico* et les modèles animaux induits.

I.3.1 Modèles cellulaires

En fonction des types moléculaires de cancers mammaires, des lignées cellulaires ont été isolées. Le tableau suivant donne une classification sommaire des lignées cellulaires de cancer du sein (Costa *et al.*, 2020).

Tableau II: Lignées cellulaires de cancer du sein et leurs caractéristiques

Lignées cellulaires		Type	Profil		Marqueurs de
		moléculaire	immunologique		prolifération
MCF-7, SUM185	T47D,	Luminal A	ER+, HER2–	PR+/-,	Ki67 bas
BT474, ZR-75		Luminal B	ER+, HER2+	PR+/-,	Ki67 élevé
SKBR3, 453	MDA-MB-	HER	ER–, PR–, HER2+		Ki67 élevé
MDA-MB-468, SUM190		Basale	ER–, PR–, HER2–		EGFR ⁺ et/ou cytokératine 5/6 ⁺ , Ki67 élevé
BT549, 231, SUM1315	MDA-MB-Hs578T,	Claudine bas	ER–, PR–, HER2–		Ki67, E-cadherin, claudin-3, -4 et -7 bas

I.3.2 Modèles animaux

En fonction de la méthode l'induction de la carcinogénèse chez les animaux, on distingue les modèles transgéniques, les modèles transplantés et les modèles chimiques

I.3.2.1 Modèle transgénique

Cette technique consiste en le transfert d'un gène cloné dans le génome des animaux, faisant naître des organismes génétiquement modifiés (OGM). Ces gènes sont capables d'induire des changements dans les cellules cultivées, conduisant au bout de 6 à 18 mois à des tumeurs dans ce modèle (**Bazm et al., 2018**). Les souris portant une modification d'un seul oncogène sont dit monogéniques, comparativement aux multigéniques portant les modifications d'au moins 2 oncogènes. Des souris transgéniques ERBB2/HER2/neu, TGFβR2, IGF-IR, c-MET sont utilisés en laboratoire comme modèles d'étude dans le cancer du sein (**Regua et al., 2021**). Il existe également des modèles transgéniques induits par des oncogènes dérivés des virus. Il s'agit notamment du modèle induit par l'antigène *Polyoma middle T*, dont la forme hyperplasique montre des niveaux élevés de ER et PR avec des niveaux plus faibles de HER2/neu. Leurs cellules tumorales PyMT perdent l'expression de ER/PR et augmentent les niveaux de HER2 au fur et à mesure de la progression intraépithéliale mammaire et/ou carcinome tardif (**Lin et al., 2003**).

I.3.2.2 Modèles transplantés

Dans cette approche, les cellules sont généralement isolées à partir du tissu tumoral de différentes manières avant d'être transplantée chez l'animal. D'une part, les lignées de cellules tumorales sont cultivées dans des milieux de culture bidimensionnels (2D) ou tridimensionnels (3D) de façon individuelle ou en co-culture (**Bazm et al., 2018**). D'autre part, ces cellules peuvent être extraites de tumeurs humaines, puis cultivées et transplantée. La xénogreffe des cellules est généralement accompagnée d'une induction hormonale pour la promotion de la croissance tumorale. Cette technique implique l'utilisation de lignées cellulaires présentant des phénotypes CD+ 44/CD-24 comme lignées cellulaires initiatrices de tumeurs. La xénogreffe de cellules tumorales est réalisée de trois façons (**Ingvarsson, 1999**) :

- Par injection sous-cutanée (SC) de cellules tumorales dans le dans le coussinet adipeux mammaire des animaux, auquel cas les cellules se reproduisent rapidement dans la région cible.
- Par injection directe des cellules dans les ganglions lymphatiques de la région (xénogreffe orthotopique) ou même dans le coussinet adipeux mammaire, ce qui s'accompagne généralement de la métastase des cellules tumorales.
- Par injection intraveineuse (IV vers la veine caudale) pour induire des métastases pulmonaires ou à d'autres organes. Dans la xénogreffe de coussinet adipeux mammaire.

Par ailleurs, des fragments tumoraux peuvent être cultivés et transplantés en sous-cutané au niveau de l'abdomen (**Rezakhani et al., 2014**)

I.3.2.3 Modèles chimiques

Les composés chimiques cancérigènes sont divisés en composés métalliques (arsenic, plomb et cadmium), hormonaux et chimiques. Les métaux comme le plomb développent différentes tumeurs de diverses manières, notamment en endommageant l'ADN et en empêchant sa synthèse et sa réparation, la formation de radicaux libres, l'augmentation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de facteurs suppresseurs de tumeurs tels que P53 (**Silbergeld et al., 2000**). Par ailleurs, **Mense et al. (2008)** ont induit un cancer du sein par administration sous-cutanée d'une dose de 3 mg d'estradiol (17 β -estradiol) avec développement d'une hyperplasie lobulaire au jour 7 et des tumeurs au jour 120.

Les composés chimiques utilisés pour induire des tissus tumoraux nécessitent des caractéristiques telles qu'une forte tumorigénicité, un tissu cible spécifique, une longue demi-vie, une disponibilité et une capacité de bioprocédé. L'une des classes les plus utilisées pour induire les tumeurs mammaires est celle des hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Bazm et**

al., 2018). Parmi elles on a le N-méthyl-N-nitroso-2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo [4,5-B] pyridine, le Methylcholanthrene et le 7,12-Diméthylbenz(a)anthracene (DMBA). Ces composés sont utilisés sous forme de promutagène, procarcinogène et tératogène. C'est à l'issue de leur métabolisme hépatique dépendamment par le cytochrome P450, que ses métabolites actifs sont produits et transférés vers les tissus cibles (**Xu et al., 2006**).

Le DMBA est l'un des plus utilisés pour induire les tumeurs mammaires seul, ou suivi par l'administration de promoteurs. Il est administré à une dose unique comprise entre 50 et 80 mg/Kg de PC par voie orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée. Ses métabolites actifs sont le 7-hydroxy méthylbenz(a)anthracene (7-OH-12-MBA) et le 7,12-diOHMBA qui peuvent former des dérivés époxydes (Figure 17). Ces 2 composés peuvent entraîner une dépurination de la molécule d'ADN, conduisant à des mutations et plus tard une tumorigenèse (**Bazm et al., 2018**). Pour accroître sa spécificité, le DMBA est administré par voie sous-cutané à des jeunes rats d'âge compris entre 4 et 7 semaines dont les cellules mammaires sont encore non différenciées (**Karimi et al., 2018**). Ceci est également favorable au développement ultérieur des tumeurs RE positives (**Tsubura et al., 2011**).

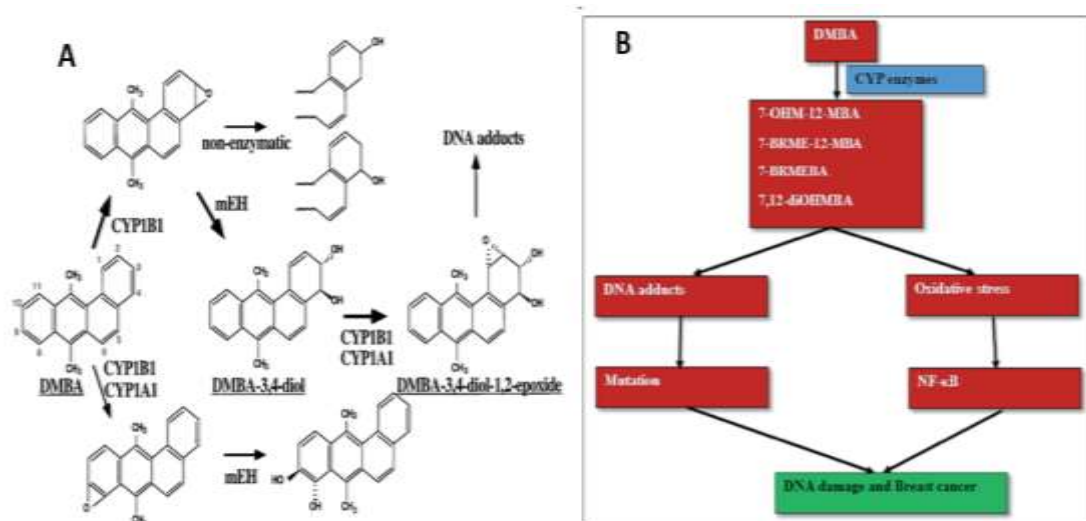


Figure 17 : Métabolisme du DMBA (A) et induction de la tumorigenèse mammaire (B) (**Bazm et al., 2018**)

I.4 Prise en charge du cancer du sein

La stratégie thérapeutique dépend du stade et les caractéristiques biologiques du cancer, l'âge du patient, et les risques et bénéfices (**Farhadhosseinabadi et al., 2018**).

I.4.1 Stratégie de prise en charge du cancer de sein précoce

La plupart des femmes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce subiront une chirurgie suivie d'autres traitements tels que la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie (endocrinienne) et/ou une thérapie ciblée en fonction du type moléculaire et des risques de récurrences (**Cardoso et al., 2016 ; Goss et al., 2016**)

a) Chirurgie

Le principal moyen de traitement local et régional du cancer du sein reste l'intervention chirurgicale qui peut être conservatrice ou totale. La chirurgie de conservation ou tumorectomie consiste à enlever la tumeur et juste une portion de tissu normal. Il existe cependant un risque plus élevé de récurrence locale chez les femmes plus jeunes (moins de 40 ans) et les patientes présentant des tumeurs plus grosses et/ou plus agressives. La chirurgie totale ou mastectomie quant à elle consiste à enlever le sein malade dans son intégralité. L'un ou l'autre procédé est généralement accompagné de l'ablation d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques régionaux de l'aisselle ; ceci dans le but de déterminer l'étendue de la maladie, et s'il faille envisager une intervention chirurgicale ultérieure, une radiothérapie ou des traitements systémiques (**McGuire et al., 2009**).

La chirurgie entraîne cependant une asymétrie mammaire, des douleurs et la raideur de l'épaule ainsi qu'une altération de l'image corporelle (**ARC, 2021**).

b) Radiothérapie

Il s'agit d'une thérapie utilisant des faisceaux ou des particules à haute énergie pour tuer les cellules cancéreuses. Cette thérapie est souvent effectuée après une intervention chirurgicale de conservation pour détruire les cellules cancéreuses restantes dans le sein, la paroi thoracique ou dans la région de l'aisselle. Elle réduit le risque de récurrence et de décès d'environ 50 % et 20 %, respectivement chez les patients ayant subi une tumorectomie. Elle est également prescrite chez les patientes traitées par mastectomie ayant une tumeur supérieure à 5 cm ou si le cancer est présent dans les ganglions lymphatiques (**McDonald et al., 2016**).

La radiothérapie entraîne une fatigue, des douleurs, des œdèmes du sein, une fibrose mammaire, une toxicité cardiaque, la rétraction mammaire et les maux de tête (**American Cancer Society, 2020**).

I.4.2 Stratégie de prise en charge des cancers avancés du sein

La prise en charge du cancer du sein métastatique doit être fonction du sous-type ainsi que des caractéristiques de la maladie et des préférences du patient. Les thérapies systémiques sont les plus sollicitées dans ce cas. Le traitement endocrinien (hormonothérapie), avec ou sans thérapie ciblée, est le pilier de la maladie de type luminal (**Pagani et al., 2014**). Dans le cas d'une maladie triple négative, la chimiothérapie est le traitement principal et doit se faire de façon séquentielle (**Minckwitz et al., 2012**). Pour les tumeurs triple-négatives associées aux cellules immunitaires exprimant PD-L1 et HER2+, les thérapies ciblées ou immunothérapies sont recommandées (**Harbeck et al., 2019**).

a) Chimiothérapie

Les médicaments de chimiothérapie sont des cytotoxines ayant pour propriété commune l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales en agissant sur le cycle. Selon les cibles les cytotoxines peuvent être (Figure 18) :

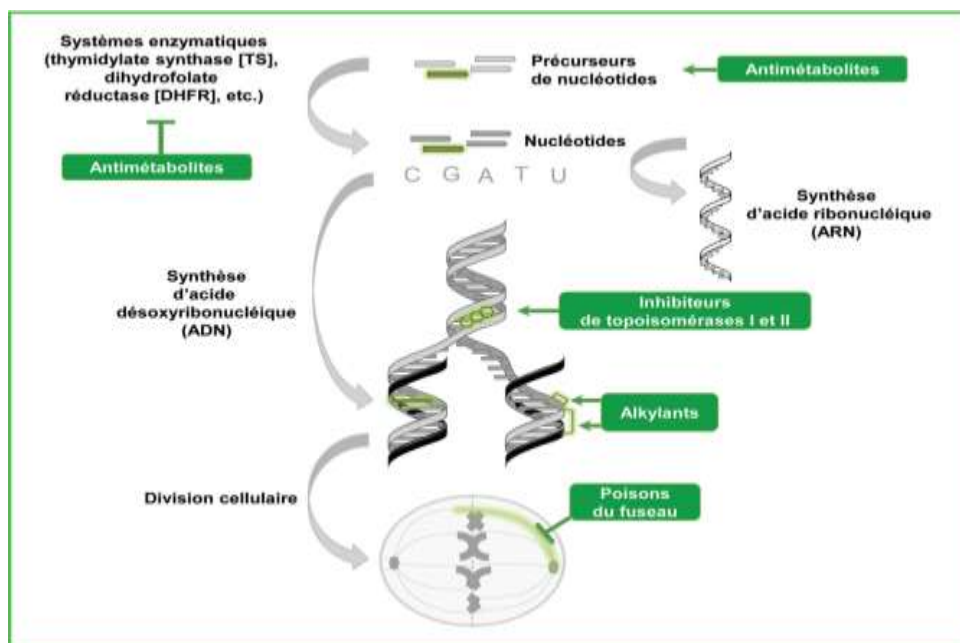


Figure 18: Mécanismes d'action des médicaments de chimiothérapie (**Abotaleb et al., 2018**)

- Les agents alkylants

Ils peuvent être des moutardes azotées des alkylsulfonates, des triazènes. Ils possèdent un ou plusieurs groupements alkyles ou alcoyles, très réactifs, capables de former des liaisons covalentes avec des sites très nucléophiles. Au niveau de l'ADN, ces médicaments se lient préférentiellement à l'azote N7 de la guanine tandis que de nombreux autres sites de liaison sont possibles avec l'ADN, l'ARN ou les protéines via leurs groupements thiol. En établissant

des liaisons covalentes, les alkylants créent des ponts extra- ou intercaténaux, qui inhibent la transcription et la réplication et conduisent à la mort de la cellule. Par ailleurs, ces agents sont responsables de la libération de radicaux libres entraînant des cassures de la chaîne d'ADN (Sadiq *et al.*, 2020).

- **Les antimétabolites**

Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques de l'ADN (et parfois de l'ARN), en empêchant l'activité de diverses enzymes clés. Ils sont à cet effet efficace sur les cellules en phase S du cycle cellulaire. Ils peuvent être des analogues de l'acide folique reconnus par les enzymes clés du cycle des folates. Ils bloquent ainsi le cycle des folates, inhibant de manière indirecte la thymidylate synthase (TS), enzyme indispensable pour la synthèse des bases pyrimidiques telles que la thymine. Certains antimétabolites sont des analogues pyrimidiques qui ont la capacité d'inhiber la synthèse des nucléotides pyrimidiques. Parmi eux, la 5-fluorouracile interagit avec les enzymes du métabolisme des pyrimidines et peut être phosphorylée en triphosphate et incorporé à la place de l'uracile dans les ARN messagers. La dernière catégorie des antimétabolites regroupe les analogues de purines qui agissent principalement en inhibant l'adénosine désaminase, enzyme clé pour la synthèse des purines (Abotaleb *et al.*, 2018).

- **Les agents intercalant et inhibiteurs des topoisomérases :**

Les agents intercalants sont une famille d'agents antitumoraux qui peuvent s'insérer dans la double hélice de l'ADN par le biais d'interactions non covalentes, entraînant des modifications structurales de l'ADN et l'arrêt de la réplication (Zhao *et al.*, 2023 ; Tenconi et Rigali, 2018). L'effet cytotoxique est obtenu suite à l'inhibition des topoisomérases (ou DNA-gyrase) par des composés administrés en complément tel que l'etoposide (Mastrangelo *et al.*, 2022).

- **Les poisons du fuseau ou poisons mitotiques :**

Ces médicaments se lient à la tubuline qui entre dans la composition du fuseau mitotique et qui joue un rôle important dans le maintien du cytosquelette. Ils agissent ainsi au moment de la mitose et entraînent la mort de la cellule. Plusieurs types de poisons du fuseau sont distingués en fonction de leur structure, de leur origine (souvent naturelle) et de leur site de liaison sur la tubuline ce sont généralement les taxanes et les alcaloïdes (Renard, 2013).

De façon générale, les agents alkylants, les antimétabolites et les inhibiteurs de topoisomérases altèrent les capacités de réplication et de transcription des gènes, en induisant

des modifications des acides nucléiques, tandis que les poisons du fuseau inhibent les capacités de mitose de la cellule tumorale.

La chimiothérapie peut être responsable des effets indésirables tels que l'alopécie, les nausées, l'immunodépression, l'anémie, les dysménorrhées, l'infertilité, l'insuffisance cardiaque, et l'hépatotoxicité (Adamowicz et Baczkowska-Waliszewska, 2020).

b) Thérapies ciblées dans la prise en charge du cancer du sein

Différents inhibiteurs de récepteurs membranaires ont montré une activité dans le cancer du sein. Ils comprennent les anticorps monoclonaux, qui bloquent les récepteurs de surfaces des cellules cancéreuses tel que le récepteur de la mort programmée PD-1, les récepteurs de facteurs de croissance, les modulateurs de l'angiogenèse. L'autre classe concerne les petites molécules pouvant traverser la membrane plasmique et inhiber les protéines anti-apoptotiques, les seconds messagers intracellulaires ou moduler les voies métaboliques et épigénétiques (Figure 19). Par ailleurs, différents inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) ont démontré une bonne efficacité chez les patientes atteintes d'un cancer du sein présentant une mutation germinale du gène BRCA (Hu et McArthur, 2018 ; Rugo *et al.*, 2016).

Bien que spécifiques, ces médicaments peuvent entraîner des effets indésirables tels qu'une l'asthénie, les lésions cutanées, l'hypertension et les malaises gastro-intestinaux (Du *et al.*, 2021).

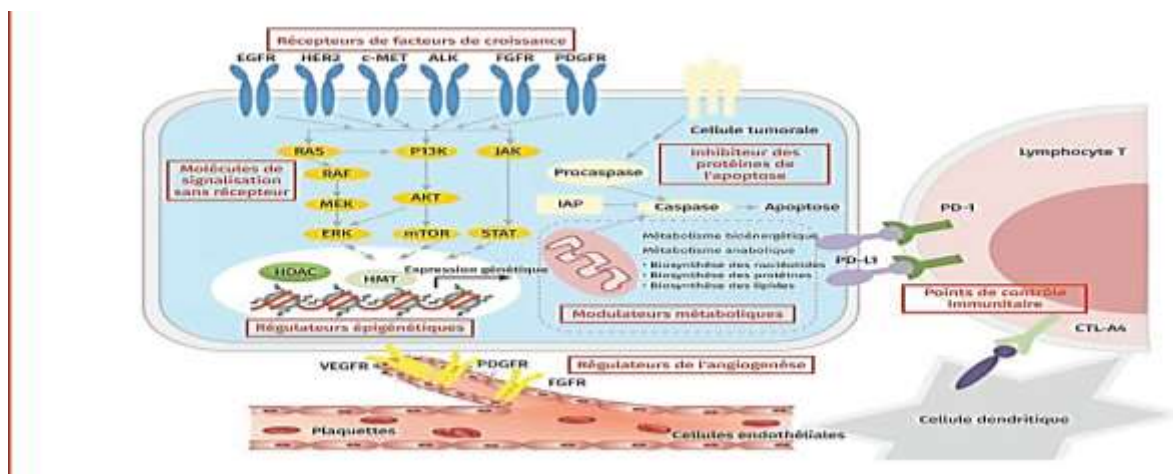


Figure 19: Stratégies thérapeutiques en thérapie ciblée (Shuel, 2022)

c) Immunothérapie dans la prise en charge du cancer du sein

Elle est plus adaptée pour les cancers du sein triple négatif dont le pronostic est faible (Abotaleb *et al.*, 2018). L'enjeu de l'immunothérapie est de réactiver ou de renforcer l'immunité anticancéreuse, afin de contrôler le développement tumoral, en ciblant entre autres des *checkpoint* (Verret et Loirat, 2016). En effet, il existe au sein de la tumeur différents types de cellules immunitaires avec des rôles opposés soit pro- (LT régulateurs, MAT) ou antitumoral (LT effecteurs, MAT). Toutes ces cellules interagissent entre elles et avec les cellules tumorales par le biais de différentes protéines de surfaces, ce qui constitue des *checkpoints* accessibles à un traitement ciblé (Demaria *et al.*, 2011). Ces molécules peuvent établir des liaisons avec la *PD-1* et la *cytotoxic T-lymphocytes-associated protein-4* (CTLA-4) (Figure 20). Cette dernière régule négativement les lymphocytes T, et son blocage permet une restauration de l'action des lymphocytes. La *PD-1* quant à elle est une protéine exprimée à la surface des lymphocytes T activés, qui lorsqu'elle est stimulée par son ligand (*PD-L1*), exprimé à la surface des cellules tumorales et stromales, inhibe l'activation lymphocytaire (Topalian *et al.*, 2012).

L'autre stratégie consiste en l'administration des vaccins antitumoraux dont le principe est d'éduquer ou de renforcer le système immunitaire, principalement les lymphocytes T CD8+ et CD4+, à reconnaître la tumeur, via les épitopes dérivés des antigènes spécifiques de la tumeur et présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Emens *et al.*, 2012).

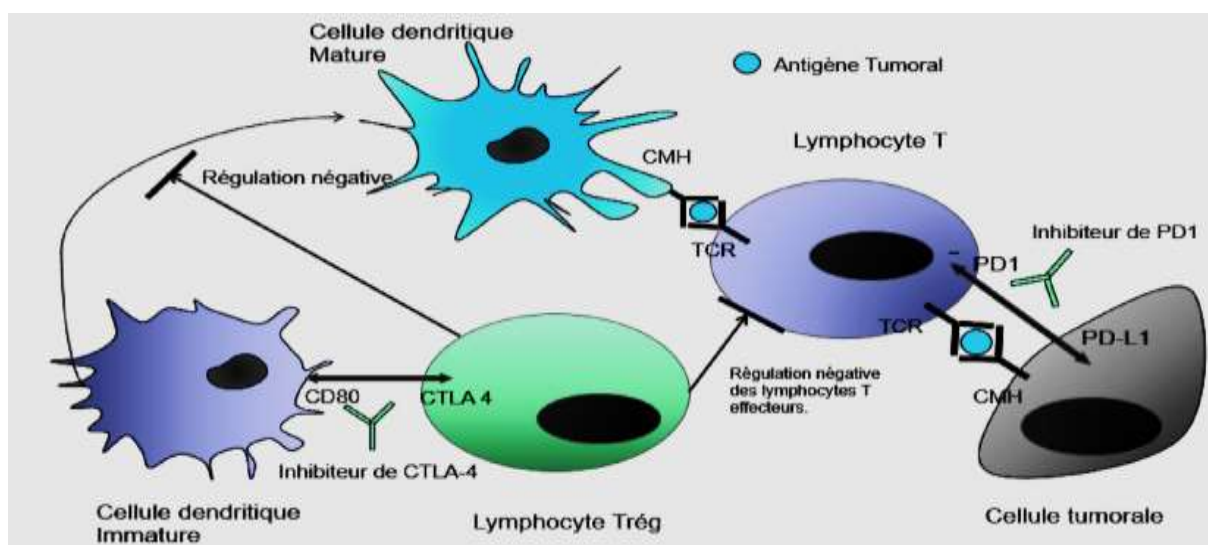


Figure 20: Mécanismes d'action des modulateurs de l'immunité (Verret et Loirat, 2016)

d) Hormonothérapie dans la prise en charge du cancer du sein

L'hormonothérapie est administrée aux patientes atteintes d'un cancer du sein ER+/PR+ afin de diminuer le taux d'œstrogènes ou de bloquer la croissance cancéreuse du sein. Ces traitements sont de 3 catégories (Figure 21) ; d'une part il y a les inhibiteurs de l'aromatase, limitant la synthèse des œstrogènes au niveau des tissus adipeux. Si l'on craint un risque accru d'ostéoporose ou une intolérance aux, les modulateurs sélectifs des RE tel que le tamoxifène peuvent être prescrits. Cependant, il est suggéré d'associer au tamoxifène des supprimeurs de la fonction ovarienne (Inhibiteurs de GnRH) et l'exémestane, uniquement chez les patients ayant subi une chimiothérapie (Pagani *et al.*, 2014).

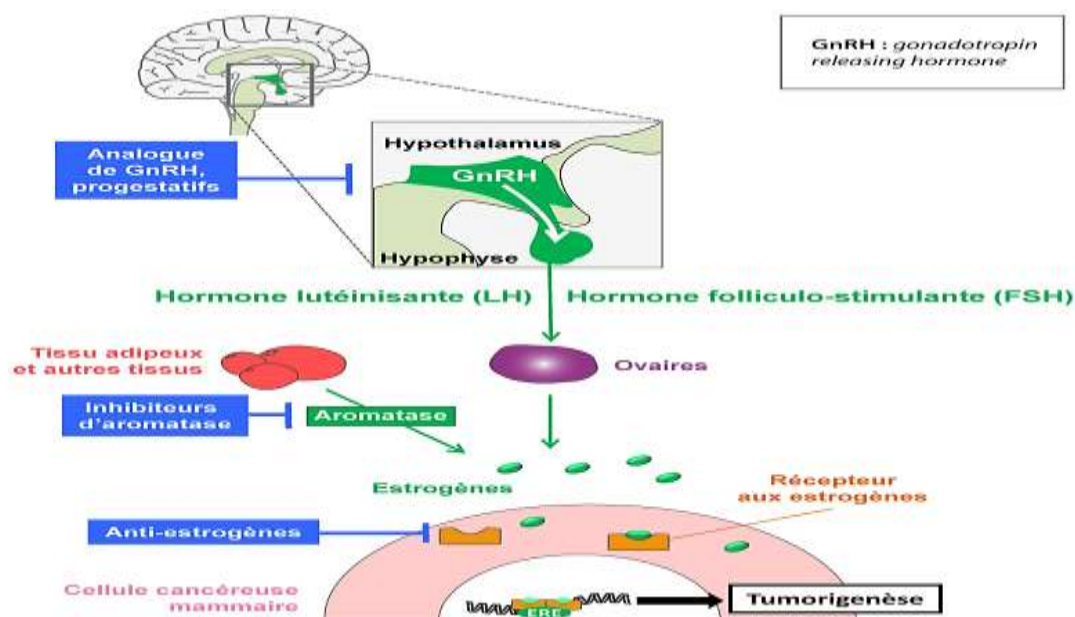


Figure 21: Mécanisme d'action des médicaments utilisés en hormonothérapie (Pagani *et al.*, 2014)

L'hormonothérapie peut cependant entraîner des bouffées de chaleur, la sécheresse vaginale, la baisse de la Libido, le cancer de l'endomètre, ostéoporose et les douleurs articulaires (Adamowicz et Baczowska-Waliszewska, 2020).

I.5 Généralités sur le tamoxifène

Le tamoxifène (TAM), de son nom chimique (Z)-2-[4-(1,2-Diphényl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-diméthylethanamine, est un traitement chimio/hormonal largement et fréquemment prescrit pour la prévention et le traitement de tous les stades du cancer du sein RE positif chez les femmes pré et post-ménopausées (Chunjie *et al.*, 2016). Il est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) comme traitement adjuvant du cancer du sein métastatique et post-chirurgical pour éliminer les micrométastases (Ahmed et Lennard,

2009) et sert de médicament préventif pour les personnes saines à haut risque (**Rong et al., 2015**). Il est commercialisé sous le nom de Nolvadex®

I.5.1 Pharmacocinétique du tamoxifène

La pharmacocinétique est l'étude du déroulement temporel de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (ADME) d'un médicament après son administration dans l'organisme (**Jianghong et Lannoy, 2013**).

I.5.1.1 Administration et absorption

Le TAM est disponible sous forme de comprimés enrobés administré par voie orale. Le schéma posologique utilisé pour le traitement et la prévention du cancer du sein invasif est de 10 mg deux fois par jour ou 20 mg une fois par jour pendant 5 ans. La biodisponibilité orale de la TAM est élevée, environ 100 % (**Huda et al., 2020**).

I.5.1.2 Distribution

Le tamoxifène est insoluble dans l'eau et se répartit dans les membranes lipidiques, ce qui entraîne une destruction oxydative accrue. Une fois dans l'organisme, le tamoxifène se lie à 99% aux protéines sériques, principalement l'albumine et la globuline, afin de faciliter son transport (**Shahbaz et al., 2017**). Son volume de distribution est de 50-60 L/kg (**Lien et al., 1991**).

I.5.1.3 Métabolisme du tamoxifène

Le tamoxifène est un pro-médicament, ne possédant donc que peu ou pas d'activité pharmacologique. Son activation se fait *in vivo* par des réactions enzymatiques ou chimiques ou par une combinaison des deux (**Hansten, 2018**). Après administration orale, le TAM est largement métabolisé dans le foie par des enzymes de phase I et de phase II du complexe enzymatique lié au cytochrome P450 notamment le CYP2D6 et du CYP3A (**Shahbaz et al., 2017**). Sous l'action de ces enzymes, le TAM subit une série de réactions, notamment, la N-déméthylation, la N-oxydation, l'époxydation, l'hydroxylation et l'isomérisation, aboutissant respectivement à l'aminotamoxifène, au N-déméthyl tamoxifène et au 4-hydroxyl-N-déméthyltamoxifène (endoxifène), au N-oxyde de tamoxifène, à l'époxitamoxifène, l'alpha hydroxytamoxifène et au 4-hydroxyltamoxifène (Figure 22) (**Musa et al., 2007**). Cependant, seul le 4-hydroxytamoxifène, le N-desméthyltamoxifène et le 4-hydroxy-N-desméthyltamoxifène (endoxifène) ont une forte affinité pour le RE (**Nazarali et Narod,**

2014). En outre, le principal métabolite responsable de l'activité antiproliférative du tamoxifène est l'endoxifène (Hansten, 2018).

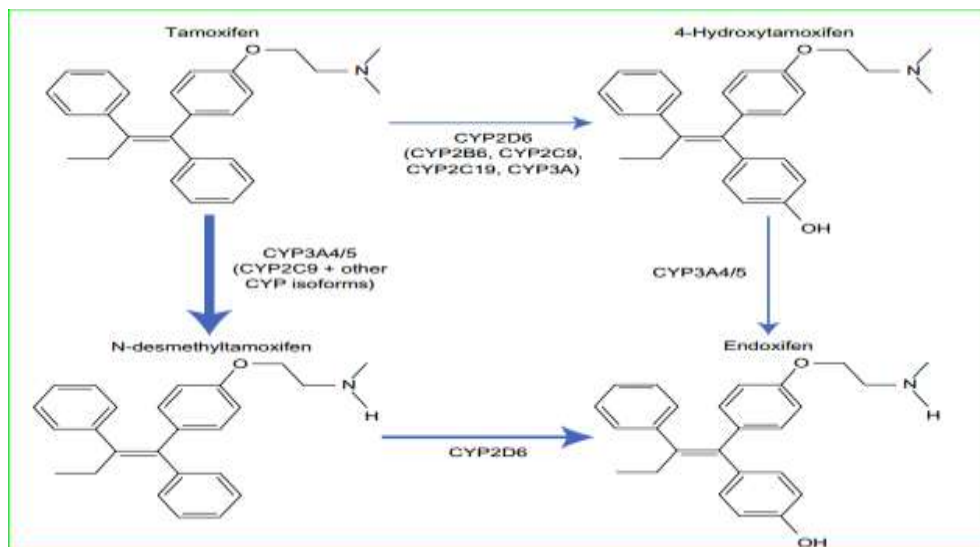


Figure 22: Métabolisme du tamoxifène (Musa *et al.*, 2007)

1.5.1.4 Excrétion

La demi-vie du TAM et de ses métabolites est d'environ 5 à 7 jours après une dose unique (Fedro *et al.*, 2020). Le TAM est éliminé via les réactions de détoxification de phase II catalysées par les glycosyltransférases sous forme de TAM-O-glucuronide dans l'urine. De même, le tamoxifène et/ou ses métabolites peuvent subir le cycle entéro-hépatique important.

1.5.2 Mécanisme d'action antitumorale du tamoxifène

Le TAM se lie de manière compétitive ou antagoniste au RE sur tissu mammaire, empêchant ainsi l'apport d'œstrogènes nécessaire à la croissance des cellules cancéreuses à RE positifs (Adikwu *et al.*, 2020 ; Schuurman *et al.*, 2019). Cette liaison produit un complexe nucléaire qui diminue la synthèse de l'ADN, inhibe l'action des œstrogènes et bloque l'angiogenèse (Karn *et al.*, 2010), la croissance, la prolifération et la survie des cellules (Colleoni et Munzone, 2015). De plus, le tamoxifène a des effets cytostatiques provoquant l'accumulation des cellules dans les phases G0 et G1 du cycle cellulaire (Derya *et al.*, 2018). Il induit une activation de la protéine kinase C ainsi que l'augmentation de l'activité des cellules NK (Karn *et al.*, 2010). Par ailleurs, le 4-hydroxytamoxifène inhibe la transcription des gènes sensibles aux œstrogènes en formant le complexe ER/tamoxifène qui amène des protéines co-répressives telles que le corépresseur des récepteurs nucléaires (NCoR) à réguler les fonctions de plusieurs gènes (Wong *et al.*, 2014).

I.5.3 Effet indésirables associés à la prise du tamoxifène

Le tamoxifène a montré son succès dans la prise en charge du cancer mais avec des effets toxiques graves, notamment une myélosuppression, une toxicité gastro-intestinale, une cardiotoxicité, une hépatotoxicité, une neurotoxicité, et bien d'autres (**Liu et al., 2018**).

I.5.3.1 Induction du cancer de l'endomètre

Des recherches récentes ont prouvé que le tamoxifène augmente le risque de cancer de l'endomètre chez les femmes d'environ 2 à 7 fois via l'élévation des niveaux d'œstradiol (**Günter et al., 2020**). Chez les patientes souffrant d'affections endométriales telles que l'hyperplasie avant le traitement au tamoxifène, le taux de progression vers des lésions endométriales de stade plus avancé est de près de 50 % (**Garuti, 2006**). Par ailleurs, le tamoxifène en lui-même agirait comme agoniste des RE au niveau de l'endomètre.

I.5.3.2 Hépto-toxicité et Néphro-toxicité du tamoxifène

Le TAM est connu pour provoquer une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) chez les patients concernés (**Yoo et al., 2020 ; Hamid et al., 2015**) et d'autres effets secondaires hépatiques tels que l'élévation des tests de la fonction hépatique, l'ictère, la diminution des protéines totales, la cholestase et la nécrose hépatique massive (**Pan et al., 2015 ; Cole et al., 2010**). Le mécanisme par lequel le TAM provoque l'hépatotoxicité n'est pas bien compris ; cependant il a été démontré que le TAM provoque une diminution de la β -oxydation mitochondriale et des dommages oxydatifs hépatiques. Ceci passerait par une augmentation de la peroxydation lipidique hépatique, ainsi qu'une déplétion des enzymes antioxydantes hépatiques, la libération d'ions fer libres qui participent à la génération de radicaux hydroxyles (**Miyamura et al., 2016**). C'est par ces mêmes mécanismes que le TAM induirait des dommages rénaux tel que répertorié dans la littérature (**Saleh et al., 2016 ; Zuhair, 2011**).

I.5.3.3 Autres effets toxiques du tamoxifène

Des évidences scientifiques indiquent que, le TAM causerait également des troubles dans le système immunitaire (**Hugo et al., 2019 ; Panchal et al., 2014**), digestif (**Jordan and Assikis, 1995**) et oculaire (**Garima, 2018**). On note également des signes généraux de toxicité tel que l'alopecie, l'agressivité, la perte de poids, les saignements vaginaux et la fatigue (**Panchal et al., 2014**).

Face aux effets indésirables associés aux différents traitements, les patients ont recours à des thérapies alternatives et complémentaires telle que l'acupuncture et la phytothérapie.

I.6 Traitement alternatif et complémentaire dans la prise en charge du cancer du sein : la phytothérapie

Des enquêtes menées auprès des patients sous traitement conventionnels ont indiqués que ces derniers avaient également recours à la phytothérapie pour booster l'efficacité des traitements ou pour faire passer les effets indésirables associés à ceux-ci (**Chin et al., 2020 ; Liao et al., 2013**). Ces données ont donc été à la base de nombreux travaux scientifiques visant à évaluer l'effet des suppléments alimentaires et extraits de plantes dans la prise en charge des cancers. Les composés bioactifs qu'ils contiennent sont en principe capables d'agir à différents niveaux de la carcinogenèse (**Prasad et al., 2017**) à travers des mécanismes variés (Figure 23).

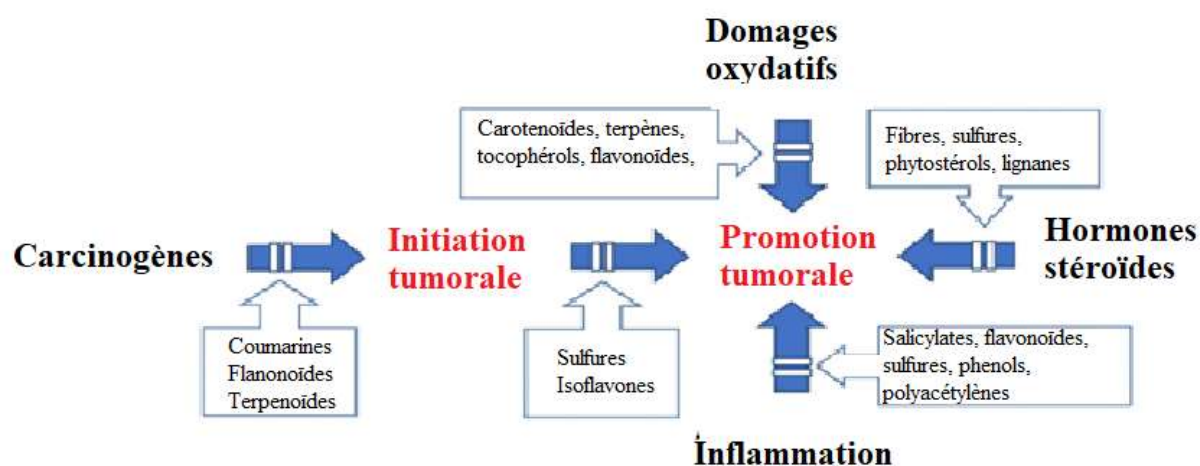


Figure 23: Inhibition de la progression tumorale par les composés bioactifs de plantes (**Prasad et al., 2017**)

I.6.1 Mécanismes d'action des composés bioactifs dans la lutte antitumorale

Les classes de composés bioactifs les plus étudiés sont les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes. Ces composés agissent en modulant la transcription des gènes, l'expression des protéines, en bloquant les récepteurs membranaires, en inhibant les voies internes de transduction du signal ou en induisant un stress intracellulaire. Ces différentes actions ont pour conséquences un arrêt du cycle cellulaire, une inhibition des mécanismes de survie, une inhibition de l'angiogenèse tumorale et invasion, une induction de la mort cellulaire (**Rampogu et al., 2022 ; Ateba et al., 2018 ; Mocanu et al., 2015**). La Figure 24

ci-dessous présente quelques mécanismes d'action antiproliférative des métabolites secondaires des plantes.

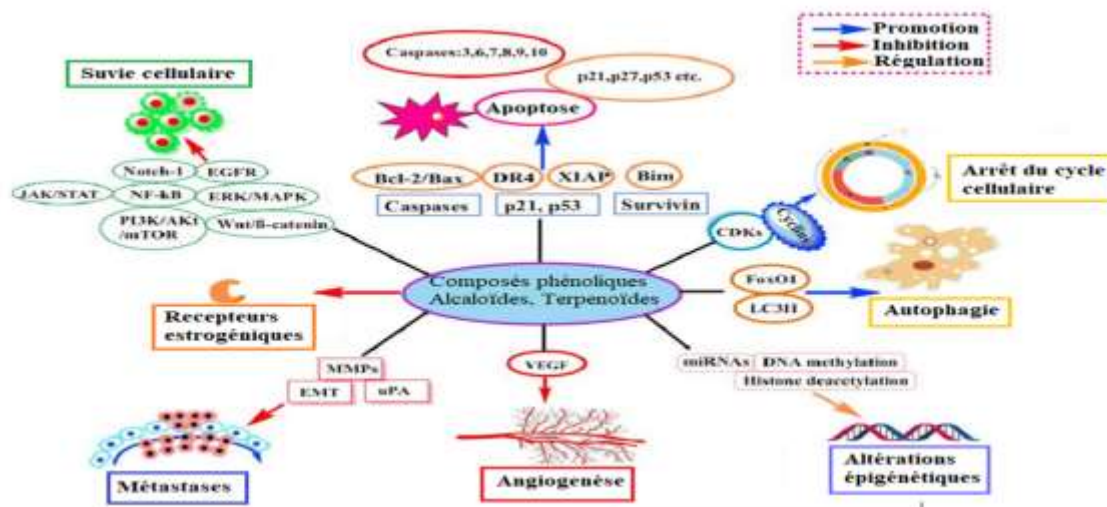


Figure 24: Mécanisme d'action antiproliférative des composés bioactifs adapté de **Kamran et al. (2022)**

I.6.2 Phytothérapie et prise en charge complémentaire du cancer du sein

Il a été montré que, la supplémentation en acide décoxahexanoïque (DHA) facilite l'action de la Doxorubicine dans les cellules MDA-MB-231 et chez les souris nu/nu, via l'amplification de l'effet de la doxorubicine sur l'apoptose et les gènes du cycle cellulaire (**Ewashuck et al., 2012**). Par ailleurs une enquête a révélé que, des produits végétaux tels que le gingembre, la camomille, la menthe, la cardamome et l'oignon étaient utilisés par les patientes pour réduire la nausée et les vomissements associés aux traitements conventionnels (**Habibeh et al., 2020**). Il a également été rapporté que, *Uncaria tomentosa* utilisé en médecine traditionnelle chinoise aiderait à la restauration de l'ADN cellulaire, prévenant ainsi les mutations et les dommages cellulaires causés par les médicaments de chimiothérapie et la radiothérapie (**Santos et al., 2012**).

En outre, **Mbong et al. (2020)** avaient montré que, les extraits de *Coffea arabica* et *Cola anomala* protégeaient les rats Wistar contre le stress oxydant et le désordre métabolique associés à la prise du méthotrexate par les rats Wistar. De même, **Mvondo et al. (2020)** ont montré que, les extraits des noyaux de *Pearsea americana* protégeaient l'endomètre utérin contre une hyperplasie induite par le tamoxifène chez des rates Wistar ovariectomisées.

Face à ces données intéressantes, il convient que la phytothérapie reste une approche prometteuse pour l'amélioration de la prise en charge des cancers. Les recherche devraient donc être continuellement menées dans ce sens.

I.7 Généralités sur la plante d'intérêt : *Aframomum angustifolium*

Aframomum angustifolium est une plante de la famille des Zingibéracée poussant dans les vallées et les régions humides. En Afrique *A. angustifolium* est présente dans les pays tels que l'Angola, le Benin, le Burundi, le Cameroun, le Congo, la Côte d'Ivoire, la Guinée Equatoriale, l'Éthiopie, le Gabon, le Ghana, le Kenya, le Madagascar, le Malawi, la Mozambique, le Nigeria, l'Ouganda, la RDC, le Rwanda, le Soudan, la Tanzanie, le Togo, la Zambie et le Zimbabwe (www.lavierebelle.org/afmomum-angustifolium-igitunguru). Elle appartient à une grande famille de plantes à activités anticancéreuses et anti-inflammatoires prouvées (Amadi *et al.*, 2016 ; Kuété *et al.*, 2014).

I.7.1 Classification botanique d'*A. angustifolium*

Le tableau III ci-dessous résume la classification botanique d'*A. angustifolium*

Tableau III: Classification botanique d'*A. angustifolium*

Domaine	BIOTA
Règne	PLANTAE
Classe	LILIOPSIDA
Sous-classe	LILIIDAE
Ordre	ZINGIBERALES
Famille	ZINGIBERACEAE
Genre	<i>Aframomum</i>
Espèce	<i>angustifolium</i>

Noms usuels : En français, cette plante est connue sous le nom de cardamome. Au Madagascar, elle est appelée *Longoza*, *sintogno*, *Longozakely* (Rakotonirina, 2019). Au Cameroun, son appellation varie d'une langue vernaculaire à l'autre. Ainsi on l'appelle « *tsouh* » en *Ghomala* dans les Hauts-Plateaux et le *Nkung-khi*, « *tchouh* » en *Guemba* dans la Mifi, « *chuchu* » en *Fèfè* dans le Haut-Nkam et *Ngwaka* en *Bulu*.

I.7.2 Description botanique d'*A. angustifolium*

Aframomum angustifolium se présente comme une grande plante herbacée vivace, de 1,5 à 4 m de haut, issue de rhizomes étendus et possédant des grandes feuilles simples, alternes et caduques, de couleur verte. Elle possède des fleurs en forme de trompette, de couleur jaune ou rosée qui s'organisent en épis. Ces fleurs groupées en inflorescences de 4 à 10 fleurs, apparaissant à la base des pousses feuillées. Elles ont des pétales rouges, un labelle jaune ou orange pâle. Les fruits sont ovoïdes à sub-globuleux dont la taille pourrait varier de 7 à 9,5 cm de long, y compris le calice dont la couleur est rouge à maturité. La tige est très rigide lorsqu'elle atteint une hauteur 1,50 m à 2 m. La plante a une odeur fruitée, avec des notes d'abricot, épicée et sucrée, légèrement poivrée. Les graines ressemblent à celles du poivre et de la cardamone par leur goût épicé, piquant avec un arrière-goût légèrement âcre (Rakotonirina, 2019).



Figure 25: Photographie d'un plant (A), des fruits (B) et des graines (C) d'*A. angustifolium* (Photographié par Makamwé, 2019)

I.7.3 Utilisations traditionnelles d'*Aframomum angustifolium*

Toutes les parties de la plante sont utilisées seules ou en association, sous différentes préparations. Elle est très utilisée en médecine traditionnelle congolaise (RDC) et malgache. On note également leur utilisation au Libéria, Kenya, Cameroun, Congo Brazzaville, Nigéria, Burundi, Tanzanie, Angola, Ouganda, et République Centrafricaine (Inkoto *et al.*, 2021). Le tableau ci-dessous est un résumé de l'utilisation traditionnelle d'*A. angustifolium*.

Tableau IV: Utilisation ethnopharmacologique d'*A. angustifolium*

Partie de la plante	Voie d'administration (préparation)	Affections prises en charge	References
Plante entière	Cutanée (pâte)	plaies	Konda et al., 2012
Tige	Orale (Décoction)	hémorroïdes	Konda et al., 2012
	Mastication	vers intestinaux	Kamatenesi et al., 2011
	Orale (Macération)	diarrhée et choléra	Abondo et al., 1991
Feuilles	Orale (Décoction)	toux, tachycardie	Ngezahayo et al., 2015
	Bain de vapeur	Diabète	Ratovondramamy, 2008
	Massage (pâte)	Pneumonie	Konda et al., 2012
	;Orale (macération)	Douleur articulaire, céphalées, fièvre Mal gastrique	
Fruits	Orale (décoction)	Splénomégalie,	Konda et al., 2012
		ascite, rougeole	Walsh, 2009
		Aliment	Ratovondramamy, 2008
			Tarashima et Ishikawa, 2003
Grains	Orale (décoction)	Anti helminthes	Githiori, 2004
Racines	Orale (décoction)	Epilepsie, fièvre jaune, renforcement du système immunitaire	Lautenschläger et al., 2018 ; Tugume et al., 2016 ; Konda et al., 2012

I.7.4 Synthèse des travaux antérieurs effectués sur *Aframomum angustifolium*

Les travaux effectués sur *A. angustifolium* portent sur sa valeur nutritive, la phytochimie et les propriétés biologiques

I.7.4.1 Valeur nutritive d'A. angustifolium

Les grains, la pulpe et la peau des fruits d'*A. angustifolium* peuvent être de bonne source de macro et micronutriments. Selon les travaux de **(Kaana et Samuel, 2018)**, les graines contiennent environ 3,55% de cendres, 2,59% de lipides, 13,72% de fibres, 23,5% de protéines et 43,96% d'hydrates de carbone. La pulpe et la peau sont moins riches en ces différents éléments, excepté le taux de lipide qui varie de 65,30% pour la pulpe à 41,06% pour la peau.

I.7.4.2 Criblage phytochimique et toxicité

le criblage photochimique des extraits de graines et de peau d'*Aframomum angustifolium* a montré qu'ils contiennent des flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les saponines, les glucosides cardiques et des triterpènes **(Anywar et Kirimuhuzya, 2015)**. Par ailleurs, les huiles essentielles extraites des graines d'*A. angustifolium* se sont montrés riches en β -pinene, (24.8%), β -caryophyllène (17.8%) Cis-pinocarvyle acetate (11%), Myrtenyl acetate (8.5%), Trans-pinocarvyle (5.3%), Caryophyllène oxide (3.5%), α -pinene (3.3%), Sabinene (2.7%), α -humulene (2.9%) et le α -terpineol **(Baser et Kürkçüglu, 2001)** qui sont des composé à potentiel antiprolifératif prouvés **(Inkoto et al., 2021)**.

Il a été montré que, l'extrait hydro-éthanolique des fruits présente un effet toxique chez les souris. Par ailleurs, les travaux **d'Ebhohimen et Okolie (2021)** ont révélé un effet hépatotoxique de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*, administré pendant 28 jours à une dose de 1000mg/Kg de poids corporel. Cependant, à des doses inférieures (750 et 350 mg/Kg,PC), cet extrait s'avère non toxique dans les mêmes conditions.

I.5.4.3 Propriétés pharmacologiques d'A. angustifolium

Le peu d'études antérieures réalisées avec *A. angustifolium* fait état de ses activités antimicrobienne, anti oxydant, antiâge, hépato et néphroprotecteur **(Inkoto et al., 2021)**.

- Activité antimicrobienne

Les extraits à l'éther et au méthanol des peaux mûres d'*A. angustifolium* inhibent la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec des concentrations inhibitrice 50 de 125 mg/mL **(Anywar et Kirimuhuzya, 2015)**

- Activité antioxydante

Ebhohimen et al. (2017) ont montré que, la chaleur réduisait le potentiel chélateur et piègeur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*. Egalemeent, le pouvoir réducteur

des extraits aqueux et éthanolique serait réduit par un traitement thermique de 30 minutes tandis que le pouvoir piégeur de l'oxyde nitrique augmenterait avec le traitement thermique. Par ailleurs, les travaux effectués par **Edemhanria et al. (2020)** ont montré que, les huiles essentielles de grains d'A. *angustifolium* ont la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique des tissus hépatiques et rénaux congelés de bœufs.

- Activité antiâge

Les études d'**Andre et al. (2008)** ont révélé que le cosméceutique contenant l'extrait de graines d'A. *angustifolium* produisait un effet de rajeunissement global en termes de rougeur, de pigmentation et de ridules similaire à celui constaté en utilisant une source de lumière pulsée intense. Ces extraits serviraient donc à préserver ou restaurer la structure de la peau, notamment par stimulation de la synthèse du collagène VII de la jonction dermo-épidermique et de l'élastine. Ils pourraient également agir sur les fibres d'oxytaline et/ou les fibres d'élaunine.

- Effet hépato et néphroprotecteur

Les travaux d'**Ebhohimen et al. (2020)** et **Ebhohimen et Okolie (2021)** ont révélés que, l'extrait éthanolique de graines d'A *angustifolium* administré aux doses de 10, 100 et 750 mg/Kg, PC accélérât la réparation de l'hépatite et la néphrotoxicité induite par le Bromure de potassium chez les rats. Cette réparation se ferait à travers la stimulation du système antioxydant endogène, avec une augmentation de l'activité de la catalase et une baisse du taux de malondialdéhyde **Ebhohimen et al. (2020)**.

-Autres potentiels pharmacologiques possibles mais non explorés.

Aframomum angustifolium est une plante riche en terpenoïdes, constituant environ 81,7% de sa composition en l'huile essentielle. La présence de ces composés tels que le β -caryophyllène, le limonène, le β -pinène et α -pinène (**Inkoto et al., 2021**) pourrait lui conférer des propriétés biologiques telles que antiinflammatoires, cytotoxiques, pro-apoptotiques et même antitumoraux. D'où l'intérêt d'évaluer les propriétés anticancéreuses d'un extrait éthanolique de ses graines ayant fait l'objet de la plupart des études antérieures.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel

Le matériel utilisé dans ce travail était constitué de matériel végétal, matériel animal, appareils et réactifs.

II.1.1 Matériel végétal

Du fait de sa vaste répartition géographique et de son appartenance à une famille de plante à potentiel anticancéreux prouvés *Aframomum angustifolium* était l'objet d'étude. Ses graines ont été utilisées de par la présence dans leur huiles essentielles, de composés à potentiel antiprolifératif et de la capacité de son extrait éthanolique à protéger le foie et les reins d'une toxicité, réguler les gènes liés au renouvellement épidermique (**Inkoto et al., 2021**). Le matériel végétal était constitué des graines de fruits d'*Aframomum angustifolium*. Les fruits matures (de couleur rouge) ont été récoltés entre Avril et Juillet 2019 dans la localité de Baham du Département des Hauts-plateaux (altitude ; 1700 mètres ; 5°20'04" Nord, 10°22'08" Est). La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun comparativement au spécimen enregistré au numéro 44827/HNC du 14 Février 1998. Les fruits ont été transportés au Laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle.

II.1.2 Matériel animal

Il était constitué de lignées cellulaires et de rats albinos femelles de souche *Wistar*.

II.1.2.1 Lignées cellulaires

Face à l'impérieuse nécessité de développer de nouvelles stratégies anticancéreuses, l'évaluation précoce d'agents thérapeutiques sur plusieurs modèles tumoraux s'impose. Les caractéristiques fondamentales communes aux cellules cancéreuses indépendamment de leur origine telles que la prolifération anarchique, l'évasion apoptotique ou l'adaptation métabolique, légitiment une approche transversale. Ainsi, les Lignées cellulaires cancéreuses murines adhérentes du gliome (CT2A et GL261) et du mélanome (YUMM1.7 et B16-F1) ainsi que celle du cancer du sein humain (MCF-7) ont été utilisées. Elles provenaient du laboratoire d'immunologie de la *Yale University School of Medicine*. La description de ces lignées est présentée à l'**annexe 1**.

II.1.2.2 Animaux expérimentaux

Pour cette étude, quarante-deux (42) rates albinos de souche *Wistar* et âgées de 6 semaines ont été utilisées. Elles provenaient de l'animalerie du Département de Biologie et Physiologie Animal de l'Université de Yaoundé I. Parvenus au LNNB elles ont aléatoirement été réparties dans les cages métaboliques, constituées de bassines en plastique recouvertes de grillages et tapissées copeaux de bois blanc. Les cages étaient nettoyées tous les 2 jours. L'environnement était plongé dans un cycle de 12 heures jour et 12 h nuit, à température ambiante ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$). Elles étaient nourries d'une diète standard et avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux ont été acclimatés pendant 7 jours avant leur utilisation.

II.1.3 Appareils, instruments et consommables

Les appareils et instruments utilisés étaient constitués d'une balance électronique sensible (AHAUS), un blender (*Sayonna, Chine*), une étuve ventilée (Binder), un spectrophotomètre UV-Visible (*Fisher*), un lecteur de microplaque (*DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter*), un thermocycleur (*Biorad*), un incubateur (*Thermofisher*), un bain marie (*Bioline Scientific*), un microtome (*Biobase*), une plaque réfrigérante (*Plac-center SELECTA*), un microscope optique (*Bresser Junior set*), un lecteur luminex (*Bioplex*), un spectromètre de masse (*Waters Inc., Milford, MA*), une colonne chromatographique (*Phenomenex Luna® Omega 1,6 μm EVO C18 100 Å*), le NANODROP (*Thermo Scientific*), une centrifugeuse (*Thermo fisher*), un compteur d'hématologie (*Accurex Biomedical Pvt Ltd*) un hemocytomètre, le dispositif d'immunotransfert, la membrane de polyvidilène difluoride, les microplaques, les boîtes de culture de 25Cm^3 , une sonde œsophagienne, des micropipettes, un pied à coulisse, des tubes à essai, des tubes eppendorf et coniques, des lames et lamelles.

Comme consommable les solvants (Ethanol ; eau distillée, méthanol, chloroforme), les kits de dosage (Chronolab, Labkit, Monobind, BioRad. Sigma), les milieux de culture, les sédatifs (kétamine, diazépam, éther) ont été utilisés. La liste de ces réactifs classés en fonction des dosages effectués est présentée à l'**annexe 2**.

II.2 Méthodes

II.2.1 Caractérisation phytochimique et détermination mécanismes d'action antiprolifératives de l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium*

Il était question ici de déterminer la composition phytochimique, le potentiel antioxydant et les voies d'action antiproliférative de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*.

II.2.1.1 Détermination de la teneur en quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Les composés bioactifs d'intérêt étaient les composés phénoliques dont les flavonoïdes et les tanins, les alcaloïdes et les terpenoïdes.

Préparation de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

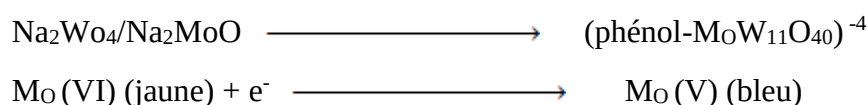
Pour la préparation de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* (EEAa), les fruits ont été préalablement lavés et séchés à température ambiante (et à l'abri du soleil) jusqu'à obtention d'un poids constant. Les fruits secs ont été épluchés et égrainés, puis les graines ont été finement broyées dans un *blender*. Cinq cent grammes (500 g) de poudre ont été macérés pendant 72 h dans 2L d'éthanol 95% (rapport 1/4, p/v). Puis, le macérât a été tamisé et filtré au papier Wattman N°3, le filtrat a été concentré au rota-vapor. Enfin, le solvant résiduel a été évaporé dans une étuve ventilée à 45°C pendant 48 h. L'extrait ainsi obtenu a été conservé dans un bocal en verre opaque à température ambiante. Le rendement d'extraction était calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement} = (\text{poids poudre de graines d}'A \text{ angustifolium} / \text{poids extrait}) * 100$$

II.2.1.1.1 Dosage des composés phénoliques (Waterhouse, 2002).

i) Principe

Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin, du réactif d'acide phosphotungstique phosphomolybdique (Folin-Ciocalteu) par les groupements oxydables des composés phénoliques pour former un complexe bleu-coloré dont l'absorbance est mesurée à 750 nm



ii) Mode opératoire

A 30 µL d'extrait (4 mg/mL) ont été ajoutés 1 mL de solution de Folin (0,2 N) et 1 mL de carbonate de sodium. L'absorbance a été mesurée à 750 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante (25°C). L'acide gallique a été utilisé comme standard à différentes concentrations (0, 100, 200, 400, 800 et 1000 µg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

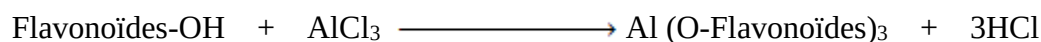
iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration en polyphénols totaux a été calculée et exprimée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme de matière sèche (µg d'EqAG/mg MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 3).

II.2.1.1.2 Dosage des flavonoïdes (Bahorun *et al.*, 1996)

i) Principe

Les flavonoïdes réagissent avec le trichlorure d'aluminium et l'acétate de potassium pour former un complexe de couleur rosâtre qui absorbe à 420 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes contenue dans l'échantillon. L'équation de la réaction est la suivante:



ii) Mode opératoire

A 1mL d'échantillon préparé dans l'éthanol à la concentration de 4 mg/mL ont été ajoutés 1 mL d'AlCl₃ (10%), 1 mL d'acétate de potassium (1 M) et 5,6 mL d'eau distillée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 420 nm. L'étalonnage a été fait avec la quercétine aux concentrations (0, 500, 600, 700, 800 et 1000 µg/mL).

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration des flavonoïdes a été calculée et exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme de matière sèche (µg d'EqQ/mg MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 4)

II.2.1.1.3 Dosage des tanins condensés (Sun *et al.*, 1998)

i) Principe

En milieu acide, le groupement flavonoïde des tanins condensés réagissent avec la vanilline pour former un complexe coloré rouge qui absorbe à 550 nm ;

iii) Mode opératoire

Un volume de 0,3 mL de HCl a été ajouté à 0,6 mL de vanilline dissoute dans de l'éthanol (4% v/v) et à 0,1 mL d'extrait (1 mg/mL). La solution a été homogénéisée et incubée à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc. L'acide gallique a été utilisé comme standard à différentes concentrations (0-100-200-400-800 et 1000 µg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

iv) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration en tanins a été calculée à partir de l'équation issue de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Annexe 5) et exprimée en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme de MS (µg EqAg/mg , MS).

II.2.1.1.4 Dosage des alcaloïdes (Singh *et al.* 2004)

i) Principe

Les alcaloïdes contenus dans l'échantillon réagissent avec le chlorure de fer, le chlorure d'hydrogène et le 1,10- Phénanthroline pour former une solution de couleur rouge qui absorbe à 510 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'alcaloïdes présents dans le milieu.

ii) Mode opératoire

Cent milligrammes (100 mg) de poudre d'extrait ont été soumis à l'extraction dans 10 mL d'éthanol 95%, ensuite filtrés et centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 minutes. A 1 mL de surnageant, ont été ajoutés 1 mL de FeCl_3 (0,025M) + HCl (0,5M) et 1 mL de 1,10 phénanthroline (0,05M) préparé dans de l'éthanol. Le mélange obtenu a été incubé au bain marie à 70°C pendant 30 minutes. L'absorbance de la coloration rouge du complexe formé a été lue à 510 nm contre le blanc. La Quinine a été utilisée comme standard à différentes concentrations (0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 et 0,1 mg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La teneur en alcaloïdes a été déterminée à partir de l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage établie avec la quinine (Annexe 6) et exprimée en microgramme d'équivalents de quinine par milligramme de matière sèche ($\mu\text{g EqQui/mg MS}$).

II.2.1.1.5 Dosage des terpenoïdes (Ghoraï *et al.*, 2012)

i) Principe

Les terpènes présents dans l'échantillon, en présence du chloroforme et de l'acide sulfurique concentré, forment un précipité brun rougeâtre qui est soluble dans le méthanol et absorbe à 538 nm

ii) Mode opératoire

Deux cent microlitres (200 μL) de solution méthanolique d'extrait (0,1g/mL) ont été ajoutés à 1,5 ml de chloroforme. L'ensemble a été mélangé au vortex puis, 100 μL d'acide sulfurique concentré y ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 2 h. Après incubation, le dépôt marron rougeâtre apparu au fond du tube a été délicatement séparé sur surnageant. A ce précipité, a été ajouté 1,5 mL de méthanol et l'ensemble a été mélangé au vortex. La DO a été lue à 538 nm contre le blanc réalisé avec du méthanol. Le monoterpène linalool a été utilisé comme standard.

iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalent de linalool par gramme de matière sèche (mg EqLi/g MS) à l'aide de l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 7).

II.2.1.1.6 Identification de quelques composés bioactifs par LC/MS

a) Principe

Cette méthode analytique combine la séparation des composés par chromatographie liquide et leur identification par spectrométrie de masse. En effet, les composés présents dans l'échantillon sont élués en fonction de leurs propriétés chimiques (polarité, poids moléculaires). Ensuite, ils sont ionisés et accélérés dans un champ électrique et dirigés dans un analyseur de masse où ils sont détectés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) dont

la mesure de l'abondance génère un spectre de masse. L'identification des composés se fait en comparant le spectre de masse obtenu avec les bases de données.

b) Mode opératoire

L'EEAa a été préparé pour la LC-MS en dissolvant 5 mg de l'extrait dans 1 mL de solvant hydrométhanolique (50:50, v/v). L'extrait a été dilué dix fois et 5 µL ont été injectés sur la colonne LC. L'analyse LC/MS était équipée d'une colonne C18 (2,1 mm de diamètre intérieur × 100 mm de longueur)]. Le système consistait en un mélange méthanol (Phase A) et acide formique 0,1%/ eau (Phase B). La colonne a été éluée à un débit fixé à 0,3 ml/min pendant toute la durée de l'analyse, soit une durée totale de 20 minutes, tandis que la température de la colonne a été maintenue constante à 50 °C. La séparation par étape en phase inversée a été réalisée sur la base d'un schéma d'élution en gradient commençant par 97 % de H₂O (0,1 % d'acide formique) jusqu'à 100 % de méthanol (0,1 % d'acide formique). Ensuite, la colonne a été lavée pendant 2 min, suivie d'un conditionnement et d'un rétablissement des conditions initiales. Pour séparer et identifier les différents composés, l'analyse Q-TOF-MS/MS a été réalisée par un spectromètre de masse muni d'une source ESI pouvant fonctionner en mode positif ou négatif. Le système de spectrométrie comprenait un système Waters Acquity UPLC® associé à l'instrument QTOF.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

Le logiciel MesRnova a permis de reconstituer les chromatogrammes obtenus en mode ion positif et négatif, et ressortir les spectres de masses des différents composés identifiés à l'aide des bases de données de la littérature.

II.2.1.2 Mesure du potentiel antioxydant de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

II.2.1.2.1 Mesure du potentiel anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Le potentiel antioxydant de l'extrait a été évalué à travers les tests anti radicalaires (piégeage des radicaux DPPH, ABTS et NO), et les tests de réduction (pouvoir réducteur du fer, capacité réductrice du molybdate).

a) Test de piégeage du radical DPPH· (Lee *et al.*, 2007)

i) Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]). Ce dernier est réduit sous forme d'hydrazine (de couleur violette) en acceptant un atome d'hydrogène.

ii) Mode opératoire

Un volume de 1,950 mL de la solution éthanolique du DPPH[•] (0.025 g/L) fraîchement préparée a été ajouté à 50 µL de chaque concentration (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) d'extrait éthanolique. L'absorbance à 515 nm a été mesurée après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La formule suivante a été utilisée pour le calcul du pourcentage de piégeage du radical libre :

$$\% \text{ de piégeage} = \frac{\text{Absorbance témoin} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance témoin}} \times 100$$

La courbe de régression concentrations-pourcentages de piégeage a permis de calculer la concentration en extrait qui piège 50% de radical (CP₅₀). Le pouvoir antiradicalaire (µmol de DPPH/g d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de DPPH utilisée (0.025 g/L) par cette CP₅₀

b) Test de piégeage du radical ABTS (Gill *et al.*, 1999)

i) Principe

En réagissant avec le permanganate de potassium, l'acide 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) forme le radical ABTS^{•+} de couleur bleue à verte, l'ajout d'un antioxydant réduit ce radical et provoque la décoloration du mélange. Cette décoloration est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm et est proportionnelle à l'activité des antioxydants présents dans l'échantillon.

ii) Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'extrait (1-2-3-4 et 5 mg/mL) préparé dans de l'éthanol a été ajouté à 1000 µL de la solution d'ABTS^{•+}. Après 30 minutes d'incubation à température

ambiante à l'abri de la lumière, L'absorbance a été lue à 734 nm contre le contrôle constitué de la solution d'ABTS⁺. La catéchine a été utilisée comme référence.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage du radical ABTS⁺ selon la formule suivante :

Piégeage du radical ABTS⁺ (%) = $(Ac - Ae/Ac) \times 100$; Ac représentant l'absorbance du contrôle et Ae celle de l'essai.

Le pouvoir antiradicalaire (μmol de ABTS/g d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de D'ABTS (7,4 mM) par cette CP₅₀

c) Capacité de piégeage du radical oxyde nitrique (Jayachandra *et al.*, 2011)

i) Principe

Au cours de l'expérience, le NO produit par le nitroprussiate de sodium au pH physiologique réagit avec l'oxygène pour donner les ions nitrites. Ces derniers sont mis en évidence par le réactif de Greiss. Le produit de la réaction absorbe à 540 nm ; et plus l'extrait sera actif, moins forte sera densité optique.

ii) Mode opératoire

A 1 ml de d'extrait à différentes concentrations (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) ont été ajoutés 2 ml de solution de nitroprussiate de sodium, et l'ensemble a été incubé pendant 2h 30 min à température ambiante. Par la suite, 500 μl de ce mélange ont été transférés dans un autre tube, auxquels a été ajouté 1 ml de solution d'acide sulfonique. Après 5 min d'incubation à température ambiante, y a été ajouté 1 ml de Naphtyl ethylene diamine (NED), puis s'en est suivit une incubation de 30 minutes dans les mêmes conditions. Passée cette étape, l'absorbance a été lue à 540 nm.

iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage selon la formule

% de piégeage= $(Abs1-Abs2)/ Abs1 \times 100$

Abs1= absorbance du contrôle ; **Abs2**= absorbance de l'essai

II.2.1.2.2 Mesure du potentiel réducteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

a) Test de réduction du fer (Ou *et al.*, 2002)

i) Principe

La méthode est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu absorbant à 700nm.

ii) Mode opératoire

Un millilitre d'extrait à différentes concentrations (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) a été mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $[K_3Fe(CN)_6]$ à 1%. L'ensemble a été incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique ont été ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10min à 25°C. Un aliquote (2,5ml) de surnageant a été combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été faite à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Une augmentation de l'absorbance correspondait à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Le pourcentage de réduction du fer a été calculé par la réaction suivant :

Pouvoir réducteur de fer (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$. A_0 : est l'absorbance de $FeCl_3$.

A_1 : est l'absorbance de $FeCl_3$ en présence de l'extrait. La courbe de régression dose réponse a permis de calculer la concentration réductrice 50. Le potentiel réducteur ($\mu\text{mol de } Fe^{2+}/g$ d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de $FeCl_3$ utilisée (0,1%) par cette la concentration réductrice 50

b) Mesure de la capacité antioxydante totale (Prieto *et al.*, 1999)

i) Principe

En milieu acide, le molybdène [Mo (VI)] présent sous la forme d'ions molybdate (MoO_4^{2-}) est réduit en Mo (V) (MoO^{2+}) en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) qui absorbe à 695 nm

ii) Mode opératoire

Un volume de 0,3 mL d'extrait méthanolique à différentes concentrations (0, 5, 6,25, 7,5, 8,75 et 10 mg/mL) a été mélangé avec 3 mL de solution du réactif (0,6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes ont été vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc contenant 3 mL de la solution du réactif et 0,3 mL du méthanol et incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La capacité antioxydante totale a été exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) à l'aide de la courbe d'étalonnage présentée à l'Annexe 8

II.2.1.3 Détermination des potentielles voies d'action antiprolifératives de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'extrait a été testé sur la viabilité de 04 lignées cellulaires provenant du gliome (GL261 et CT-2A) et du mélanome murin (B16-F1 et YUMM1.7). Chacune de ces lignées présentait au moins une des mutations généralement rencontrées dans les tumeurs mammaires. Celle qui a présenté une meilleure sensibilité a été utilisée pour explorer les potentielles voies d'action antiproliférative de l'EEAa

II.2.1.3.1 Culture des lignées cellulaires

Les cellules étaient cultivées en milieu liquide dans les boîtes de 25 Cm² contenant des milieux de culture spécifiques (Annexe 2) telle que décrit dans le guide procédures standards et opérationnelles du laboratoire.

Brièvement, les cellules souches stockées dans les cryotubes ont été dégivrées à 37°C, puis 1mL de milieu de culture spécifique y a été ajouté. L'ensemble a été transféré dans un tube conique de 15 mL contenant 9 mL de milieu de culture et centrifugé à 300g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été aspiré, le culot cellulaire suspendu dans 5mL de milieu de culture et transféré dans un flacon de 25 cm³ pour la culture. Après 48H d'incubation à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂ (jusqu'à confluence), le milieu de culture a été aspiré et les cellules lavées 2 fois avec 5mL de tampon phosphate salin (PBS 1X). Puis 4 mL de trypsine-EDTA 0,25% ont été ajoutés et l'ensemble incubé pendant 3 minutes pour permettre aux cellules adhérentes de se détacher du fond du flacon de culture. Ensuite, 4mL de milieu de culture ont été ajoutés pour suspendre les cellules et désactiver la trypsine. Après

homogénéisation, l'ensemble a été transféré dans un tube conique de 15 mL, centrifugé à 300 g pendant 5 minutes et le surnageant éliminé. Le culot a été re-suspendu dans 1mL de milieu de culture.

Préparation des charges cellulaires

La suspension cellulaire a été diluée au 1/10 avec du bleu trypan. 10µL de cette dilution ont été déposés dans chaque chambre de l'hémocytomètre. Les cellules viables (translucides) présentes dans 4 cadrans de chaque chambre ont été comptées au microscope optique. La charge cellulaire a alors été calculée selon la formule :

$$\text{Concentration cellulaire (Cellule/mL)} = \frac{\text{nombre de cellules comptées}}{\text{nombre de carrés comptés}} \times 10^4 \times fd$$

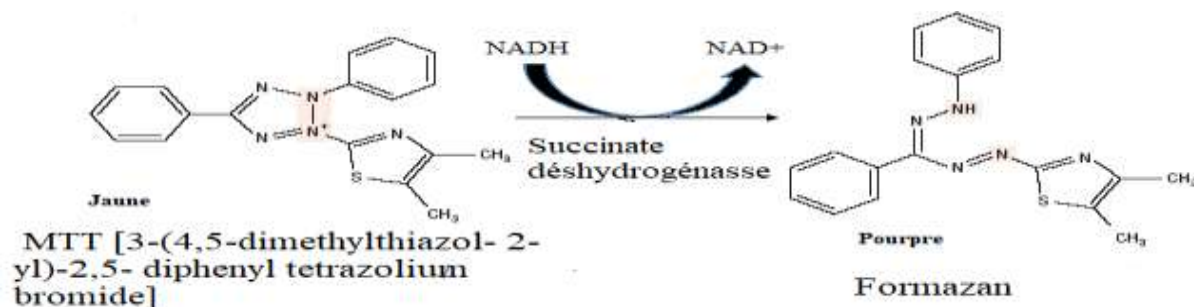
fd représentant le facteur de dilution et 10^4 l'inverse du volume de chaque cadran

II.2.1.3.2 Identification de la lignée cellulaire la plus sensible à l'EEAa : Mesure de la viabilité cellulaire

Les lignées cellulaires susmentionnées ont été utilisées pour tester l'effet de l'EEAa sur la viabilité cellulaire afin d'en sélectionner la plus sensible. La viabilité cellulaire a été mesurée par la méthode au 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT).

a) Principe (Van *et al.*, 2011)

Le principe du test repose sur l'utilisation d'un sel de térazolium qui est réduit en formazan par les déshydrogénases intracellulaires (succinate déshydrogénase mitochondriale) des cellules vivantes. La quantité de formazan (violet) produit est proportionnelle à l'activité métabolique de cellules. Ce composé insoluble est solubilisé par du DMSO ou de l'isopropanol pour permettre son dosage spectrophotométrique à 570 nm.



b) Mode opératoire

Les cellules ont étéensemencées dans les plaques de culture (96 puits) en raison de 5000 cellules/puits (YUMM 1.7, B16-F1), 10000 cellules/puits (CT2A), 15000 cellules/puits

(GL261) pour un volume total de 100 µL/puits. Les plaques ont été pré-incubées dans les conditions optimales de croissance (37°C ; 5% CO₂) pendant 12H (temps de latence des différentes lignées) pour permettre aux cellules d'atteindre un état physiologique stable, de se répartir de façon homogène dans la plaque et d'atteindre leur phase de croissance optimale. Puis, 100 µL d'extrait préparé dans les milieux de culture ont été ajoutés dans chaque puits pour des concentrations finales de 10, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/mL. Les plaques ont été incubées dans les mêmes conditions pendant 24 et 48 H, à la suite desquels le milieu de culture était aspiré. La viabilité cellulaire a été mise en évidence par ajout de 10 µL de MTT (0,5 µg/mL) dans chacun des puits (à l'abri de la lumière) suivit de 4 H d'incubation. La révélation a été faite par ajout de 100 µL de DMSO (100%) dans les puits. Les densités optiques ont enfin été lues à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentage de viabilité selon la formule :

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance témoin}} \times 100$$

Des courbes dose-réponse (pourcentage de viabilité en fonction de la concentration en extrait) ont été réalisées afin de déterminer la CI₅₀ (concentration qui tue 50% de cellules) de l'extrait pour chaque cellule et à chaque temps d'incubation. La lignée cellulaire pour laquelle l'extrait a présenté la plus faible CI₅₀ après 48H a été sélectionnée pour la suite.

II.2.1.3.3 Détermination de l'effet de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* sur la peroxydation lipidique induite par le RSL 3

Ce test a été effectué chez la lignée cellulaire la plus sensible à l'extrait.

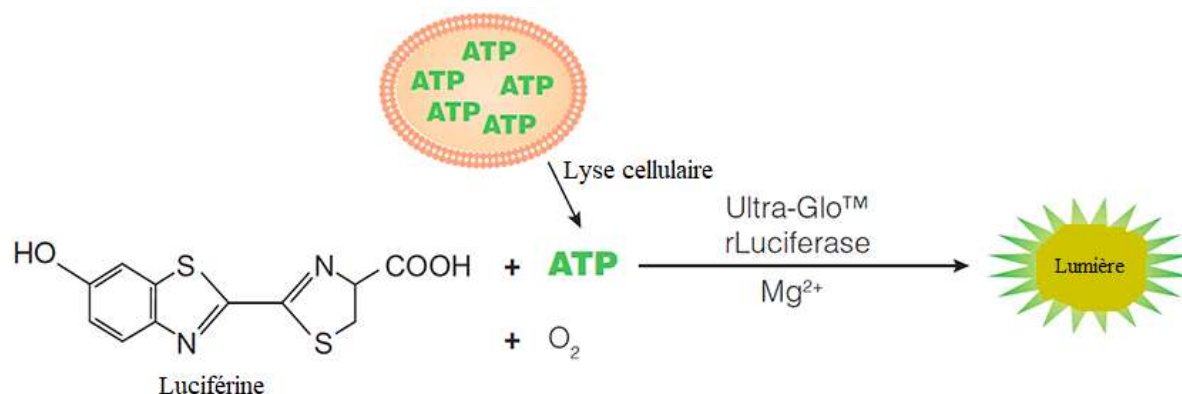
a) Principes

➤ Principe d'action du RSL-3

Le RSL-3 inhibe la glutathion peroxydase 4 indépendamment du glutathion réduit, conduisant à une accumulation des peroxydes lipidiques et donc la mort cellulaire (Yang *et al.*, 2014).

➤ Principe de la mesure de la viabilité cellulaire au CellTiter Glo 2.0

Il est basé sur la génération d'un signal lumineux issu de l'action de la luciférase sur l'oxyluciférine en présence de l'ATP produit par les cellules viables. Le signal généré est proportionnel à la quantité d'ATP présent. Cette quantité d'ATP est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes présentes en culture.



b) Mode opératoire

Les cellules ont étéensemencées 5000/puits durant une nuit. Puis, elles ont été traitées avec 100 μ L d'EEAa aux concentrations de 50, 100 et 150 μ g/mL ou la ferrostatine (2 μ mol/mL). Après 1 h d'incubation (37°C, 5% CO₂), le milieu de culture a été remplacé par 100 μ L de RSL-3 (0,004 mM) préparé dans le milieu de culture contenant l'extrait ou la ferrostatine. La plaque a été incubée pendant 4 h et la viabilité cellulaire a été mesurée après ajout de 90 μ L de *Cell Titer-Glo* dans chaque puits. La plaque a été couverte avec un film en aluminium pendant 15 min et la luminescence a été mesurée.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

II.2.1.3.4 Détection par western blot des protéines clés des processus de mort cellulaire par apoptose et nécroptose chez les cellules traitées avec l'EEAa

Dans le but d'élucider les voies par lesquelles l'EEAa induit la mort des cellules cancéreuses, la recherche des protéines impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire a été faite par la technique de western blot. Deux voies d'induction de la mort cellulaire ont été explorées à savoir ; l'apoptose à travers la détection de la Caspase-3 clivée (active) et la nécroptose à travers la détection des formes phosphorylée (active) et déphosphorylée (inactive) de la protéine *Mixed Lineage Kinase-Like* (MLKL). La β -actine a été détectée comme gène de référence.

Les cellules (la lignée la plus sensible) ont été ensemencées dans des microplaques de 6 puits pour une densité de 350000 cellules/puits. Après une nuit d'incubation, (37°C, 5% CO₂), les cellules ont été traitées ou non avec l'EEAa à CI₅₀ pendant 24h puis, L'étoposide à la concentration de 2 µM a été utilisé comme composé pro-apoptotique de référence.

a) Extraction des protéines

➤ Mode opératoire

Après 24 h de traitement, les cellules ont été décollées par trypsinisation (ajout de 1mL/puit de trypsine-EDTA 0.25%) et centrifugé à 1200 tr/min pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été solubilisé dans 25 µL de tampon de lyse et les cellules soumises à trois cycles de chocs thermiques (azote liquide/bain marie 37°C) afin d'améliorer la lyse cellulaire. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 13 000 tr/min à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant constituant l'extrait protéique a ensuite été transféré dans un nouveau tube.

Quantification des protéines par la méthode de Bradford

Principe : en milieu acide, la forme anionique du bleu de Coomassie forme un complexe avec les résidus aromatiques des acides aminés constitutif des protéines, absorbant entre 465 et 595 nm.

Mode opératoire : l'échantillon a été dilué au 1/4, puis 25 µL ont été introduits dans une plaque 96 puits auxquels ont été ajoutés 200 µL de réactif de travail. Après 30 min d'incubation à 37°C, la densité optique a été mesurée à 562 nm. La quantité de protéine a été estimée à partir de l'étalonnage faite avec de l'albumine du sérum bovin (500 µg/mL – 2000 µg/mL).

b) Séparation des protéines par électrophorèse

i) Principe de l'électrophorèse en condition dénaturante

C'est une technique de séparation des molécules dans un champ électrique en fonction de leur poids moléculaire et leur charge. Le β-mercaptoéthanol rompant les ponts dissulfures et le sodium dodecyl sulfate (SDS) conférant à toutes les protéines une charge nette négative, elles migreront toutes vers l'anode en fonction de leur poids moléculaire ; les plus grosses migrant plus lentement.

ii) Mode opératoire

➤ **Préparation de l'échantillon**

A 12 µg de protéines ont été ajoutés du tampon Laemmli 5X ; puis les protéines ont été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. L'ensemble a été centrifugé à vitesse maximale pendant 10 sec, pour précipiter l'ensemble des protéines dans le mélange.

➤ **Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide**

Le gel de polyacrylamide à 12,5% a été coulé sur une lame de verre. Puis 150 mL de tampon cathodique 1X ont été versés dans le joint pour laver les puits et éliminer les bulles. Ensuite, le tampon anodique 1X a été introduit dans la partie extérieure du réservoir de tampon jusqu'au trait de jauge. Puis, 7,5 µL de marqueurs de poids moléculaires et 50 µL d'extrait protéique ont été introduits dans les puits correspondants. Enfin, la cuve électrophorétique a été connectée à un circuit d'alimentation électrique de 80V pendant 90 min.

c) Transfert des protéines séparées sur membrane de polyvidylene difluoride

i) Mode opératoire

La membrane a été activée dans le méthanol (100%) pendant 10 min puis, équilibrée dans le tampon de transfert pendant 5 min. Le gel issu de l'électrophorèse a été transféré dans un récipient en plastique avec du tampon de transfert pour l'équilibrer pendant 5 min également. De même, toutes les autres composantes du transfert (cassette, 2 éponges, 2 morceaux de papier filtre) ont été trempés dans le tampon froid. Un sandwich a été construit de bas en haut, en plaçant cassette (posée sur sa face noire), l'éponge, le papier filtre, le gel centré, la membrane de PVDF, le papier filtre, l'éponge et la face transparente de la cassette. La cassette a été fermée et serrée, puis placée dans la cellule de transfert. Puis la cellule de transfert a été placée dans le réservoir de tampon placé sur de la glace. Le réservoir de tampon a été rempli au 1/3, transféré dans la chambre froide et complété au plein avec du tampon. Enfin, un courant électrique constant de 0,2A et 15V a été appliqué au réservoir pendant 15h pour favoriser le transfert entre le gel et la membrane de PVDF.

- Blocage de la membrane PVDF

Passé le temps de transfert, la cassette a été retirée de la cellule de transfert, puis, les éléments du sandwich ont été soigneusement décollés du haut vers le bas jusqu'à ce que la membrane soit atteinte. Elle a immédiatement été rincée dans du TBST 1X (membrane côté protéine vers le haut) et 10 mL de tampon de blocage LI-COR Odyssey (TBS) y a été ajouté. L'ensemble a été incubé pendant 1h à 25°C (TA) pour bloquer la membrane.

d) Révélation immunologique des spots

La révélation a été faite en présence des anticorps primaires spécifiques à la β -actine, à la caspase-3 clivée et aux protéines pMLKL et MLKL. Le complexe immunitaire formé a été mis en évidence grâce à un anticorps secondaire couplé à un élément radioactif.

i) Mode opératoire

- Incubation avec l'anticorps primaire

La membrane a été sortie du tampon de blocage et placée sur du papier film, puis elle a été réhydratée avec ce même tampon. Après marquage de son orientation, la membrane a été placée à l'intérieur du tube conique avec l'anticorps primaire (côté protéine tourné vers l'intérieur du cône), et incubé pendant 12H dans une chambre froide et sous rotation (vitesse = 10-15). Enfin, la membrane a été retirée du tube conique et rincée 3 fois dans du TBST 1X pendant 5 min.

- Incubation avec l'anticorps secondaire et visualisation

La membrane a ensuite été incubée pendant 1 h, à TA, à l'abri de la lumière et sous agitation dans 10 ml de tampon de blocage Odyssey (LiCOR) contenant l'anticorps secondaire. La membrane a ensuite été lavée 3 fois dans du TBST (1X), pendant 5 minutes chacune sur l'agitateur et toujours à l'abri de la lumière.

Expression des résultats

L'image a été réalisée avec le logiciel ImageStudio et le système Odyssey.

II.2.1.3.5 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* sur l'expression de quelques gènes impliqués dans la cancérogenèse

La lignée cellulaire la plus sensible a également été utilisée comme système d'essai. Les gènes évalués étaient ceux impliqués dans l'inflammation (TNF- α , IL-10, IL-6, et IL-1 β , TGF- β), l'angiogenèse et l'invasion (VGEF, IGF-1, PDGFR), la progression du cycle cellulaire (E2F2 et E2F1) et la résistance à l'apoptose (BCL-2, BCL-6). Les cellules ont étéensemencées dans les microplaques de 6 puits et traitées comme dans la section précédente et l'ARN total a été extrait.

a) Extraction de l'ARN total

i) Principe (RNeasy mini kit)

La technologie combine les propriétés de liaison sélective d'une membrane à base de silice et la vitesse de la technologie de microspin. Un système de tampon spécialisé à haute teneur en sel permet de lier à la membrane de silice RNeasy jusqu'à 100 µg d'ARN de plus de 200 bases. Les échantillons biologiques sont d'abord lysés et homogénéisés en présence d'un tampon guanidine-thym hautement dénaturant contenant de la guanidine-thiocyanate, qui inactive immédiatement les RNases afin de garantir la purification de l'ARN intact. De l'éthanol est ajouté pour créer les conditions de liaison appropriées. L'échantillon est ensuite appliqué à une colonne d'essorage RNeasy Mini, où l'ARN total se lie à la membrane et les contaminants sont efficacement éliminés. L'ARN de haute qualité est ensuite élué dans 30-100 µl d'eau.

ii) Mode opératoire

➤ Lyse cellulaire et homogénéisation

Après traitement, le surnageant a été éliminé, les cellules trypsinées (ajout de 1 mL/puits de trypsine-EDTA 0.25% pendant 3 minutes) puis, 600 µL de tampon de lyse RLT a été ajouté à chaque puits et l'ensemble a été mélangé par pipetage. Ensuite, le lysat a été transféré dans la colonne d'essorage QIAshredder placé dans un microtube (2mL) de collecte. L'ensemble a été homogénéisé pendant 2 min à 14000 trs/min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée.

➤ Isolement de l'ARN

Un volume équivalent d'éthanol 70% a été ajouté à l'homogénat et l'ensemble a été mélangé par pipetage. Puis, 700 µL ont été transférés dans la colonne d'essorage RNeasy placé dans un microtube de collecte. L'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 15 secondes et le flux a été rejeté. A la colonne RNeasy, 350 µL de tampon RW1 ont été ajoutés, et l'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 15 secondes. Le flux a été éliminé et 80 µL du super mélange DNase ont été ajoutés à la colonne, puis l'ensemble a été incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Ensuite, le même volume de RW1 a été ajouté, la colonne a été centrifugée à 10000 tr/min pendant 15 secondes et le flux éliminé. Puis, 500 µL de tampon RPE ont été ajoutés dans la colonne, l'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 2 min et le flux éliminé. Cette étape a été répétée une fois, et la colonne RNeasy a été transférée dans un autre tube de collecte et l'ensemble a été centrifugé à vitesse maximale pendant 1 min pour éliminer le maximum de tampon RPE. La colonne RNeasy a une fois de plus été transférée dans un autre microtube de collecte (1,5 mL), et 50 µL d'eau stérile dépourvue de RNase ont été ajoutés à la membrane de la colonne d'essorage. Après 5 min

d'incubation à température ambiante, l'ensemble a été centrifugé et le flux contenu dans le tube de collecte contenant l'ARN a été conservé.

La pureté de l'extrait d'ARN a été mesurée en faisant le rapport des densités optiques obtenues au NANODROP entre 260 nm et 280 nm (260/280).

b) Transcription inverse et synthèse de l'ADN complémentaire double brin

i) Principe

Il s'agit d'une réaction enzymatique qui convertit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), en utilisant une ADN polymérase dépendante de l'ARN (aussi appelée transcriptase inverse). L'ARNm est chauffé pour éliminer les structures secondaires. Une **amorce** (oligo-dT) La **transcriptase inverse** ajoute des nucléotides complémentaires à la matrice d'ARN, générant un brin d'ADNc. **Ensuite**, La transcriptase inverse est désactivée par chauffage (70–85°C) pour stopper la réaction. Une ADN polymérase est ajoutée en solution pour synthétiser un deuxième brin d'ADNc.

ii) Mode opératoire

L'ARN obtenu a été retro-transcrit en ADNc en prélude à la PCR. Pour cela, Un microgramme (1 µg) d'ARN total a été ajouté à 4 µL de mélange réactionnel 5X et 1µL de transcriptase inverse. L'ensemble a été complété à 20 µL avec de l'eau dépourvue de nucléase. Puis, le mélange a été introduit dans un thermocycleur programmé 5 min à 25°C (fixation des amorces), 20 min à 46°C (transcription inverse) et 1 min à 95°C (désactivation de la transcriptase inverse) puis Récupération à 4°C.

c) Polymerase Chaine Reaction à temps réel

i) Principe

Il repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant au cycle $n < 40$ (PCR semi-quantitative). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman³ et Beacon) ; ces sondes ne fluoresçant qu'une fois fixées à l'ADN. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un numéro de cycle PCR appelé Ct (Cycle Threshold) ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

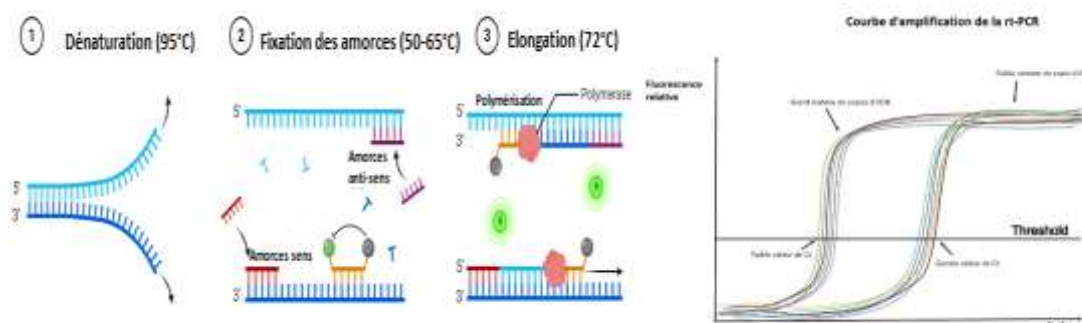


Figure 26: Principe rt-PCR

ii) Mode opératoire

Pour chaque gène, 10 μ L du super mélange KAPA SYBR FAST qPCR (2X), 0,4 μ L d'amorces (Tableau V) sens (200 mM dans le milieu réactionnel), 0,4 μ L d'amorce anti sens (200 mM) et l'ADNc extrait à partir d'1 ng d'ARN ont été introduits dans les microtubes pour PCR. Les tubes ont été introduits dans le thermo-cycleur et la température a été maintenue à 95°C pendant 3 min pour l'activation de l'enzyme. Ensuite 40 cycles de 95°C pendant 3 sec (dénaturation) et 60°C pendant 20 sec (fixation des amorces, élongation et acquisition des données) ont été effectués.

Tableau V: Séquences d'amorces spécifiques aux gènes étudiés

Gènes	Sens (5'- 3')	Anti sens (5'- 3')
<i>β-actin</i>	ACGACGTGGCAGCTCTCGTTGTGG	GGTGCTTCGGTCAGCAGCACGGA
<i>GAPDH</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	GAAGGTGGAAGAGTGGGTG
<i>HRPT</i>	TGGATACAGGCCAGACTTTGTT	CAGATTCAACTTGCCTCATC
<i>18s</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTACTAGCG
<i>VEGF</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	TTTACACGTCTGCGGATCTT
<i>IGF-1</i>	GTGTGGACCGAGGGCTTTTACT	GCTTCAGTGGGGCACAGTACATC
<i>PDGF-R</i>	TAGCGCGGAACCTCAGAGAGA	TGGGAGGTCCCCATAGCTCC
<i>BCL-2</i>	ATGCCTTTGTGGAATATATGCG	GGTATGCACCCAGAGTGATGC
<i>BCL-6</i>	CCTGAGGGAAGGCAATATCA	GTTTAAGTGCAGGGGCCATT
<i>E2F1</i>	GAGGCTGGATCTGGAGACTG	GAAGCGTTTGGTGGTCAGAT
<i>E2F2</i>	AGTTGCTCCCTGAGCTTCAA	GCTCCTTGAAGTTGCCTACG
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IL-10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>IL-6</i>	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTT
<i>IL-1β</i>	CTTGGGCCTCAAAGGAAAGAA	AAGACAAACCGTTTTTCCATCTTC
<i>TGF-β</i>	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Les seuils de déclenchement (Ct) des gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport à ceux des gènes de référence. Et l'expression relative du gène d'intérêt par rapport au témoin non traité a été calculée selon la formule ci-après :

$$\text{Expression relative} = 2^{20 - \Delta\text{Ct échantillon}} - 2^{20 - \Delta\text{Ct témoin}}$$

Avec : $\Delta\text{Ct} = \text{Ct gène cible} - \text{moyenne Ct gènes domestiques}$

L'échantillon représentant les cellules traitées et le témoin les cellules non traitées.

Les gènes domestiques étaient la β -actine, le Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDHase), l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT) et le ribosome S18.

II.2.2 Exploration des activités antitumorales et immunomodulatrice de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* chez des modèles expérimentaux de cancer du sein

Le système d'étude était constitué de rates albinos de souche *Wistar* âgées de 6 semaines, avec un poids moyen de $78 \text{ g} \pm 10$. Ce protocole expérimental a été approuvé par le comité éthique institutionnel de l'université de Yaoundé I, ceci marqué par la délivrance de la clairance éthique N° **BTC-JIRB2023-2024** (Annexe 9)

II.2.2.2.1 Protocole expérimental

Le protocole décrit par **Mvondo et al (2021)** avec des modifications a été exécuté.

a) Induction du cancer du sein au DMBA

Après la période d'acclimatation, 25 rats ont été soumis à une induction du cancer du sein au 7,12- Dimethylbenz(a)anthracène (DMBA) à la dose unique de 50mg/Kg de poids corporel (Pc).

Les animaux ont préalablement été mis sous anesthésie par injection intrapéritonéale de 5 mg/Kg, PC de diazépam (10 mg/mL) et 75 mg /Kg, PC de kétamine (50 mg/mL) au niveau de la patte arrière droite. Les volumes d'administrations étaient de 0.5 mL/Kg, PC et 1 mL/Kg, PC respectivement. Une fois endormis, la solution de DMBA précédemment préparée leur a été injectée par voie sous cutanée, au niveau du mamelon, situé sur la patte arrière gauche. Le volume d'administration du DMBA étant de 1mL/Kg, PC.

Le DMBA étant un composé hautement cancérigène, l'induction s'est faite par un personnel expérimenté, arborant une blouse à usage unique, un masque facial et des gants de protection.

Diagnostic

Les animaux ont été observés et les mamelles palpées (avec des mains gantées) à partir du deuxième mois. La réponse positive à l'induction était marquée par la modification de la peau au niveau de la zone d'induction, soit la peau sous forme de peau d'orange, ou l'apparition des tumeurs solides.

a) Traitement des animaux

Au bout du troisième mois après l'induction, les animaux ayant positivement répondu à l'induction (n = 20) ont été répartis en 6 groupes de 5 rats chacun (2 animaux avec tumeur par groupe) et traités comme suit :

- Un groupe témoin malade (DMBA) non traité
- Deux (2) groupes essais qui recevaient de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 mg/Kg, PC (EEAa 150) et 300 mg/Kg, PC
- Un groupe référence (TAM) qui recevait le tamoxifène à la dose de 3,3 mg/Kg, Pc
- A ces groupes a été joint le groupe de 5 rats n'ayant pas reçu du DMBA, représentant ici le témoin normal (TN)

NB: (1) les animaux n'ayant pas répondu positivement à l'induction avant le début du traitement ont été euthanasiés et ensevelis.

(2) le choix des doses s'est fait selon l'étude de toxicité menée par **Ebhohimen et Okolie (2021)** qui a relevé que l'EEAa était non toxique à des doses inférieures à 1000 mg/Kg, Pc. De plus cette étude a relevé la capacité de cet extrait à protéger d'une toxicité hépatique et rénale induite chez le rat aux doses de 350 et 750 mg/Kg, Pc. En se basant sur les recommandations de la FDA proposant d'utiliser des doses inférieures ou à égales à 400 mg/Kg, PC pour des extraits bruts, les doses ont donc été sélectionnées selon une suite géométrique d'ordre 2 d'une dose proche de la plus faible utilisée par **Ebhohimen et Okolie (2021)**.

Le traitement se faisait tous les matins par gavage œsophagien à l'aide d'une sonde. Le volume d'administration était de 5 ml/Kg, Pc pour les extraits et le tamoxifène, préparés dans de l'eau distillée. Le traitement a duré 28 jours au cours desquels les animaux étaient pesés de façon hebdomadaire.

b) Sacrifice des animaux

Au 29^{ième} jour, les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie à la vapeur d'éther après un jeûne non hydrique de 12 heures. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque et introduit en partie dans les tubes secs et les tubes avec anticoagulant (EDTA) en prélude à la préparation du sérum, plasma et la numération sanguine. Les animaux ont été disséqués. Le foie, les poumons, le thymus, la rate, et la glande mammaire ont été isolés, rincés dans une solution de NaCl 0,9%, essorés et pesés. Les carcasses après dissection ont été ensevelies.

Les diamètres tumoraux ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse puis, une portion de la glande mammaire et du foie a été prélevée pour la préparation des homogénats. Les portions restantes ainsi que les autres organes ont été fixés dans du formol 10% pour la réalisation ultérieure des coupes histologiques.

c) Préparation des différents échantillons biologiques

i) Préparation du sérum et du plasma

Les tubes secs et EDTA contenant du sang ont été laissés au repos à température ambiante (25 °C) puis centrifugés pendant 10 min à 3000g à 25 °C. Le surnageant constituant le sérum (tube sec) ou le plasma (tube EDTA) ont été collectés dans les tubes Eppendorf et conservés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

ii) Préparation des homogénats de glande mammaire et foie

0,5 g d'organe a été broyé dans un mortier en porcelaine en présence d'1 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7). Le broyat a été complété à 5mL avec le tampon phosphate (0,1 M, pH 7), puis centrifugé à 1500 g pendant 5min. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -20°C.

II.2.2.2 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium* sur la progression des tumeurs

L'effet des traitements sur la progression des tumeurs mammaires a été évalué à travers la détermination des paramètres tumoraux, de dosage de quelques paramètres

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

biochimiques associés et l'analyse histopathologique de la glande mammaire et quelques organes de métastases.

a) Détermination des paramètres tumoraux

Les mensurations tumorales (diamètres et épaisseur) prises lors du sacrifice, le nombre d'animaux par groupe ayant les tumeurs en fin de traitement ainsi que la masse ont permis de calculer l'incidence tumorale, le volume tumoral, la masse tumorale moyenne et les inhibitions relatives à ces paramètres selon les formules ci-après (**Faustino-Rocha et al., 2013**) :

$$\text{Incidence tumorale (\%)} = \frac{\text{Nombre d'animaux avec tumeur dans le groupe}}{\text{Nombre total d'animaux dans le groupe}} \times 100$$

$$\text{Masse relative de la tumeur} = \frac{\text{Masse de la tumeur}}{\text{Masse de l'animal}} \times 100$$

$$\text{Masse tumorale moyenne} = \frac{\text{Somme des masses des tumeurs dans le groupe}}{\text{Nombre d'animaux dans le groupe}}$$

$$\text{Volume tumoral (Cm}^3\text{)} = (\text{Grand diamètre} \times \text{petit diamètre} \times \text{Epaisseur})$$

Les pourcentages d'inhibition par rapport au témoin malade ont été calculés selon la formule générale suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Valeur du paramètre dans le groupe traité}}{\text{Valeur dans le groupe témoin malade}} \times 100$$

a) Mesure des taux sériques promoteurs de la croissance tumorale estradiol et EGF

En plus de la physiologie du sein, la caractéristique moléculaire HER et RE des cancers mammaires laissent comprendre que l'estradiol et le facteur de croissance épidermique (*EGF*) sont des agents de promotion de la tumorigenèse mammaire. Ainsi, les taux sériques de ces 2 facteurs de croissance ont été mesurés. Par ailleurs, l'approvisionnement en glucose et son utilisation sont impératifs pour la survie et la croissance des cellules cancéreuses ; d'où sa prise en considération comme facteur de survie.

i) Dosage des taux sériques d'EGF

Le dosage s'est fait à l'aide d'un kit commercial exploitant le principe du Luminex multiplex.

➤ Principe du test (BioRad)

La technologie Luminex multiplex permet de doser simultanément une large gamme de molécules dans un même puits à l'aide des billes colorées de l'intérieur. Ces billes

possèdent des régions spécifiques pour chaque biomarqueur. La réaction est basée sur le principe immuno-enzymatique en sandwich sur des microsphères ou billes (phase solide). En effet, les anticorps de capture dirigé contre l'élément à doser sont fixés de manière covalente aux billes. Les billes cotées réagissent avec l'élément à doser (biomarqueur) présent dans l'échantillon. un anticorps de détection biotinylé est ajouté pour créer un complexe sandwich. Le complexe final de détection est formé après addition de la streptavidine couplé à la phycoérythrine (PE) ; cette dernière (PE) servant d'indicateur fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'élément à doser présent dans l'échantillon.

Principe de mesure de la fluorescence : l'intensité du signal renvoyé par la PE est mesurée à l'aide d'un lecteur Luminex ou un système Bio-Plex. En principe, un laser rouge (635 nm) illumine les teintes fluorescentes à l'intérieur des billes afin de les classer et identifier les biomarqueurs. Simultanément, un laser vert (532nm) excite la PE pour générer un signal rapporteur, qui est détecté par un tube photomultiplicateur. Un processeur digital à haute vitesse gère l'entrée des données, et le logiciel Bio-Plex Manager les présente comme intensités fluorescentes médianes, associées aux concentrations correspondantes en pg/L (Figure 26).

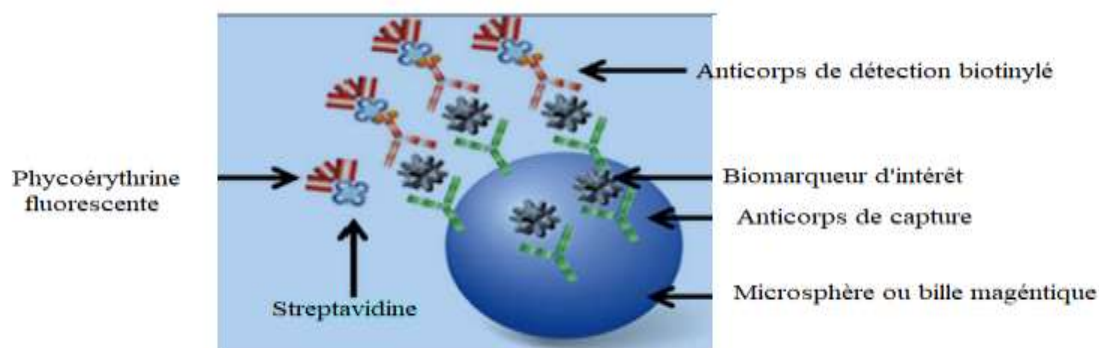


Figure 27: Schéma de principe d'ELISA multiplex

➤ Mode opératoire

Préparation : Les échantillons et les réactifs ont été tout d'abord ramenés à température ambiante. Puis les échantillons ont été dilués au 1 /4 avec le diluant pour échantillon. Le standard a été reconstitué par ajout de 500 µL du diluant de standard, puis une cascade de dilution a été effectuée à partir de 50 µL de standard pour des volumes finaux de 150 µL. les billes ont été diluées 10 fois avec le tampon de test.

Réalisation : 50 µL de billes cotées diluées ont été ajoutés à chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Les puits ont été lavés 2 fois avec 100 µL de tampon de lavage. Puis, 50 µL d'échantillon, standard ou blanc (tampon d'essai) ont été ajoutés dans les puits. La plaque a été couverte avec un papier scellant, et incubée 1 h à température ambiante sous agitation à 850 tr/min. Les puits ont ensuite été lavés 3 fois avec 100 µL de tampon de lavage. Puis, 25 µL d'anticorps de détection fraîchement dilué (au 1/10 avec le diluant requis) y ont été ajoutés. La plaque a une fois de plus été incubée dans les mêmes conditions que précédemment. Ensuite les puits ont été lavés 3 fois et 10 µL de streptavidine-PE (100 ×) fraîchement diluée au 1/100 dans le tampon d'essai ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été incubée comme précédemment. Les puits ont une fois de plus été lavés, et 125 µL de tampon de test ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été agitée pendant 30 secondes et la fluorescence a été mesurée au Bio-Plex 200.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats étaient exprimés en pg/L

ii) Dosage de l'estradiol (ELISA Compétitif retardé)

➤ **Principe**

La méthode reposait sur le principe d'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) compétitif retardé. En effet, en mettant l'anticorps biotinylé en présence du sérum antigénique, il se produit un complexe immun. L'ajout retardé d'un conjugué enzymatique déclenche une réaction de compétition entre ce dernier et l'antigène sérique pour les sites non liés de l'anticorps biotine. Après élimination des anticorps biotine non liés par lavages, l'ajout du substrat de l'enzyme déclenche une activité enzymatique dans la fraction liée qui est inversement proportionnelle à la concentration en estradiol dans le sérum.

➤ **Mode opératoire**

Avant de procéder à l'essai, tous les réactifs, le sérum, les calibreurs de référence et les contrôles ont été ramenés à température ambiante (20-27°C). Les microplaques ont été formatées pour chaque sérum de référence. Cinquante microlitre (50 µL) de réactif œstradiol biotine ont été introduits dans tous les puits. Puis, 25 µL du sérum de référence ou du spécimen ont été ajoutés dans les puits assignés. Ensuite, la microplaque a été homogénéisée pendant 20 à 30 min et incubée à température ambiante pendant 30 minutes. 50 µL de réactif enzymatique d'œstradiol y ont été ajoutés, la plaque a été agitée une seconde fois pendant 20 à 30 min et laissée incubée pendant 90 min. Le contenu de la microplaque a été décanté par aspiration et

350 µL de tampon de lavage ont été ajouté pour nettoyage, suivi de l'ajout de 100 µL de réactif de substrat. Après 20 min d'incubation du mélange à température ambiante, 50 µL de solution d'arrêt ont été ajoutés, l'ensemble a été homogénéisé pendant 20 min et les densités optiques ont été lues à 450 nm.

➤ Expression des résultats

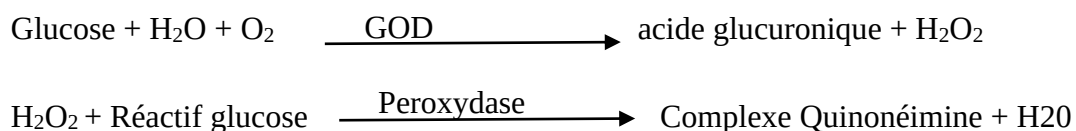
La détermination de la concentration d'œstradiol pour une inconnue s'est faite en plaçant l'absorbance de chaque sérum de référence en fonction de la concentration d'œstradiol correspondante (pg/L) sur un graphique linéaire (Annexe 10). Les points ont été reliés avec une courbe de meilleure qualité. Les concentrations (en pg/L) à partir de l'absorbance des moyennes.

b) Mesure de l'activité cellulaire dans la glande mammaire : dosage du glucose mammaire

Le fonctionnement des cellules mammaires a été évalué à travers le dosage du glucose dans l'homogénat de la glande mammaire, l'aide du kit Chronolab, utilisant la méthode de glucose oxydase. (Trinder, 1959)

i) Principe

Ce dosage est basé sur une double réaction enzymatique. La glucose-oxydase (GOD) oxyde le glucose en acide glucuronique et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier permet l'oxydation du 4-amino-antipyrine et du phénol en un complexe Quinonéimine coloré (rouge brique) qui absorbe à une longueur d'onde de 510nm grâce à une peroxydase. L'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration en glucose dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

Dix microlitres (10 µl) d'échantillon ou de standard ont été ajoutés à 1000 µL de réactif puis incubé pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance de l'échantillon contre le blanc réactif a été lue à la longueur d'onde de 510 nm.

iii) Expression des résultats

$$[Glucose] \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{D.O \text{ echantillon}}{D.O \text{ etalon}} \times Valeur \text{ etalon}$$

c) Analyse histologique de la glande mammaire et de quelques organes de métastase

i) Principe de la coloration à l'hématoxyline et l'éosine

Il est basé sur la coloration bichromatique des fragments tissulaires ; la nature cationique ou basique de l'hématoxyline lui confère une affinité avec les composantes cellulaires chargées négativement comme les acides nucléiques, conduisant à une coloration bleu-violet du noyau. L'éosine par contre, de par sa nature anionique ou acide, se lie aux éléments cellulaires cationiques présents dans le cytoplasme, conduisant à une coloration du cytoplasme allant du rose au rouge vif.

ii) Mode opératoire

Des coupes transversales de portions de glande mammaire, foie poumons, thymus et rate préalablement fixés dans le formol 10% ont été rangées dans des cassettes. Elles ont par la suite subit une déshydratation dans des séries d'alcool de concentration croissante (1 h dans de l'éthanol à 80%, 8h dans 4 solutions d'éthanol 95% et 6 heure dans 3 solution d'éthanol 100%). Elles ont ensuite été éclaircies dans 2 bains de Xylène (2 h/bain) et imprégnés dans 2 solutions de paraffine chaude (à raison de 2 h par passage). Les tissus ont par la suite été inclus de façon orientée dans un moule en inox contenant de la paraffine à 60°C, puis l'ensemble a été refroidi sur une plaque réfrigérante à 4°C. Les rubans de 5 µm d'épaisseur obtenus à l'aide d'un microtome ont été étalés dans un bain-marie (d'environ 40°C) contenant de l'eau gélatinée. Ces coupes ont par la suite été déposées sur des lames porte-objet et, séchées à 45°C à l'étuve pendant 24 heures. Ensuite, elles ont été colorées à l'hématoxyline et l'éosine. Une fois asséchées à TA, Les lames ont été recouvertes de lamelle et la microarchitecture a été observée au microscope optique (Axioskop 40) à l'objectif 400 pour la glande mammaire, 100 poumons et 200 pour le foie et les reins (Smith et Bruton, 1977).

iii) Expression des résultats

Les images des mircoarchitectures ont été réalisées sur ordinateur connecté au microscope. L'image a été transférée à l'aide des logiciels MRGrab1.0 et Axio Vision 3.1 (Zeiss, Hallbergmoos, Germany). L'Atlas et la classification histologique des tumeurs mammaires chez le rat (**Rousso et Rousso, 2000**) a été utilisé pour classer histologiquement les glandes mammaires.

II.2.2.2.3 Evaluation l'activité immuno-modulatrice de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* chez un modèle animal de cancer du sein

Elle a été effectuée à travers l'analyse hématologique, le dosage de quelques médiateurs cellulaires sériques et l'analyse l'histologie des organes lymphoïdes

a) Analyse hématologique

L'hémogramme s'est déterminé à l'aide d'un automate d'hématologie. Elle consistait en le dénombrement des globules rouges, plaquettes, globules blancs et ses sous classes. Le principe de fonctionnement repose sur la variation de la résistance électrique. En effet, le passage des cellules contenues dans l'échantillon de sang entre les électrodes de l'appareil entraîne une baisse de la conductivité électrique. Cette baisse de conductivité est proportionnelle à la taille de la cellule et est enregistrée sous forme d'impulsions électriques.

Le dosage de l'hémoglobine s'est fait par spectrophotométrie. En effet, l'agent de lyse des hématies se lie à l'hémoglobine pour former un complexe coloré qui absorbe à 525nm.

b) Dosage des cytokines TNF- α et INF- γ

Le dosage des médiateurs cellulaires s'est fait avec la technologie Luminex multiplex comme précédemment décrit (II.2.2.2.2 a). Il s'agissait précisément des taux sériques de *tumour necrosis factor* apha (TNF- α) et interféron gamma (INF γ) considérés respectivement comme cytokines pro et antiinflammatoires.

c) Dosage du radical oxyde nitrique (Manish *et al.*, 2006)

i) Principe

Il est basé sur la réaction de diazotation décrite par Griess. Il décrit la réaction chimique utilisant la sulfanilamide et le dichlorure de N-1-Naphtyléthylène diamine (NED) en milieu acide phosphorique avec obtention d'un produit coloré détectant le nitrite formé. La coloration pourpre est indicatrice de la présence de nitrites formés et la lecture est faite à 540 nm.

ii) Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'échantillon (glande mammaire ou sérum) ont été ajoutés à 100 µL d'une solution de sulfanilamide. Le mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après incubation, 100 µL de solution de NED y ont été ajoutés puis incubés de nouveau 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La lecture de la densité optique s'est faite à 540 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration en radical oxyde nitrique est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Concentration NO } (\mu\text{M}) = \frac{DO}{\epsilon \cdot l} ; \quad \text{Avec } \epsilon = 39500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ et } L=1\text{cm}$$

II.2.3 Exploration de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* contre les effets toxiques associés à l'administration du tamoxifène à des rats *Wistar* souffrant de cancer du sein

Le protocole expérimental était semblable à celui décrit dans la section précédente. A la seule différence que, les animaux traités avec l'EEAa aux doses susmentionnées (150 et 300 mg/Kg, Pc) recevaient 3,3 mg/Kg, Pc de TAM une heure après. Durant les 28 jours de traitement, le poids des animaux était pris.

Après sacrifice, le sang a été collecté dans les tubes EDTA et secs pour la préparation du plasma, du sérum et des hémolysât. Le foie et les reins ont été isolés pour la préparation des homogénats et la réalisation des coupes histologiques. L'utérus a également été isolé pour les coupes histologiques.

ii) Préparation de l'hémolysât

Après élimination du plasma et des globules blancs, dans le tube à anticoagulant EDTA, 100 µL du culot globulaire ont été introduits dans des tubes coniques puis lavé avec 2 ml d'une solution de NaCl (0,9%). L'ensemble a été centrifugé à 1500 g pendant 10 min à température ambiante et le surnageant jeté. Ce processus est répété 2 fois. L'hémolyse des érythrocytes a été réalisée après ajout de 2ml d'eau distillée ; le mélange a été centrifugé à 3400g pendant 10 min à 25 °C et le surnageant représentant l'hémolysât a été récupéré et conservé à -20 °C.

II.2.3.2 Evaluation de l'effet de l'extrait sur le développement d'une hyperplasie utérine induite par le tamoxifène

Le dosage de l'estradiol sérique, et l'analyse histologique de l'utérus ont été effectués comme décrits précédemment. La mesure de l'épaisseur de l'endomètre utérin a été faite à l'aide du logiciel image J

II.2.3.3 Evaluation de l'effet du traitement sur le statut métabolique

Le tamoxifène est connu pour entraîner une perte d'appétit conduisant à une perte de poids. Par ailleurs, sa prise altère le métabolisme lipidique, avec pour conséquence lointaine la stéatose hépatique non alcoolique. Par conséquent, la variation du poids et le profil lipidique ont été évalués pour apprécier l'effet du traitement sur le métabolisme.

II.2.3.3.1 Calcule de la variation de poids

Elle été calculée au début du traitement, après 2 semaines et à la fin du traitement selon la formule ci-après :

$$\text{Variation des poids (\%)} = \frac{P_x - P_{\text{initial}}}{P_{\text{initial}}} \times 100$$

P_x étant le poids à l'intervalle 2 semaines

II.2.3.3.2 Dosage des paramètres du profil lipidique

Il s'agissait particulièrement des taux de triglycérides et de cholestérol plasmatique

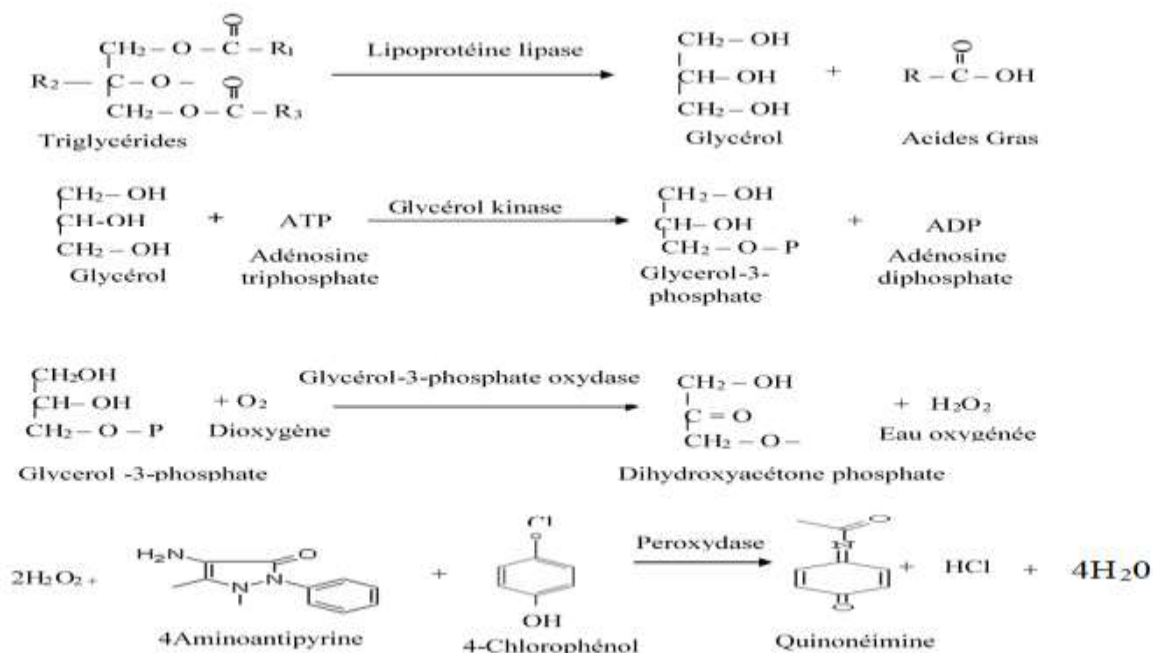
a) Dosage des triglycérides plasmatiques

Le dosage des triglycérides a été effectué à l'aide du kit Chronolab.

i) Principe (Fossati et principe, 1982)

Le glycérol, produit par hydrolyse enzymatique des triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase (EC 3.1.1.34), est phosphorylé par l'ATP pour produire le glycérol-3-phosphate et l'ADP à travers une réaction catalysée par le glycérol kinase (EC 2.7.1.30). La glycérol-3-phosphate oxydase (EC 1.1.3.21) catalyse ensuite l'oxydation du glycérol -3-phosphate pour produire le dihydroxyacétone-3-phosphate et H_2O_2 . Ce dernier se combine au 4-aminoantipyrine et au 4-chlorophénol pour former la quinonéimine sous l'influence

catalytique de la peroxydase (EC 1.11.1.9). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides présents dans l'échantillon.



iii) Mode opératoire

Dans des tubes étiquetés blancs, étalon et essai, ont été introduits respectivement 10 µL d'eau distillée, d'étalon ou d'échantillon plasmatique à analyser et 1000 µL de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 min à 25°C. L'absorbance de l'échantillon a été lue contre le blanc réactif à 505 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

iv) Expression des résultats

La concentration des triglycérides dans le plasma est donnée par la relation :

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance essai}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{valeur de l'étalon}$$

Avec : -Concentration étalon = 200 mg/dL ;

-Conversion en unité SI (mmol/L) = [triglycérides] en mg/dL × 0,0113.

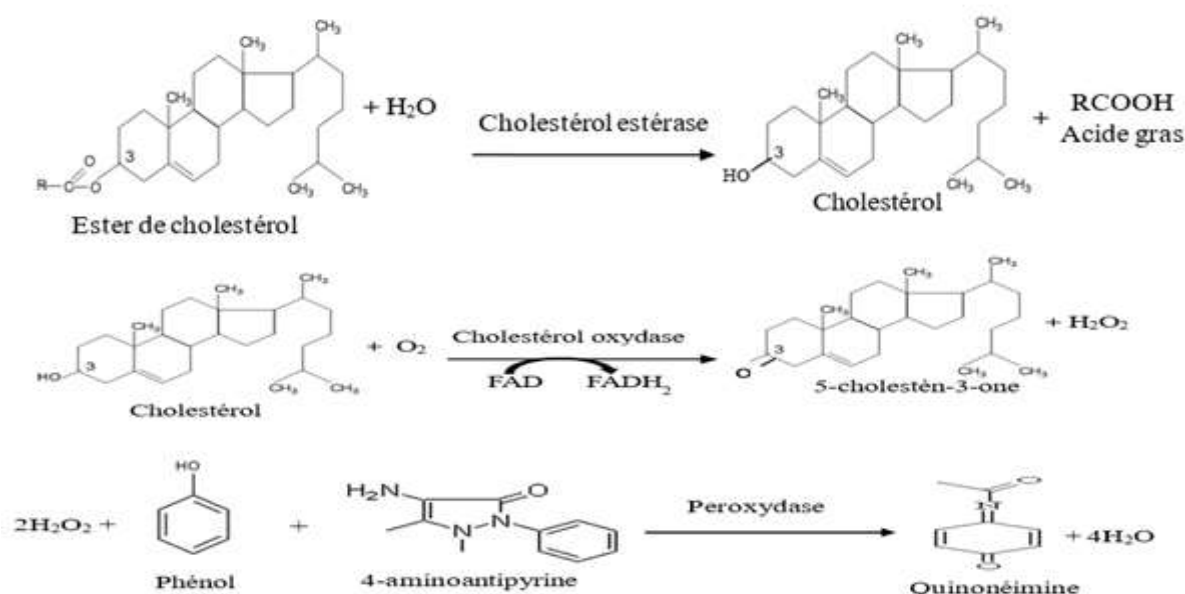
b) Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total a été fait à l'aide du kit Chronolab

i) Principe (Richmond, 1973)

La cholestérol estérase (EC 3.1.1.3) catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre y compris celui présent à l'origine est alors oxydé par la cholestérol oxydase (EC 1.1.1.6) en 4-cholestèn-3-one et en peroxyde

d'hydrogène. En présence de la peroxydase (EC 1.11.1.9), le phénol et le 4-aminoantipyrine se combinent avec le peroxyde d'hydrogène pour former un chromophore rouge (la quinonéimine) qui absorbe entre 500 et 550 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol total présent dans l'échantillon.



iii) Mode opératoire

Dans des tubes étiquetés blancs, étalon et essai ont été introduits respectivement 10 μ L d'eau distillée, d'étalon ou d'échantillon à analyser et 1000 μ L de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 min à 25°C. L'absorbance de l'échantillon a été lue contre le blanc réactif à 505 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

iv) Expression des résultats

La concentration en cholestérol total dans le plasma est donnée par la relation :

$$\text{Cholestérol total (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{valeur de l'étalon}$$

Avec : Concentration de l'étalon = 200 mg/dL ;

Conversion en unité SI (mmol/L) = [cholestérol total] en (mg/dL) $\times$ 0,0259.

II.2.3.4. Evaluation de l'effet du traitement sur l'intégrité du foie et des reins

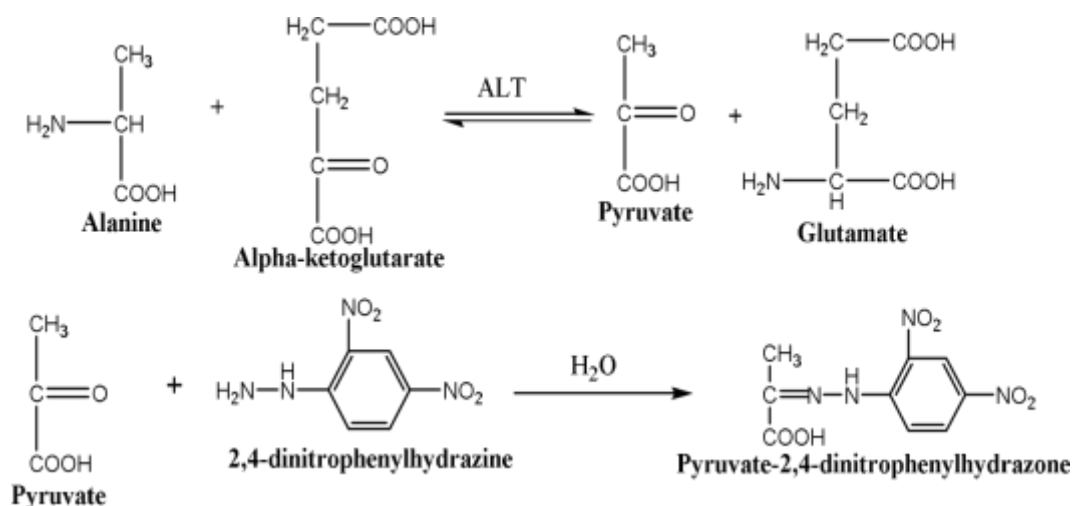
L'activité plasmatique des enzymes hépatique a été utilisée comme marqueur de l'intégrité hépatique et les taux plasmatiques d'acide urique et de créatinine ont été utilisés comme marqueurs de la fonction rénale. Le statut antioxydant a été évalué comme mécanisme de protection de ces organes.

II.2.3.4.1 Mesure des activités plasmatiques des enzymes hépatiques

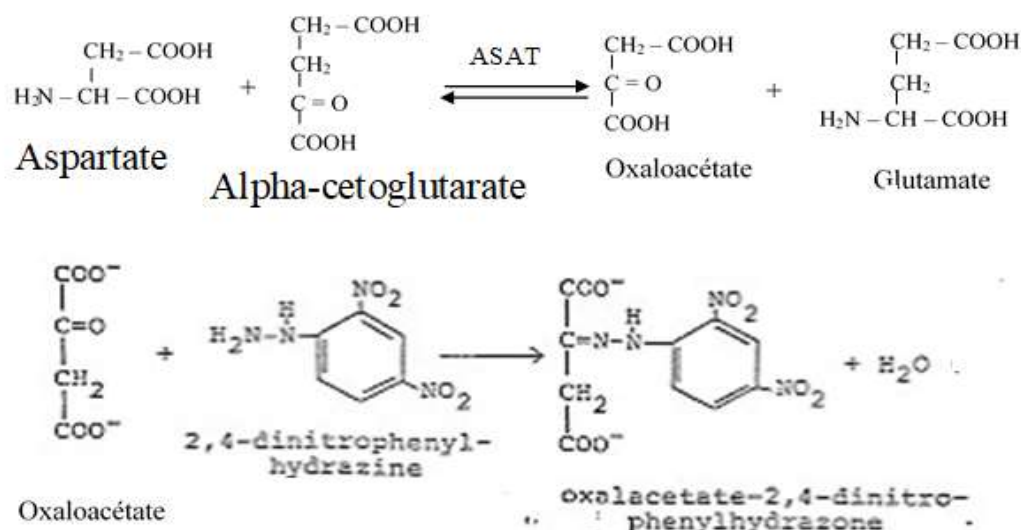
a) Mesure de l'activité plasmatique des transaminases (Reitman et Frankel, 1957)

i) Principes

L'alanine aminotransférase (ALAT) (EC 2.6.1.2) catalyse le transfert du groupement amine du L'alanine sur l' α -cétooglutarate pour former le pyruvate et le L-glutamate. Le pyruvate formé réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) pour donner le pyruvate-2,4-dinitrophénylhydrazone (complexe de couleur brun) dont l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité de pyruvate et présente un maximum d'absorption à 505 nm Selon la réaction ci-après :



L'aspartate aminotransférase (ASAT) (EC 2.6.1.1) catalyse le transfert du groupement amine de l'acide L- aspartique sur l' α - cétooglutarate pour former et le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate formé réagit avec le 2,4 DNPH (complexe de couleur brun). L'intensité de la coloration de dinitrophényhydrazine est directement proportionnelle à la quantité d'oxaloacétate et présente un maximum d'absorption à 505nm.



ii) Mode opératoire

Un volume (0,1 mL) de la solution substrat a été introduit dans les tubes à essai puis, pré-incubés à 37°C pendant 5 min. Ensuite, 0,02 mL de plasma y a été introduit suivit d'un ajout de 0,1mL d'eau distillée. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 30min (ALAT) ou 1H (ASAT) puis, 0,1mL de réactif de coloration y a été ajouté suivit d'une incubation à température ambiante pendant 20 min. La réaction a été arrêtée par ajout de 1 mL de NaOH (0,4N). Les densités optiques sont lues à 505 nm contre le tube blanc.

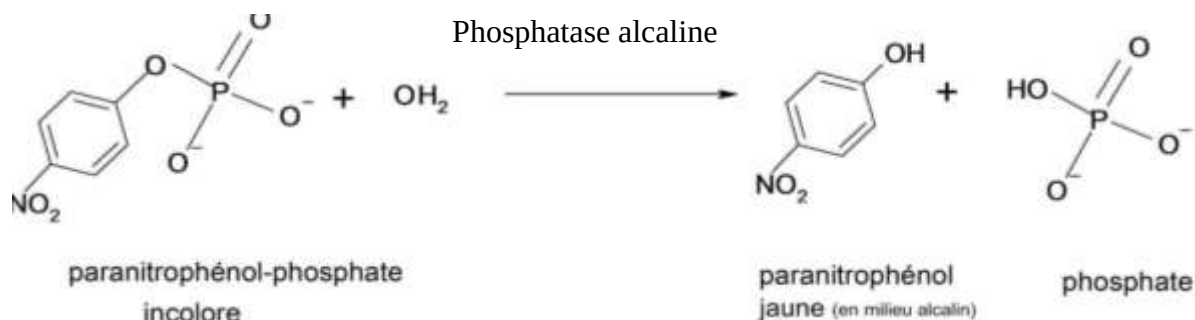
iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en activité d'ALAT et l'ASAT, déterminées à partir de l'équation des droites d'étalonnage présentée à l'annexe 10.

b) Dosage de la phosphatase alcaline (Bergmeyer *et al.*, 1974) :

i) Principe

La phosphatase alcaline (EC3.1.3.1) catalyse la réaction d'hydrolyse du groupement phosphate du paranitrophénol-phosphate, un chromogène à pH 10,4 libérant un produit coloré (jaune) appelé chromophore, le paranitrophénol et le phosphate suivant la réaction suivante :



ii) Mode opératoire :

1,2mL de réactif de travail a été introduit dans une cuve. Ensuite, 20µL de substrat y a été ajouté, puis homogénéisé et incubé pendant 1min. Les absorbances (A) ont été lues à 405 nm toutes les minutes pendant 3minutes.

iii) Expression des résultats

$$\text{PAL (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 330$$

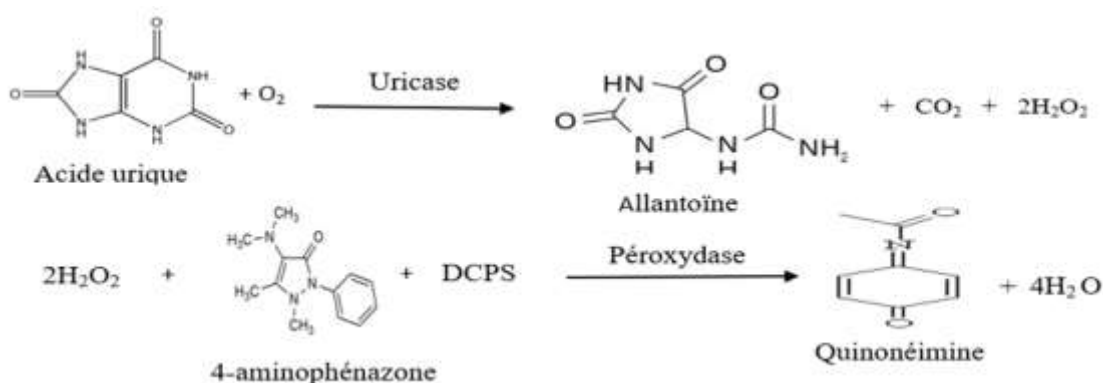
II.2.3.4.2 Dosage des paramètres biochimiques liés à l'intégrité du rein

L'acide urique et la créatinine ont été dosés dans le plasma des animaux, et l'analyse histologique des reins a été effectuée comme décrit précédemment

a) Dosage de l'acide urique plasmatique

i) Principe :

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$) qui, en présence de la peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et du 2,4-dichlorophenol sulfonate (DCPS) forme un composé rosacé : la quinonéimine. L'intensité de la quinonéimine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présente dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

A 25µL d'échantillon ou d'étalon, a été ajouté 1ml de réactif de travail. Le mélange a été incubé pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance a été lue à 520nm contre le blanc

iii) Expression des résultats

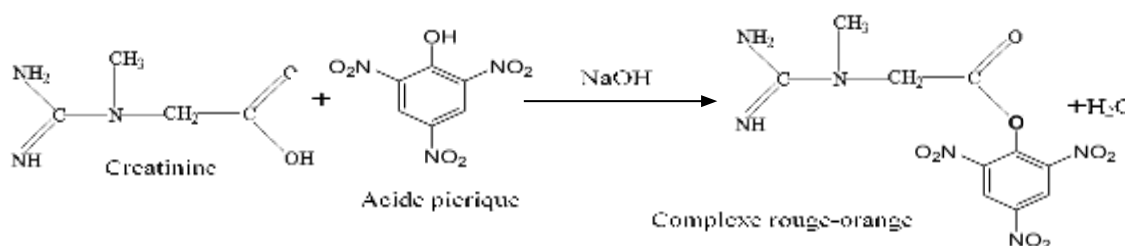
$$\text{concentration acide urique} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration étalon}$$

Avec : concentration étalon = 6mg/dL

b) Dosage de la créatinine (Bartels *et al.*, 1972)

i) Principe

En milieu alcalin, la créatinine forme un complexe jaune orange avec l'acide picrique. L'intensité de la coloration étant fonction de la concentration de la créatinine dans le milieu.



ii) Mode opératoire

Dans un tube à essai, 100µL d'échantillon ou de standard ont été ajoutés à 1mL de la solution de travail. Après agitation, l'absorbance à 520nm est lue à 30 et à 90 secondes après stabilisation du mélange. Le tube blanc a été réalisé avec de l'eau distillée.

iii) Expression des résultats

$$[\text{Créatinine}] = \frac{\text{DO essai}}{\text{DO étalon}} \times [\text{étalon}](\text{mg/dL})$$

Concentration de l'étalon=2 mg/dL

II.2.3.4.3 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur le statut antioxydant

L'activité de la catalase a été mesurée aux niveaux érythrocytaire, hépatique et rénale et les taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique ont été déterminés dans le plasma, le foie et les reins

a) Mesure de l'activité de la catalase (Sinha, 1972).

i) Principe

Cette méthode est basée sur le fait que la catalase (EC1.11.1.6) présente dans l'échantillon hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau (H_2O) et en Oxygène (O_2). Le H_2O restant après action de la catalase se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu-vert d'acide perchlorique instable ; ce dernier va ensuite être décomposé par la chaleur pour former un complexe vert qui absorbe à la longueur d'onde de 620nm. L'activité de la catalase est proportionnelle à la densité optique et est déterminé grâce à une courbe d'étalonnage ;

ii) Mode opératoire

Dans un tube à essai, ont été introduits successivement 50 μL d'échantillon et 750 μL de tampon phosphate. A ce mélange, ont été ajouté 200 μL de peroxyde d'hydrogène. L'arrêt de la réaction a été fait après 1 minute par addition de 1 mL du dichromate d'acétate. Les tubes ont été chauffés à 100°C pendant 10minutes, et l'absorbance mesurée à 620 nm contre le blanc après refroidissement des tubes.

iii) Expression des résultats

L'activité de la catalase est exprimée en mM de peroxyde d'hydrogène consommé/min/mg de protéines. En utilisant la courbe d'étalonnage $Y = 0,0013X$ obtenu à partir du standard (**annexe 12**). Le protocole de dosage des protéines totales est décrit à l'Annexe 13

a) Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (Yagi, 1976).

i) Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à essai en verre et à vis, ont été introduits 100 μL d'échantillon, 400 μL de réactif TBA puis les tubes ont été fermés hermétiquement. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts, les tubes ont été centrifugés à 1500g pendant 5 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration du MDA est déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) selon la formule ci-après

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

II.2.4 Traitement des données et analyse statistique

Le logiciel Excel a permis de traiter les données et de tracer les graphes. L'analyse statistique a été faite à l'aide du logiciel SPSS (*Statistical Package for Social Science*) version 25.0 pour Windows. Le test ANOVA (*Analysis Of Variance*) à un facteur suivi d'un test post-hoc LSD (*least significant difference*) a été utilisé les comparaisons multiples. Le *t-test* de *student* a été utilisé pour comparer les variables quantitatives entre 2 groupes. Le seuil de significativité était fixé à $p < 0,05$. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type et pourcentage de variation. Les courbes de régression dose-réponse ont permis de déterminer les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀).

Le logiciel MesRenova a été utilisé pour traité des chromatogrammes et spectres de masse, Image Studio sur le système Odysee a été utilisé pour le traitement des résultats de Western Blot et Image J a été utilisé pour le traitement des coupes histologiques.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre a été organisé en partie en fonction des objectifs spécifiques du travail.

Partie I : Teneurs en quelques composés bioactifs, potentiel antioxydant et mécanisme d'action antiproliférative de l'extrait éthanolique de graines d' *A angustifolium*

I.1 Teneur et identification de quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

I.1.1 Teneur en quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Les phytoéléments évalués dans ce travail étaient les composés phénoliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes les terpenoïdes et les tanins. Il ressort du Tableau VI ci-dessous que, pour 1 gramme de matière sèche, l'EEAa contient environ 219,19 mg EAG de composés phénoliques avec 5,29 mg EQ de flavonoïdes et 1,27 mg EAG de tanins. Par ailleurs, il contient 62,83 mg EQui d'alcaloïdes, et 195 mg Eli de terpenoïdes.

Tableau VI Teneur de l'EEAa en quelques composés phytochimiques

Classes de composés bioactifs	Teneurs
Composés phénoliques (mg EAG/g, MS)	219,19 ± 13,37
Flavonoïdes (mg EQ/g, MS)	5,29 ± 0,62
Tanins (mg EAG/g, MS)	1,27 ± 0,22
Alcaloïdes (mg EQui/g, MS)	62,83 ± 3,16
Terpenoïdes (mg EQLinalool/g, MS)	195,5 ± 3,75

Expression des résultats : moyenne ± écart-type ; EAG : équivalent acide gallique ; EA : équivalent quercétine ; EQui : équivalent quinine, EQLinalool : équivalent de linalool ; MS : matière sèche.

I.1.2 Quelques composés identifiés dans l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

La Figure 28 ci-dessous représente les chromatogrammes obtenus en mode ESI positif.

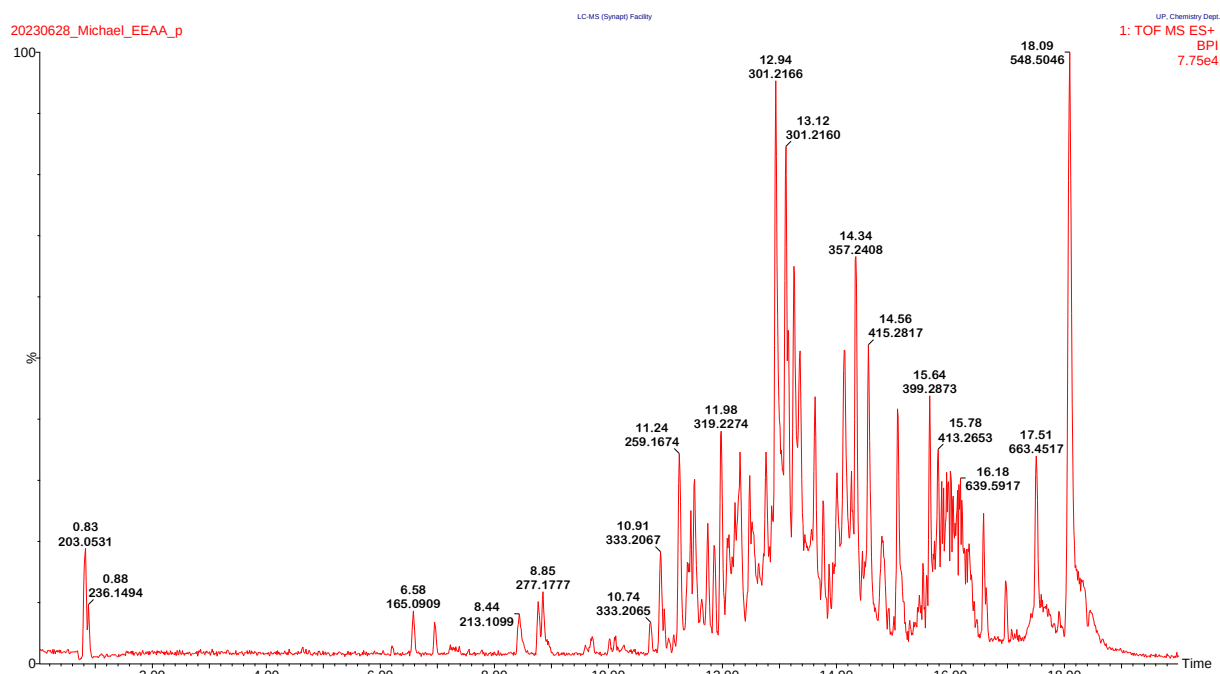


Figure 28: Chromatogrammes de l'EEAa en mode ESI positif

L'analyse spectrale des pics d'élution présents sur ce chromatogramme révèlent la présence probable de 6-paradole, 6-gingérol, quercétine, stigmasterol, α -pinène, caryophyllène ; pipérine et isoprinosine dont les spectres de masse sont présentés à l'annexe 14 et Les caractéristiques décrites dans le **Tableau VII**.

Tableau VII: Caractéristiques spectrales de quelques composés identifiés dans l'EEAa

Composés	Temps de rétention (minutes)	m/z expérimental	Erreur	Abondance (n)	Adduits
Pinène	8,31	194,12	-0,13	298	[M+K] ⁺ , [M+Cl] ⁻
Caryophyllène	13,44	205,088	-0,27	5500	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺
6-Paradol	11,56	279,23	-0,17	630	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ [M+H ₂ O] ⁺
6-Gingérol	11,77	295,22	-0,18	525	[M+H] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+H ₂ O] ⁺
Quercétine	12,55	303,21	-0,02	180	[M+H] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+Na] ⁺
Stigmastérol	15,79	413,26	-0,44	25000	[M+H] ⁺ , [M+H ₂ O] ⁺
Pipérine	12,55	325,25	-0,08	165	[M+K] ⁺ , [M+Na] ⁺
Isoprinosine	16,50	1116,32	+0,09	4750	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺

m/z : rapport entre masse atomique et charge

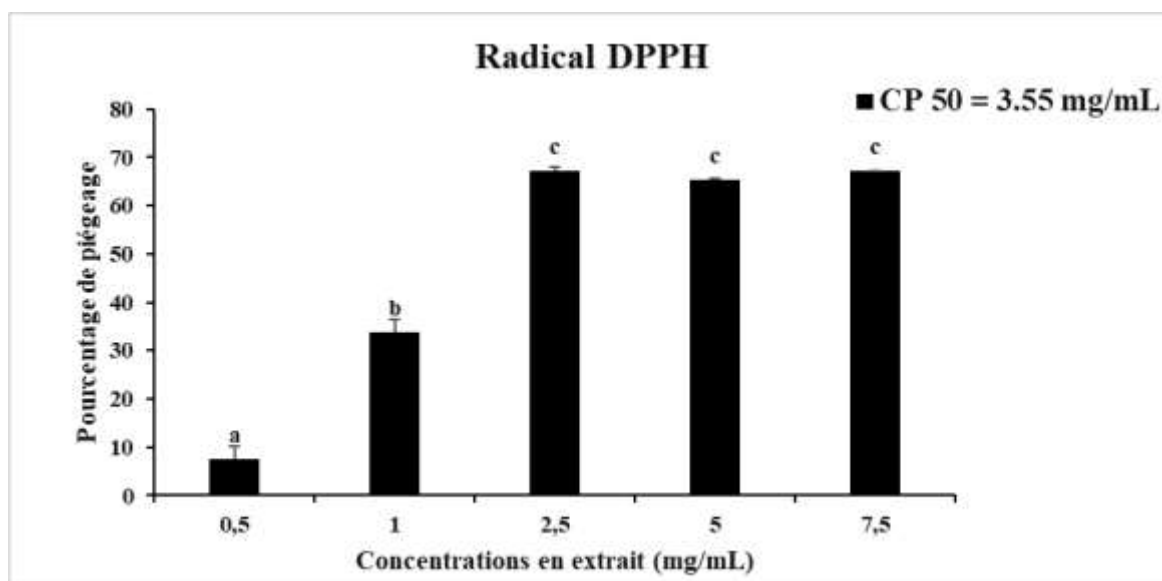
I.2 Potentiel antioxydant *in vitro* de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium*

Le potentiel antioxydant de l'EEAa a été évaluée à travers la mesure de son pouvoir anti-radicalaire du DPPH, de l'ABTS et NO, et son pouvoir réducteur du fer et du molybdate.

I.2.1 Potentiel antiradicalaire de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium*

a) Pouvoir anti-radicalaire de l'EEAa contre le radical DPPH

La mesure du potentiel de l'EEAa à piéger le radical synthétique DPPH a révélé que, l'extrait a piégé ce radical à toutes les concentrations testées (0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mg/mL). Le pourcentage de piégeage était proportionnel à la concentration en extrait jusqu'à la concentration de 2,5 mg/mL à partir de laquelle le potentiel anti-radicalaire a atteint son maximum (67,31%) et s'est plus ou moins stabilisé (Figure 29). La CP₅₀ était de 3,55mg/mL, soit un pouvoir antiradicalaire de 7,42µg de DPPH piégé par mg d'EEAa

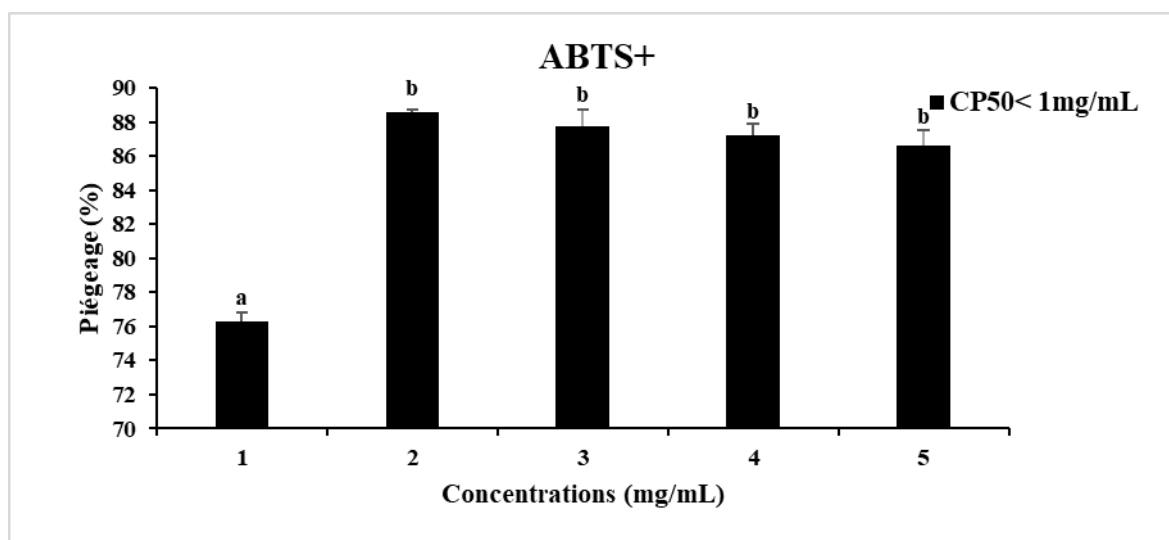


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pourcentages de piégeage différents à $p < 0,05$.

Figure 29: Piégeage du radical DPPH par l'EEAa à différentes concentrations

b) Potentiel piégeur du radical ABTS par l'EEAa

Il ressort de la figure 30 ci-dessous que, l'EEAa a piégé le radical cationique ABTS⁺ de façon inversement proportionnelle à sa concentration, avec une CP50 non déterminée car inférieure à la plus petite concentration en extrait testée (1mg/mL) soit un pouvoir antiradicalaire supérieur à 7,4 mmol d'ABTS piégé par mg d'EEAa.

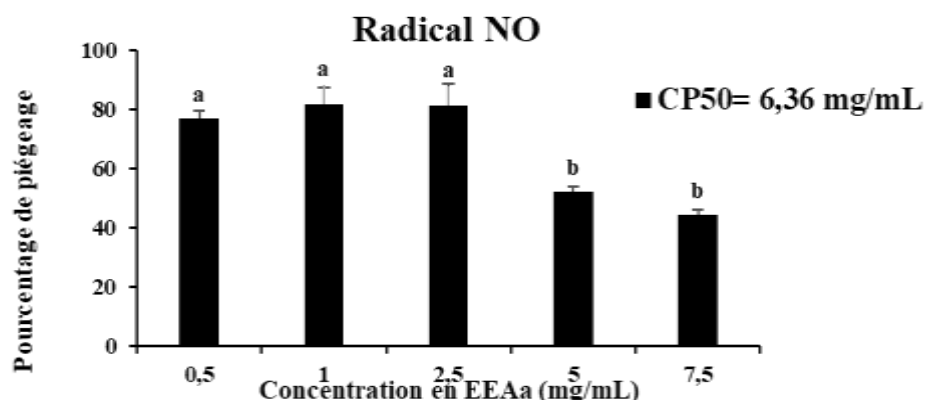


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b) ont des pourcentages de piégeage différents à $p < 0,05$.

Figure 30: Piégeage du radical ABTS⁺ par l'EEAa à différentes concentrations

c) Potentiel anti-radicalaire de l'EEAa contre le radical biologique NO

Il ressort du test de piégeage du radical NO que (Figure 31), l'EEAa aux concentrations testées (0,5-7,5 mg/mL) a piégé le radical NO avec une CP50 de 6,36 mg/mL. Le potentiel anti-radicalaire de l'extrait était inversement proportionnel à la concentration, avec un pic à 1 mg/mL (81,65%).



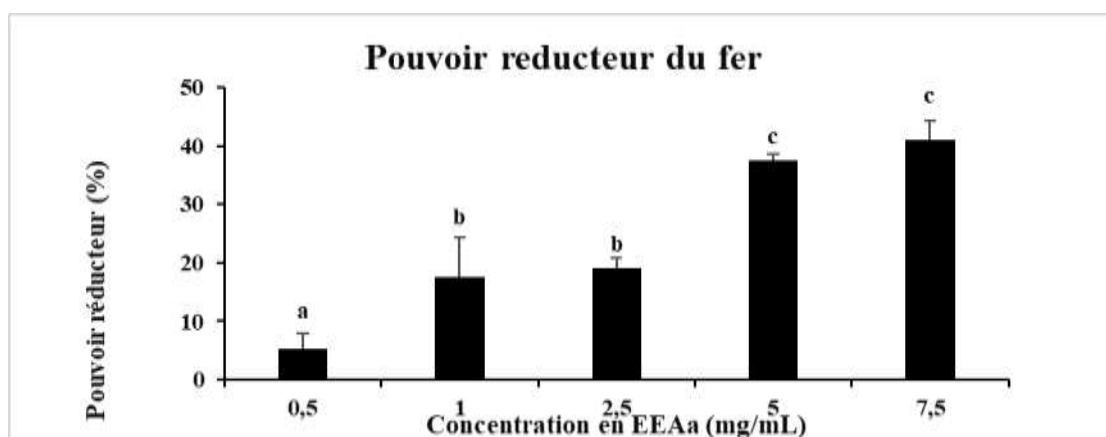
Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration Piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pourcentages de piégeage différents ($p < 0,05$).

Figure 31 : Piégeage du radical NO par l'EEAa à différentes concentrations

I.2.2 Potentiel réducteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

a) Potentiel réducteur du fer

La mesure du pouvoir réducteur du fer a révélé un potentiel proportionnel aux concentrations en extrait testées (Figure 32). Cependant, la CR50 était supérieure à la concentration maximale en extrait testée (7,5 mg/mL).

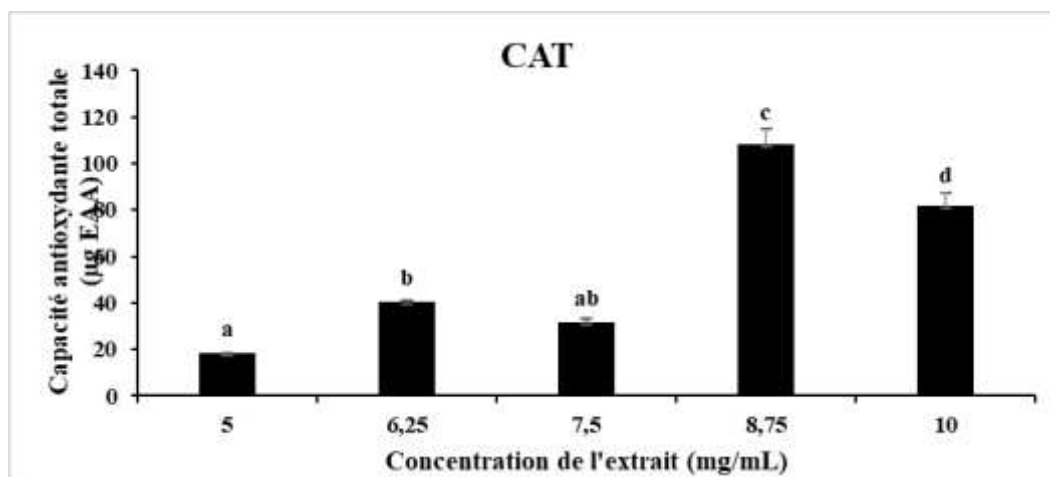


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pouvoirs réducteurs statistiquement différents ($p < 0,05$).

Figure 32: Réduction du Fe^{3+} par l'EEAa à différentes concentrations

b) Capacité antioxydante totale

Les résultats (Figure 33) montrent que, la capacité antioxydante de l'EEAa varie de façon sinusoïdale avec la concentration en extrait ; le pic (108.12 µg EAA) de capacité a été atteint à la concentration de 8,5 mg/mL .



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c, d) ont des CAT statistiquement différentes ($p < 0,05$).

Figure 33: Capacité antioxydante totale de l'EEAa à différentes concentrations

I.3 Potentiel antiprolifératif de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* sur quelques lignées de cellules cancéreuses

L'activité antiproliférative de l'extrait a été évaluée à travers la mesure de son activité cytotoxique sur une large gamme de lignées cellulaires cancéreuse. A la suite de ce test la lignée cellulaire la plus sensible après 48 H d'exposition à l'extrait a été utilisée pour l'exploration de quelques mécanismes d'action antiprolifératifs ; ceci a été réalisé à travers la mesure de l'expression de quelques gènes par qPCR et la détection des protéines par western blot.

I.3.1 Lignée cellulaire la plus sensible à l'EEAa

L'extrait a été testé sur trois (2) lignées cellulaires du gliome (CT 2Aet GL 261) et deux (2) lignées cellulaires du mélanome (B16-F1 et YUMM 1.7). Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentage de viabilité après 24 et 48 h de traitement.

extracellulaire, assurant l'intravasation des cellules invasives (**Massagué et Obenauf, 2016**). Une fois dans les capillaires, elles formeront des agrégats avec les plaquettes pour assurer leur survie et leur migration (**Stegner et al., 2014**). Les cellules cancéreuses pourront également bloquer la circulation, s'attacher à la membrane endothéliale, développer une microvascularisation pour assurer leur extravasation dans le nouveau site (**Alix-Panabières et Pantel, 2016; Lorusso et Rüegg, 2012**). les cellules extravasées retrouveront leur caractéristiques épithéliales favorables à la formation du nouveau foyer cancéreux par micro et macro métastase respectivement, ceci sous l'action des facteurs de croissances produits par l'hôte (**Peinado et al., 2012**).

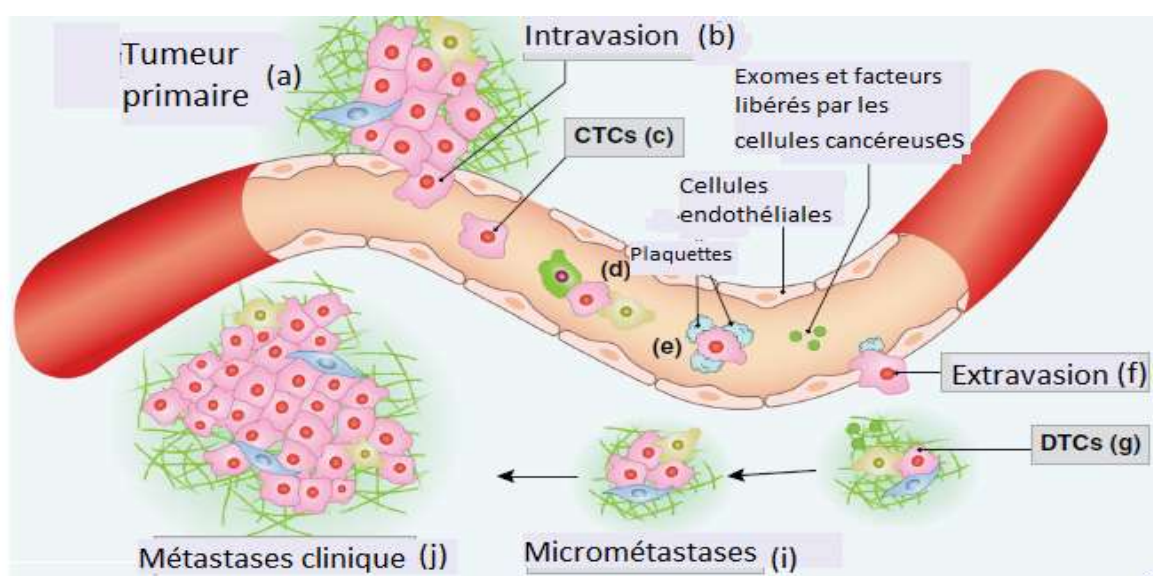


Figure 9: Etapes de formation des métastases (**Martino et al., 2023**)

I.1.3 Etapes de développement du cancer

La maladie évolue le plus souvent lentement et progressivement, parfois à partir d'une lésion précancéreuse vers une tumeur maligne infiltrante, d'abord localisée après une phase occulte parfois longue. La tumeur envahit l'organe qui lui a donné naissance puis les organes de voisinage. Peuvent survenir des métastases via un essaimage à distance par voies lymphatique ou sanguine, celles-ci étant la principale cause de décès par cancer (**His, 2016**). De manière générale, l'acquisition de nouvelles caractéristiques par les cellules cancéreuses se fait en 3 étapes résumées par la Figure 10 ci-dessous :

- **L'initiation** marquée par des altérations irréversibles de l'ADN en réponse à un ou plusieurs agent(s) mutagène(s) (polluants chimiques, radiations ionisantes...). Ces altérations affectent pour la plupart les proto-oncogènes par activation et les gènes suppresseurs par inhibition (**Lemaire et al., 2020**).

- **La promotion** pendant laquelle la cellule initiée va proliférer de manière incontrôlée à la suite d'altérations épigénétiques et sous le contrôle des facteurs de croissance pour former des foyers pré-cancéreux ;
- **La progression** au cours de laquelle la prolifération est continue, les gènes suppresseurs de tumeurs perdent complètement leur activité. Par ailleurs, il se produit une sur-activation des métallo-protéases permettant le remodelage de la matrice extracellulaire (Gialeli *et al.*, 2011). Ceci permet donc à la tumeur néoformée de se développer un réseau vasculaire pour satisfaire le besoin en oxygène et en nutriments de ses cellules, et d'être capable d'envahir les tissus environnants pour former de nouveaux foyers (Basu, 2018).



Figure 10: Etapes de la cancérogenèse (Gialeli *et al.*, 2011)

I.1.4 Prévalences

Parmi les maladies non transmissibles (MNT), la charge globale des cancers a grandement augmenté ces dernières années, les plaçant en deuxième position après les maladies cardiovasculaires (Chanika *et al.*, 2020). Le Cancer est responsable d'environ 30% des décès prématurés liés aux MNT chez les adultes de 30-69 ans. En 2022 dans le monde, les statistiques GLOBOCAN estiment à 19 976 499 le nombre de nouveaux cas de cancers (Ferley *et al.*, 2024), soit 1,9 millions de plus d'en 2018 (Bray *et al.*, 2018). 9 664 889 des cas étaient diagnostiqués chez les femmes contre 10 311 610 chez les hommes. Les types les plus répertoriés étaient les cancers du poumon (12,4%), du sein (11,5%) et le cancer colorectal (9,6%). Sur 9.958.133 cas de décès causés par les cancers, celui du poumon (18,7%) est reconnu comme la principale cause ; puis viennent les cancers colorectal (9,3%), hépatique (7,8%) et mammaires (6,8%). Les prévision estiment environ 35 millions de nouveaux cas d'ici 2050 (Ferley *et al.*, 2024).

En Afrique, 1 185 216 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués. Les cancers gynécologiques étant les plus répertoriés ; notamment les cancers du sein (16,8%), de col de

extracellulaire, assurant l'intravasation des cellules invasives (**Massagué et Obenauf, 2016**). Une fois dans les capillaires, elles formeront des agrégats avec les plaquettes pour assurer leur survie et leur migration (**Stegner et al., 2014**). Les cellules cancéreuses pourront également bloquer la circulation, s'attacher à la membrane endothéliale, développer une microvascularisation pour assurer leur extravasation dans le nouveau site (**Alix-Panabières et Pantel, 2016; Lorusso et Rüegg, 2012**). les cellules extravasées retrouveront leur caractéristiques épithéliales favorables à la formation du nouveau foyer cancéreux par micro et macro métastase respectivement, ceci sous l'action des facteurs de croissances produits par l'hôte (**Peinado et al., 2012**).

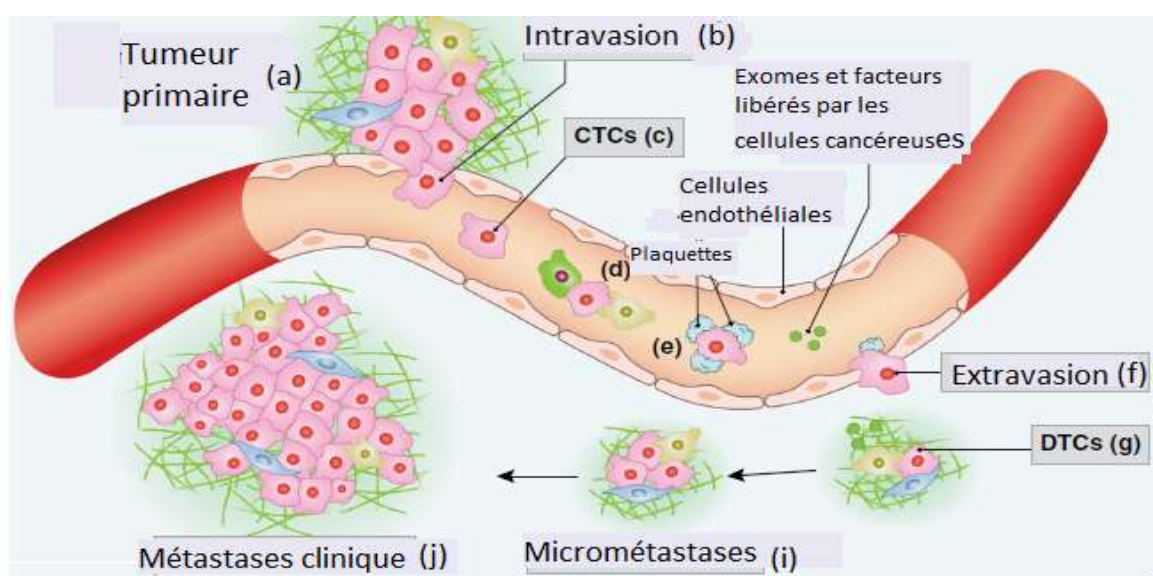


Figure 9: Etapes de formation des métastases (**Martino et al., 2023**)

I.1.3 Etapes de développement du cancer

La maladie évolue le plus souvent lentement et progressivement, parfois à partir d'une lésion précancéreuse vers une tumeur maligne infiltrante, d'abord localisée après une phase occulte parfois longue. La tumeur envahit l'organe qui lui a donné naissance puis les organes de voisinage. Peuvent survenir des métastases via un essaimage à distance par voies lymphatique ou sanguine, celles-ci étant la principale cause de décès par cancer (**His, 2016**). De manière générale, l'acquisition de nouvelles caractéristiques par les cellules cancéreuses se fait en 3 étapes résumées par la Figure 10 ci-dessous :

- **L'initiation** marquée par des altérations irréversibles de l'ADN en réponse à un ou plusieurs agent(s) mutagène(s) (polluants chimiques, radiations ionisantes...). Ces altérations affectent pour la plupart les proto-oncogènes par activation et les gènes suppresseurs par inhibition (**Lemaire et al., 2020**).

- **La promotion** pendant laquelle la cellule initiée va proliférer de manière incontrôlée à la suite d'altérations épigénétiques et sous le contrôle des facteurs de croissance pour former des foyers pré-cancéreux ;
- **La progression** au cours de laquelle la prolifération est continue, les gènes suppresseurs de tumeurs perdent complètement leur activité. Par ailleurs, il se produit une sur-activation des métallo-protéases permettant le remodelage de la matrice extracellulaire (Gialeli *et al.*, 2011). Ceci permet donc à la tumeur néoformée de se développer un réseau vasculaire pour satisfaire le besoin en oxygène et en nutriments de ses cellules, et d'être capable d'envahir les tissus environnants pour former de nouveaux foyers (Basu, 2018).



Figure 10: Etapes de la cancérogenèse (Gialeli *et al.*, 2011)

I.1.4 Prévalences

Parmi les maladies non transmissibles (MNT), la charge globale des cancers a grandement augmenté ces dernières années, les plaçant en deuxième position après les maladies cardiovasculaires (Chanika *et al.*, 2020). Le Cancer est responsable d'environ 30% des décès prématurés liés aux MNT chez les adultes de 30-69 ans. En 2022 dans le monde, les statistiques GLOBOCAN estiment à 19 976 499 le nombre de nouveaux cas de cancers (Ferley *et al.*, 2024), soit 1,9 millions de plus d'en 2018 (Bray *et al.*, 2018). 9 664 889 des cas étaient diagnostiqués chez les femmes contre 10 311 610 chez les hommes. Les types les plus répertoriés étaient les cancers du poumon (12,4%), du sein (11,5%) et le cancer colorectal (9,6%). Sur 9.958.133 cas de décès causés par les cancers, celui du poumon (18,7%) est reconnu comme la principale cause ; puis viennent les cancers colorectal (9,3%), hépatique (7,8%) et mammaires (6,8%). Les prévision estiment environ 35 millions de nouveaux cas d'ici 2050 (Ferley *et al.*, 2024).

En Afrique, 1 185 216 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués. Les cancers gynécologiques étant les plus répertoriés ; notamment les cancers du sein (16,8%), de col de

l'utérus (10,6%) et de la prostate (8,7%). En termes de décès, environ 29% des patients sont décédés ces 5 dernières années. Le cancer du sein a fait plus ravages avec suivit des cancers de la prostate et du foie (**Ferley et al., 2024**).

Le Cameroun a présenté les mêmes tendances que l'Afrique en générale. Cependant, une baisse du nombre de nouveaux cas de 1181 a été noté entre 2020 et 2022 (**Ferley et al., 2024 ; 2021**).

Au regard de ces statistiques, fort est de constater que les cancers gynécologiques (cancer du sein en particulier) sont les plus à craindre en Afrique et au Cameroun en particulier; d'où la nécessité d'y accorder un intérêt particulier.

I.2 Le cancer du sein

La glande mammaire est une glande exocrine qui se développe chez la femme du stade fœtal jusqu'à sa ménopause. Tout au long de la vie, l'évolution de la glande est déterminée par des cycles de croissance et de différenciation de ses cellules épithéliales. Ceci augmente le risque que celles-ci accumulent des erreurs lors de la réplication des chromosomes. Une accumulation de ces erreurs peut être à l'origine des pathologies dont le cancer du sein qui est la plus à craindre (**Feng et al., 2018**).

En 2022, le cancer du sein occupait le premier rang avec environ 11% de cas sur le nombre total de cancers diagnostiqués dans le monde, soit 2.480.675 nouveaux cas (**Ferley et al., 2024**). Au Cameroun, il représente plus du tiers des cancers diagnostiqués chez la femme depuis 2020. Sa prévalence a augmenté de 2,3% et le nombre de décès de 1,9% entre 2020 et 2022 (**Ferley et al., 2024 ; 2021**). Les études menées par **Engbang et al. (2015)** dans quelques régions du pays avaient révélé que le carcinome invasif était la forme la plus rependue de la maladie et les femmes en âge de procréer les plus atteintes.

I.2.1 Anatomie du sein et de la glande mammaire

Le sein est un organe pair qui se développe davantage chez la femme dès l'âge pubère, et se présente sous forme atrophié chez l'homme. Il est situé sur la partie supérieure du corps et repose sur le muscle pectoral entre la 2^e et la 6^e côte (**Bistoni et Farhadin 2015**).

I.2.1.1 Composition tissulaire du sein

De l'extérieure vers l'intérieure, le sein est constitué de la peau (dont le derme est lié au fascia superficiel) ; du parenchyme mammaire, du complexe mamelon-auréole et du fascia profond.

Le parenchyme mammaire est constitué de 3 tissus principaux que sont l'épithélium glandulaire, le stroma fibreux et le tissu conjonctif de soutien auxquels s'ajoute la graisse. Le tissu épithélial est constitué de 15 à 20 lobes, eux même contenant 20 à 40 lobules. Ces dernières contiennent chacune 10 à 100 acini (petits conduits terminaux) qui sont le siège de production du lait. Le conduit épithélial est constitué de cellules myoépithéliales qui sont chargées de transporter le lait tout au long du conduit. Au niveau du complexe mamelon-auréole, les conduits s'élargissent pour former les sinus lactifères, et le lait est excrété à travers les orifices mamelonnaires (10 à 15). La glande mammaire est ainsi constituée d'un réseau interconnecté entre les lobules et les canaux (**Bazira et al., 2024 ; Javed et Lteif, 2013**). Les 2 autres tissus forment le ligament de Cooper qui est un ensemble de fibres traversant la glande mammaire et s'insérant dans le derme pour la soutenir (**Bistoni et Farhadi, 2015**).

De plus, des structures neuro-vasculaires traversent le sein. Ils sont constitués des artères, des veines, des neurones (sensitifs) et des vaisseaux lymphatiques. Ces structures se rejoignent dans les ganglions axillaires, qui sont des structures contigües au sein (**Bazira et al., 2024**).

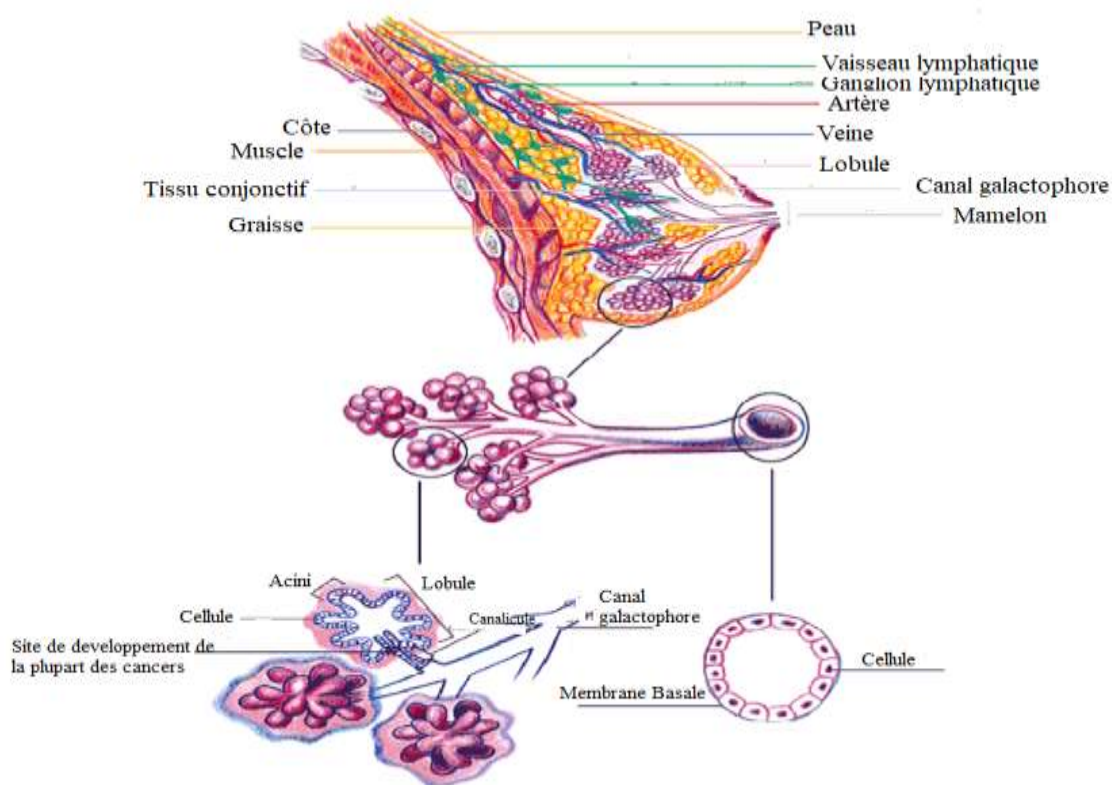


Figure 11: Anatomie du sein et de la glande mammaire (Bistoni et Farhadi, 2015)

1.2.1.2 Mammogenèse

Le développement de la glande mammaire est un processus qui commence au stade fœtal et est modifié selon le stade gynécologique de la femme. Avant la puberté, le système excréteur de la glande mammaire ne contient pas d'acinus. A la puberté, le développement de la glande mammaire est sous l'influence des estrogènes et de la progestérone. En effet, à cette période, l'axe hypothalamo-hypophysaire devient peu sensible au rétrocontrôle négatif des estrogènes. Ceci concourt à une augmentation de la libération de l'hormone de libération des gonadotrophines *GnRH* (*gonadotrophine releasing hormone*) par l'hypothalamus. Il s'en suit une libération des gonadotrophines *FSH* (*folicle-stimulating hormone*) et *LH* (*luteinizing hormone*) par l'antéhypophyse. Ces dernières en se fixant sur leurs récepteurs ovariens vont stimuler la libération des estrogènes et de la progestérone. Au niveau de la glande mammaire, la progestérone va stimuler le développement lobulaire et la différenciation épithéliale tandis que les estrogènes vont stimuler le développement canalaire (Bistoni et Farhadi, 2015). Pendant la grossesse et la lactation, la prolactine est en majeure partie responsable de la régulation à la hausse des récepteurs hormonaux, le développement épithélial et la galactogénèse (Brunicardi et al., 2005).

En dehors des estrogènes, la progestérone et la prolactine, d'autres facteurs de croissance agissent également sur le développement de l'épithélium mammaire. L'IGF (*insuline-like growth factor*) est produit par les cellules mammaires elles-mêmes et agit sur leur croissance (Neville *et al.*, 2013). L'EGF (*epidermal growth factor*) et le TGF- α (*transforming growth factor alpha*) quant à eux se fixent sur les récepteurs ERB2 ou NEU, stimulant la prolifération épithéliale, la synthèse de la lame basale et inhibant la production du lait (Hynes et Watson, 2010).

La différenciation des cellules mammaires à partir de la puberté est accompagnée d'une multiplication rapide de ces dernières, augmentant pour elles le risque d'accumuler des mutations. La perpétuation de ces mutations peut conduire à l'âge adulte au développement d'un cancer du sein.

I.2.2 Facteurs de risque du cancer du sein

Plusieurs facteurs de risque entrent dans l'étiologie du cancer du sein. Les plus incriminés semblent être les facteurs liés à la reproduction et aux hormones stéroïdiennes (Basset, 2014 ; Davidson, 2013). A côté de ceux-là, on note d'autres facteurs de risques tels que la prédisposition génétique, l'adiposité, la nutrition, l'exposition aux radiations ionisantes, l'exposition aux toxines chimiques etc. (Gurer-Orhan *et al.*, 2017; Basset, 2014).

I.2.2.1 Facteurs de risques liés à la reproduction et aux hormones stéroïdiennes

L'un des facteurs de risque les plus établis du cancer du sein est l'exposition de la femme pendant toute sa vie aux oestrogènes (Davidson, 2013). Ceci implique donc la nulliparité, la puberté précoce (< 12 ans), le premier accouchement à un âge tardif (≥ 30 ans) et la ménopause tardive (> 55 ans) (Gurer-Orhan *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'utilisation des contraceptifs oraux et des traitements substitutifs hormonaux semblent également jouer un rôle dans la carcinogenèse mammaire. En effet, l'estradiol est un facteur de croissance pour les cellules mammaires ; par ailleurs, son métabolisme génère des espèces oxygénées réactives, susceptible d'induire des dommages à l'ADN selon le mécanisme illustré par la figure 12.

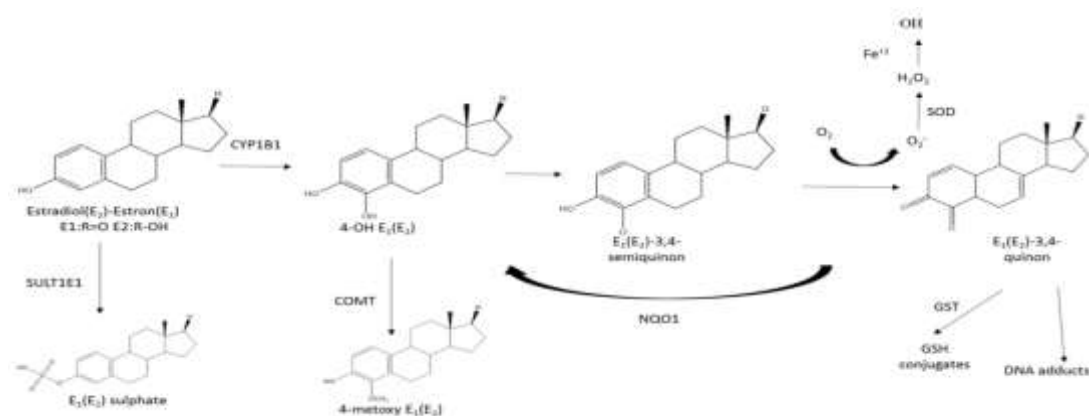


Figure 12: Métabolisme oxydatif de l'estradiol (Gurer-Orhan *et al.*, 2017)

I.2.2.2 Facteurs de risque génétiques et antécédents familiaux

Les études portant sur les antécédents familiaux et sur les jumeaux montrent l'implication importante de la susceptibilité génétique dans le développement des carcinomes mammaires. Bien que 20 à 25% des patients atteints de cancer du sein aient des antécédents familiaux positifs, seuls 5 à 10% des cas démontrent une dominance autosomale héritée (Bayraktar et Arun 2019). Les mutations les plus importantes en clinique sont associées aux gènes BRCA-1 (BRCA1), BRCA2 et de TP53 (Nunes *et al.*, 2019). Ils sont hérités de façon autosomique dominante, et plus de 50% des cas proviennent du syndrome BRCA-1 et BRCA-2. Les gènes sont en temps normal impliqués dans la réparation des lésions cellulaires dans le sein et les ovaires. Les mutations TP53 quant à elles se caractérisent principalement par la survenue de sarcomes, de carcinomes mammaires, de tumeurs cérébrales et de la surrénale. Son incidence mondiale est de 0.02 % à 0,005% (Lakhani *et al.*, 2012). À côté de ces 2 gènes, on a également une mutation des gènes PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) concourant au syndrome de Cowden, STK11 causant le syndrome de Peutz-Jegher, la neurobromatose (NF1), et l'E-cadherin (CDH-1) (Davidson, 2013).

I.2.2.3 Facteurs de risques liés à l'alimentation et au mode de vie

Il s'agit de l'alimentation, le syndrome métabolique, l'activité physique, l'alcoolisme, l'exposition aux polluants environnementaux et aux radiations ionisantes.

- L'alimentation

La consommation d'aliments riches en graisse, de viande rouge, surtout grillée a été associée à un risque accru de carcinomes mammaires (Kabat *et al.*, 2009). Par contre, le régime à base de fruits et de légumes n'est pas associé aux risques de carcinomes mammaires (Ronco *et al.*,

2010). De même, les régimes alimentaires riches en phyto-œstrogènes (présents dans de nombreux végétaux comme les fèves de soja), qui partagent des similitudes de structure avec les œstrogènes sont inversement liés à l'incidence du cancer du sein (**Mense et al., 2008**)

- **Le syndrome métabolique et l'activité physique**

Chez les femmes pré-ménopausées l'augmentation de la masse adipeuse s'associe à des cycles anovulatoires plus fréquents et donc à une exposition hormonale endogène plus faible. Cependant, le surpoids et l'obésité ont été incriminés dans 10% des cas de carcinomes mammaires chez la femme ménopausée aux Etats Unis (**Lakhani, 2012**). Les graisses viscérales sont riches en aromatase, enzyme qui converti la testostérone en estrone. Ce dernier stimule la prolifération des cellules canalaire (Tian et al., 2007). Les graisses intra abdominales quant à elles en plus de leur richesse en acides gras libres et d'adiponectine, sont une source de facteurs promoteurs de tumeurs comme le *TNF- α* , *IL-1*, *IL-6* et *IAP-1*. Par ailleurs un indice de masse corporel élevé est associé à une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie chronique, conduisant à une baisse du taux de protéine *IGF binding protein 2 (IGFBP 2)* et donc une augmentation de la biodisponibilité de l'*IGF-1* (**Capasso et al., 2010**) impliqué dans la progression tumorale.

L'activité physique impactant sur le poids corporel, un niveau d'activité physique modéré ou élevé serait corrélé à une réduction du risque de cancer du sein 15% à 20% (**Desnoyers et al., 2017**).

- **Exposition aux polluants environnementaux**

Il s'agit des agents ayant une origine chimique, notamment les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), les résidus de pesticides et le tabagisme. Ces contaminants environnementaux peuvent induire la formation de cancers en modulant les récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, particulièrement les récepteurs EGFR et erbB2. Ils peuvent également moduler des médiateurs intracellulaires tels que la protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB, la *Integrin-Linked Kinase (ILK)* et la E-cadhérine impliquées dans la communication cellulaire (**Girard, 2015**). Ces messagers secondaires ont une influence directe sur la différenciation, la prolifération, la communication et l'invasion cellulaire. Au cours du métabolisme des HAPs tel que le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA), le cycle redox des o-quinones et, dans une moindre mesure, l'activité catalytique des CYP450 peuvent induire des quantités trop importantes d'ERO (**Keyte et al., 2013**) et ainsi faciliter la création d'adduits covalents entre ADN et ces métabolites, l'induction d'un stress oxydant et une immunotoxicité (**Liamin, 2019**).

- L'alcoolisme

Le risque relatif de carcinome mammaire augmente de 7,1% pour chaque 10g d'alcool ingéré par jour. En 2020, le cancer du sein occupait la 3^{ème} place parmi les cancers causés par l'alcool avec 98300 cas (**Rumgay et al., 2021** ; Basset, 2014). Ce risque s'est avéré associé aux cancers positifs aux récepteurs hormonaux (**Clinton et al., 2020** ; **Sun et al., 2020**). Des évidences scientifiques soutiennent que, la carcinogenèse mammaire induite par l'éthanol passerait par son métabolisme oxydatif. En effet, L'acétaldéhyde issue de l'action de l'alcool déshydrogénase est capable de former des adduits avec la molécule d'ADN (**Nakamura et al., 2003**) et d'inhiber la O-méthyl-guanine transférase, enzyme responsable de la réparation de l'ADN (**Dumitrescu et Shields, 2005**). Par ailleurs, la consommation d'alcool modifie le cycle menstruel en le rallongeant et entraîne une augmentation du taux urinaire et plasmatique des métabolites estrogéniques (**Seitz et al., 2012**).

I.2.3 Physiopathologie du cancer du sein

Comme tous les types de cancers, celui de sein s'installe en 3 phases avec des modifications structurales, génétiques et moléculaires définies.

I.2.3.1 Modifications structurales associées à la physiopathologie du cancer du sein.

Après initiation de la cancérogenèse du sein sous l'influence des agents mutagènes tels que les radiations ionisantes, les polluants environnementaux et les métabolites oxydatifs, survient la promotion. Elle donne naissance au cancer du sein précoce caractérisée par une hyperplasie atypique. Elle est représentée par de lésions bénignes prolifératives et est réversible. C'est lors de l'étape de progression que les lésions malignes proprement dites s'installent. On passe ainsi à la phase intermédiaire, caractérisée par le développement d'un carcinome *in situ*, en passant par une dysplasie. Puis survient la phase finale au cours de laquelle, les cellules cancéreuses épithéliales acquièrent des propriétés invasives donnant place à un carcinome invasif ; ce dernier pouvant par la suite se disséminer dans l'organisme et former des foyers métastatiques (**Moyret-Lalle et al., 2016** ; **Kahia, 2012**). La figure 13 ci-dessous présente les modifications structurales survenant lors du développement des cancers mammaires.

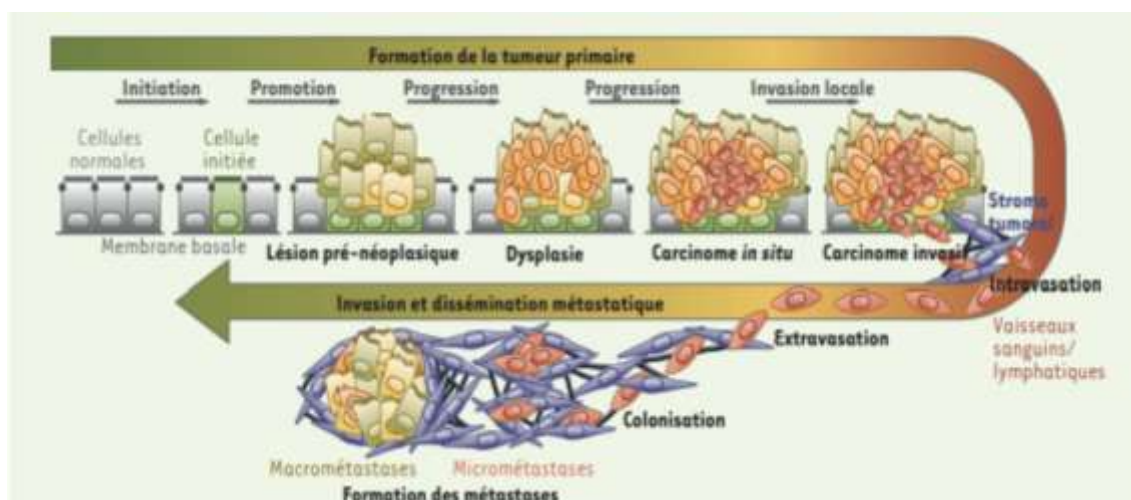


Figure 13: Modifications structurales au cours de la cancérogenèse mammaire Etapes d'évolution du cancer du sein (Moyret-Lalle *et al.*, 2016)

I.2.3.2 Altérations moléculaires dans le cancer du sein

Les altérations moléculaires dans le cancer peuvent être d'ordre génétique, épigénétique ou protéique.

I.2.3.2.1 Altérations génétiques dans le cancer du sein

Les gènes les plus fréquemment mutés et/ou amplifiés dans les cellules tumorales sont TP53 (41% des tumeurs), PIK3CA (30%), MYC (20%), PTEN (16%), CCND1 (16%), ERBB2 (13%), FGFR1 (11%) et GATA3 (10%) tel que relevé dans une série de cancers du sein précoces (Nik-Zainal *et al.*, 2016). Ces gènes codent pour des modulateurs du cycle cellulaire qui sont soit réprimés (p53) ou activés (cycline D1). Ces mutations soutiennent la prolifération et/ou inhibent l'apoptose, en activant les voies oncogènes (MYC, HER2 et FGFR1) ou en inhibant des éléments qui ne sont plus réprimés (PTEN). La plupart des cancers du sein sont causés par de multiples mutations à faible pénétration qui agissent de manière cumulative (Harbeck *et al.*, 2019).

I.2.3.2.2 Altérations épigénétiques dans le cancer du sein

Il s'agit généralement d'une hypométhylation globale, qui entraîne l'activation des gènes, la régulation positive d'oncogènes et l'instabilité chromosomique. Dans de rares cas, on assiste à une hyperméthylation de façon focale (locus spécifique), entraînant la répression des gènes et l'instabilité génétique due à la mise sous silence des gènes de réparation de l'ADN. D'autres mécanismes épigénétiques impliquent des modifications de la queue des histones par méthylation de l'ADN, induisant des modifications de la structure de la chromatine, mettant

sous silence l'expression des gènes et le remodelage nucléosomal. Ces modifications sont réversibles, médiées par des enzymes et potentiellement ciblables (Heitzer *et al.*, 2019).

I.2.3.2.3 Altérations protéiques dans le cancer du sein

Ceci concerne essentiellement les récepteurs de facteurs de croissance (récepteurs à œstrogènes, récepteurs de facteurs de croissance), les transducteurs du signal intracellulaires et les régulateurs du cycle cellulaire.

a) Altération de la voie des récepteurs à œstrogènes

Les récepteurs à œstrogènes (RE) sont surexprimés dans environ 60 % des cancers du sein invasifs (Malhotra *et al.*, 2010). Il en existe les isoformes α (RE α) et β (RE β) ; les RE α sont impliqués dans les processus de prolifération associé au cancer du sein, tandis que les RE β exercent un effet contraire (Fuentes *et al.*, 2019). Ce sont des facteurs de transcription nucléaires détectables dans la membrane plasmique, le cytoplasme et le noyau.

➤ Voie génomique d'action des récepteurs à œstradiol

L'action génomique ou classique du RE α a lieu dans le noyau. Après activation des RE α cytosolique par son ligand, le RE α se lie de manière coordonnée avec un certain nombre de protéines co-régulatrices aux éléments de réponse aux œstrogènes dans la région promotrice des gènes sensibles aux œstrogènes. Ceci dirige à son tour la transcription ou la répression de nombreux gènes favorisant la croissance (Williams et Lin, 2013). Ainsi, au niveau du noyau, le RE α peut activer l'action transcriptionnelle de *Stimulating protein-1* (Sp-1), aboutissant à l'expression des récepteurs à *Low Density Lipoprotein* (LDL), les récepteurs B à progestérone, l'oxyde nitrique synthase endothéliale et *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT 5). Le RE peut également se fixer à la sous-unité c-rel de NF- κ B, inhibant ainsi son action transcriptionnelle. Il peut aussi interagir avec les modulateurs transcriptionnels tels que *activating transcription factor* (ATF)-2, *c-jun*, ATF-1/cAMP response element binding protein (ATF-1/CREB), et le *nuclear transcription factor-Y* (NF-Y) (O'Lone *et al.*, 2004). Par ailleurs, Le RE α peut induire l'expression des gènes contenant les sites pour le facteur de transcription *activator protein-1* (AP-1). Ce dernier étant impliqué dans la régulation des processus tels que la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Fuentes *et al.*, 2019). Ainsi, l'AP-1 peut induire l'expression de l'IGF-1 et son récepteur, la collagénase, ovalbumine et la cycline D1.

➤ Voie non génomique d'action des récepteurs à œstradiol

L'action non génomique des RE est extrêmement rapide après l'exposition des RE membranaire aux œstrogènes. Au niveau de la membrane plasmique, il existe des RE 1

couplés à la protéine G (REPG1) qui agissent par activation des voies de transduction intracellulaire du signal (**Prossnitz et Barton, 2011**). Ces voies concourent à la production des seconds messagers, la régulation de l'AMPc, l'activation des protéines kinases via les cascades de signalisation (**Lösel & Wehling, 2003**). Cette dernière peut se faire à travers la voie de la protéine kinase C (PKC), la cascade Ras/Raf/MAPK, la cascade PI3K/Akt ou la voie AMPc/PKA (**Fuentes et al., 2019**). Par ailleurs les REGP1 peuvent promouvoir l'activation dépendante des estrogènes de l'adenylate cyclase et de l'EGFR ; ceci conduisant à une phosphorylation activatrice des voies de signalisation susmentionnées avec pour point culminant, l'activation des facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes cibles (**Arnal et al., 2017 ; Levin, et Pietras, 2008**). Ces facteurs de transcription peuvent être *Elk-1*, CREB, *CCAAT-enhancer-binding protein beta* (C/EBP β), le complexe *NF- κ B* et la famille des *STAT* (**Cavalcanti, et Porto, 2015; Furth, 2014; Laliotis et al., 2013 ; Kousteni et al., 2003**).

b) Altération de la voie des récepteurs de facteur de croissance

Le gène des récepteurs du facteur de croissance épidermique est muté dans certains cancers mammaires. Il s'agit d'une famille des 4 récepteurs transmembranaires étroitement liés EGFR/ErbB1, HER2, HER3/ErbB3, et HER4/ErbB4, structurés par deux domaines extracellulaires riches en cystéine et un domaine transmembranaire de liaison au ligand (**Hynes et MacDonald, 2009**). Parmi ces récepteurs, le gène HER2/ErbB2/neu est amplifié et/ou sa protéine surexprimée dans 13-15% de tous les cancers du sein invasifs primaires (**Harbeck et al., 2019**). Ces récepteurs sont spécifiques à une large gamme de ligands dont l'EGF et le TGF- α . L'interaction ligand-HER2 conduit à des changements conformationnels, associé à une homo ou hétéro-dimérisation (**O'Donovan et al., 2011**). Il s'en suit une transphosphorylation des résidus tyrosine situés sur les domaines intracellulaires. Les tyrosines phosphorylées vont recruter de nombreux transducteurs de signaux tels que la protéine RAS. Elles pourront activer une multitude de voies de signalisation en aval à travers MAPK et PI3K pour assurer la survie prolongée des cellules, la prolifération, la motilité accrue, l'invasion et les métastases (**Song et Hu, 2017 ; Hynes et MacDonald, 2009**)

c) Les voies de second messenger

Les évidences scientifiques suggèrent que les voies PI3K/AKT et Ras-MAPK sont particulièrement importantes dans le cancer du sein en raison de la fréquence des mutations, de l'amplification et/ou de l'activation de ces voies.

- **Mutation de la voie PI3K-AKT/mTOR**

PI3K-AKT/mTOR est une voie de signalisation centrale en aval de nombreuses tyrosine kinases réceptrices, ou des récepteurs couplés aux protéines G, qui régule le métabolisme, la croissance, la prolifération cellulaires et l'angiogenèse (Miricescu et al., 2020). Les mutations activatrices de la famille des gènes AKT (protéine kinase B) sont observées dans 2 à 4 % des cancers du sein. Plus particulièrement, environ 80% des cancers du sein hormonaux présente des mutations de cette voie, 39% des cancers positifs aux récepteur HER2 et 8–25% des cancers triples négatifs (Prever et al., 2021). L'hyperactivation de AKT est d'une part due à la mutation de PTEN, responsable de son inactivation par déphosphorylation, ou de la mutation de sa sous unité catalytique p110 α . Cette dernière conduit à l'activation de la voie PI3K, concourant à l'activation par la kinase 3-phosphoinositide-dépendante, de plusieurs kinases connues, notamment les protéines kinases B (AKT1, AKT2 et AKT3). Les AKT activées vont faire perdre aux protéines membranaire leur connexion avec la membrane cellulaire ; il va s'en suivre leur relargage dans le cytosol où elles vont phosphoryler les protéines cytosoliques et celles de la membrane nucléaire ; stimulant ainsi la survie et la croissance cellulaire (Miricescu et al., 2020).

Par ailleurs, les effecteurs prolifératifs en aval de la voie PI3K comprennent *Forkhead box other 1* (*Foxo 1*), le complexe *mTOR* composé de mTOR, raptor et *mamalian lethal with SEC13 protein* (mLST8) (Miricescu et al., 2020 ; Lien et al., 2016). Ce complexe active la S6-kinase 1 (activateur de la protéine S6 ribosomale) et la suppression de 4E-BP1, un inhibiteur de la traduction cap-dépendante. Il s'en suit une surproduction des ribosomes et une synthèse des protéines favorisant la croissance cellulaire. *Foxo 1* quant à lui est impliqué dans la synthèse des enzymes de la neoglucogenèse, l'inhibition de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphate et de la formation des triacylglycérols (Lien et al., 2016).

- **Mutation de la voie Ras-MAPK**

Bien que seulement 2 % des cancers du sein humains présentent des mutations *RAS*, plusieurs RTK associés au cancer du sein tels que l'*EGFR*, l'*IGF-1R*, et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (*PDGFR*) peuvent maintenir *RAS* dans un état d'activation favorisant la progression néoplasique (Saini et Piccart-Gebhart, 2013). Encore appelée GTPase car liée au guanosine diphosphate (GDP) dans leur forme actives, les petites protéines *RAS* conduisent une série de phosphorylation en allant de Raf à *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (*ERK*), en passant par *Mitogen-Activated, Extracellular-Signal Regulated Kinase* (*MEK*). Après activation, les kinases *ERK1/2* catalysent la phosphorylation de nombreux substrats dont certains sont localisés dans le cytoplasme, au niveau d'organites

intracellulaires et d'autres dans le noyau après translocation de ERK1/2. Il active de ce fait certains facteurs de transcription comme *Ets1/2*, *c-Myc*, *c-Jun* qui sont impliqués dans l'initiation et la régulation de la prolifération et dans la transformation oncogénique (Chauvin, 2015 ; Shaul & Seger, 2007). Une signalisation aberrante de la voie RAS se produit dans environ 50 % des tumeurs mammaires en raison d'une signalisation constitutive en amont (comme dans le cas de la surexpression de HER) (Nolan *et al.*, 2023).

d) Dérégulation du cycle cellulaire

L'axe cycline D1-CDK4/6-RB est le régulateur clé de la transition G1-S du cycle cellulaire. Plusieurs voies mitogènes pertinentes pour le cancer du sein, y compris les voies de signalisation des œstrogènes et HER2-PI3K, augmentent l'activité de CDK4/6 par une régulation transcriptionnelle à la hausse de CCND1 (qui code pour la cycline D1) ou par la stabilisation post-traductionnelle de cette cycline. De plus, l'amplification de CCND1 et de CDK4 est fréquemment observée dans les cancers du sein luminal B (80 %) et HER2+ (60 %) (Nolan *et al.*, 2023). Contrairement aux cancers luminal, l'activation du cycle cellulaire dans les tumeurs de type *basal-like* se fait par perte de RB1 (TCGA, 2012), les rendant ainsi non sensibles aux inhibiteurs de CDK4/6. En effet, la liaison physique des cyclines de type D (D1, D2 ou D3) à la CDK4 ou à son homologue CDK6, entraîne une activation enzymatique de CDK4/6, qui phosphoryle ensuite la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (Rb). Ceci entraîne l'inactivation de la fonction antiproliférative de Rb à la fin de la phase G, et la libération des protéines prolifératives que sont les facteurs de transcription E2F. Non seulement les protéines Rb sont mutées dans le cancer du sein, mais la signalisation par le réticulum endoplasmique augmente l'expression de la cycline D1, activant les CDK et phosphorylant Rb, favorisant ainsi la prolifération tumorale (Lim et Kaldis, 2013 ; Roy *et al.*, 2010). La résistance aux inhibiteurs de CDK4/6 survient par des mécanismes pléiotropes incluant la perte de RB, l'activation de cycline E-CDK2, la cooptation d'autres CDK comme CDK7, et l'activation d'autres voies oncogéniques, y compris RAS/MAPK et PI3K/AKT (Goel *et al.*, 2022).

La figure 14 ci-dessous résume les différentes aberrations moléculaires survenant dans la cancérogenèse mammaire.

- Une inflammation qui se matérialise par la rougeur, la chaleur et l'œdème, reflétant souvent une infiltration cellulaire tumorale des vaisseaux lymphatiques dermiques du sein ;
- Un écoulement du mamelon qui peut être d'aspect laiteux (Rarement malin), clair ou sanguinolent.

Ces différents symptômes sont généralement constatés par le patient même lors de l'examen physique d'autopalpation. Ces signaux d'alerte poussent le clinicien à prescrire des examens plus poussés tel que la mammographie. A cette dernière, est souvent ajoutée une biopsie exérèse de toute zone suspecte. Si les résultats sont normaux, une échographie ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) pourront exclure la faible probabilité de tumeur maligne.

1.2.4.2 Examens d'imagerie médicale

Les examens d'imagerie médicale incluent la mammographie, l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique.

a) Mammographie

Il s'agit de l'examen radiologique du sein. Elle est utilisée sur une patiente présentant des signes cliniques ou des symptômes de maladie du sein et sur une personne pour laquelle une évaluation plus approfondie a été demandée en raison d'un dépistage anormal ou pour le suivi de résultats d'imagerie antérieurs (**American College of Radiology, 2014**). Par ailleurs les femmes ayant des antécédents personnels de cancer du sein et traitées par conservation du sein peuvent choisir de subir une mammographie de diagnostic. Puisque l'apparence du tissu mammaire normal varie sur la mammographie, la comparaison avec des mammographies antérieures est extrêmement précieuse et peut permettre au radiologue de détecter une malignité subtile en développement. En outre, des vues mammographiques supplémentaires notamment les vues latérales vraies, les vues cranio-caudale roulées, les vues cranio-caudales exagérées, les vues tangentielles et les vues de clivage sont nécessaires pour permettent de mieux caractériser la lésion et son emplacement (**Ganott et al., 2019**).

b) Echographie

Il s'agit d'une technique d'analyse qui utilise des ultrasons et permet de générer des images plus précises de la partie interne des seins et des ganglions. Elle est essentielle pour l'imagerie des anomalies non visibles à la mammographie (**Gharekhanloo et al., 2018**). Elle est précieuse pour guider les biopsies à l'aiguille des lésions suspectes et aspirer les

collections de liquide. Elle peut également être utilisée pour suivre les lésions peu suspectes et pour évaluer la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. En plus de cela, l'élastographie et la sonographie Doppler sont des outils connexes permettant une caractérisation plus poussée, afin de pouvoir classer correctement une lésion en fonction de sa rigidité et de sa vascularisation **Ganott et al., 2019**).

c) Imagerie par résonance magnétique

Le Collège Américain de Radiologie (**ACR, 2014**) recommande un dépistage annuel par IRM en complément de la mammographie pour les patientes présentant une mutation connue du gène BRCA, les patientes non testées dont un parent au premier degré est porteur d'une mutation BRCA, Les patientes considérées comme à haut risque avec un risque calculé de 20 % ou plus sur la durée de vie, celles qui ont des antécédents d'irradiation thoracique avant l'âge de 30 ans, ainsi que les patientes présentant les gènes Li-Fraumeni, Cowden et Bannayan-Riley-Ruvalcaba et leurs parents au premier degré (**National Comprehensive Cancer Network, 2017**). L'IRM est également employée pour guider l'aiguille à la biopsie des lésions uniquement détectables par résonance magnétique (**Ganott et al., 2019**).

I.2.4.3 Analyse histopathologique et diagnostic moléculaire

Elle va de l'observation des cellules colorées à l'hématoxyline/éosine, à l'analyse des marqueurs moléculaire par immunohistochimie pour déterminer le type moléculaire. D'autres méthodes consistent en la culture des fragments tissulaire, suivit de la mesure des taux d'expression des gènes par RT-PCR (**Cao et al., 2016**). L'interprétation des résultats de cette analyse devrait s'inspirer de la classification des tumeurs mammaires établie par l'OMS.

a) Histologie à l'hématoxyline et éosine (H&E)

Ces colorants histologiques permettent de mettre en évidence le cytoplasme (éosine), le réticulum endoplasmique granuleux et le noyau (Hématoxyline). Ce test est fait sur de fines couches de tissu mammaire sous paraffine et permet de renseigner sur le type de lésion pathologique du sein (**Nengtai et Lin, 2016**).

b) Analyse immunohistochimique

Cette analyse a permis de mettre en évidence des types moléculaires de cancers du sein. Elle est basée sur la recherche des marqueurs moléculaires tels que les récepteurs à estrogènes (RE), les récepteurs à progestérone (RP), le récepteur du facteur de croissance épidermique humain (HER-2) et les marqueurs de prolifération telle que la cytokératine, Ki-67 (**Prat et Perou, 2011**). A côté de ces marqueurs, l'antigène cancéreux 15-3 (CA 15-3),

l'antigène carcino-embryonnaire, l'activateur de l'urokinase plasminogène et ses inhibiteurs sont également analysés comme marqueurs tissulaires pronostic (**He et al., 2020**).

I.2.4.4 Typologie des tumeurs mammaires

La classification des cancers du sein a évolué au fil des années, les unes et les autres se complétant. On distingue de ce fait une classification histologique, moléculaire et fonctionnelle du cancer du sein.

a) Types histologiques des tumeurs mammaires et grades

La classification histologique des tumeurs mammaires est en première ligne basée sur son niveau d'expansion et le type de cellules impliquées. On distingue dans ce cas les tumeurs in-situ (localisée) des tumeurs infiltrantes ou invasives, et les tumeurs lobulaires des tumeurs canalaire (**Malhotra et al., 2010**). En fonction de l'architecture cytologique à l'histologie des tumeurs canalaire *in-situ*, des sous-types ont également été répertoriés (Figure 15).

Les grades histologiques basé sur le niveau de différenciation, sont généralement appliqués aux carcinomes invasifs de tout type. Trois caractéristiques tumorales sont évaluées : la formation de tubules comme expression de la différenciation glandulaire, le pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses. Un système de notation numérique de 1 à 3 est utilisé

- Lors de l'évaluation des tubules et des acini glandulaires, seules les structures présentant des luminescences centrales claires entourées de cellules néoplasiques polarisées sont comptées ; les points de coupure (PC) de 75% et 10% de la surface glandulaire/tumorale sont utilisés pour attribuer le score ($PC > 75\% = 1$, $10\% \leq PC \leq 75\% = 2$, $PC < 10\% = 3$) ; (**Tavassoli et Devilee, 2003**)

Le pléomorphisme nucléaire est quant à lui évalué pour la zone présentant le plus mauvais degré de pléomorphisme. Il est évalué par rapport à la régularité de la taille et la forme des noyaux des cellules épithéliales normales dans le tissu mammaire adjacent. Les noyaux de score 1 ont une taille très similaire ($< 1,5$) à celle des cellules épithéliales bénignes préexistantes et présentent un pléomorphisme minimal. Les noyaux de score 2 sont 1,5-2 fois la taille des noyaux des cellules épithéliales bénignes, avec un pléomorphisme léger à modéré et des nucléoles visibles. Le score 3 correspond aux noyaux de taille plus de 2 fois supérieure à celle des cellules épithéliales bénignes, avec une chromatine vésiculaire ; (**Cioroboreanu et Lazăr 2012**).

- Enfin, le comptage mitotique est effectué pour la zone présentant le plus de prolifération. Seules les figures mitotiques définies excluant les noyaux hyperchromatiques et pyknotiques seront comptées. La sélection du champ pour le comptage des mitoses doit se faire à partir du bord périphérique de la tumeur afin de trouver la zone avec la plus grande activité mitotique, et seuls les champs présentant une charge en cellules tumorales représentative doivent être évalués (Ellis et Elston, 2006).

La somme des scores issus des 3 paramètres permettra de définir 3 grades tumoraux dont le grade I (2-5 points) bien différencié, le grade II (6-7 points) modérément différencié et le grade III (8-9 points) faiblement différencié (Cioroboreanu et Lazăr 2012).

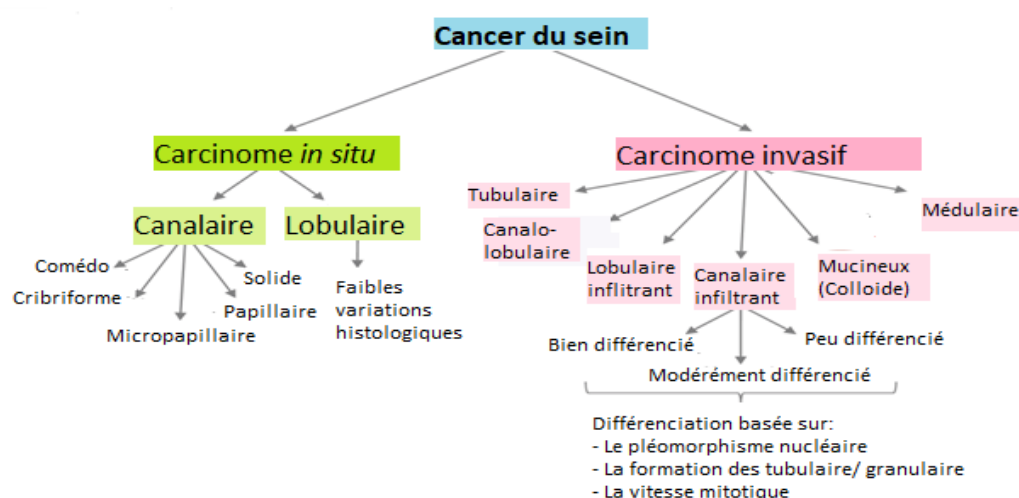


Figure 15: Classification histologique des tumeurs du sein (Malhotra et al., 2010)

b) Types moléculaires des tumeurs mammaires

Dans l'optique d'affiner les pronostics de réponses aux traitements, l'association des marqueurs moléculaires à l'histologie (immunohistochimie) a fait naître une autre classification des carcinomes mammaires (Figure 16). Elle tient en compte en première ligne le niveau d'expression des récepteurs à estrogènes (RE), les récepteurs à progestérone (RP), et *human epidermal growth factor receptor* (HER). A côté de ceux-là, il y'a des marqueurs émergents tel que le taux de claudine, et les marqueurs de la prolifération tel que Ki-67 (McDonald et al., 2016). Statistiquement, environ 70% des cancers mammaires sont RE+ (Nolan et al., 2023).

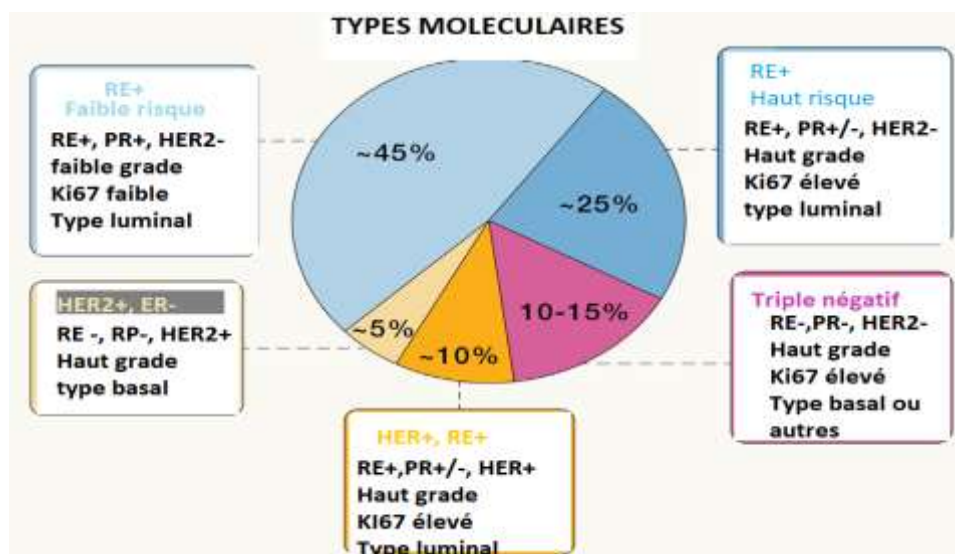


Figure 16: Classification moléculaire du cancer du sein (Nolan *et al.*, 2023).

c) Classification fonctionnelle du cancer du sein

Cette classification est basée sur l'origine des cellules responsables de l'initiation et la progression tumorale, appelées cellules souches cancéreuses (CSC). Elles sont discriminées des autres cellules cancéreuses ayant un potentiel tumorigène plus faible. 2 hypothèses ont donc été prise en considération ; l'une stipulant que, les CSC responsables des différent sous-types moléculaires du cancer du sein proviennent des cellules normales dans la hiérarchie des cellules souches, tandis que l'autre soutient que ces CSC proviennent d'une cellule souche commune (Malhotra *et al.*, 2010).

d) Les phases d'évolution de la maladie

Dans le but d'assurer une meilleure politique de prise en charge, le stade de la maladie est défini en tenant compte de la taille de la tumeur (T), la présence des nodules ganglionnaires (N) et les métastases (M). Ces paramètres ont donc permis de stratifier les tumeurs mammaires en 8 stades (Farhadihosseinabadi *et al.*, 2018; Davidson, 2013).

Tableau I: phases d'évolution selon le critère Taille de la tumeur, présence des nodules et Métastases

Stades	Catégorie TNM
0	TisN0M0 Tis : carcinome canalaire/ lobulaire invasif ou maladie de Paget
I	T1N0M0 , T1 : tumeur de plus grande dimension < 2 cm T0N1miM0/ T1N1miM0 N1 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux et non mobilisable
IIA	T1N1M0 N1 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux et mobilisables T0N1M0/ T2N0M0 , T2 : Tumeur > 20 mm mais ≤ 50 mm dans sa plus grande dimension
IIB	T2 N1M0 T3N0M0 , T3 : Tumeur > 50 mm dans sa plus grande dimension
IIIA	T0/ T1/T2N2M0 ou T3N1/N2M0 , N2 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux qui sont non mobilisables et agrégés
IIIB	T4N0 ou N1 ou N2M0 , T4 : Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau (y compris le carcinome inflammatoire)
IIIC	Tout T, N3M0 , N3 : Métastases dans les ganglions sous-claviculaires homolatéraux (niveau axillaire III) avec ou sans implication ganglionnaire axillaire de niveaux I, II
IV	Tout T, tout NM1 , M1 : Métastases à distance décelables et/ou prouvées histologiquement, et de taille supérieure à 0,2 mm

T : taille de la tumeur ; N : présence des nodules nodules ; M : présence des métastases

I.3 Modèles expérimentaux d'étude du cancer du

Trois grands modèles expérimentaux d'étude du cancer en général et celui du sein en particulier ont été développés par la communauté scientifique. Il d'agit des modèles cellulaires, les modèles *in-silico* et les modèles animaux induits.

I.3.1 Modèles cellulaires

En fonction des types moléculaires de cancers mammaires, des lignées cellulaires ont été isolées. Le tableau suivant donne une classification sommaire des lignées cellulaires de cancer du sein (Costa *et al.*, 2020).

Tableau II: Lignées cellulaires de cancer du sein et leurs caractéristiques

Lignées cellulaires		Type	Profil		Marqueurs de
		moléculaire	immunologique		prolifération
MCF-7, SUM185	T47D,	Luminal A	ER+, HER2–	PR+/-,	Ki67 bas
BT474, ZR-75		Luminal B	ER+, HER2+	PR+/-,	Ki67 élevé
SKBR3, 453	MDA-MB-	HER	ER–, PR–, HER2+		Ki67 élevé
MDA-MB-468, SUM190		Basale	ER–, PR–, HER2–		EGFR ⁺ et/ou cytokératine 5/6 ⁺ , Ki67 élevé
BT549, 231, SUM1315	MDA-MB-Hs578T,	Claudine bas	ER–, PR–, HER2–		Ki67, E-cadherin, claudin-3, -4 et -7 bas

I.3.2 Modèles animaux

En fonction de la méthode l'induction de la carcinogénèse chez les animaux, on distingue les modèles transgéniques, les modèles transplantés et les modèles chimiques

I.3.2.1 Modèle transgénique

Cette technique consiste en le transfert d'un gène cloné dans le génome des animaux, faisant naître des organismes génétiquement modifiés (OGM). Ces gènes sont capables d'induire des changements dans les cellules cultivées, conduisant au bout de 6 à 18 mois à des tumeurs dans ce modèle (**Bazm et al., 2018**). Les souris portant une modification d'un seul oncogène sont dit monogéniques, comparativement aux multigéniques portant les modifications d'au moins 2 oncogènes. Des souris transgéniques ERBB2/HER2/neu, TGFβR2, IGF-IR, c-MET sont utilisés en laboratoire comme modèles d'étude dans le cancer du sein (**Regua et al., 2021**). Il existe également des modèles transgéniques induits par des oncogènes dérivés des virus. Il s'agit notamment du modèle induit par l'antigène *Polyoma middle T*, dont la forme hyperplasique montre des niveaux élevés de ER et PR avec des niveaux plus faibles de HER2/neu. Leurs cellules tumorales PyMT perdent l'expression de ER/PR et augmentent les niveaux de HER2 au fur et à mesure de la progression intraépithéliale mammaire et/ou carcinome tardif (**Lin et al., 2003**).

I.3.2.2 Modèles transplantés

Dans cette approche, les cellules sont généralement isolées à partir du tissu tumoral de différentes manières avant d'être transplantée chez l'animal. D'une part, les lignées de cellules tumorales sont cultivées dans des milieux de culture bidimensionnels (2D) ou tridimensionnels (3D) de façon individuelle ou en co-culture (**Bazm et al., 2018**). D'autre part, ces cellules peuvent être extraites de tumeurs humaines, puis cultivées et transplantée. La xénogreffe des cellules est généralement accompagnée d'une induction hormonale pour la promotion de la croissance tumorale. Cette technique implique l'utilisation de lignées cellulaires présentant des phénotypes CD+ 44/CD-24 comme lignées cellulaires initiatrices de tumeurs. La xénogreffe de cellules tumorales est réalisée de trois façons (**Ingvarsson, 1999**) :

- Par injection sous-cutanée (SC) de cellules tumorales dans le dans le coussinet adipeux mammaire des animaux, auquel cas les cellules se reproduisent rapidement dans la région cible.
- Par injection directe des cellules dans les ganglions lymphatiques de la région (xénogreffe orthotopique) ou même dans le coussinet adipeux mammaire, ce qui s'accompagne généralement de la métastase des cellules tumorales.
- Par injection intraveineuse (IV vers la veine caudale) pour induire des métastases pulmonaires ou à d'autres organes. Dans la xénogreffe de coussinet adipeux mammaire.

Par ailleurs, des fragments tumoraux peuvent être cultivés et transplantés en sous-cutané au niveau de l'abdomen (**Rezakhani et al., 2014**)

I.3.2.3 Modèles chimiques

Les composés chimiques cancérigènes sont divisés en composés métalliques (arsenic, plomb et cadmium), hormonaux et chimiques. Les métaux comme le plomb développent différentes tumeurs de diverses manières, notamment en endommageant l'ADN et en empêchant sa synthèse et sa réparation, la formation de radicaux libres, l'augmentation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de facteurs suppresseurs de tumeurs tels que P53 (**Silbergeld et al., 2000**). Par ailleurs, **Mense et al. (2008)** ont induit un cancer du sein par administration sous-cutanée d'une dose de 3 mg d'estradiol (17 β -estradiol) avec développement d'une hyperplasie lobulaire au jour 7 et des tumeurs au jour 120.

Les composés chimiques utilisés pour induire des tissus tumoraux nécessitent des caractéristiques telles qu'une forte tumorigénicité, un tissu cible spécifique, une longue demi-vie, une disponibilité et une capacité de bioprocédé. L'une des classes les plus utilisées pour induire les tumeurs mammaires est celle des hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Bazm et**

al., 2018). Parmi elles on a le N-méthyl-N-nitroso-2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine, le Methylcholanthrene et le 7,12-Diméthylbenz(a)anthracène (DMBA). Ces composés sont utilisés sous forme de promutagène, procarcinogène et tératogène. C'est à l'issue de leur métabolisme hépatique dépendamment par le cytochrome P450, que ses métabolites actifs sont produits et transférés vers les tissus cibles (**Xu et al., 2006**).

Le DMBA est l'un des plus utilisés pour induire les tumeurs mammaires seul, ou suivi par l'administration de promoteurs. Il est administré à une dose unique comprise entre 50 et 80 mg/Kg de P.c. par voie orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée. Ses métabolites actifs sont le 7-hydroxy méthylbenz(a)anthracène (7-OHM-12-MBA) et le 7,12-diOHMBA qui peuvent former des dérivés époxydes (Figure 17). Ces 2 composés peuvent entraîner une dépurination de la molécule d'ADN, conduisant à des mutations et plus tard une tumorigenèse (**Bazm et al., 2018**). Pour accroître sa spécificité, le DMBA est administré par voie sous-cutanée à des jeunes rates d'âge compris entre 4 et 7 semaines dont les cellules mammaires sont encore non différenciées (**Karimi et al., 2018**). Ceci est également favorable au développement ultérieur des tumeurs RE positives (**Tsubura et al., 2011**).

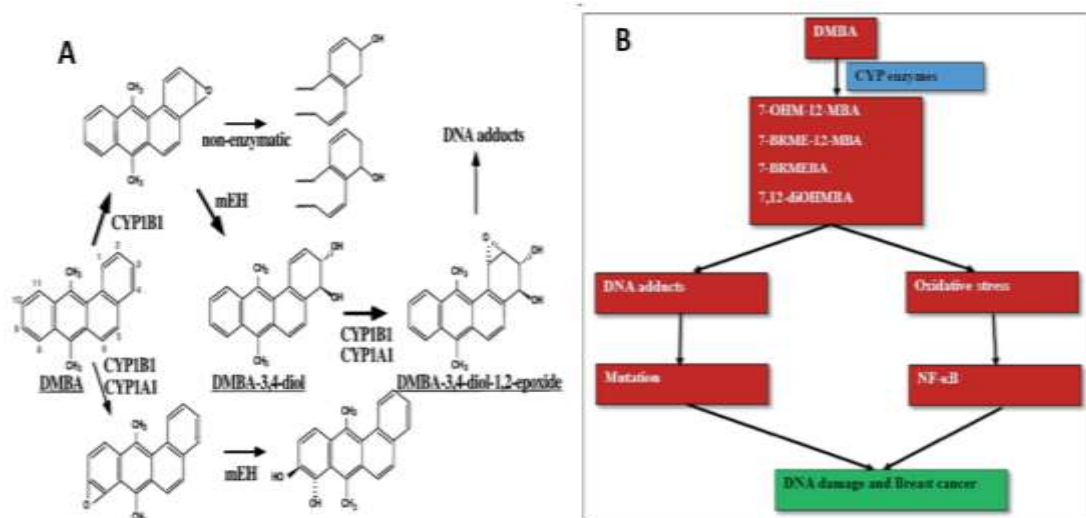


Figure 17 : Métabolisme du DMBA (A) et induction de la tumorigenèse mammaire (B) (**Bazm et al., 2018**)

I.4 Prise en charge du cancer du sein

La stratégie thérapeutique dépend du stade et les caractéristiques biologiques du cancer, l'âge du patient, et les risques et bénéfices (**Farhadhosseinabadi et al., 2018**).

I.4.1 Stratégie de prise en charge du cancer de sein précoce

La plupart des femmes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce subiront une chirurgie suivie d'autres traitements tels que la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie (endocrinienne) et/ou une thérapie ciblée en fonction du type moléculaire et des risques de récides (**Cardoso et al., 2016 ; Goss et al., 2016**)

a) Chirurgie

Le principal moyen de traitement local et régional du cancer du sein reste l'intervention chirurgicale qui peut être conservatrice ou totale. La chirurgie de conservation ou tumorectomie consiste à enlever la tumeur et juste une portion de tissu normal. Il existe cependant un risque plus élevé de récidence locale chez les femmes plus jeunes (moins de 40 ans) et les patientes présentant des tumeurs plus grosses et/ou plus agressives. La chirurgie totale ou mastectomie quant à elle consiste à enlever le sein malade dans son entièreté. L'un ou l'autre procédé est généralement accompagné de l'ablation d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques régionaux de l'aisselle ; ceci dans le but de déterminer l'étendue de la maladie, et s'il faille envisager une intervention chirurgicale ultérieure, une radiothérapie ou des traitements systémiques (**McGuire et al., 2009**).

La chirurgie entraîne cependant une asymétrie mammaire, des douleurs et la raideur de l'épaule ainsi qu'une altération de l'image corporelle (**ARC, 2021**).

b) Radiothérapie

Il s'agit d'une thérapie utilisant des faisceaux ou des particules à haute énergie pour tuer les cellules cancéreuses. Cette thérapie est souvent effectuée après une intervention chirurgicale de conservation pour détruire les cellules cancéreuses restantes dans le sein, la paroi thoracique ou dans la région de l'aisselle. Elle réduit le risque de récidence et de décès d'environ 50 % et 20 %, respectivement chez les patients ayant subi une tumorectomie. Elle est également prescrite chez les patientes traitées par mastectomie ayant une tumeur supérieure à 5 cm ou si le cancer est présent dans les ganglions lymphatiques (**McDonald et al., 2016**).

La radiothérapie entraîne une fatigue, des douleurs, des œdèmes du sein, une fibrose mammaire, une toxicité cardiaque, la rétraction mammaire et les maux de tête (**American Cancer Society, 2020**).

I.4.2 Stratégie de prise en charge des cancers avancés du sein

La prise en charge du cancer du sein métastatique doit être fonction du sous-type ainsi que des caractéristiques de la maladie et des préférences du patient. Les thérapies systémiques sont les plus sollicitées dans ce cas. Le traitement endocrinien (hormonothérapie), avec ou sans thérapie ciblée, est le pilier de la maladie de type luminal (**Pagani et al., 2014**). Dans le cas d'une maladie triple négative, la chimiothérapie est le traitement principal et doit se faire de façon séquentielle (**Minckwitz et al., 2012**). Pour les tumeurs triple-négatives associées aux cellules immunitaires exprimant PD-L1 et HER2+, les thérapies ciblées ou immunothérapies sont recommandées (**Harbeck et al., 2019**).

a) Chimiothérapie

Les médicaments de chimiothérapie sont des cytotoxines ayant pour propriété commune l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales en agissant sur le cycle. Selon les cibles les cytotoxines peuvent être (Figure 18) :

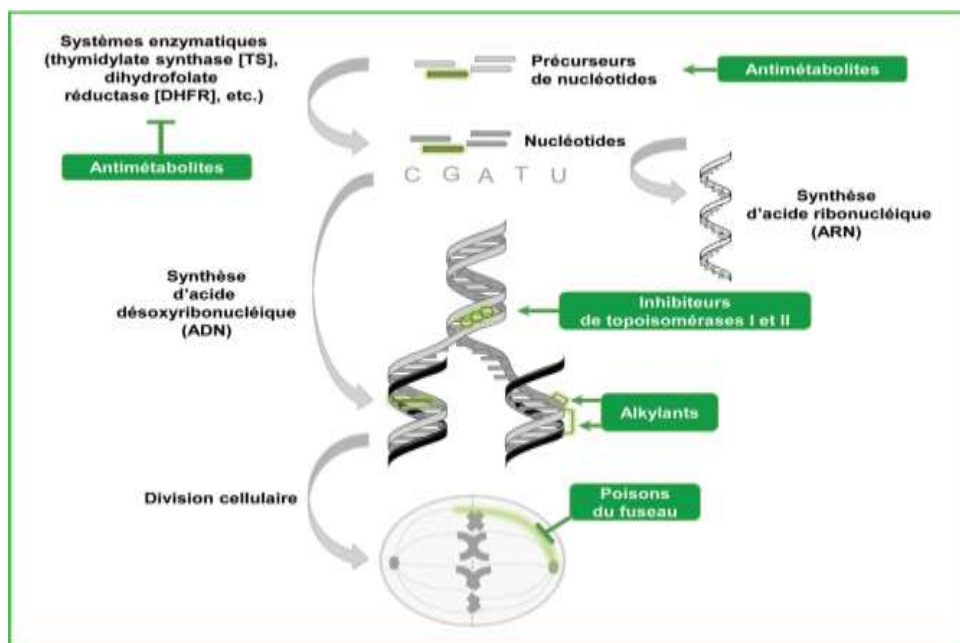


Figure 18: Mécanismes d'action des médicaments de chimiothérapie (**Abotaleb et al., 2018**)

- Les agents alkylants

Ils peuvent être des moutardes azotées des alkylsulfonates, des triazènes. Ils possèdent un ou plusieurs groupements alkyles ou alcoyles, très réactifs, capables de former des liaisons covalentes avec des sites très nucléophiles. Au niveau de l'ADN, ces médicaments se lient préférentiellement à l'azote N7 de la guanine tandis que de nombreux autres sites de liaison sont possibles avec l'ADN, l'ARN ou les protéines via leurs groupements thiol. En établissant

des liaisons covalentes, les alkylants créent des ponts extra- ou intercaténaux, qui inhibent la transcription et la réplication et conduisent à la mort de la cellule. Par ailleurs, ces agents sont responsables de la libération de radicaux libres entraînant des cassures de la chaîne d'ADN (Sadiq *et al.*, 2020).

- **Les antimétabolites**

Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques de l'ADN (et parfois de l'ARN), en empêchant l'activité de diverses enzymes clés. Ils sont à cet effet efficace sur les cellules en phase S du cycle cellulaire. Ils peuvent être des analogues de l'acide folique reconnus par les enzymes clés du cycle des folates. Ils bloquent ainsi le cycle des folates, inhibant de manière indirecte la thymidylate synthase (TS), enzyme indispensable pour la synthèse des bases pyrimidiques telles que la thymine. Certains antimétabolites sont des analogues pyrimidiques qui ont la capacité d'inhiber la synthèse des nucléotides pyrimidiques. Parmi eux, la 5-fluorouracile interagit avec les enzymes du métabolisme des pyrimidines et peut être phosphorylée en triphosphate et incorporé à la place de l'uracile dans les ARN messagers. La dernière catégorie des antimétabolites regroupe les analogues de purines qui agissent principalement en inhibant l'adénosine désaminase, enzyme clé pour la synthèse des purines (Abotaleb *et al.*, 2018).

- **Les agents intercalant et inhibiteurs des topoisomérases :**

Les agents intercalants sont une famille d'agents antitumoraux qui peuvent s'insérer dans la double hélice de l'ADN par le biais d'interactions non covalentes, entraînant des modifications structurelles de l'ADN et l'arrêt de la réplication (Zhao *et al.*, 2023 ; Tenconi et Rigali, 2018). L'effet cytotoxique est obtenu suite à l'inhibition des topoisomérases (ou DNA-gyrase) par des composés administrés en complément tel que l'étoposide (Mastrangelo *et al.*, 2022).

- **Les poisons du fuseau ou poisons mitotiques :**

Ces médicaments se lient à la tubuline qui entre dans la composition du fuseau mitotique et qui joue un rôle important dans le maintien du cytosquelette. Ils agissent ainsi au moment de la mitose et entraînent la mort de la cellule. Plusieurs types de poisons du fuseau sont distingués en fonction de leur structure, de leur origine (souvent naturelle) et de leur site de liaison sur la tubuline ce sont généralement les taxanes et les alcaloïdes (Renard, 2013).

De façon générale, les agents alkylants, les antimétabolites et les inhibiteurs de topoisomérases altèrent les capacités de réplication et de transcription des gènes, en induisant

des modifications des acides nucléiques, tandis que les poisons du fuseau inhibent les capacités de mitose de la cellule tumorale.

La chimiothérapie peut être responsable des effets indésirables tels que l'alopecie, les nausées, l'immunodépression, l'anémie, les dysménorrhées, l'infertilité, l'insuffisance cardiaque, et l'hépatotoxicité (Adamowicz et Baczkowska-Waliszewska, 2020).

b) Thérapies ciblées dans la prise en charge du cancer du sein

Différents inhibiteurs de récepteurs membranaires ont montré une activité dans le cancer du sein. Ils comprennent les anticorps monoclonaux, qui bloquent les récepteurs de surfaces des cellules cancéreuses tel que le récepteur de la mort programmée PD-1, les récepteurs de facteurs de croissance, les modulateurs de l'angiogenèse. L'autre classe concerne les petites molécules pouvant traverser la membrane plasmique et inhiber les protéines anti-apoptotiques, les seconds messagers intracellulaires ou moduler les voies métaboliques et épigénétiques (Figure 19). Par ailleurs, différents inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) ont démontré une bonne efficacité chez les patientes atteintes d'un cancer du sein présentant une mutation germinale du gène BRCA (Hu et McArthur, 2018 ; Rugo *et al.*, 2016).

Bien que spécifiques, ces médicaments peuvent entraîner des effets indésirables tels qu'une l'asthénie, les lésions cutanées, l'hypertension et les malaises gastro-intestinaux (Du *et al.*, 2021).

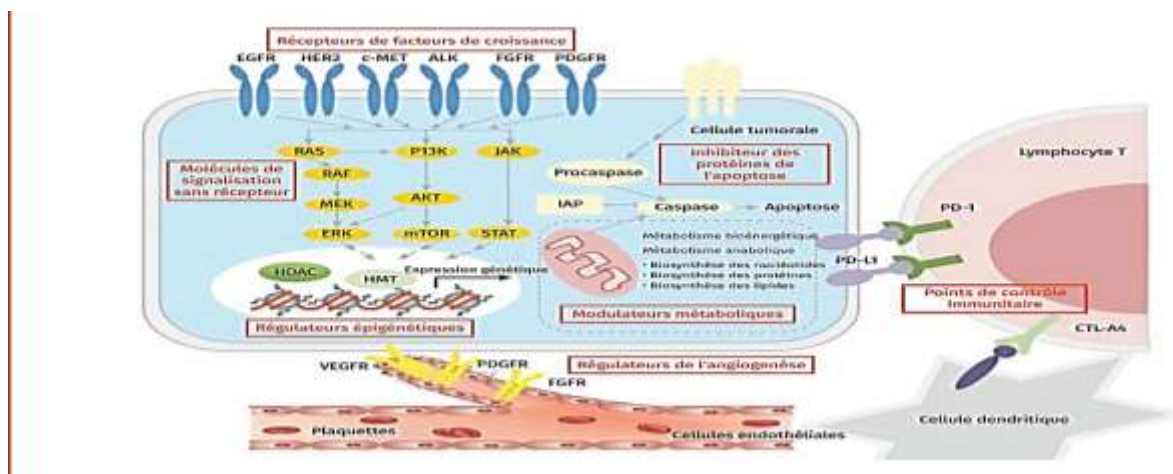


Figure 19: Stratégies thérapeutiques en thérapie ciblée (Shuel, 2022)

c) Immunothérapie dans la prise en charge du cancer du sein

Elle est plus adaptée pour les cancers du sein triple négatif dont le pronostic est faible (Abotaleb *et al.*, 2018). L'enjeu de l'immunothérapie est de réactiver ou de renforcer l'immunité anticancéreuse, afin de contrôler le développement tumoral, en ciblant entre autres des *checkpoint* (Verret et Loirat, 2016). En effet, il existe au sein de la tumeur différents types de cellules immunitaires avec des rôles opposés soit pro- (LT régulateurs, MAT) ou antitumoral (LT effecteurs, MAT). Toutes ces cellules interagissent entre elles et avec les cellules tumorales par le biais de différentes protéines de surfaces, ce qui constitue des *checkpoints* accessibles à un traitement ciblé (Demaria *et al.*, 2011). Ces molécules peuvent établir des liaisons avec la *PD-1* et la *cytotoxic T-lymphocytes-associated protein-4* (CTLA-4) (Figure 20). Cette dernière régule négativement les lymphocytes T, et son blocage permet une restauration de l'action des lymphocytes. La *PD-1* quant à elle est une protéine exprimée à la surface des lymphocytes T activés, qui lorsqu'elle est stimulée par son ligand (*PD-L1*), exprimé à la surface des cellules tumorales et stromales, inhibe l'activation lymphocytaire (Topalian *et al.*, 2012).

L'autre stratégie consiste en l'administration des vaccins antitumoraux dont le principe est d'éduquer ou de renforcer le système immunitaire, principalement les lymphocytes T CD8+ et CD4+, à reconnaître la tumeur, via les épitopes dérivés des antigènes spécifiques de la tumeur et présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Emens *et al.*, 2012).

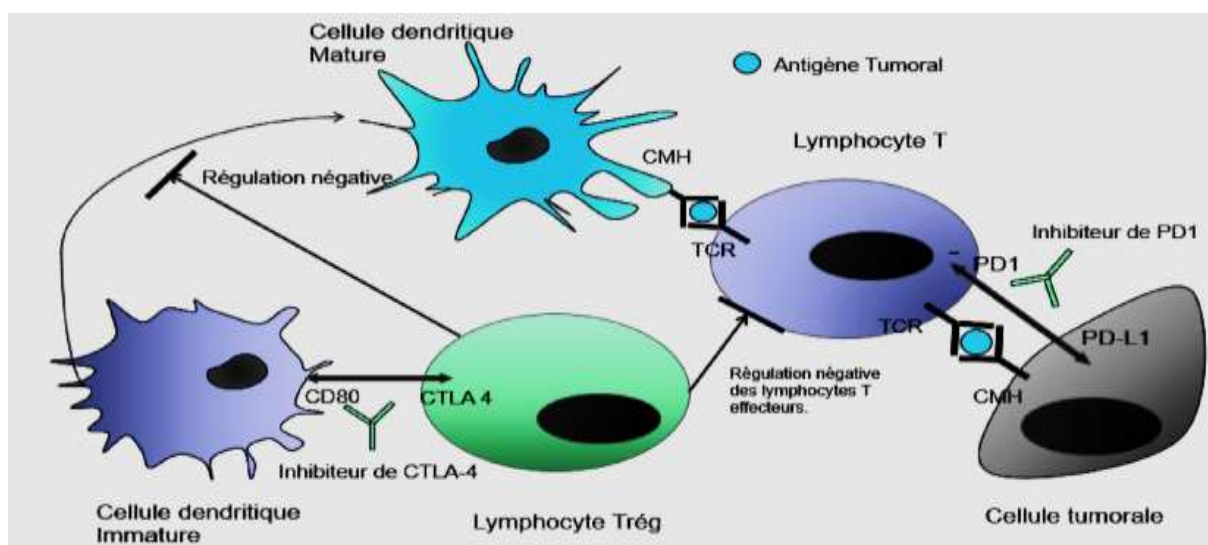


Figure 20: Mécanismes d'action des modulateurs de l'immunité (Verret et Loirat, 2016)

d) Hormonothérapie dans la prise en charge du cancer du sein

L'hormonothérapie est administrée aux patientes atteintes d'un cancer du sein ER+/PR+ afin de diminuer le taux d'œstrogènes ou de bloquer la croissance cancéreuse du sein. Ces traitements sont de 3 catégories (Figure 21) ; d'une part il y a les inhibiteurs de l'aromatase, limitant la synthèse des œstrogènes au niveau des tissus adipeux. Si l'on craint un risque accru d'ostéoporose ou une intolérance aux, les modulateurs sélectifs des RE tel que le tamoxifène peuvent être prescrits. Cependant, il est suggéré d'associer au tamoxifène des supprimeurs de la fonction ovarienne (Inhibiteurs de GnRH) et l'exémestane, uniquement chez les patients ayant subi une chimiothérapie (Pagani *et al.*, 2014).

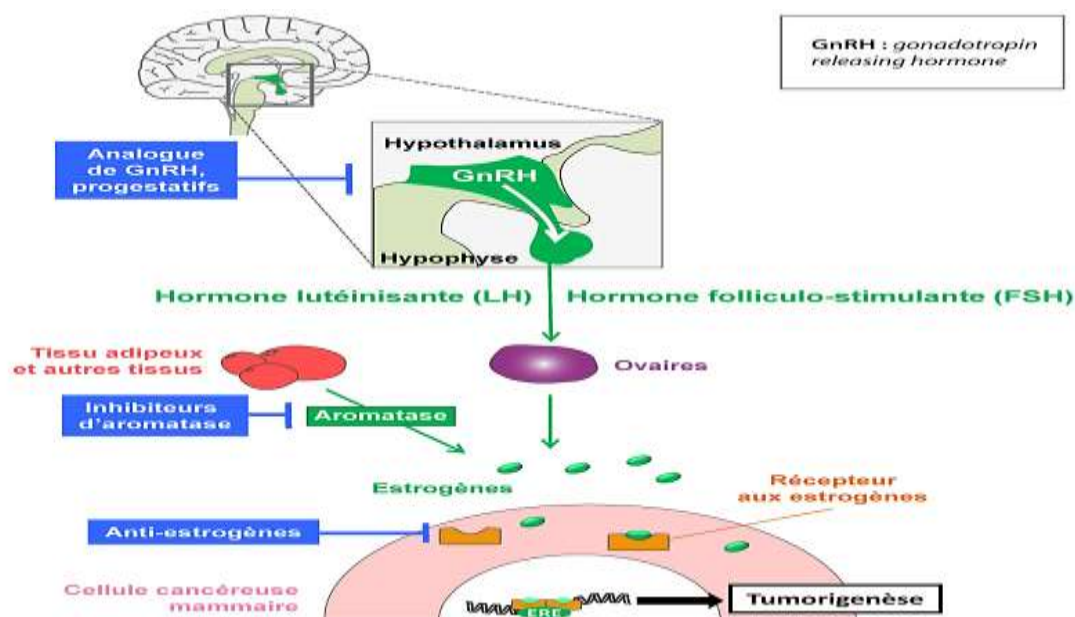


Figure 21: Mécanisme d'action des médicaments utilisés en hormonothérapie (Pagani *et al.*, 2014)

L'hormonothérapie peut cependant entraîner des bouffées de chaleur, la sécheresse vaginale, la baisse de la Libido, le cancer de l'endomètre, ostéoporose et les douleurs articulaires (Adamowicz et Baczkowska-Waliszewska, 2020).

I.5 Généralités sur le tamoxifène

Le tamoxifène (TAM), de son nom chimique (Z)-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-diméthylethanamine, est un traitement chimio/hormonal largement et fréquemment prescrit pour la prévention et le traitement de tous les stades du cancer du sein RE positif chez les femmes pré et post-ménopausées (Chunjie *et al.*, 2016). Il est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) comme traitement adjuvant du cancer du sein métastatique et post-chirurgical pour éliminer les micrométastases (Ahmed et Lennard,

2009) et sert de médicament préventif pour les personnes saines à haut risque (**Rong et al., 2015**). Il est commercialisé sous le nom de Nolvadex®

I.5.1 Pharmacocinétique du tamoxifène

La pharmacocinétique est l'étude du déroulement temporel de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (ADME) d'un médicament après son administration dans l'organisme (**Jianghong et Lannoy, 2013**).

I.5.1.1 Administration et absorption

Le TAM est disponible sous forme de comprimés enrobés administré par voie orale. Le schéma posologique utilisé pour le traitement et la prévention du cancer du sein invasif est de 10 mg deux fois par jour ou 20 mg une fois par jour pendant 5 ans. La biodisponibilité orale de la TAM est élevée, environ 100 % (**Huda et al., 2020**).

I.5.1.2 Distribution

Le tamoxifène est insoluble dans l'eau et se répartit dans les membranes lipidiques, ce qui entraîne une destruction oxydative accrue. Une fois dans l'organisme, le tamoxifène se lie à 99% aux protéines sériques, principalement l'albumine et la globuline, afin de faciliter son transport (**Shahbaz et al., 2017**). Son volume de distribution est de 50-60 L/kg (**Lien et al., 1991**).

I.5.1.3 Métabolisme du tamoxifène

Le tamoxifène est un pro-médicament, ne possédant donc que peu ou pas d'activité pharmacologique. Son activation se fait *in vivo* par des réactions enzymatiques ou chimiques ou par une combinaison des deux (**Hansten, 2018**). Après administration orale, le TAM est largement métabolisé dans le foie par des enzymes de phase I et de phase II du complexe enzymatique lié au cytochrome P450 notamment le CYP2D6 et du CYP3A (**Shahbaz et al., 2017**). Sous l'action de ces enzymes, le TAM subit une série de réactions, notamment, la N-déméthylation, la N-oxydation, l'époxydation, l'hydroxylation et l'isomérisation, aboutissant respectivement à l'aminotamoxifène, au N-déméthyl tamoxifène et au 4-hydroxyl-N-déméthyltamoxifène (endoxifène), au N-oxyde de tamoxifène, à l'époxitamoxifène, l'alpha hydroxytamoxifène et au 4-hydroxyltamoxifène (Figure 22) (**Musa et al., 2007**). Cependant, seul le 4-hydroxytamoxifène, le N-desméthyltamoxifène et le 4-hydroxy-N-desméthyltamoxifène (endoxifène) ont une forte affinité pour le RE (**Nazarali et Narod,**

2014). En outre, le principal métabolite responsable de l'activité antiproliférative du tamoxifène est l'endoxifène (Hansten, 2018).

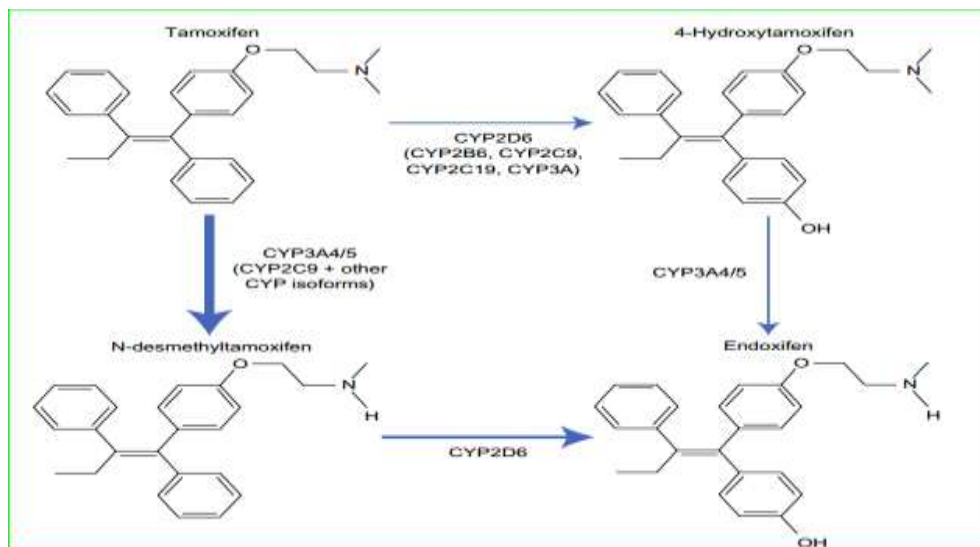


Figure 22: Métabolisme du tamoxifène (Musa *et al.*, 2007)

1.5.1.4 Excrétion

La demi-vie du TAM et de ses métabolites est d'environ 5 à 7 jours après une dose unique (Fedro *et al.*, 2020). Le TAM est éliminé via les réactions de détoxification de phase II catalysées par les glycosyltransférases sous forme de TAM-O-glucuronide dans l'urine. De même, le tamoxifène et/ou ses métabolites peuvent subir le cycle entéro-hépatique important.

1.5.2 Mécanisme d'action antitumorale du tamoxifène

Le TAM se lie de manière compétitive ou antagoniste au RE sur tissu mammaire, empêchant ainsi l'apport d'œstrogènes nécessaire à la croissance des cellules cancéreuses à RE positifs (Adikwu *et al.*, 2020 ; Schuurman *et al.*, 2019). Cette liaison produit un complexe nucléaire qui diminue la synthèse de l'ADN, inhibe l'action des œstrogènes et bloque l'angiogenèse (Karn *et al.*, 2010), la croissance, la prolifération et la survie des cellules (Colleoni et Munzone, 2015). De plus, le tamoxifène a des effets cytostatiques provoquant l'accumulation des cellules dans les phases G0 et G1 du cycle cellulaire (Derya *et al.*, 2018). Il induit une activation de la protéine kinase C ainsi que l'augmentation de l'activité des cellules NK (Karn *et al.*, 2010). Par ailleurs, le 4-hydroxytamoxifène inhibe la transcription des gènes sensibles aux œstrogènes en formant le complexe ER/tamoxifène qui amène des protéines co-répressives telles que le corépresseur des récepteurs nucléaires (NCoR) à réguler les fonctions de plusieurs gènes (Wong *et al.*, 2014).

I.5.3 Effet indésirables associés à la prise du tamoxifène

Le tamoxifène a montré son succès dans la prise en charge du cancer mais avec des effets toxiques graves, notamment une myélosuppression, une toxicité gastro-intestinale, une cardiotoxicité, une hépatotoxicité, une neurotoxicité, et bien d'autres (**Liu et al., 2018**).

I.5.3.1 Induction du cancer de l'endomètre

Des recherches récentes ont prouvé que le tamoxifène augmente le risque de cancer de l'endomètre chez les femmes d'environ 2 à 7 fois via l'élévation des niveaux d'œstradiol (**Günter et al., 2020**). Chez les patientes souffrant d'affections endométriales telles que l'hyperplasie avant le traitement au tamoxifène, le taux de progression vers des lésions endométriales de stade plus avancé est de près de 50 % (**Garuti, 2006**). Par ailleurs, le tamoxifène en lui-même agirait comme agoniste des RE au niveau de l'endomètre.

I.5.3.2 Hépto-toxicité et Néphro-toxicité du tamoxifène

Le TAM est connu pour provoquer une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) chez les patients concernés (**Yoo et al., 2020 ; Hamid et al., 2015**) et d'autres effets secondaires hépatiques tels que l'élévation des tests de la fonction hépatique, l'ictère, la diminution des protéines totales, la cholestase et la nécrose hépatique massive (**Pan et al., 2015 ; Cole et al., 2010**). Le mécanisme par lequel le TAM provoque l'hépatotoxicité n'est pas bien compris ; cependant il a été démontré que le TAM provoque une diminution de la β -oxydation mitochondriale et des dommages oxydatifs hépatiques. Ceci passerait par une augmentation de la peroxydation lipidique hépatique, ainsi qu'une déplétion des enzymes antioxydantes hépatiques, la libération d'ions fer libres qui participent à la génération de radicaux hydroxyles (**Miyamura et al., 2016**). C'est par ces mêmes mécanismes que le TAM induirait des dommages rénaux tel que répertorié dans la littérature (**Saleh et al., 2016 ; Zuhair, 2011**).

I.5.3.3 Autres effets toxiques du tamoxifène

Des évidences scientifiques indiquent que, le TAM causerait également des troubles dans le système immunitaire (**Hugo et al., 2019 ; Panchal et al., 2014**), digestif (**Jordan and Assikis, 1995**) et oculaire (**Garima, 2018**). On note également des signes généraux de toxicité tel que l'alopecie, l'agressivité, la perte de poids, les saignements vaginaux et la fatigue (**Panchal et al., 2014**).

Face aux effets indésirables associés aux différents traitements, les patients ont recours à des thérapies alternatives et complémentaires telle que l'acupuncture et la phytothérapie.

I.6 Traitement alternatif et complémentaire dans la prise en charge du cancer du sein : la phytothérapie

Des enquêtes menées auprès des patients sous traitement conventionnels ont indiqués que ces derniers avaient également recours à la phytothérapie pour booster l'efficacité des traitements ou pour faire passer les effets indésirables associés à ceux-ci (**Chin et al., 2020 ; Liao et al., 2013**). Ces données ont donc été à la base de nombreux travaux scientifiques visant à évaluer l'effet des suppléments alimentaires et extraits de plantes dans la prise en charge des cancers. Les composés bioactifs qu'ils contiennent sont en principe capables d'agir à différents niveaux de la carcinogenèse (**Prasad et al., 2017**) à travers des mécanismes variés (Figure 23).

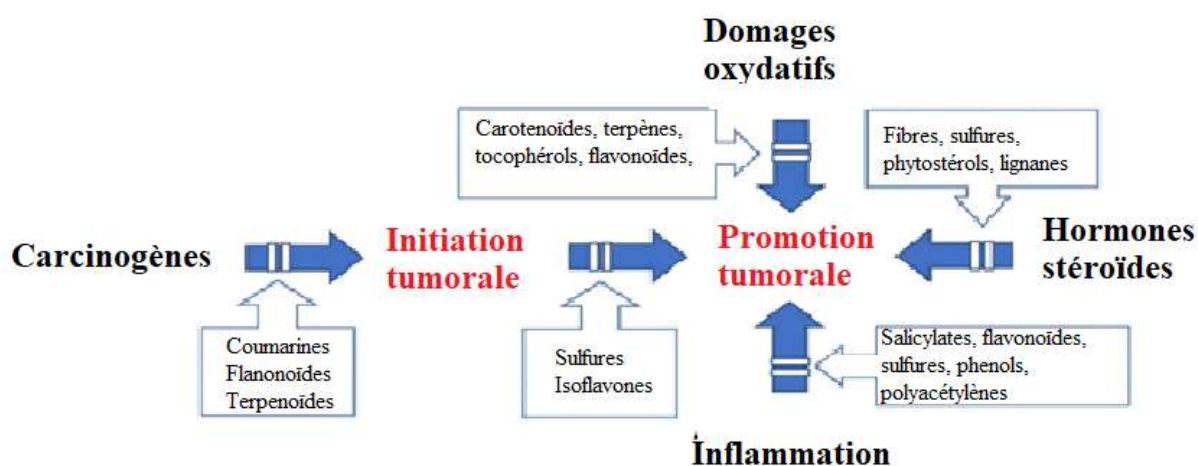


Figure 23: Inhibition de la progression tumorale par les composés bioactifs de plantes (**Prasad et al., 2017**)

I.6.1 Mécanismes d'action des composés bioactifs dans la lutte antitumorale

Les classes de composés bioactifs les plus étudiés sont les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes. Ces composés agissent en modulant la transcription des gènes, l'expression des protéines, en bloquant les récepteurs membranaires, en inhibant les voies internes de transduction du signal ou en induisant un stress intracellulaire. Ces différentes actions ont pour conséquences un arrêt du cycle cellulaire, une inhibition des mécanismes de survie, une inhibition de l'angiogenèse tumorale et invasion, une induction de la mort cellulaire (**Rampogu et al., 2022 ; Ateba et al., 2018 ; Mocanu et al., 2015**). La Figure 24

ci-dessous présente quelques mécanismes d'action antiproliférative des métabolites secondaires des plantes.

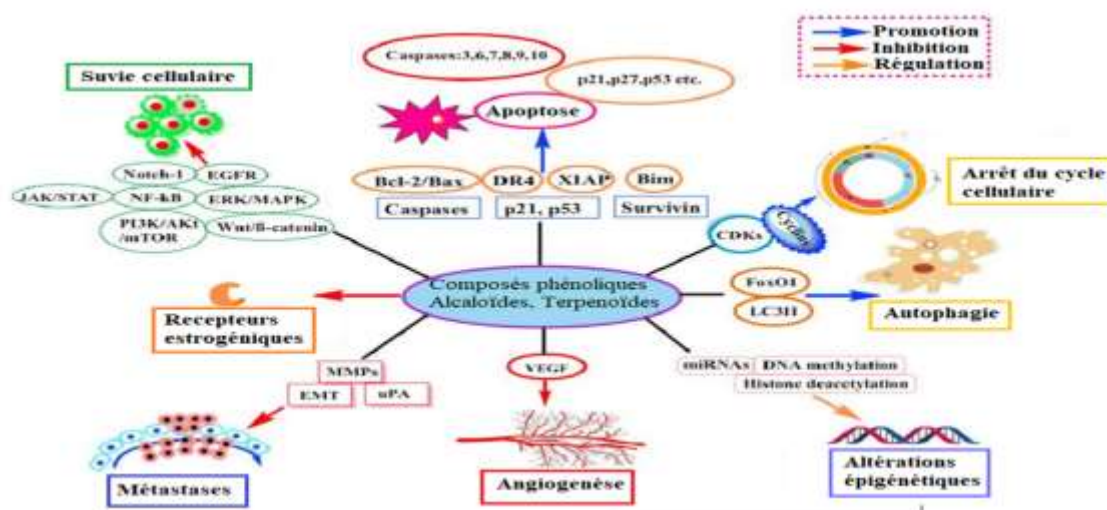


Figure 24: Mécanisme d'action antiproliférative des composés bioactifs adapté de **Kamran et al. (2022)**

I.6.2 Phytothérapie et prise en charge complémentaire du cancer du sein

Il a été montré que, la supplémentation en acide décoxahexanoïque (DHA) facilite l'action de la Doxorubicine dans les cellules MDA-MB-231 et chez les souris nu/nu, via l'amplification de l'effet de la doxorubicine sur l'apoptose et les gènes du cycle cellulaire (**Ewashuck et al., 2012**). Par ailleurs une enquête a révélé que, des produits végétaux tels que le gingembre, la camomille, la menthe, la cardamome et l'oignon étaient utilisés par les patientes pour réduire la nausée et les vomissements associés aux traitements conventionnels (**Habibeh et al., 2020**). Il a également été rapporté que, *Uncaria tomentosa* utilisé en médecine traditionnelle chinoise aiderait à la restauration de l'ADN cellulaire, prévenant ainsi les mutations et les dommages cellulaires causés par les médicaments de chimiothérapie et la radiothérapie (**Santos et al., 2012**).

En outre, **Mbong et al. (2020)** avaient montré que, les extraits de *Coffea arabica* et *Cola anomala* protégeaient les rats Wistar contre le stress oxydant et le désordre métabolique associés à la prise du méthotrexate par les rats Wistar. De même, **Mvondo et al. (2020)** ont montré que, les extraits des noyaux de *Pearsea americana* protégeaient l'endomètre utérin contre une hyperplasie induite par le tamoxifène chez des rates Wistar ovariectomisées.

Face à ces données intéressantes, il convient que la phytothérapie reste une approche prometteuse pour l'amélioration de la prise en charge des cancers. Les recherche devraient donc être continuellement menées dans ce sens.

I.7 Généralités sur la plante d'intérêt : *Aframomum angustifolium*

Aframomum angustifolium est une plante de la famille des Zingibéracée poussant dans les vallées et les régions humides. En Afrique *A. angustifolium* est présente dans les pays tels que l'Angola, le Benin, le Burundi, le Cameroun, le Congo, la Côte d'Ivoire, la Guinée Equatoriale, l'Éthiopie, le Gabon, le Ghana, le Kenya, le Madagascar, le Malawi, la Mozambique, le Nigeria, l'Ouganda, la RDC, le Rwanda, le Soudan, la Tanzanie, le Togo, la Zambie et le Zimbabwe (www.lavierebelle.org/afmomum-angustifolium-igitunguru). Elle appartient à une grande famille de plantes à activités anticancéreuses et anti-inflammatoires prouvées (Amadi *et al.*, 2016 ; Kuété *et al.*, 2014).

I.7.1 Classification botanique d'*A. angustifolium*

Le tableau III ci-dessous résume la classification botanique d'*A. angustifolium*

Tableau III: Classification botanique d'*A. angustifolium*

Domaine	BIOTA
Règne	PLANTAE
Classe	LILIOPSIDA
Sous-classe	LILIIDAE
Ordre	ZINGIBERALES
Famille	ZINGIBERACEAE
Genre	<i>Aframomum</i>
Espèce	<i>angustifolium</i>

Noms usuels : En français, cette plante est connue sous le nom de cardamome. Au Madagascar, elle est appelée *Longoza*, *sintogno*, *Longozakely* (Rakotonirina, 2019). Au Cameroun, son appellation varie d'une langue vernaculaire à l'autre. Ainsi on l'appelle « *tsouh* » en *Ghomala* dans les Hauts-Plateaux et le Nkung-khi, « *tchouh* » en *Guemba* dans la Mifi, « *chuchu* » en *Fèfè* dans le Haut-Nkam et *Ngwaka* en *Bulu*.

I.7.2 Description botanique d'*A. angustifolium*

Aframomum angustifolium se présente comme une grande plante herbacée vivace, de 1,5 à 4 m de haut, issue de rhizomes étendus et possédant des grandes feuilles simples, alternes et caduques, de couleur verte. Elle possède des fleurs en forme de trompette, de couleur jaune ou rosée qui s'organisent en épis. Ces fleurs groupées en inflorescences de 4 à 10 fleurs, apparaissant à la base des pousses feuillées. Elles ont des pétales rouges, un labelle jaune ou orange pâle. Les fruits sont ovoïdes à sub-globuleux dont la taille pourrait varier de 7 à 9,5 cm de long, y compris le calice dont la couleur est rouge à maturité. La tige est très rigide lorsqu'elle atteint une hauteur 1,50 m à 2 m. La plante a une odeur fruitée, avec des notes d'abricot, épicée et sucrée, légèrement poivrée. Les graines ressemblent à celles du poivre et de la cardamone par leur goût épicé, piquant avec un arrière-goût légèrement âcre (Rakotonirina, 2019).



Figure 25: Photographie d'un plant (A), des fruits (B) et des graines (C) d'*A. angustifolium* (Photographié par Makamwé, 2019)

I.7.3 Utilisations traditionnelles d'*Aframomum angustifolium*

Toutes les parties de la plante sont utilisées seules ou en association, sous différentes préparations. Elle est très utilisée en médecine traditionnelle congolaise (RDC) et malgache. On note également leur utilisation au Libéria, Kenya, Cameroun, Congo Brazzaville, Nigéria, Burundi, Tanzanie, Angola, Ouganda, et République Centrafricaine (Inkoto *et al.*, 2021). Le tableau ci-dessous est un résumé de l'utilisation traditionnelle d'*A. angustifolium*.

Tableau IV: Utilisation ethnopharmacologique d'*A. angustifolium*

Partie de la plante	Voie d'administration (préparation)	Affections prises en charge	References
Plante entière	Cutanée (pâte)	plaies	Konda et al., 2012
Tige	Orale (Décoction)	hémorroïdes	Konda et al., 2012
	Mastication	vers intestinaux	Kamatenesi et al., 2011
	Orale (Macération)	diarrhée et choléra	Abondo et al., 1991
Feuilles	Orale (Décoction)	toux, tachycardie	Ngezahayo et al., 2015
	Bain de vapeur	Diabète	Ratovondramamy, 2008
	Massage (pâte)	Pneumonie	Konda et al., 2012
	;Orale (macération)	Douleur articulaire, céphalées, fièvre Mal gastrique	
Fruits	Orale (décoction)	Splénomégalie,	Konda et al., 2012
		ascite, rougeole	Walsh, 2009
		Aliment	Ratovondramamy, 2008
			Tarashima et Ishikawa, 2003
Grains	Orale (décoction)	Anti helminthes	Githiori, 2004
Racines	Orale (décoction)	Epilepsie, fièvre jaune,	Lautenschläger et al., 2018 ; Tugume et al., 2016 ; Konda et al., 2012
		renforcement du système immunitaire	

I.7.4 Synthèse des travaux antérieurs effectués sur *Aframomum angustifolium*

Les travaux effectués sur *A. angustifolium* portent sur sa valeur nutritive, la phytochimie et les propriétés biologiques

I.7.4.1 Valeur nutritive d'A. angustifolium

Les grains, la pulpe et la peau des fruits d'*A. angustifolium* peuvent être de bonne source de macro et micronutriments. Selon les travaux de **(Kaana et Samuel, 2018)**, les graines contiennent environ 3,55% de cendres, 2,59% de lipides, 13,72% de fibres, 23,5% de protéines et 43,96% d'hydrates de carbone. La pulpe et la peau sont moins riches en ces différents éléments, excepté le taux de lipide qui varie de 65,30% pour la pulpe à 41,06% pour la peau.

I.7.4.2 Criblage phytochimique et toxicité

le criblage photochimique des extraits de graines et de peau d'*Aframomum angustifolium* a montré qu'ils contiennent des flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les saponines, les glucosides cardiques et des triterpènes **(Anywar et Kirimuhuzya, 2015)**. Par ailleurs, les huiles essentielles extraites des graines d'*A. angustifolium* se sont montrés riches en β -pinene, (24.8%), β -caryophyllène (17.8%) Cis-pinocarvyle acetate (11%), Myrtenyl acetate (8.5%), Trans-pinocarvyle (5.3%), Caryophyllène oxide (3.5%), α -pinene (3.3%), Sabinene (2.7%), α -humulene (2.9%) et le α -terpineol **(Baser et Kürkçüglu, 2001)** qui sont des composé à potentiel antiprolifératif prouvés **(Inkoto et al., 2021)**.

Il a été montré que, l'extrait hydro-éthanolique des fruits présente un effet toxique chez les souris. Par ailleurs, les travaux **d'Ebhohimen et Okolie (2021)** ont révélé un effet hépatotoxique de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*, administré pendant 28 jours à une dose de 1000mg/Kg de poids corporel. Cependant, à des doses inférieures (750 et 350 mg/Kg,PC), cet extrait s'avère non toxique dans les mêmes conditions.

I.5.4.3 Propriétés pharmacologiques d'A. angustifolium

Le peu d'études antérieures réalisées avec *A. angustifolium* fait état de ses activités antimicrobienne, anti oxydant, antiâge, hépato et néphroprotecteur **(Inkoto et al., 2021)**.

- Activité antimicrobienne

Les extraits à l'éther et au méthanol des peaux mûres d'*A. angustifolium* inhibent la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec des concentrations inhibitrice 50 de 125 mg/mL **(Anywar et Kirimuhuzya, 2015)**

- Activité antioxydante

Ebhohimen et al. (2017) ont montré que, la chaleur réduisait le potentiel chélateur et piègeur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*. Egalement, le pouvoir réducteur

des extraits aqueux et éthanolique serait réduit par un traitement thermique de 30 minutes tandis que le pouvoir piégeur de l'oxyde nitrique augmenterait avec le traitement thermique. Par ailleurs, les travaux effectués par **Edemhanria et al. (2020)** ont montré que, les huiles essentielles de grains d'A. *angustifolium* ont la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique des tissus hépatiques et rénaux congelés de bœufs.

- Activité antiâge

Les études d'**Andre et al. (2008)** ont révélé que le cosméceutique contenant l'extrait de graines d'A. *angustifolium* produisait un effet de rajeunissement global en termes de rougeur, de pigmentation et de ridules similaire à celui constaté en utilisant une source de lumière pulsée intense. Ces extraits serviraient donc à préserver ou restaurer la structure de la peau, notamment par stimulation de la synthèse du collagène VII de la jonction dermo-épidermique et de l'élastine. Ils pourraient également agir sur les fibres d'oxytaline et/ou les fibres d'élaunine.

- Effet hépato et néphroprotecteur

Les travaux d'**Ebhohimen et al. (2020)** et **Ebhohimen et Okolie (2021)** ont révélés que, l'extrait éthanolique de graines d'A *angustifolium* administré aux doses de 10, 100 et 750 mg/Kg, PC accélérât la réparation de l'hépatite et la néphrotoxicité induite par le Bromure de potassium chez les rats. Cette réparation se ferait à travers la stimulation du système antioxydant endogène, avec une augmentation de l'activité de la catalase et une baisse du taux de malondialdéhyde **Ebhohimen et al. (2020)**.

-Autres potentiels pharmacologiques possibles mais non explorés.

Aframomum angustifolium est une plante riche en terpenoïdes, constituant environ 81,7% de sa composition en l'huile essentielle. La présence de ces composés tels que le β -caryophyllène, le limonène, le β -pinène et α -pinène (**Inkoto et al., 2021**) pourrait lui conférer des propriétés biologiques telles que antiinflammatoires, cytotoxiques, pro-apoptotiques et même antitumoraux. D'où l'intérêt d'évaluer les propriétés anticancéreuses d'un extrait éthanolique de ses graines ayant fait l'objet de la plupart des études antérieures.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel

Le matériel utilisé dans ce travail était constitué de matériel végétal, matériel animal, appareils et réactifs.

II.1.1 Matériel végétal

Du fait de sa vaste répartition géographique et de son appartenance à une famille de plante à potentiel anticancéreux prouvés *Aframomum angustifolium* était l'objet d'étude. Ses graines ont été utilisées de par la présence dans leur huiles essentielles, de composés à potentiel antiprolifératif et de la capacité de son extrait éthanolique à protéger le foie et les reins d'une toxicité, réguler les gènes liés au renouvellement épidermique (**Inkoto et al., 2021**). Le matériel végétal était constitué des graines de fruits d'*Aframomum angustifolium*. Les fruits matures (de couleur rouge) ont été récoltés entre Avril et Juillet 2019 dans la localité de Baham du Département des Hauts-plateaux (altitude ; 1700 mètres ; 5°20'04" Nord, 10°22'08" Est). La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun comparativement au spécimen enregistré au numéro 44827/HNC du 14 Février 1998. Les fruits ont été transportés au Laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle.

II.1.2 Matériel animal

Il était constitué de lignées cellulaires et de rats albinos femelles de souche *Wistar*.

II.1.2.1 Lignées cellulaires

Face à l'impérieuse nécessité de développer de nouvelles stratégies anticancéreuses, l'évaluation précoce d'agents thérapeutiques sur plusieurs modèles tumoraux s'impose. Les caractéristiques fondamentales communes aux cellules cancéreuses indépendamment de leur origine telles que la prolifération anarchique, l'évasion apoptotique ou l'adaptation métabolique, légitiment une approche transversale. Ainsi, les Lignées cellulaires cancéreuses murines adhérentes du gliome (CT2A et GL261) et du mélanome (YUMM1.7 et B16-F1) ainsi que celle du cancer du sein humain (MCF-7) ont été utilisées. Elles provenaient du laboratoire d'immunologie de la *Yale University School of Medicine*. La description de ces lignées est présentée à l'**annexe 1**.

II.1.2.2 Animaux expérimentaux

Pour cette étude, quarante-deux (42) rates albinos de souche *Wistar* et âgées de 6 semaines ont été utilisées. Elles provenaient de l'animalerie du Département de Biologie et Physiologie Animal de l'Université de Yaoundé I. Parvenus au LNNB elles ont aléatoirement été réparties dans les cages métaboliques, constituées de bassines en plastique recouvertes de grillages et tapissées copeaux de bois blanc. Les cages étaient nettoyées tous les 2 jours. L'environnement était plongé dans un cycle de 12 heures jour et 12 h nuit, à température ambiante ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$). Elles étaient nourries d'une diète standard et avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux ont été acclimatés pendant 7 jours avant leur utilisation.

II.1.3 Appareils, instruments et consommables

Les appareils et instruments utilisés étaient constitués d'une balance électronique sensible (AHAUS), un blender (*Sayonna, Chine*), une étuve ventilée (Binder), un spectrophotomètre UV-Visible (*Fisher*), un lecteur de microplaque (*DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter*), un thermocycleur (*Biorad*), un incubateur (*Thermofisher*), un bain marie (*Bioline Scientific*), un microtome (*Biobase*), une plaque réfrigérante (*Plac-center SELECTA*), un microscope optique (*Bresser Junior set*), un lecteur luminex (*Bioplex*), un spectromètre de masse (*Waters Inc., Milford, MA*), une colonne chromatographique (*Phenomenex Luna® Omega 1,6 μm EVO C18 100 Å*), le NANODROP (*Thermo Scientific*), une centrifugeuse (*Thermo fisher*), un compteur d'hématologie (*Accurex Biomedical Pvt Ltd*) un hemocytomètre, le dispositif d'immunotransfert, la membrane de polyvidilène difluoride, les microplaques, les boîtes de culture de 25Cm^3 , une sonde œsophagienne, des micropipettes, un pied à coulisse, des tubes à essai, des tubes eppendorf et coniques, des lames et lamelles.

Comme consommable les solvants (Ethanol ; eau distillée, méthanol, chloroforme), les kits de dosage (Chronolab, Labkit, Monobind, BioRad. Sigma), les milieux de culture, les sédatifs (kétamine, diazépam, éther) ont été utilisés. La liste de ces réactifs classés en fonction des dosages effectués est présentée à l'**annexe 2**.

II.2 Méthodes

II.2.1 Caractérisation phytochimique et détermination mécanismes d'action antiprolifératives de l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium*

Il était question ici de déterminer la composition phytochimique, le potentiel antioxydant et les voies d'action antiproliférative de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*.

II.2.1.1 Détermination de la teneur en quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Les composés bioactifs d'intérêt étaient les composés phénoliques dont les flavonoïdes et les tanins, les alcaloïdes et les terpenoïdes.

Préparation de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

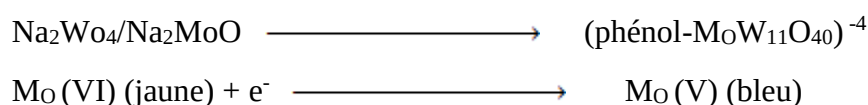
Pour la préparation de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* (EEAa), les fruits ont été préalablement lavés et séchés à température ambiante (et à l'abri du soleil) jusqu'à obtention d'un poids constant. Les fruits secs ont été épluchés et égrainés, puis les graines ont été finement broyées dans un *blender*. Cinq cent grammes (500 g) de poudre ont été macérés pendant 72 h dans 2L d'éthanol 95% (rapport 1/4, p/v). Puis, le macérât a été tamisé et filtré au papier Wattman N°3, le filtrat a été concentré au rota-vapor. Enfin, le solvant résiduel a été évaporé dans une étuve ventilée à 45°C pendant 48 h. L'extrait ainsi obtenu a été conservé dans un bocal en verre opaque à température ambiante. Le rendement d'extraction était calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement} = (\text{poids poudre de graines d}'A \text{ angustifolium} / \text{poids extrait}) * 100$$

II.2.1.1.1 Dosage des composés phénoliques (Waterhouse, 2002).

i) Principe

Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin, du réactif d'acide phosphotungstique phosphomolybdique (Folin-Ciocalteu) par les groupements oxydables des composés phénoliques pour former un complexe bleu-coloré dont l'absorbance est mesurée à 750 nm



ii) Mode opératoire

A 30 µL d'extrait (4 mg/mL) ont été ajoutés 1 mL de solution de Folin (0,2 N) et 1 mL de carbonate de sodium. L'absorbance a été mesurée à 750 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante (25°C). L'acide gallique a été utilisé comme standard à différentes concentrations (0, 100, 200, 400, 800 et 1000 µg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

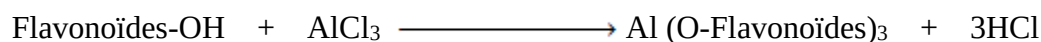
iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration en polyphénols totaux a été calculée et exprimée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme de matière sèche (µg d'EqAG/mg MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 3).

II.2.1.1.2 Dosage des flavonoïdes (Bahorun *et al.*, 1996)

i) Principe

Les flavonoïdes réagissent avec le trichlorure d'aluminium et l'acétate de potassium pour former un complexe de couleur rosâtre qui absorbe à 420 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes contenue dans l'échantillon. L'équation de la réaction est la suivante:



ii) Mode opératoire

A 1mL d'échantillon préparé dans l'éthanol à la concentration de 4 mg/mL ont été ajoutés 1 mL d'AlCl₃ (10%), 1 mL d'acétate de potassium (1 M) et 5,6 mL d'eau distillée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 420 nm. L'étalonnage a été fait avec la quercétine aux concentrations (0, 500, 600, 700, 800 et 1000 µg/mL).

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration des flavonoïdes a été calculée et exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme de matière sèche (µg d'EqQ/mg MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 4)

II.2.1.1.3 Dosage des tanins condensés (Sun *et al.*, 1998)

i) Principe

En milieu acide, le groupement flavonoïde des tanins condensés réagissent avec la vanilline pour former un complexe coloré rouge qui absorbe à 550 nm ;

iii) Mode opératoire

Un volume de 0,3 mL de HCl a été ajouté à 0,6 mL de vanilline dissoute dans de l'éthanol (4% v/v) et à 0,1 mL d'extrait (1 mg/mL). La solution a été homogénéisée et incubée à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc. L'acide gallique a été utilisé comme standard à différentes concentrations (0-100-200-400-800 et 1000 µg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

iv) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration en tanins a été calculée à partir de l'équation issue de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Annexe 5) et exprimée en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme de MS (µg EqAg/mg , MS).

II.2.1.1.4 Dosage des alcaloïdes (Singh *et al.* 2004)

i) Principe

Les alcaloïdes contenus dans l'échantillon réagissent avec le chlorure de fer, le chlorure d'hydrogène et le 1,10- Phénanthroline pour former une solution de couleur rouge qui absorbe à 510 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'alcaloïdes présents dans le milieu.

ii) Mode opératoire

Cent milligrammes (100 mg) de poudre d'extrait ont été soumis à l'extraction dans 10 mL d'éthanol 95%, ensuite filtrés et centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 minutes. A 1 mL de surnageant, ont été ajoutés 1 mL de FeCl_3 (0,025M) + HCl (0,5M) et 1 mL de 1,10 phénanthroline (0,05M) préparé dans de l'éthanol. Le mélange obtenu a été incubé au bain marie à 70°C pendant 30 minutes. L'absorbance de la coloration rouge du complexe formé a été lue à 510 nm contre le blanc. La Quinine a été utilisée comme standard à différentes concentrations (0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 et 0,1 mg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La teneur en alcaloïdes a été déterminée à partir de l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage établie avec la quinine (Annexe 6) et exprimée en microgramme d'équivalents de quinine par milligramme de matière sèche ($\mu\text{g EqQui/mg MS}$).

II.2.1.1.5 Dosage des terpenoïdes (Ghoraï *et al.*, 2012)

i) Principe

Les terpènes présents dans l'échantillon, en présence du chloroforme et de l'acide sulfurique concentré, forment un précipité brun rougeâtre qui est soluble dans le méthanol et absorbe à 538 nm

ii) Mode opératoire

Deux cent microlitres (200 μL) de solution méthanolique d'extrait (0,1g/mL) ont été ajoutés à 1,5 ml de chloroforme. L'ensemble a été mélangé au vortex puis, 100 μL d'acide sulfurique concentré y ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 2 h. Après incubation, le dépôt marron rougeâtre apparu au fond du tube a été délicatement séparé sur surnageant. A ce précipité, a été ajouté 1,5 mL de méthanol et l'ensemble a été mélangé au vortex. La DO a été lue à 538 nm contre le blanc réalisé avec du méthanol. Le monoterpène linalool a été utilisé comme standard.

iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalent de linalool par gramme de matière sèche (mg EqLi/g MS) à l'aide de l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 7).

II.2.1.1.6 Identification de quelques composés bioactifs par LC/MS

a) Principe

Cette méthode analytique combine la séparation des composés par chromatographie liquide et leur identification par spectrométrie de masse. En effet, les composés présents dans l'échantillon sont élués en fonction de leurs propriétés chimiques (polarité, poids moléculaires). Ensuite, ils sont ionisés et accélérés dans un champ électrique et dirigés dans un analyseur de masse où ils sont détectés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) dont

la mesure de l'abondance génère un spectre de masse. L'identification des composés se fait en comparant le spectre de masse obtenu avec les bases de données.

b) Mode opératoire

L'EEAa a été préparé pour la LC-MS en dissolvant 5 mg de l'extrait dans 1 mL de solvant hydrométhanolique (50:50, v/v). L'extrait a été dilué dix fois et 5 µL ont été injectés sur la colonne LC. L'analyse LC/MS était équipée d'une colonne C18 (2,1 mm de diamètre intérieur × 100 mm de longueur)]. Le système consistait en un mélange méthanol (Phase A) et acide formique 0,1%/ eau (Phase B). La colonne a été éluée à un débit fixé à 0,3 ml/min pendant toute la durée de l'analyse, soit une durée totale de 20 minutes, tandis que la température de la colonne a été maintenue constante à 50 °C. La séparation par étape en phase inversée a été réalisée sur la base d'un schéma d'élution en gradient commençant par 97 % de H₂O (0,1 % d'acide formique) jusqu'à 100 % de méthanol (0,1 % d'acide formique). Ensuite, la colonne a été lavée pendant 2 min, suivie d'un conditionnement et d'un rétablissement des conditions initiales. Pour séparer et identifier les différents composés, l'analyse Q-TOF-MS/MS a été réalisée par un spectromètre de masse muni d'une source ESI pouvant fonctionner en mode positif ou négatif. Le système de spectrométrie comprenait un système Waters Acquity UPLC® associé à l'instrument QTOF.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

Le logiciel MesRnova a permis de reconstituer les chromatogrammes obtenus en mode ion positif et négatif, et ressortir les spectres de masses des différents composés identifiés à l'aide des bases de données de la littérature.

II.2.1.2 Mesure du potentiel antioxydant de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

II.2.1.2.1 Mesure du potentiel anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Le potentiel antioxydant de l'extrait a été évalué à travers les tests anti radicalaires (piégeage des radicaux DPPH, ABTS et NO), et les tests de réduction (pouvoir réducteur du fer, capacité réductrice du molybdate).

a) Test de piégeage du radical DPPH· (Lee *et al.*, 2007)

i) Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]). Ce dernier est réduit sous forme d'hydrazine (de couleur violette) en acceptant un atome d'hydrogène.

ii) Mode opératoire

Un volume de 1,950 mL de la solution éthanolique du DPPH[•] (0.025 g/L) fraîchement préparée a été ajouté à 50 µL de chaque concentration (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) d'extrait éthanolique. L'absorbance à 515 nm a été mesurée après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La formule suivante a été utilisée pour le calcul du pourcentage de piégeage du radical libre :

$$\% \text{ de piégeage} = \frac{\text{Absorbance témoin} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance témoin}} \times 100$$

La courbe de régression concentrations-pourcentages de piégeage a permis de calculer la concentration en extrait qui piège 50% de radical (CP₅₀). Le pouvoir antiradicalaire (µmol de DPPH/g d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de DPPH utilisée (0.025 g/L) par cette CP₅₀

b) Test de piégeage du radical ABTS (Gill *et al.*, 1999)

i) Principe

En réagissant avec le permanganate de potassium, l'acide 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) forme le radical ABTS^{•+} de couleur bleue à verte, l'ajout d'un antioxydant réduit ce radical et provoque la décoloration du mélange. Cette décoloration est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm et est proportionnelle à l'activité des antioxydants présents dans l'échantillon.

ii) Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'extrait (1-2-3-4 et 5 mg/mL) préparé dans de l'éthanol a été ajouté à 1000 µL de la solution d'ABTS^{•+}. Après 30 minutes d'incubation à température

ambiante à l'abri de la lumière, L'absorbance a été lue à 734 nm contre le contrôle constitué de la solution d'ABTS⁺. La catéchine a été utilisée comme référence.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage du radical ABTS⁺ selon la formule suivante :

Piégeage du radical ABTS⁺ (%) = $(Ac - Ae/Ac) \times 100$; Ac représentant l'absorbance du contrôle et Ae celle de l'essai.

Le pouvoir antiradicalaire (μmol de ABTS/g d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de D'ABTS (7,4 mM) par cette CP₅₀

c) Capacité de piégeage du radical oxyde nitrique (Jayachandra *et al.*, 2011)

i) Principe

Au cours de l'expérience, le NO produit par le nitroprussiate de sodium au pH physiologique réagit avec l'oxygène pour donner les ions nitrites. Ces derniers sont mis en évidence par le réactif de Greiss. Le produit de la réaction absorbe à 540 nm ; et plus l'extrait sera actif, moins forte sera densité optique.

ii) Mode opératoire

A 1 ml de d'extrait à différentes concentrations (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) ont été ajoutés 2 ml de solution de nitroprussiate de sodium, et l'ensemble a été incubé pendant 2h 30 min à température ambiante. Par la suite, 500 μl de ce mélange ont été transférés dans un autre tube, auxquels a été ajouté 1 ml de solution d'acide sulfonique. Après 5 min d'incubation à température ambiante, y a été ajouté 1 ml de Naphtyl ethylene diamine (NED), puis s'en est suivit une incubation de 30 minutes dans les mêmes conditions. Passée cette étape, l'absorbance a été lue à 540 nm.

iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage selon la formule

% de piégeage= $(\text{Abs1}-\text{Abs2})/ \text{Abs1}) \times 100$

Abs1= absorbance du contrôle ; **Abs2**= absorbance de l'essai

II.2.1.2.2 Mesure du potentiel réducteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

a) Test de réduction du fer (Ou *et al.*, 2002)

i) Principe

La méthode est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu absorbant à 700nm.

ii) Mode opératoire

Un millilitre d'extrait à différentes concentrations (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) a été mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $[K_3Fe(CN)_6]$ à 1%. L'ensemble a été incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique ont été ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10min à 25°C. Un aliquote (2,5ml) de surnageant a été combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été faite à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Une augmentation de l'absorbance correspondait à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Le pourcentage de réduction du fer a été calculé par la réaction suivant :

Pouvoir réducteur de fer (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$. A_0 : est l'absorbance de $FeCl_3$.

A_1 : est l'absorbance de $FeCl_3$ en présence de l'extrait. La courbe de régression dose réponse a permis de calculer la concentration réductrice 50. Le potentiel réducteur ($\mu\text{mol de } Fe^{2+}/g$ d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de $FeCl_3$ utilisée (0,1%) par cette la concentration réductrice 50

b) Mesure de la capacité antioxydante totale (Prieto *et al.*, 1999)

i) Principe

En milieu acide, le molybdène [Mo (VI)] présent sous la forme d'ions molybdate (MoO_4^{2-}) est réduit en Mo (V) (MoO^{2+}) en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) qui absorbe à 695 nm

ii) Mode opératoire

Un volume de 0,3 mL d'extrait méthanolique à différentes concentrations (0, 5, 6,25, 7,5, 8,75 et 10 mg/mL) a été mélangé avec 3 mL de solution du réactif (0,6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes ont été vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc contenant 3 mL de la solution du réactif et 0,3 mL du méthanol et incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La capacité antioxydante totale a été exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) à l'aide de la courbe d'étalonnage présentée à l'Annexe 8

II.2.1.3 Détermination des potentielles voies d'action antiprolifératives de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'extrait a été testé sur la viabilité de 04 lignées cellulaires provenant du gliome (GL261 et CT-2A) et du mélanome murin (B16-F1 et YUMM1.7). Chacune de ces lignées présentait au moins une des mutations généralement rencontrées dans les tumeurs mammaires. Celle qui a présenté une meilleure sensibilité a été utilisée pour explorer les potentielles voies d'action antiproliférative de l'EEAa

II.2.1.3.1 Culture des lignées cellulaires

Les cellules étaient cultivées en milieu liquide dans les boîtes de 25 Cm² contenant des milieux de culture spécifiques (Annexe 2) telle que décrit dans le guide procédures standards et opérationnelles du laboratoire.

Brièvement, les cellules souches stockées dans les cryotubes ont été dégivrées à 37°C, puis 1mL de milieu de culture spécifique y a été ajouté. L'ensemble a été transféré dans un tube conique de 15 mL contenant 9 mL de milieu de culture et centrifugé à 300g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été aspiré, le culot cellulaire suspendu dans 5mL de milieu de culture et transféré dans un flacon de 25 cm³ pour la culture. Après 48H d'incubation à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂ (jusqu'à confluence), le milieu de culture a été aspiré et les cellules lavées 2 fois avec 5mL de tampon phosphate salin (PBS 1X). Puis 4 mL de trypsine-EDTA 0,25% ont été ajoutés et l'ensemble incubé pendant 3 minutes pour permettre aux cellules adhérentes de se détacher du fond du flacon de culture. Ensuite, 4mL de milieu de culture ont été ajoutés pour suspendre les cellules et désactiver la trypsine. Après

homogénéisation, l'ensemble a été transféré dans un tube conique de 15 mL, centrifugé à 300 g pendant 5 minutes et le surnageant éliminé. Le culot a été re-suspendu dans 1mL de milieu de culture.

Préparation des charges cellulaires

La suspension cellulaire a été diluée au 1/10 avec du bleu trypan. 10µL de cette dilution ont été déposés dans chaque chambre de l'hémocytomètre. Les cellules viables (translucides) présentes dans 4 cadrans de chaque chambre ont été comptées au microscope optique. La charge cellulaire a alors été calculée selon la formule :

$$\text{Concentration cellulaire (Cellule/mL)} = \frac{\text{nombre de cellules comptées}}{\text{nombre de carrés comptés}} \times 10^4 \times fd$$

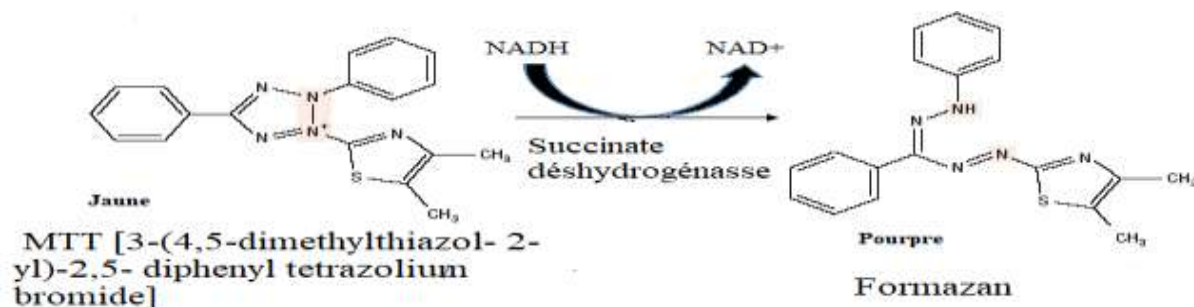
fd représentant le facteur de dilution et 10^4 l'inverse du volume de chaque cadran

II.2.1.3.2 Identification de la lignée cellulaire la plus sensible à l'EEAa : Mesure de la viabilité cellulaire

Les lignées cellulaires susmentionnées ont été utilisées pour tester l'effet de l'EEAa sur la viabilité cellulaire afin d'en sélectionner la plus sensible. La viabilité cellulaire a été mesurée par la méthode au 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT).

a) Principe (Van *et al.*, 2011)

Le principe du test repose sur l'utilisation d'un sel de térazolium qui est réduit en formazan par les déshydrogénases intracellulaires (succinate déshydrogénase mitochondriale) des cellules vivantes. La quantité de formazan (violet) produit est proportionnelle à l'activité métabolique de cellules. Ce composé insoluble est solubilisé par du DMSO ou de l'isopropanol pour permettre son dosage spectrophotométrique à 570 nm.



b) Mode opératoire

Les cellules ont étéensemencées dans les plaques de culture (96 puits) en raison de 5000 cellules/puits (YUMM 1.7, B16-F1), 10000 cellules/puits (CT2A), 15000 cellules/puits

(GL261) pour un volume total de 100 µL/puits. Les plaques ont été pré-incubées dans les conditions optimales de croissance (37°C ; 5% CO₂) pendant 12H (temps de latence des différentes lignées) pour permettre aux cellules d'atteindre un état physiologique stable, de se répartir de façon homogène dans la plaque et d'atteindre leur phase de croissance optimale. Puis, 100 µL d'extrait préparé dans les milieux de culture ont été ajoutés dans chaque puits pour des concentrations finales de 10, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/mL. Les plaques ont été incubées dans les mêmes conditions pendant 24 et 48 H, à la suite desquels le milieu de culture était aspiré. La viabilité cellulaire a été mise en évidence par ajout de 10 µL de MTT (0,5 µg/mL) dans chacun des puits (à l'abri de la lumière) suivit de 4 H d'incubation. La révélation a été faite par ajout de 100 µL de DMSO (100%) dans les puits. Les densités optiques ont enfin été lues à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentage de viabilité selon la formule :

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance témoin}} \times 100$$

Des courbes dose-réponse (pourcentage de viabilité en fonction de la concentration en extrait) ont été réalisées afin de déterminer la CI₅₀ (concentration qui tue 50% de cellules) de l'extrait pour chaque cellule et à chaque temps d'incubation. La lignée cellulaire pour laquelle l'extrait a présenté la plus faible CI₅₀ après 48H a été sélectionnée pour la suite.

II.2.1.3.3 Détermination de l'effet de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* sur la peroxydation lipidique induite par le RSL 3

Ce test a été effectué chez la lignée cellulaire la plus sensible à l'extrait.

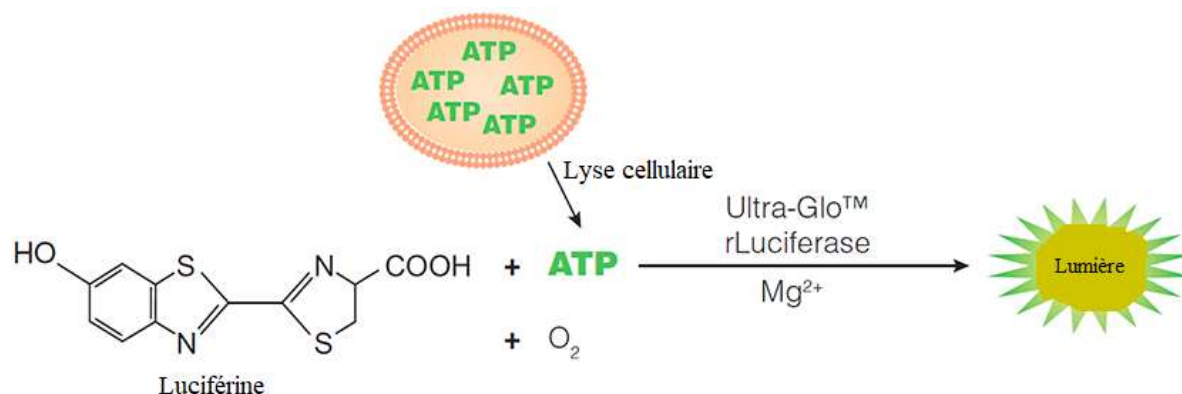
a) Principes

➤ Principe d'action du RSL-3

Le RSL-3 inhibe la glutathion peroxydase 4 indépendamment du glutathion réduit, conduisant à une accumulation des peroxydes lipidiques et donc la mort cellulaire (Yang *et al.*, 2014).

➤ Principe de la mesure de la viabilité cellulaire au CellTiter Glo 2.0

Il est basé sur la génération d'un signal lumineux issu de l'action de la luciférase sur l'oxyluciférine en présence de l'ATP produit par les cellules viables. Le signal généré est proportionnel à la quantité d'ATP présent. Cette quantité d'ATP est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes présentes en culture.



b) Mode opératoire

Les cellules ont étéensemencées 5000/puits durant une nuit. Puis, elles ont été traitées avec 100 µL d'EEAa aux concentrations de 50, 100 et 150 µg/mL ou la ferrostatine (2 µmol/mL). Après 1 h d'incubation (37°C, 5% CO₂), le milieu de culture a été remplacé par 100 µL de RSL-3 (0,004 mM) préparé dans le milieu de culture contenant l'extrait ou la ferrostatine. La plaque a été incubée pendant 4 h et la viabilité cellulaire a été mesurée après ajout de 90 µL de *Cell Titer-Glo* dans chaque puits. La plaque a été couverte avec un film en aluminium pendant 15 min et la luminescence a été mesurée.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

II.2.1.3.4 Détection par western blot des protéines clés des processus de mort cellulaire par apoptose et nécroptose chez les cellules traitées avec l'EEAa

Dans le but d'élucider les voies par lesquelles l'EEAa induit la mort des cellules cancéreuses, la recherche des protéines impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire a été faite par la technique de western blot. Deux voies d'induction de la mort cellulaire ont été explorées à savoir ; l'apoptose à travers la détection de la Caspase-3 clivée (active) et la nécroptose à travers la détection des formes phosphorylée (active) et déphosphorylée (inactive) de la protéine *Mixed Lineage Kinase-Like* (MLKL). La β-actine a été détectée comme gène de référence.

Les cellules (la lignée la plus sensible) ont été ensemencées dans des microplaques de 6 puits pour une densité de 350000 cellules/puits. Après une nuit d'incubation, (37°C, 5% CO₂), les cellules ont été traitées ou non avec l'EEAa à CI₅₀ pendant 24h puis, L'étoposide à la concentration de 2 µM a été utilisé comme composé pro-apoptotique de référence.

a) Extraction des protéines

➤ Mode opératoire

Après 24 h de traitement, les cellules ont été décollées par trypsinisation (ajout de 1mL/puit de trypsine-EDTA 0.25%) et centrifugé à 1200 tr/min pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été solubilisé dans 25 µL de tampon de lyse et les cellules soumises à trois cycles de chocs thermiques (azote liquide/bain marie 37°C) afin d'améliorer la lyse cellulaire. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 13 000 tr/min à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant constituant l'extrait protéique a ensuite été transféré dans un nouveau tube.

Quantification des protéines par la méthode de Bradford

Principe : en milieu acide, la forme anionique du bleu de Coomassie forme un complexe avec les résidus aromatiques des acides aminés constitutif des protéines, absorbant entre 465 et 595 nm.

Mode opératoire : l'échantillon a été dilué au 1/4, puis 25 µL ont été introduits dans une plaque 96 puits auxquels ont été ajoutés 200 µL de réactif de travail. Après 30 min d'incubation à 37°C, la densité optique a été mesurée à 562 nm. La quantité de protéine a été estimée à partie de l'étalonnage faite avec de l'albumine du sérum bovin (500 µg/mL – 2000 µg/mL).

b) Séparation des protéines par électrophorèse

i) Principe de l'électrophorèse en condition dénaturante

C'est une technique de séparation des molécules dans un champ électrique en fonction de leur poids moléculaire et leur charge. Le β-mercaptoéthanol rompant les ponts dissulfures et le sodium dodecyl sulfate (SDS) conférant à toutes les protéines une charge nette négative, elles migreront toutes vers l'anode en fonction de leur poids moléculaire ; les plus grosses migrant plus lentement.

ii) Mode opératoire

➤ **Préparation de l'échantillon**

A 12 µg de protéines ont été ajoutés du tampon Laemmli 5X ; puis les protéines ont été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. L'ensemble a été centrifugé à vitesse maximale pendant 10 sec, pour précipiter l'ensemble des protéines dans le mélange.

➤ **Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide**

Le gel de polyacrylamide à 12,5% a été coulé sur une lame de verre. Puis 150 mL de tampon cathodique 1X ont été versés dans le joint pour laver les puits et éliminer les bulles. Ensuite, le tampon anodique 1X a été introduit dans la partie extérieure du réservoir de tampon jusqu'au trait de jauge. Puis, 7,5 µL de marqueurs de poids moléculaires et 50 µL d'extrait protéique ont été introduits dans les puits correspondants. Enfin, la cuve électrophorétique a été connectée à un circuit d'alimentation électrique de 80V pendant 90 min.

c) Transfert des protéines séparées sur membrane de polyvidylene difluoride

i) Mode opératoire

La membrane a été activée dans le méthanol (100%) pendant 10 min puis, équilibrée dans le tampon de transfert pendant 5 min. Le gel issu de l'électrophorèse a été transféré dans un récipient en plastique avec du tampon de transfert pour l'équilibrer pendant 5 min également. De même, toutes les autres composantes du transfert (cassette, 2 éponges, 2 morceaux de papier filtre) ont été trempés dans le tampon froid. Un sandwich a été construit de bas en haut, en plaçant cassette (posée sur sa face noire), l'éponge, le papier filtre, le gel centré, la membrane de PVDF, le papier filtre, l'éponge et la face transparente de la cassette. La cassette a été fermée et serrée, puis placée dans la cellule de transfert. Puis la cellule de transfert a été placée dans le réservoir de tampon placé sur de la glace. Le réservoir de tampon a été rempli au 1/3, transféré dans la chambre froide et complété au plein avec du tampon. Enfin, un courant électrique constant de 0,2A et 15V a été appliqué au réservoir pendant 15h pour favoriser le transfert entre le gel et la membrane de PVDF.

- Blocage de la membrane PVDF

Passé le temps de transfert, la cassette a été retirée de la cellule de transfert, puis, les éléments du sandwich ont été soigneusement décollés du haut vers le bas jusqu'à ce que la membrane soit atteinte. Elle a immédiatement été rincée dans du TBST 1X (membrane côté protéine vers le haut) et 10 mL de tampon de blocage LI-COR Odyssey (TBS) y a été ajouté. L'ensemble a été incubé pendant 1h à 25°C (TA) pour bloquer la membrane.

d) Révélation immunologique des spots

La révélation a été faite en présence des anticorps primaires spécifiques à la β -actine, à la caspase-3 clivée et aux protéines pMLKL et MLKL. Le complexe immunitaire formé a été mis en évidence grâce à un anticorps secondaire couplé à un élément radioactif.

i) Mode opératoire

- Incubation avec l'anticorps primaire

La membrane a été sortie du tampon de blocage et placée sur du papier film, puis elle a été réhydratée avec ce même tampon. Après marquage de son orientation, la membrane a été placée à l'intérieur du tube conique avec l'anticorps primaire (côté protéine tourné vers l'intérieur du cône), et incubé pendant 12H dans une chambre froide et sous rotation (vitesse = 10-15). Enfin, la membrane a été retirée du tube conique et rincée 3 fois dans du TBST 1X pendant 5 min.

- Incubation avec l'anticorps secondaire et visualisation

La membrane a ensuite été incubée pendant 1 h, à TA, à l'abri de la lumière et sous agitation dans 10 ml de tampon de blocage Odyssey (LiCOR) contenant l'anticorps secondaire. La membrane a ensuite été lavée 3 fois dans du TBST (1X), pendant 5 minutes chacune sur l'agitateur et toujours à l'abri de la lumière.

Expression des résultats

L'image a été réalisée avec le logiciel ImageStudio et le système Odyssey.

II.2.1.3.5 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* sur l'expression de quelques gènes impliqués dans la cancérogenèse

La lignée cellulaire la plus sensible a également été utilisée comme système d'essai. Les gènes évalués étaient ceux impliqués dans l'inflammation (TNF- α , IL-10, IL-6, et IL-1 β , TGF- β), l'angiogenèse et l'invasion (VGEF, IGF-1, PDGFR), la progression du cycle cellulaire (E2F2 et E2F1) et la résistance à l'apoptose (BCL-2, BCL-6). Les cellules ont étéensemencées dans les microplaques de 6 puits et traitées comme dans la section précédente et l'ARN total a été extrait.

a) Extraction de l'ARN total

i) Principe (RNeasy mini kit)

La technologie combine les propriétés de liaison sélective d'une membrane à base de silice et la vitesse de la technologie de microspin. Un système de tampon spécialisé à haute teneur en sel permet de lier à la membrane de silice RNeasy jusqu'à 100 µg d'ARN de plus de 200 bases. Les échantillons biologiques sont d'abord lysés et homogénéisés en présence d'un tampon guanidine-thym hautement dénaturant contenant de la guanidine-thiocyanate, qui inactive immédiatement les RNases afin de garantir la purification de l'ARN intact. De l'éthanol est ajouté pour créer les conditions de liaison appropriées. L'échantillon est ensuite appliqué à une colonne d'essorage RNeasy Mini, où l'ARN total se lie à la membrane et les contaminants sont efficacement éliminés. L'ARN de haute qualité est ensuite élué dans 30-100 µl d'eau.

ii) Mode opératoire

➤ Lyse cellulaire et homogénéisation

Après traitement, le surnageant a été éliminé, les cellules trypsinées (ajout de 1 mL/puits de trypsine-EDTA 0.25% pendant 3 minutes) puis, 600 µL de tampon de lyse RLT a été ajouté à chaque puits et l'ensemble a été mélangé par pipetage. Ensuite, le lysat a été transféré dans la colonne d'essorage QIAshredder placé dans un microtube (2mL) de collecte. L'ensemble a été homogénéisé pendant 2 min à 14000 trs/min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée.

➤ Isolement de l'ARN

Un volume équivalent d'éthanol 70% a été ajouté à l'homogénat et l'ensemble a été mélangé par pipetage. Puis, 700 µL ont été transférés dans la colonne d'essorage RNeasy placé dans un microtube de collecte. L'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 15 secondes et le flux a été rejeté. A la colonne RNeasy, 350 µL de tampon RW1 ont été ajoutés, et l'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 15 secondes. Le flux a été éliminé et 80 µL du super mélange DNase ont été ajoutés à la colonne, puis l'ensemble a été incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Ensuite, le même volume de RW1 a été ajouté, la colonne a été centrifugée à 10000 tr/min pendant 15 secondes et le flux éliminé. Puis, 500 µL de tampon RPE ont été ajoutés dans la colonne, l'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 2 min et le flux éliminé. Cette étape a été répétée une fois, et la colonne RNeasy a été transférée dans un autre tube de collecte et l'ensemble a été centrifugé à vitesse maximale pendant 1 min pour éliminer le maximum de tampon RPE. La colonne RNeasy a une fois de plus été transférée dans un autre microtube de collecte (1,5 mL), et 50 µL d'eau stérile dépourvue de RNase ont été ajoutés à la membrane de la colonne d'essorage. Après 5 min

d'incubation à température ambiante, l'ensemble a été centrifugé et le flux contenu dans le tube de collecte contenant l'ARN a été conservé.

La pureté de l'extrait d'ARN a été mesurée en faisant le rapport des densités optiques obtenues au NANODROP entre 260 nm et 280 nm (260/280).

b) Transcription inverse et synthèse de l'ADN complémentaire double brin

i) Principe

Il s'agit d'une réaction enzymatique qui convertit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), en utilisant une ADN polymérase dépendante de l'ARN (aussi appelée transcriptase inverse). L'ARNm est chauffé pour éliminer les structures secondaires. Une **amorce** (oligo-dT) La **transcriptase inverse** ajoute des nucléotides complémentaires à la matrice d'ARN, générant un brin d'ADNc. **Ensuite**, La transcriptase inverse est désactivée par chauffage (70–85°C) pour stopper la réaction. Une ADN polymérase est ajoutée en solution pour synthétiser un deuxième brin d'ADNc.

ii) Mode opératoire

L'ARN obtenu a été retro-transcrit en ADNc en prélude à la PCR. Pour cela, Un microgramme (1 µg) d'ARN total a été ajouté à 4 µL de mélange réactionnel 5X et 1µL de transcriptase inverse. L'ensemble a été complété à 20 µL avec de l'eau dépourvue de nucléase. Puis, le mélange a été introduit dans un thermocycleur programmé 5 min à 25°C (fixation des amorces), 20 min à 46°C (transcription inverse) et 1 min à 95°C (désactivation de la transcriptase inverse) puis Récupération à 4°C.

c) Polymerase Chaine Reaction à temps réel

i) Principe

Il repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant au cycle $n < 40$ (PCR semi-quantitative). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman3 et Beacon) ; ces sondes ne fluoresçant qu'une fois fixées à l'ADN. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un numéro de cycle PCR appelé Ct (Cycle Threshold) ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

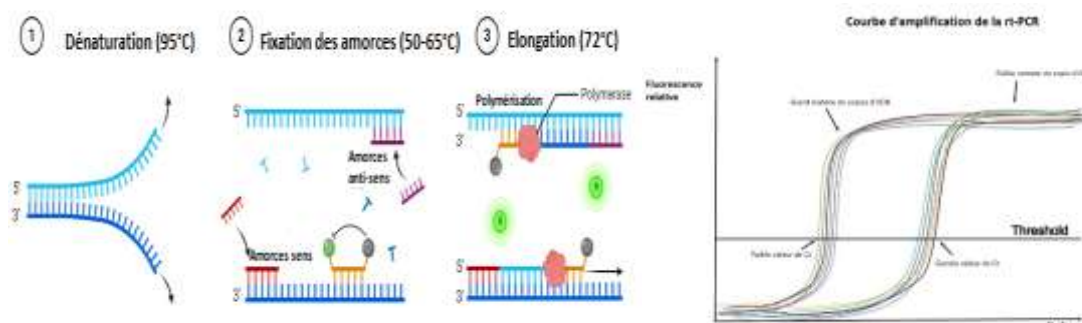


Figure 26: Principe rt-PCR

ii) Mode opératoire

Pour chaque gène, 10 μ L du super mélange KAPA SYBR FAST qPCR (2X), 0,4 μ L d'amorces (Tableau V) sens (200 mM dans le milieu réactionnel), 0,4 μ L d'amorce anti sens (200 mM) et l'ADNc extrait à partir d'1 ng d'ARN ont été introduits dans les microtubes pour PCR. Les tubes ont été introduits dans le thermo-cycleur et la température a été maintenue à 95°C pendant 3 min pour l'activation de l'enzyme. Ensuite 40 cycles de 95°C pendant 3 sec (dénaturation) et 60°C pendant 20 sec (fixation des amorces, élongation et acquisition des données) ont été effectués.

Tableau V: Séquences d'amorces spécifiques aux gènes étudiés

Gènes	Sens (5' - 3')	Anti sens (5' - 3')
<i>β-actin</i>	ACGACGTGGCAGCTCTCGTTGTGG	GGTGCTTCGGTCAGCAGCACGGA
<i>GAPDH</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	GAAGGTGGAAGAGTGGGTG
<i>HRPT</i>	TGGATACAGGCCAGACTTTGTT	CAGATTCAACTTGCCTCATC
<i>18s</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTACTAGCG
<i>VEGF</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	TTTACACGTCTGCGGATCTT
<i>IGF-1</i>	GTGTGGACCGAGGGGCTTTTACT	GCTTCAGTGGGGCACAGTACATC
<i>PDGF-R</i>	TAGCGCGGAACCTCAGAGAGA	TGGGAGGTCCCCATAGCTCC
<i>BCL-2</i>	ATGCCTTTGTGGAATATATGCG	GGTATGCACCCAGAGTGATGC
<i>BCL-6</i>	CCTGAGGGAAGGCAATATCA	GTTTAAGTGCAGGGGCCATT
<i>E2F1</i>	GAGGCTGGATCTGGAGACTG	GAAGCGTTTGGTGGTCAGAT
<i>E2F2</i>	AGTTGCTCCCTGAGCTTCAA	GCTCCTTGAAGTTGCCTACG
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IL-10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>IL-6</i>	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTT
<i>IL-1β</i>	CTTGGGCCTCAAAGGAAAGAA	AAGACAAACCGTTTTTCCATCTTC
<i>TGF-β</i>	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Les seuils de déclenchement (Ct) des gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport à ceux des gènes de référence. Et l'expression relative du gène d'intérêt par rapport au témoin non traité a été calculée selon la formule ci-après :

$$\text{Expression relative} = 2^{20 - \Delta\text{Ct échantillon}} - 2^{20 - \Delta\text{Ct témoin}}$$

Avec : $\Delta\text{Ct} = \text{Ct gène cible} - \text{moyenne Ct gènes domestiques}$

L'échantillon représentant les cellules traitées et le témoin les cellules non traitées.

Les gènes domestiques étaient la β -actine, le Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDHase), l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT) et le ribosome S18.

II.2.2 Exploration des activités antitumorales et immunomodulatrice de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* chez des modèles expérimentaux de cancer du sein

Le système d'étude était constitué de rates albinos de souche *Wistar* âgées de 6 semaines, avec un poids moyen de $78 \text{ g} \pm 10$. Ce protocole expérimental a été approuvé par le comité éthique institutionnel de l'université de Yaoundé I, ceci marqué par la délivrance de la clairance éthique N° **BTC-JIRB2023-2024** (Annexe 9)

II.2.2.2.1 Protocole expérimental

Le protocole décrit par **Mvondo et al (2021)** avec des modifications a été exécuté.

a) Induction du cancer du sein au DMBA

Après la période d'acclimatation, 25 rats ont été soumis à une induction du cancer du sein au 7,12- Dimethylbenz(a)anthracène (DMBA) à la dose unique de 50mg/Kg de poids corporel (Pc).

Les animaux ont préalablement été mis sous anesthésie par injection intrapéritonéale de 5 mg/Kg, PC de diazépam (10 mg/mL) et 75 mg /Kg, PC de kétamine (50 mg/mL) au niveau de la patte arrière droite. Les volumes d'administrations étaient de 0.5 mL/Kg, PC et 1 mL/Kg, PC respectivement. Une fois endormis, la solution de DMBA précédemment préparée leur a été injectée par voie sous cutanée, au niveau du mamelon, situé sur la patte arrière gauche. Le volume d'administration du DMBA étant de 1mL/Kg, PC.

Le DMBA étant un composé hautement cancérigène, l'induction s'est faite par un personnel expérimenté, arborant une blouse à usage unique, un masque facial et des gants de protection.

Diagnostic

Les animaux ont été observés et les mamelles palpées (avec des mains gantées) à partir du deuxième mois. La réponse positive à l'induction était marquée par la modification de la peau au niveau de la zone d'induction, soit la peau sous forme de peau d'orange, ou l'apparition des tumeurs solides.

a) Traitement des animaux

Au bout du troisième mois après l'induction, les animaux ayant positivement répondu à l'induction (n = 20) ont été répartis en 6 groupes de 5 rats chacun (2 animaux avec tumeur par groupe) et traités comme suit :

- Un groupe témoin malade (DMBA) non traité
- Deux (2) groupes essais qui recevaient de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 mg/Kg, PC (EEAa 150) et 300 mg/Kg, PC
- Un groupe référence (TAM) qui recevait le tamoxifène à la dose de 3,3 mg/Kg, Pc
- A ces groupes a été joint le groupe de 5 rats n'ayant pas reçu du DMBA, représentant ici le témoin normal (TN)

NB: (1) les animaux n'ayant pas répondu positivement à l'induction avant le début du traitement ont été euthanasiés et ensevelis.

(2) le choix des doses s'est fait selon l'étude de toxicité menée par **Ebhohimen et Okolie (2021)** qui a relevé que l'EEAa était non toxique à des doses inférieures à 1000 mg/Kg, Pc. De plus cette étude a relevé la capacité de cet extrait à protéger d'une toxicité hépatique et rénale induite chez le rat aux doses de 350 et 750 mg/Kg, Pc. En se basant sur les recommandations de la FDA proposant d'utiliser des doses inférieures ou à égales à 400 mg/Kg, PC pour des extraits bruts, les doses ont donc été sélectionnées selon une suite géométrique d'ordre 2 d'une dose proche de la plus faible utilisée par **Ebhohimen et Okolie (2021)**.

Le traitement se faisait tous les matins par gavage œsophagien à l'aide d'une sonde. Le volume d'administration était de 5 ml/Kg,Pc pour les extraits et le tamoxifène, préparés dans de l'eau distillée. Le traitement a duré 28 jours au cours desquels les animaux étaient pesés de façon hebdomadaire.

b) Sacrifice des animaux

Au 29^{ième} jour, les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie à la vapeur d'éther après un jeûne non hydrique de 12 heures. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque et introduit en partie dans les tubes secs et les tubes avec anticoagulant (EDTA) en prélude à la préparation du sérum, plasma et la numération sanguine. Les animaux ont été disséqués. Le foie, les poumons, le thymus, la rate, et la glande mammaire ont été isolés, rincés dans une solution de NaCl 0,9%, essorés et pesés. Les carcasses après dissection ont été ensevelies.

Les diamètres tumoraux ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse puis, une portion de la glande mammaire et du foie a été prélevée pour la préparation des homogénats. Les portions restantes ainsi que les autres organes ont été fixés dans du formol 10% pour la réalisation ultérieure des coupes histologiques.

c) Préparation des différents échantillons biologiques

i) Préparation du sérum et du plasma

Les tubes secs et EDTA contenant du sang ont été laissés au repos à température ambiante (25 °C) puis centrifugés pendant 10 min à 3000g à 25 °C. Le surnageant constituant le sérum (tube sec) ou le plasma (tube EDTA) ont été collectés dans les tubes Eppendorf et conservés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

ii) Préparation des homogénats de glande mammaire et foie

0,5 g d'organe a été broyé dans un mortier en porcelaine en présence d'1 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7). Le broyat a été complété à 5mL avec le tampon phosphate (0,1 M, pH 7), puis centrifugé à 1500 g pendant 5min. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -20°C.

II.2.2.2 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium* sur la progression des tumeurs

L'effet des traitements sur la progression des tumeurs mammaires a été évalué à travers la détermination des paramètres tumoraux, de dosage de quelques paramètres

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

biochimiques associés et l'analyse histopathologique de la glande mammaire et quelques organes de métastases.

a) Détermination des paramètres tumoraux

Les mensurations tumorales (diamètres et épaisseur) prises lors du sacrifice, le nombre d'animaux par groupe ayant les tumeurs en fin de traitement ainsi que la masse ont permis de calculer l'incidence tumorale, le volume tumoral, la masse tumorale moyenne et les inhibitions relatives à ces paramètres selon les formules ci-après (**Faustino-Rocha et al., 2013**) :

$$\text{Incidence tumorale (\%)} = \frac{\text{Nombre d'animaux avec tumeur dans le groupe}}{\text{Nombre total d'animaux dans le groupe}} \times 100$$

$$\text{Masse relative de la tumeur} = \frac{\text{Masse de la tumeur}}{\text{Masse de l'animal}} \times 100$$

$$\text{Masse tumorale moyenne} = \frac{\text{Somme des masses des tumeurs dans le groupe}}{\text{Nombre d'animaux dans le groupe}}$$

$$\text{Volume tumoral (Cm}^3\text{)} = (\text{Grand diamètre} \times \text{petit diamètre} \times \text{Epaisseur})$$

Les pourcentages d'inhibition par rapport au témoin malade ont été calculés selon la formule générale suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Valeur du paramètre dans le groupe traité}}{\text{Valeur dans le groupe témoin malade}} \times 100$$

a) Mesure des taux sériques promoteurs de la croissance tumorale estradiol et EGF

En plus de la physiologie du sein, la caractéristique moléculaire HER et RE des cancers mammaires laissent comprendre que l'estradiol et le facteur de croissance épidermique (*EGF*) sont des agents de promotion de la tumorigenèse mammaire. Ainsi, les taux sériques de ces 2 facteurs de croissance ont été mesurés. Par ailleurs, l'approvisionnement en glucose et son utilisation sont impératifs pour la survie et la croissance des cellules cancéreuses ; d'où sa prise en considération comme facteur de survie.

i) Dosage des taux sériques d'EGF

Le dosage s'est fait à l'aide d'un kit commercial exploitant le principe du Luminex multiplex.

➤ Principe du test (BioRad)

La technologie Luminex multiplex permet de doser simultanément une large gamme de molécules dans un même puits à l'aide des billes colorées de l'intérieur. Ces billes

possèdent des régions spécifiques pour chaque biomarqueur. La réaction est basée sur le principe immuno-enzymatique en sandwich sur des microsphères ou billes (phase solide). En effet, les anticorps de capture dirigé contre l'élément à doser sont fixés de manière covalente aux billes. Les billes cotées réagissent avec l'élément à doser (biomarqueur) présent dans l'échantillon. un anticorps de détection biotinylé est ajouté pour créer un complexe sandwich. Le complexe final de détection est formé après addition de la streptavidine couplé à la phycoérythrine (PE) ; cette dernière (PE) servant d'indicateur fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'élément à doser présent dans l'échantillon.

Principe de mesure de la fluorescence : l'intensité du signal renvoyé par la PE est mesurée à l'aide d'un lecteur Luminex ou un système Bio-Plex. En principe, un laser rouge (635 nm) illumine les teintes fluorescentes à l'intérieur des billes afin de les classer et identifier les biomarqueurs. Simultanément, un laser vert (532nm) excite la PE pour générer un signal rapporteur, qui est détecté par un tube photomultiplicateur. Un processeur digital à haute vitesse gère l'entrée des données, et le logiciel Bio-Plex Manager les présente comme intensités fluorescentes médianes, associées aux concentrations correspondantes en pg/L (Figure 26).

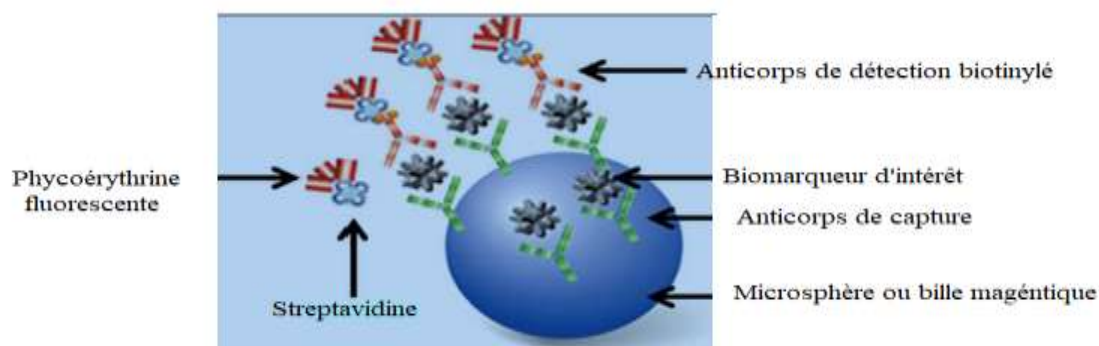


Figure 27: Schéma de principe d'ELISA multiplex

➤ Mode opératoire

Préparation : Les échantillons et les réactifs ont été tout d'abord ramenés à température ambiante. Puis les échantillons ont été dilués au 1 /4 avec le diluant pour échantillon. Le standard a été reconstitué par ajout de 500 µL du diluant de standard, puis une cascade de dilution a été effectuée à partir de 50 µL de standard pour des volumes finaux de 150 µL. les billes ont été diluées 10 fois avec le tampon de test.

Réalisation : 50 µL de billes cotées diluées ont été ajoutés à chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Les puits ont été lavés 2 fois avec 100 µL de tampon de lavage. Puis, 50 µL d'échantillon, standard ou blanc (tampon d'essai) ont été ajoutés dans les puits. La plaque a été couverte avec un papier scellant, et incubée 1 h à température ambiante sous agitation à 850 tr/min. Les puits ont ensuite été lavés 3 fois avec 100 µL de tampon de lavage. Puis, 25 µL d'anticorps de détection fraîchement dilué (au 1/10 avec le diluant requis) y ont été ajoutés. La plaque a une fois de plus été incubée dans les mêmes conditions que précédemment. Ensuite les puits ont été lavés 3 fois et 10 µL de streptavidine-PE (100 ×) fraîchement diluée au 1/100 dans le tampon d'essai ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été incubée comme précédemment. Les puits ont une fois de plus été lavés, et 125 µL de tampon de test ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été agitée pendant 30 secondes et la fluorescence a été mesurée au Bio-Plex 200.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats étaient exprimés en pg/L

ii) Dosage de l'estradiol (ELISA Compétitif retardé)

➤ **Principe**

La méthode reposait sur le principe d'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) compétitif retardé. En effet, en mettant l'anticorps biotinylé en présence du sérum antigénique, il se produit un complexe immun. L'ajout retardé d'un conjugué enzymatique déclenche une réaction de compétition entre ce dernier et l'antigène sérique pour les sites non liés de l'anticorps biotine. Après élimination des anticorps biotine non liés par lavages, l'ajout du substrat de l'enzyme déclenche une activité enzymatique dans la fraction liée qui est inversement proportionnelle à la concentration en estradiol dans le sérum.

➤ **Mode opératoire**

Avant de procéder à l'essai, tous les réactifs, le sérum, les calibreurs de référence et les contrôles ont été ramenés à température ambiante (20-27°C). Les microplaques ont été formatées pour chaque sérum de référence. Cinquante microlitre (50 µL) de réactif œstradiol biotine ont été introduits dans tous les puits. Puis, 25 µL du sérum de référence ou du spécimen ont été ajoutés dans les puits assignés. Ensuite, la microplaque a été homogénéisée pendant 20 à 30 min et incubée à température ambiante pendant 30 minutes. 50 µL de réactif enzymatique d'œstradiol y ont été ajoutés, la plaque a été agitée une seconde fois pendant 20 à 30 min et laissée incubée pendant 90 min. Le contenu de la microplaque a été décanté par aspiration et

350 µL de tampon de lavage ont été ajouté pour nettoyage, suivi de l'ajout de 100 µL de réactif de substrat. Après 20 min d'incubation du mélange à température ambiante, 50 µL de solution d'arrêt ont été ajoutés, l'ensemble a été homogénéisé pendant 20 min et les densités optiques ont été lues à 450 nm.

➤ Expression des résultats

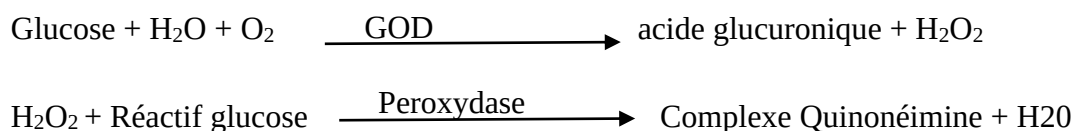
La détermination de la concentration d'œstradiol pour une inconnue s'est faite en plaçant l'absorbance de chaque sérum de référence en fonction de la concentration d'œstradiol correspondante (pg/L) sur un graphique linéaire (Annexe 10). Les points ont été reliés avec une courbe de meilleure qualité. Les concentrations (en pg/L) à partir de l'absorbance des moyennes.

b) Mesure de l'activité cellulaire dans la glande mammaire : dosage du glucose mammaire

Le fonctionnement des cellules mammaires a été évalué à travers le dosage du glucose dans l'homogénat de la glande mammaire, l'aide du kit Chronolab, utilisant la méthode de glucose oxydase. (Trinder, 1959)

i) Principe

Ce dosage est basé sur une double réaction enzymatique. La glucose-oxydase (GOD) oxyde le glucose en acide glucuronique et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier permet l'oxydation du 4-amino-antipyrine et du phénol en un complexe Quinonéimine coloré (rouge brique) qui absorbe à une longueur d'onde de 510nm grâce à une peroxydase. L'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration en glucose dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

Dix microlitres (10 µl) d'échantillon ou de standard ont été ajoutés à 1000 µL de réactif puis incubé pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance de l'échantillon contre le blanc réactif a été lue à la longueur d'onde de 510 nm.

iii) Expression des résultats

$$[Glucose] \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{D.O \text{ echantillon}}{D.O \text{ etalon}} \times Valeur \text{ etalon}$$

c) Analyse histologique de la glande mammaire et de quelques organes de métastase

i) Principe de la coloration à l'hématoxyline et l'éosine

Il est basé sur la coloration bichromatique des fragments tissulaires ; la nature cationique ou basique de l'hématoxyline lui confère une affinité avec les composantes cellulaires chargées négativement comme les acides nucléiques, conduisant à une coloration bleu-violet du noyau. L'éosine par contre, de par sa nature anionique ou acide, se lie aux éléments cellulaires cationiques présents dans le cytoplasme, conduisant à une coloration du cytoplasme allant du rose au rouge vif.

ii) Mode opératoire

Des coupes transversales de portions de glande mammaire, foie poumons, thymus et rate préalablement fixés dans le formol 10% ont été rangées dans des cassettes. Elles ont par la suite subit une déshydratation dans des séries d'alcool de concentration croissante (1 h dans de l'éthanol à 80%, 8h dans 4 solutions d'éthanol 95% et 6 heure dans 3 solution d'éthanol 100%). Elles ont ensuite été éclaircies dans 2 bains de Xylène (2 h/bain) et imprégnés dans 2 solutions de paraffine chaude (à raison de 2 h par passage). Les tissus ont par la suite été inclus de façon orientée dans un moule en inox contenant de la paraffine à 60°C, puis l'ensemble a été refroidi sur une plaque réfrigérante à 4°C. Les rubans de 5 µm d'épaisseur obtenus à l'aide d'un microtome ont été étalés dans un bain-marie (d'environ 40°C) contenant de l'eau gélatinée. Ces coupes ont par la suite été déposées sur des lames porte-objet et, séchées à 45°C à l'étuve pendant 24 heures. Ensuite, elles ont été colorées à l'hématoxyline et l'éosine. Une fois asséchées à TA, Les lames ont été recouvertes de lamelle et la microarchitecture a été observée au microscope optique (Axioskop 40) à l'objectif 400 pour la glande mammaire, 100 poumons et 200 pour le foie et les reins (Smith et Bruton, 1977).

iii) Expression des résultats

Les images des mircoarchitectures ont été réalisées sur ordinateur connecté au microscope. L'image a été transférée à l'aide des logiciels MRGrab1.0 et Axio Vision 3.1 (Zeiss, Hallbergmoos, Germany). L'Atlas et la classification histologique des tumeurs mammaires chez le rat (**Rousso et Rousso, 2000**) a été utilisé pour classer histologiquement les glandes mammaires.

II.2.2.2.3 Evaluation l'activité immuno-modulatrice de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* chez un modèle animal de cancer du sein

Elle a été effectuée à travers l'analyse hématologique, le dosage de quelques médiateurs cellulaires sériques et l'analyse l'histologie des organes lymphoïdes

a) Analyse hématologique

L'hémogramme s'est déterminé à l'aide d'un automate d'hématologie. Elle consistait en le dénombrement des globules rouges, plaquettes, globules blancs et ses sous classes. Le principe de fonctionnement repose sur la variation de la résistance électrique. En effet, le passage des cellules contenues dans l'échantillon de sang entre les électrodes de l'appareil entraîne une baisse de la conductivité électrique. Cette baisse de conductivité est proportionnelle à la taille de la cellule et est enregistrée sous forme d'impulsions électriques.

Le dosage de l'hémoglobine s'est fait par spectrophotométrie. En effet, l'agent de lyse des hématies se lie à l'hémoglobine pour former un complexe coloré qui absorbe à 525nm.

b) Dosage des cytokines TNF- α et INF- γ

Le dosage des médiateurs cellulaires s'est fait avec la technologie Luminex multiplex comme précédemment décrit (II.2.2.2.2 a). Il s'agissait précisément des taux sériques de *tumour necrosis factor* apha (TNF- α) et interféron gamma (INF γ) considérés respectivement comme cytokines pro et antiinflammatoires.

c) Dosage du radical oxyde nitrique (Manish *et al.*, 2006)

i) Principe

Il est basé sur la réaction de diazotation décrite par Griess. Il décrit la réaction chimique utilisant la sulfanilamide et le dichlorure de N-1-Naphtyléthylène diamine (NED) en milieu acide phosphorique avec obtention d'un produit coloré détectant le nitrite formé. La coloration pourpre est indicatrice de la présence de nitrites formés et la lecture est faite à 540 nm.

ii) Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'échantillon (glande mammaire ou sérum) ont été ajoutés à 100 µL d'une solution de sulfanilamide. Le mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après incubation, 100 µL de solution de NED y ont été ajoutés puis incubés de nouveau 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La lecture de la densité optique s'est faite à 540 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration en radical oxyde nitrique est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Concentration NO (}\mu\text{M)} = \frac{DO}{\epsilon \cdot l} ; \quad \text{Avec } \epsilon = 39500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ et } L=1\text{cm}$$

II.2.3 Exploration de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* contre les effets toxiques associés à l'administration du tamoxifène à des rats *Wistar* souffrant de cancer du sein

Le protocole expérimental était semblable à celui décrit dans la section précédente. A la seule différence que, les animaux traités avec l'EEAa aux doses susmentionnées (150 et 300 mg/Kg, Pc) recevaient 3,3 mg/Kg, Pc de TAM une heure après. Durant les 28 jours de traitement, le poids des animaux était pris.

Après sacrifice, le sang a été collecté dans les tubes EDTA et secs pour la préparation du plasma, du sérum et des hémolysât. Le foie et les reins ont été isolés pour la préparation des homogénats et la réalisation des coupes histologiques. L'utérus a également été isolé pour les coupes histologiques.

ii) Préparation de l'hémolysât

Après élimination du plasma et des globules blancs, dans le tube à anticoagulant EDTA, 100 µL du culot globulaire ont été introduits dans des tubes coniques puis lavé avec 2 ml d'une solution de NaCl (0,9%). L'ensemble a été centrifugé à 1500 g pendant 10 min à température ambiante et le surnageant jeté. Ce processus est répété 2 fois. L'hémolyse des érythrocytes a été réalisée après ajout de 2ml d'eau distillée ; le mélange a été centrifugé à 3400g pendant 10 min à 25 °C et le surnageant représentant l'hémolysât a été récupéré et conservé à -20 °C.

II.2.3.2 Evaluation de l'effet de l'extrait sur le développement d'une hyperplasie utérine induite par le tamoxifène

Le dosage de l'estradiol sérique, et l'analyse histologique de l'utérus ont été effectués comme décrits précédemment. La mesure de l'épaisseur de l'endomètre utérin a été faite à l'aide du logiciel image J

II.2.3.3 Evaluation de l'effet du traitement sur le statut métabolique

Le tamoxifène est connu pour entraîner une perte d'appétit conduisant à une perte de poids. Par ailleurs, sa prise altère le métabolisme lipidique, avec pour conséquence lointaine la stéatose hépatique non alcoolique. Par conséquent, la variation du poids et le profil lipidique ont été évalués pour apprécier l'effet du traitement sur le métabolisme.

II.2.3.3.1 Calcule de la variation de poids

Elle été calculée au début du traitement, après 2 semaines et à la fin du traitement selon la formule ci-après :

$$\text{Variation des poids (\%)} = \frac{P_x - P_{\text{initial}}}{P_{\text{initial}}} \times 100$$

P_x étant le poids à l'intervalle 2 semaines

II.2.3.3.2 Dosage des paramètres du profil lipidique

Il s'agissait particulièrement des taux de triglycérides et de cholestérol plasmatique

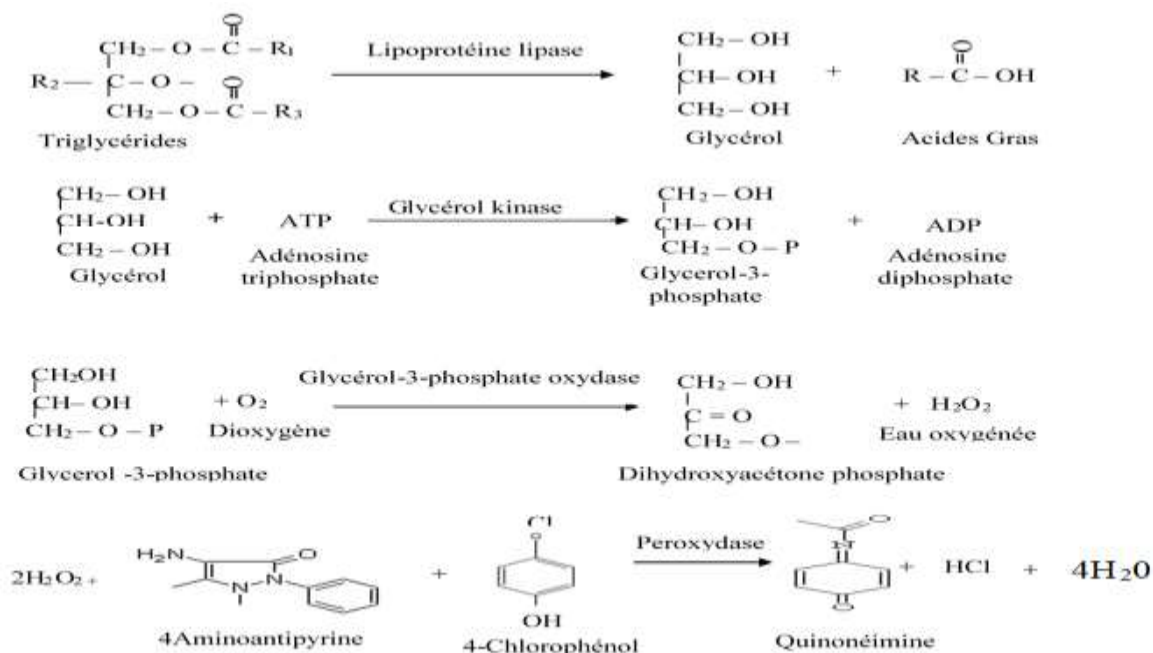
a) Dosage des triglycérides plasmatiques

Le dosage des triglycérides a été effectué à l'aide du kit Chronolab.

i) Principe (Fossati et principe, 1982)

Le glycérol, produit par hydrolyse enzymatique des triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase (EC 3.1.1.34), est phosphorylé par l'ATP pour produire le glycérol-3-phosphate et l'ADP à travers une réaction catalysée par le glycérol kinase (EC 2.7.1.30). La glycérol-3-phosphate oxydase (EC 1.1.3.21) catalyse ensuite l'oxydation du glycérol -3-phosphate pour produire le dihydroxyacétone-3-phosphate et H_2O_2 . Ce dernier se combine au 4-aminoantipyrine et au 4-chlorophénol pour former la quinonéimine sous l'influence

catalytique de la peroxydase (EC 1.11.1.9). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides présents dans l'échantillon.



iii) Mode opératoire

Dans des tubes étiquetés blancs, étalon et essai, ont été introduits respectivement 10 µL d'eau distillée, d'étalon ou d'échantillon plasmatique à analyser et 1000 µL de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 min à 25°C. L'absorbance de l'échantillon a été lue contre le blanc réactif à 505 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

iv) Expression des résultats

La concentration des triglycérides dans le plasma est donnée par la relation :

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance essai}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{valeur de l'étalon}$$

Avec : -Concentration étalon = 200 mg/dL ;

-Conversion en unité SI (mmol/L) = [triglycérides] en mg/dL × 0,0113.

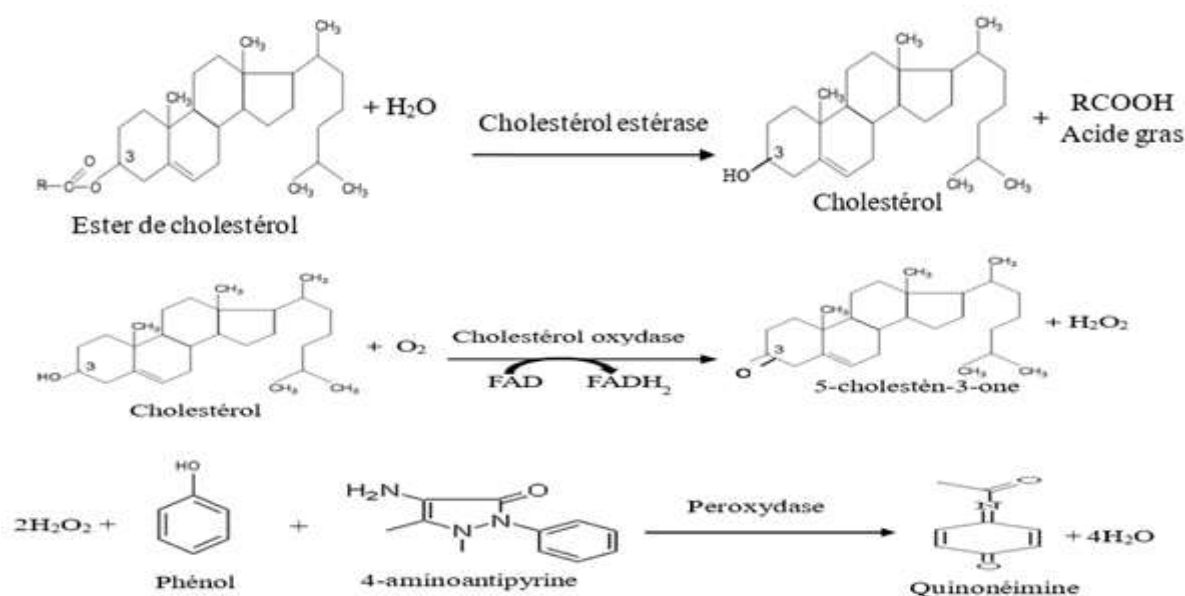
b) Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total a été fait à l'aide du kit Chronolab

i) Principe (Richmond, 1973)

La cholestérol estérase (EC 3.1.1.3) catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre y compris celui présent à l'origine est alors oxydé par la cholestérol oxydase (EC 1.1.1.6) en 4-cholestèn-3-one et en peroxyde

d'hydrogène. En présence de la peroxydase (EC 1.11.1.9), le phénol et le 4-aminoantipyrine se combinent avec le peroxyde d'hydrogène pour former un chromophore rouge (la quinonéimine) qui absorbe entre 500 et 550 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol total présent dans l'échantillon.



iii) Mode opératoire

Dans des tubes étiquetés blancs, étalon et essai ont été introduits respectivement 10 μ L d'eau distillée, d'étalon ou d'échantillon à analyser et 1000 μ L de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 min à 25°C. L'absorbance de l'échantillon a été lue contre le blanc réactif à 505 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

iv) Expression des résultats

La concentration en cholestérol total dans le plasma est donnée par la relation :

$$\text{Cholestérol total (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{valeur de l'étalon}$$

Avec : Concentration de l'étalon = 200 mg/dL ;

Conversion en unité SI (mmol/L) = [cholestérol total] en (mg/dL) $\times$ 0,0259.

II.2.3.4. Evaluation de l'effet du traitement sur l'intégrité du foie et des reins

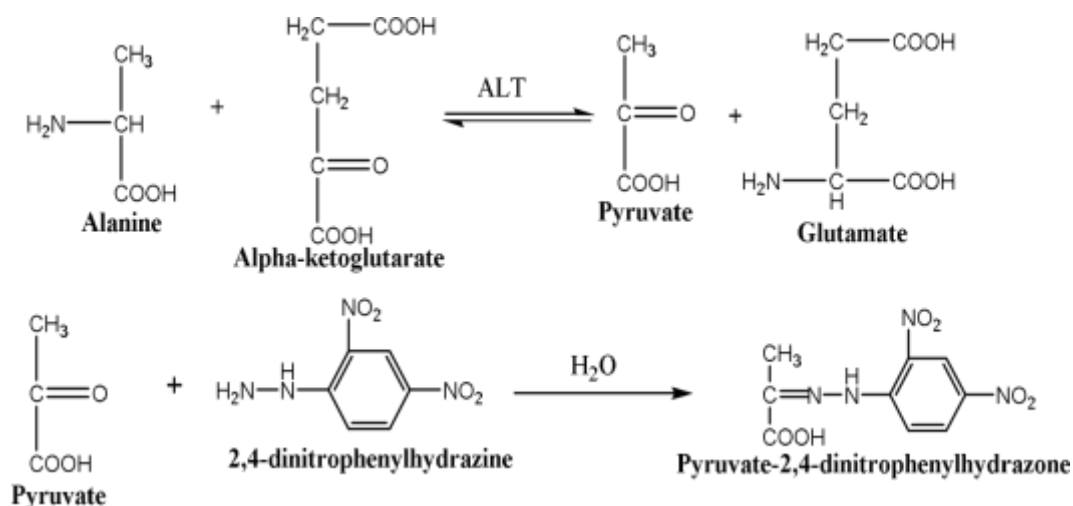
L'activité plasmatique des enzymes hépatique a été utilisée comme marqueur de l'intégrité hépatique et les taux plasmatiques d'acide urique et de créatinine ont été utilisés comme marqueurs de la fonction rénale. Le statut antioxydant a été évalué comme mécanisme de protection de ces organes.

II.2.3.4.1 Mesure des activités plasmatiques des enzymes hépatiques

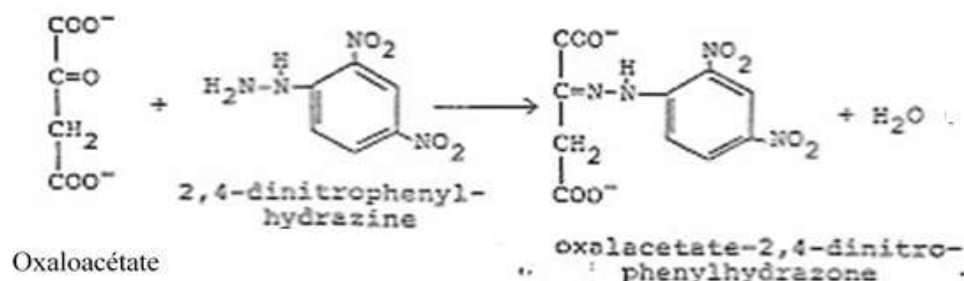
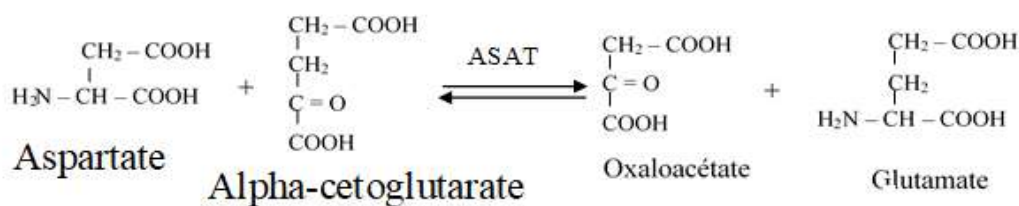
a) Mesure de l'activité plasmatique des transaminases (Reitman et Frankel, 1957)

i) Principes

L'alanine aminotransférase (ALAT) (EC 2.6.1.2) catalyse le transfert du groupement amine du L'alanine sur l' α -cétooglutarate pour former le pyruvate et le L-glutamate. Le pyruvate formé réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) pour donner le pyruvate-2,4-dinitrophénylhydrazone (complexe de couleur brun) dont l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité de pyruvate et présente un maximum d'absorption à 505 nm Selon la réaction ci-après :



L'aspartate aminotransférase (ASAT) (EC 2.6.1.1) catalyse le transfert du groupement amine de l'acide L- aspartique sur l' α - cétooglutarate pour former et le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate formé réagit avec le 2,4 DNPH (complexe de couleur brun). L'intensité de la coloration de dinitrophényhydrazine est directement proportionnelle à la quantité d'oxaloacétate et présente un maximum d'absorption à 505nm.



ii) Mode opératoire

Un volume (0,1 mL) de la solution substrat a été introduit dans les tubes à essai puis, pré-incubés à 37°C pendant 5 min. Ensuite, 0,02 mL de plasma y a été introduit suivit d'un ajout de 0,1mL d'eau distillée. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 30min (ALAT) ou 1H (ASAT) puis, 0,1mL de réactif de coloration y a été ajouté suivit d'une incubation à température ambiante pendant 20 min. La réaction a été arrêtée par ajout de 1 mL de NaOH (0,4N). Les densités optiques sont lues à 505 nm contre le tube blanc.

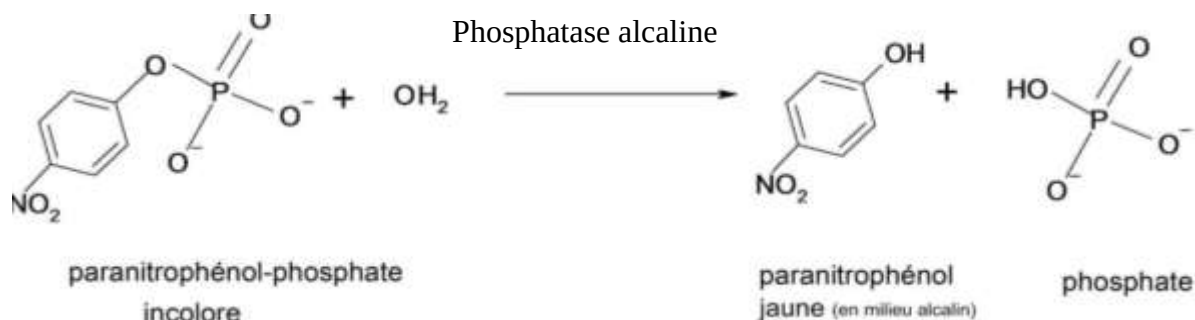
iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en activité d'ALAT et l'ASAT, déterminées à partir de l'équation des droites d'étalonnage présentée à l'annexe 10.

b) Dosage de la phosphatase alcaline (Bergmeyer *et al.*, 1974) :

i) Principe

La phosphatase alcaline (EC3.1.3.1) catalyse la réaction d'hydrolyse du groupement phosphate du paranitrophénol-phosphate, un chromogène à pH 10,4 libérant un produit coloré (jaune) appelé chromophore, le paranitrophénol et le phosphate suivant la réaction suivante :



ii) Mode opératoire :

1,2mL de réactif de travail a été introduit dans une cuve. Ensuite, 20µL de substrat y a été ajouté, puis homogénéisé et incubé pendant 1min. Les absorbances (A) ont été lues à 405 nm toutes les minutes pendant 3minutes.

iii) Expression des résultats

$$\text{PAL (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 330$$

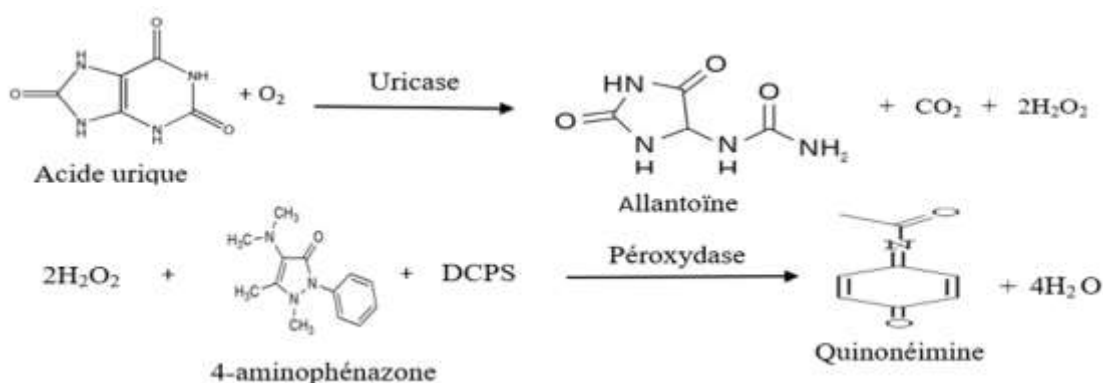
II.2.3.4.2 Dosage des paramètres biochimiques liés à l'intégrité du rein

L'acide urique et la créatinine ont été dosés dans le plasma des animaux, et l'analyse histologique des reins a été effectuée comme décrit précédemment

a) Dosage de l'acide urique plasmatique

i) Principe :

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$) qui, en présence de la peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et du 2,4-dichlorophenol sulfonate (DCPS) forme un composé rosacé : la quinonéimine. L'intensité de la quinonéimine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présente dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

A 25µL d'échantillon ou d'étalon, a été ajouté 1ml de réactif de travail. Le mélange a été incubé pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance a été lue à 520nm contre le blanc

iii) Expression des résultats

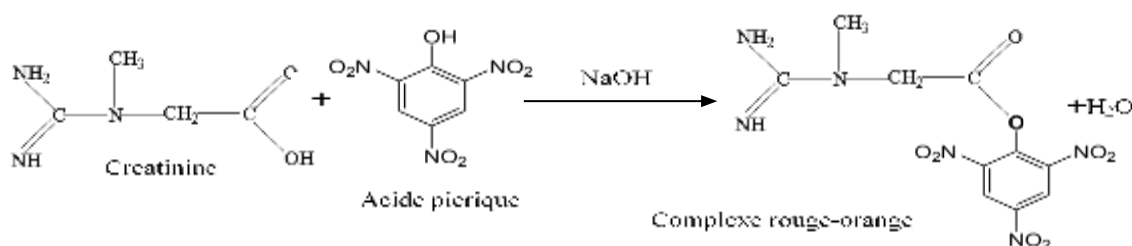
$$\text{concentration acide urique} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration étalon}$$

Avec : concentration étalon = 6mg/dL

b) Dosage de la créatinine (Bartels *et al.*, 1972)

i) Principe

En milieu alcalin, la créatinine forme un complexe jaune orange avec l'acide picrique. L'intensité de la coloration étant fonction de la concentration de la créatinine dans le milieu.



ii) Mode opératoire

Dans un tube à essai, 100µL d'échantillon ou de standard ont été ajoutés à 1mL de la solution de travail. Après agitation, l'absorbance à 520nm est lue à 30 et à 90 secondes après stabilisation du mélange. Le tube blanc a été réalisé avec de l'eau distillée.

iii) Expression des résultats

$$[\text{Créatinine}] = \frac{\text{DO essai}}{\text{DO étalon}} \times [\text{étalon}](\text{mg/dL})$$

Concentration de l'étalon=2 mg/dL

II.2.3.4.3 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur le statut antioxydant

L'activité de la catalase a été mesurée aux niveaux érythrocytaire, hépatique et rénale et les taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique ont été déterminés dans le plasma, le foie et les reins

a) Mesure de l'activité de la catalase (Sinha, 1972).

i) Principe

Cette méthode est basée sur le fait que la catalase (EC1.11.1.6) présente dans l'échantillon hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau (H₂O) et en Oxygène (O₂). Le H₂O restant après action de la catalase se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu-vert d'acide perchlorique instable ; ce dernier va ensuite être décomposé par la chaleur pour former un complexe vert qui absorbe à la longueur d'onde de 620nm. L'activité de la catalase est proportionnelle à la densité optique et est déterminé grâce à une courbe d'étalonnage ;

ii) Mode opératoire

Dans un tube à essai, ont été introduits successivement 50 µL d'échantillon et 750 µL de tampon phosphate. A ce mélange, ont été ajouté 200 µL de peroxyde d'hydrogène. L'arrêt de la réaction a été fait après 1 minute par addition de 1 mL du dichromate d'acétate. Les tubes ont été chauffés à 100°C pendant 10minutes, et l'absorbance mesurée à 620 nm contre le blanc après refroidissement des tubes.

iii) Expression des résultats

L'activité de la catalase est exprimée en mM de peroxyde d'hydrogène consommé/min/mg de protéines. En utilisant la courbe d'étalonnage $Y = 0,0013X$ obtenu à partir du standard (**annexe 12**). Le protocole de dosage des protéines totales est décrit à l'Annexe 13

a) Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (Yagi, 1976).

i) Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à essai en verre et à vis, ont été introduits 100 µL d'échantillon, 400 µL de réactif TBA puis les tubes ont été fermés hermétiquement. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts, les tubes ont été centrifugés à 1500g pendant 5 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration du MDA est déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) selon la formule ci-après

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

II.2.4 Traitement des données et analyse statistique

Le logiciel Excel a permis de traiter les données et de tracer les graphes. L'analyse statistique a été faite à l'aide du logiciel SPSS (*Statistical Package for Social Science*) version 25.0 pour Windows. Le test ANOVA (*Analysis Of Variance*) à un facteur suivi d'un test post-hoc LSD (*least significant difference*) a été utilisé les comparaisons multiples. Le *t-test* de *student* a été utilisé pour comparer les variables quantitatives entre 2 groupes. Le seuil de significativité était fixé à $p < 0,05$. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type et pourcentage de variation. Les courbes de régression dose-réponse ont permis de déterminer les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀).

Le logiciel MesRenova a été utilisé pour traité des chromatogrammes et spectres de masse, Image Studio sur le système Odyssey a été utilisé pour le traitement des résultats de Western Blot et Image J a été utilisé pour le traitement des coupes histologiques.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre a été organisé en partie en fonction des objectifs spécifiques du travail.

Partie I : Teneurs en quelques composés bioactifs, potentiel antioxydant et mécanisme d'action antiproliférative de l'extrait éthanolique de graines d' *A angustifolium*

I.1 Teneur et identification de quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

I.1.1 Teneur en quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Les phytoéléments évalués dans ce travail étaient les composés phénoliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes les terpenoïdes et les tanins. Il ressort du Tableau VI ci-dessous que, pour 1 gramme de matière sèche, l'EEAa contient environ 219,19 mg EAG de composés phénoliques avec 5,29 mg EQ de flavonoïdes et 1,27 mg EAG de tanins. Par ailleurs, il contient 62,83 mg EQui d'alcaloïdes, et 195 mg Eli de terpenoïdes.

Tableau VI Teneur de l'EEAa en quelques composés phytochimiques

Classes de composés bioactifs	Teneurs
Composés phénoliques (mg EAG/g, MS)	219,19 ± 13,37
Flavonoïdes (mg EQ/g, MS)	5,29 ± 0,62
Tanins (mg EAG/g, MS)	1,27 ± 0,22
Alcaloïdes (mg EQui/g, MS)	62,83 ± 3,16
Terpenoïdes (mg EQLinalool/g, MS)	195,5 ± 3,75

Expression des résultats : moyenne ± écart-type ; EAG : équivalent acide gallique ; EA : équivalent quercétine ; EQui : équivalent quinine, EQLinalool : équivalent de linalool ; MS : matière sèche.

I.1.2 Quelques composés identifiés dans l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

La Figure 28 ci-dessous représente les chromatogrammes obtenus en mode ESI positif.

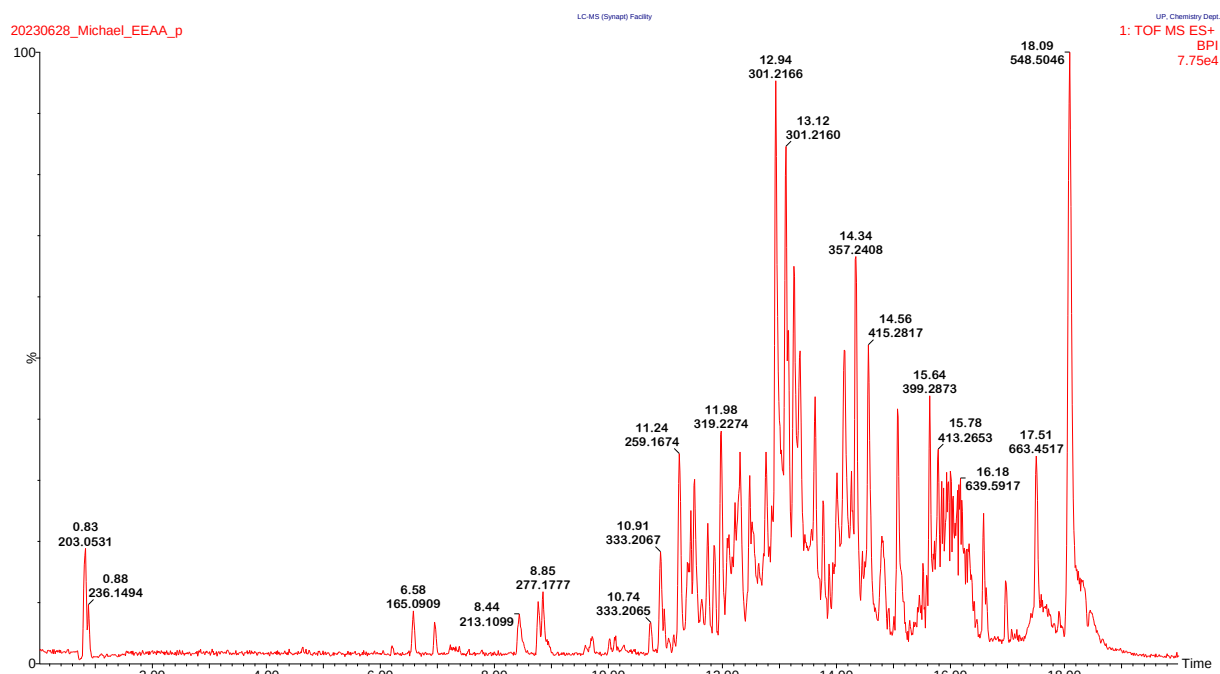


Figure 28: Chromatogrammes de l'EEAa en mode ESI positif

L'analyse spectrale des pics d'élution présents sur ce chromatogramme révèlent la présence probable de 6-paradole, 6-gingérol, quercétine, stigmasterol, α -pinène, caryophyllène ; pipérine et isoprinosine dont les spectres de masse sont présentés à l'annexe 14 et Les caractéristiques décrites dans le **Tableau VII**.

Tableau VII: Caractéristiques spectrales de quelques composés identifiés dans l'EEAa

Composés	Temps de rétention (minutes)	m/z expérimental	Erreur	Abondance (n)	Adduits
Pinène	8,31	194,12	-0,13	298	[M+K] ⁺ , [M+Cl] ⁻
Caryophyllène	13,44	205,088	-0,27	5500	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺
6-Paradol	11,56	279,23	-0,17	630	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ [M+H ₂ O] ⁺
6-Gingérol	11,77	295,22	-0,18	525	[M+H] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+H ₂ O] ⁺
Quercétine	12,55	303,21	-0,02	180	[M+H] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+Na] ⁺
Stigmastérol	15,79	413,26	-0,44	25000	[M+H] ⁺ , [M+H ₂ O] ⁺
Pipérine	12,55	325,25	-0,08	165	[M+K] ⁺ , [M+Na] ⁺
Isoprinosine	16,50	1116,32	+0,09	4750	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺

m/z : rapport entre masse atomique et charge

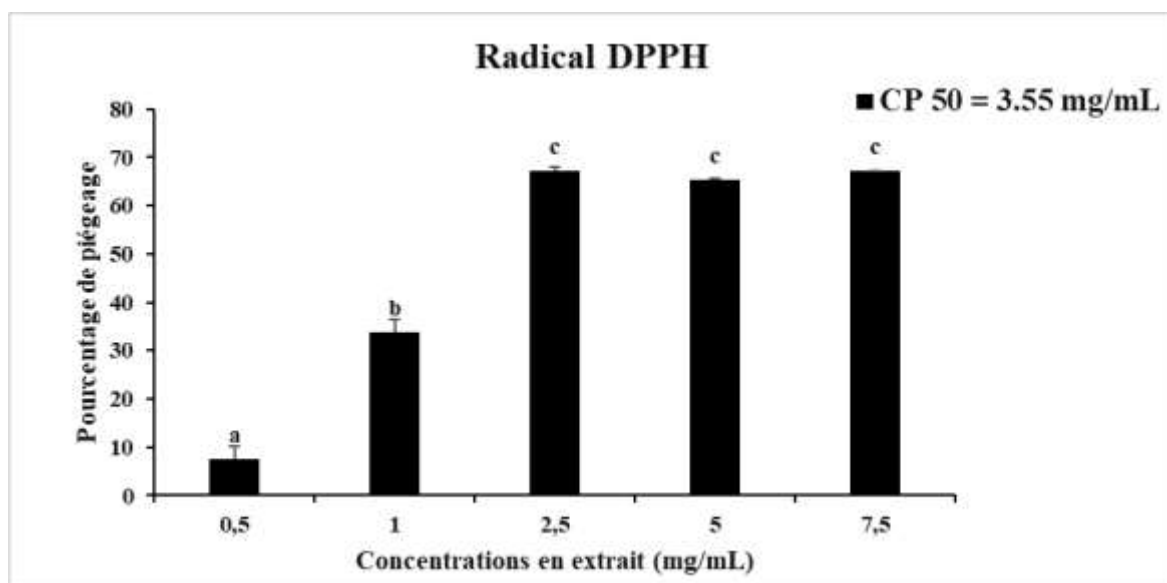
I.2 Potentiel antioxydant *in vitro* de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium*

Le potentiel antioxydant de l'EEAa a été évaluée à travers la mesure de son pouvoir anti-radicalaire du DPPH, de l'ABTS et NO, et son pouvoir réducteur du fer et du molybdate.

I.2.1 Potentiel antiradicalaire de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium*

a) Pouvoir anti-radicalaire de l'EEAa contre le radical DPPH

La mesure du potentiel de l'EEAa à piéger le radical synthétique DPPH a révélé que, l'extrait a piégé ce radical à toutes les concentrations testées (0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mg/mL). Le pourcentage de piégeage était proportionnel à la concentration en extrait jusqu'à la concentration de 2,5 mg/mL à partir de laquelle le potentiel anti-radicalaire a atteint son maximum (67,31%) et s'est plus ou moins stabilisé (Figure 29). La CP₅₀ était de 3,55mg/mL, soit un pouvoir antiradicalaire de 7,42µg de DPPH piégé par mg d'EEAa

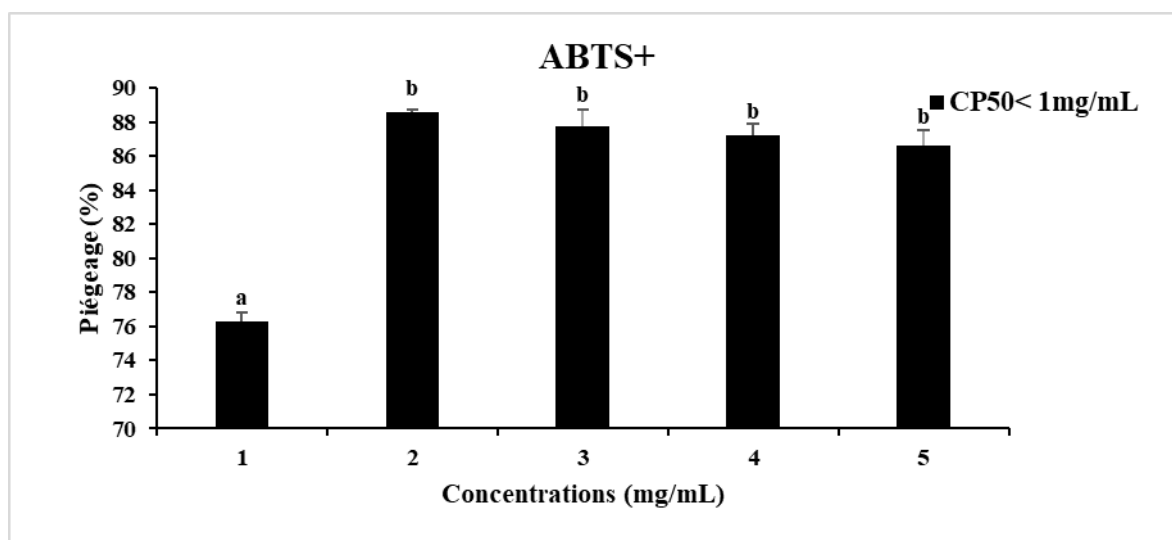


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pourcentages de piégeage différents à $p < 0,05$.

Figure 29: Piégeage du radical DPPH par l'EEAa à différentes concentrations

b) Potentiel piégeur du radical ABTS par l'EEAa

Il ressort de la figure 30 ci-dessous que, l'EEAa a piégé le radical cationique ABTS⁺ de façon inversement proportionnelle à sa concentration, avec une CP50 non déterminée car inférieure à la plus petite concentration en extrait testée (1mg/mL) soit un pouvoir antiradicalaire supérieur à 7,4 mmol d'ABTS piégé par mg d'EEAa.

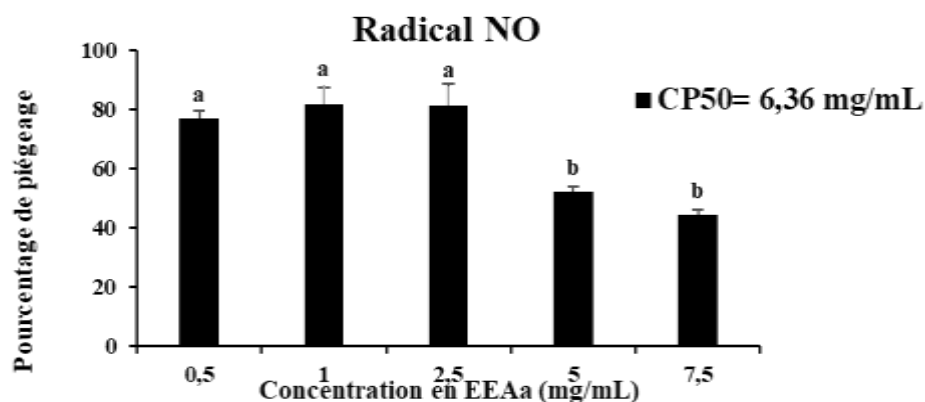


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b) ont des pourcentages de piégeage différents à $p < 0,05$.

Figure 30: Piégeage du radical ABTS⁺ par l'EEAa à différentes concentrations

c) Potentiel anti-radicalaire de l'EEAa contre le radical biologique NO

Il ressort du test de piégeage du radical NO que (Figure 31), l'EEAa aux concentrations testées (0,5-7,5 mg/mL) a piégé le radical NO avec une CP50 de 6,36 mg/mL. Le potentiel anti-radicalaire de l'extrait était inversement proportionnel à la concentration, avec un pic à 1 mg/mL (81,65%).



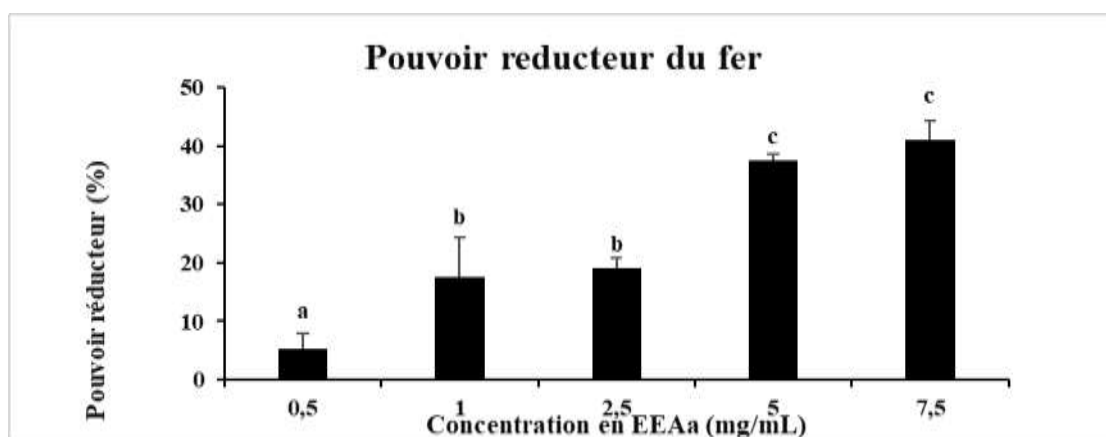
Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration Piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pourcentages de piégeage différents ($p < 0,05$).

Figure 31 : Piégeage du radical NO par l'EEAa à différentes concentrations

I.2.2 Potentiel réducteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

a) Potentiel réducteur du fer

La mesure du pouvoir réducteur du fer a révélé un potentiel proportionnel aux concentrations en extrait testées (Figure 32). Cependant, la CR50 était supérieure à la concentration maximale en extrait testée (7,5 mg/mL).

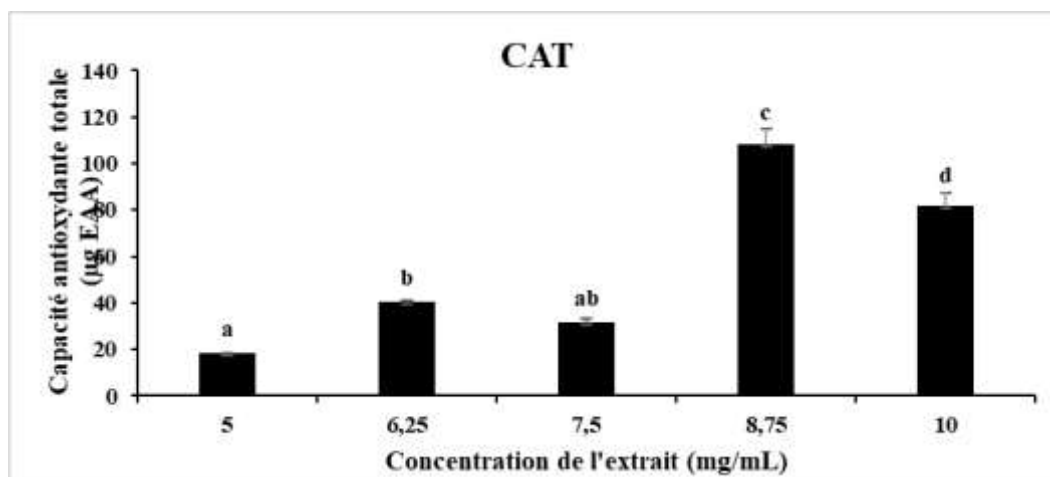


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pouvoirs réducteurs statistiquement différents ($p < 0,05$).

Figure 32: Réduction du Fe^{3+} par l'EEAa à différentes concentrations

b) Capacité antioxydante totale

Les résultats (Figure 33) montrent que, la capacité antioxydante de l'EEAa varie de façon sinusoïdale avec la concentration en extrait ; le pic (108.12 µg EAA) de capacité a été atteint à la concentration de 8,5 mg/mL .



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c, d) ont des CAT statistiquement différentes ($p < 0,05$).

Figure 33: Capacité antioxydante totale de l'EEAa à différentes concentrations

I.3 Potentiel antiprolifératif de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* sur quelques lignées de cellules cancéreuses

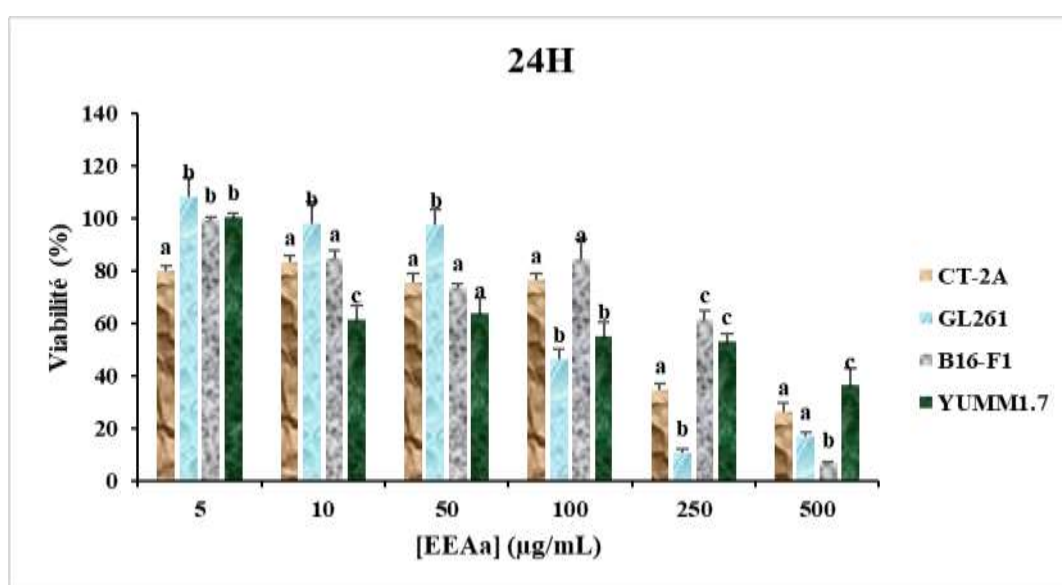
L'activité antiproliférative de l'extrait a été évaluée à travers la mesure de son activité cytotoxique sur une large gamme de lignées cellulaires cancéreuse. A la suite de ce test la lignée cellulaire la plus sensible après 48 H d'exposition à l'extrait a été utilisée pour l'exploration de quelques mécanismes d'action antiprolifératifs ; ceci a été réalisé à travers la mesure de l'expression de quelques gènes par qPCR et la détection des protéines par western blot.

I.3.1 Lignée cellulaire la plus sensible à l'EEAa

L'extrait a été testé sur trois (2) lignées cellulaires du gliome (CT 2Aet GL 261) et deux (2) lignées cellulaires du mélanome (B16-F1 et YUMM 1.7). Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentage de viabilité après 24 et 48 h de traitement.

I.3.1.1 Effet antiprolifératif de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium* sur les cellules cancéreuses après 24H d'exposition

L'activité cytotoxique sur les lignées cellulaires après 24H d'exposition est représentée par la Figure 34 ci-dessous. Il en ressort qu'après 24H d'exposition, L'EEAa à toutes les concentrations testées a inhibé la prolifération des cellules CT2A et GL261, B16-F1 et YUMM 1.7, excepté la plus petite concentration (5µg/mL) sur la lignée GL-261. Aux concentrations de 10 à 100 µg/m, l'EEAa a été plus antiprolifératif pour la lignée YUMM1.7. Cependant, aux concentrations en EEAa les plus élevées, les cellules GL261 ont été les plus sensibles.

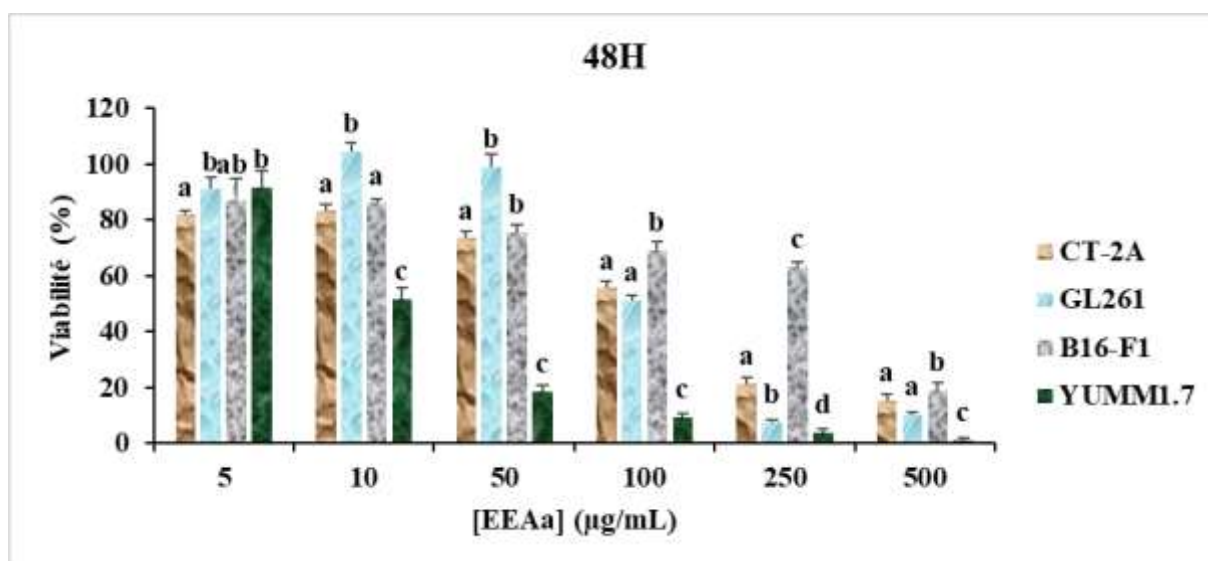


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type pour la viabilité. ; CT 2A, GL 261, B16-F1, YUMM1.7 : lignées cellulaires ; EEAa : extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* ; Pour chaque concentration en EEAa, les barres affectées de lettres différentes (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 34: Effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires CT-2A, B16-F1, GL261 et YUMM 1.7 après 24H d'exposition

I.3.1.2 Effet antiprolifératif de l'extrait éthanolique des graines d'*A. angustifolium* sur les cellules cancéreuses après 48H d'exposition

Le Figure 35 ci-après présente l'effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires après 48H. Il a été constaté que l'extrait aux concentrations testées a inhibé la prolifération de ces cellules. Une différence significative n'a été observée entre la viabilité des différentes cellules qu'à partir de la concentration en EEAa de 10µg/mL, avec une meilleure sensibilité des cellules YUMM1.7.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type pour la viabilité. ; YUMM, B16F : lignées cellulaires ; EEAa : extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* ; Pour Concentration en EEAa, les bandes affectées de lettres différentes (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 35: Effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires CT-2A, B16-F1, GL261 et YUMM 1.7 après 48H d'exposition

Concernant la CI_{50} (Tableau VIII) de l'EEAa vis-à-vis des différentes lignées cellulaires, la lignée GL261 a été la plus sensible après 24h d'exposition (215,04 µg/mL) tandis qu'à 48h, la lignée YUMM1.7 fut la plus sensible (31,5 µg/mL)

Tableau VIII: CI_{50} de l'EEAa vis à vis des différentes lignées cellulaires après 24H et 48H d'exposition

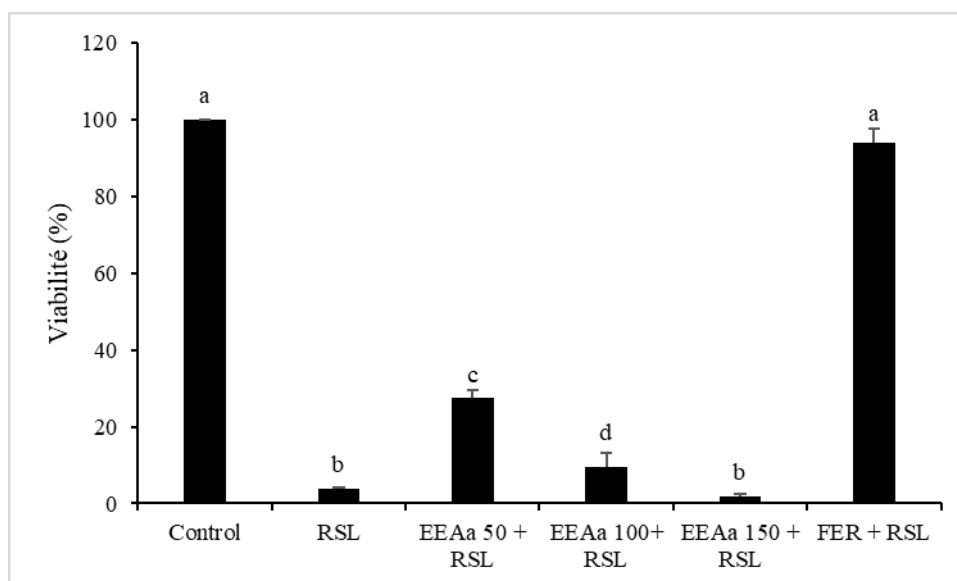
	Lignées	CT-2A	GL261	B16-F1	YUMM1.7
C50 (µg/mL)	24H	244,94	215,04	263,78	263,21
	48H	188,64	206,42	283,36	31,5

CI 50 : concentration inhibitrice 50

Le cancer étant une maladie dont le traitement se fait sur du long terme, la plus petite CI_{50} après 48H d'exposition à l'EEAa a été utilisée comme critère de sélection de la lignée cellulaire la plus sensible à l'extrait. De ce fait, la lignée YUMM 1.7 a été sélectionnée et utilisée pour l'exploration des mécanismes d'action.

I.3.2 Effet de l'extrait éthanolique d'*A. angustifolium* sur la mort cellulaire induite par le RSL-3 chez les cellules YUMM 1.7

L'effet de l'extrait sur la mort cellulaire induite l'agent pro-ferroptotique RSL-3 est représenté par la Figure 36 ci-dessous. Il en ressort que, comparativement au contrôle non traité, le traitement des cellules YUMM 1.7 avec 0,004 mM de RSL 3 a entraîné une baisse significative de la viabilité cellulaire. Cependant, le prétraitement des cellules avec de l'EEAa aux doses de 50 et 100 μ g/ml a limité la mort des cellules, conduisant à une augmentation de la viabilité cellulaire comparé au RSL-3 seul. Cette protection contre la mort induite par le RSL-3 était inversement proportionnelle à concentration en extrait, et moins efficace que la protection assurée par la ferrostatine.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; RSL : Ras small letal molecule ; EEAA : extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* : 50, 100 et 150 : concentration d'extrait en μ g/mL ; FER : Ferrostatine 1 ; les traitements affectées des lettres différentes (a, b, c, d) ont des nombres de cellules viables différents ($p < 0,05$).

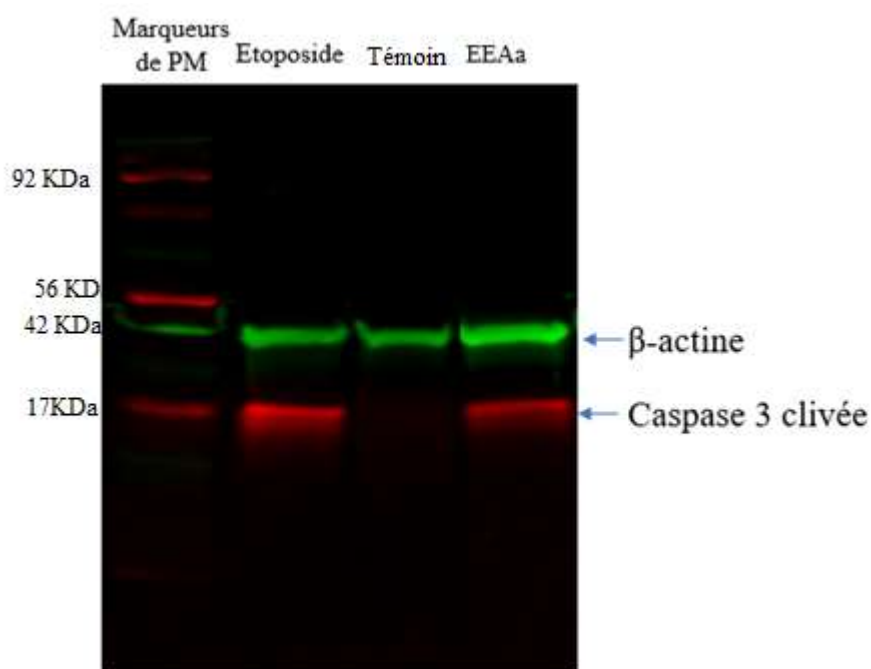
Figure 36: Effet de l'EEAa sur la peroxydation lipidique induite par el RSL-3 chez les cellules YUMM 1.7

I.3.3 Exploration des mécanismes de mort cellulaire induite par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* chez les cellules YUMM 1.7

Deux mécanismes de morts cellulaires ont été explorés, notamment l'apoptose et la nécroptose, à travers la détection des protéines impliquées par western blot

I.3.3.1 Mise en évidence de l'apoptose par détection de l'expression protéique de la Caspase-3 clivée

Les bandes électro-phorétiques pour la mise en évidence de l'apoptose chez les cellules YUMM 1.7 sont représentés sur la Figure 37 ci-dessous. On y déduit une expression de la β -actine (protéine de contrôle) tant chez les cellules non traitées (Contrôle) que chez celles traitées à l'étoposide (molécule pro-apoptotique de référence) ou l'EEAa. Cependant, seules les cellules traitées avec l'EEAa ou l'étoposide présentaient une expression protéique de la Caspase-3 clivée ou active. La Caspase-3 clivée étant l'un des effecteurs ultimes de la mort cellulaire par apoptose, l'EEAa induirait donc la mort des cellules YUMM 1.7 par apoptose.

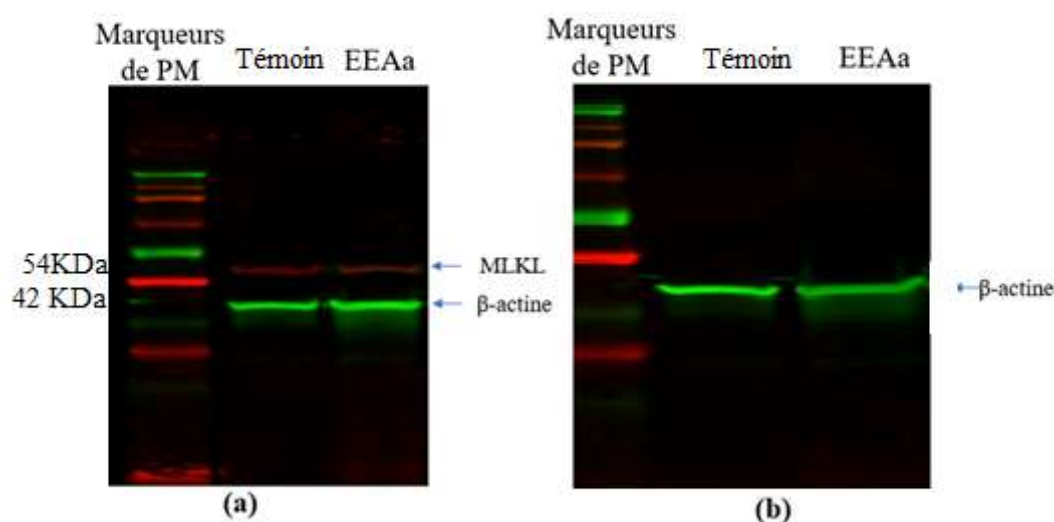


PM : poids moléculaire

Figure 37: Effet stimulateur de la caspase-3 active par l'EEAa chez les cellules YUMM1.7

I.3.3.2 Mise en évidence de la nécroptose par détection de l'expression protéique des formes inactives et actives de la protéine MLKL

Les bandes électrophorétiques de mise en évidence de la nécroptose, par détection de la protéine MLKL active (pMLKL) et inactive (MLKL) sont présentées sur la figure 38 ci-dessous. La β -actine a également été utilisée comme protéine de contrôle et a été exprimée par les cellules non traitées et les cellules traitées avec l'extrait. Concernant la protéine d'intérêt (MLKL), on note une expression de sa forme inactive (Figure 38a) tant par les cellules traitées que celles non traitées. Par contre, la forme active (pMLKL) n'a été exprimée autant par les cellules YUMM 1.7 non traitées que celles traitées avec l'EEAa (Figure 38b). Ce résultat traduit que, l'EEAa n'induit pas la mort cellulaire par nécroptose chez les cellules YUMM 1.7.



MLKL : Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase MLKL, pMLKL : phosphorylated Mixed Lineage Kinase domain Like, PM : poids moléculaire.

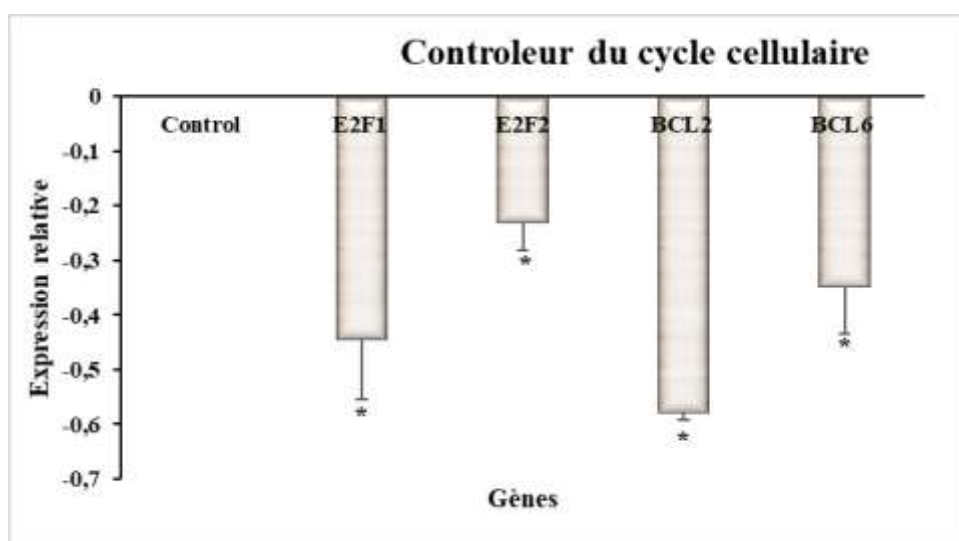
Figure 38: Effet inhibiteur de pMLKL (b) par l'EEAa chez les cellules YUMM1.7

I.3.4 Effet modulateur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur l'expression de quelques gènes chez les cellules YUMM 1.7

La mesure de l'expression des gènes codant pour les facteurs de croissance angiogéniques (VEGF, PDGF, et IGF), les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α), anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) et des facteurs de transcription et contrôleurs du cycle cellulaire (E2F1, E2F2, BCL-6 et BCL-2) a été effectuée par PCR en temps réel. Les résultats ont été exprimés en expression relative, par rapport aux cellules non traitées.

I.3.4.1 Effet de l'extrait sur l'expression des gènes E2F1, E2F2 BCL-2 et BCL-6 de contrôle du cycle

L'effet de l'extrait sur l'expression génique des contrôleurs du cycle cellulaire a montré que, la concentration en EEAA de 250 µg/mL a entraîné après 24 H une répression des facteurs de transcription E2F1 et E2F2, impliqués dans la progression du cycle cellulaire, ainsi qu'une répression des gènes anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-6. l'EEAA pourrait donc induire un arrêt de la progression du cycle cellulaire et conduire la cellule YUMM 1.7 vers une mort par voie intrinsèque de l'apoptose (Figure 39).

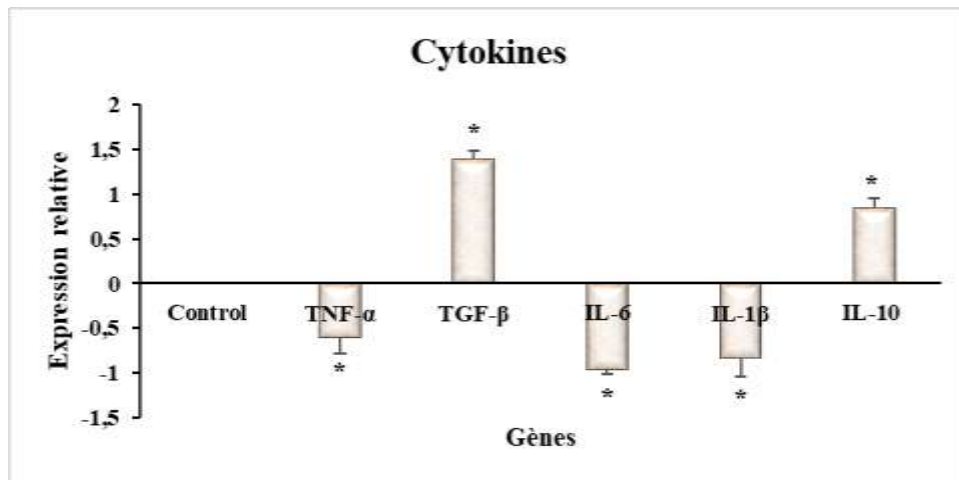


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; BCL-2 (6) : B-cell lymphoma -2 (6) ; E2F1 (2) : Eucaryotes transcription factor 1(2). les gènes affectées de l'Astérisk (*) ont des différences par rapport au à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 39: Effet inhibiteur de l'EEAA sur les contrôleurs du cycle cellulaire chez les cellules YUMM 1.7

I.3.4.2 Effet modulateur de l'extrait sur l'expression des gènes codant pour IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α et TGF- β

Le résultat de l'expression génique des cytokines pro et anti-inflammatoires est représenté sur la Figure 40 ci-dessous. Il en ressort que le traitement des cellules YUMM 1.7 a entraîné une régulation à la hausse et significative de la cytokine anti-inflammatoire (interleukine 10), tandis que, les cytokines pro-inflammatoires *Tumour Necrosis Factor alpha* (TNF- α), interleukine-1 beta (IL-1 β) et IL-6 était réprimés. Ceci traduisant un potentiel antiinflammatoire de l'EEAA. Le facteur de croissance transformant(TGF- β) a également été régulé à la hausse.

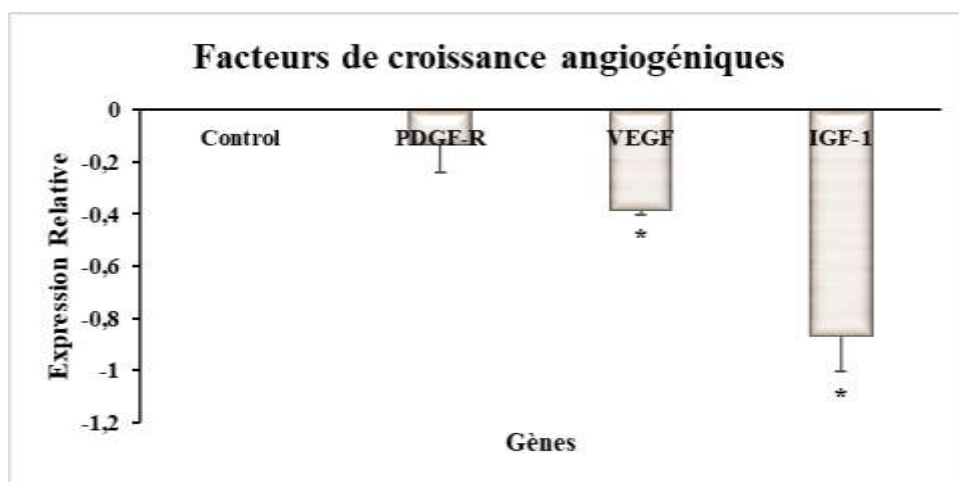


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; TNF- α : tumour necrosis facctor-alpha ; TGF- β : transforming growth factor-beta ; IL-1 β (6, 10) : interleukine-1beta (6, 10) ; les gènes affectées de l'Astérix (*) ont des différentes par rapport au à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 40: Effet modulateur de l'EEAa sur l'expression des cytokines chez les cellules YUMM 1.7

I.3.4.3 Effet modulateur de l'extrait sur l'expression des gènes de facteurs de croissance angiogéniques *VEGF*, *IGF-1* et *PDGF-R*

L'effet de l'EEAa sur l'expression relative des gènes codants pour les facteurs de croissances angiogéniques *VEGF*, *IGF-1* et le de *PDGF* (*PDGFR*) est représenté sur la Figure 41 ci-dessous. Il en ressort que, le traitement des cellules YUMM 1.7 avec de l'EEAa sur une durée de 24h à réprimé de façon significative ($P < 0,05$). De ce fait, l'EEAa serait capable d'inhiber l'angiogenèse tumorale.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; PDGFR : platelets-derived growth factor receptor ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; IGF-1 : insulin like growth factor-1 ; les gènes affectés de l'Astéris (*) ont des différences par rapport à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 41: Répression des facteurs de croissance relatifs à l'angiogenèse PDGFR, VEGF et IGF-1 par l'EEAa chez les cellules YUMM 1.7

I.4 Discussion partie I

Plusieurs études ont révélé le potentiel antiprolifératif des extraits de plantes et de leurs constituants dans la prise en charge du cancer. L'une des familles botaniques les plus explorées dans ce domaine est celle des *Zingiberaceae* (Kuété *et al.* 2014) à laquelle appartient *Aframomum angustifolium*, la plante étudiée dans le présent travail. Le stress oxydatif étant fortement impliqué dans les mécanismes cancérigènes (Jelic *et al.*, 2021), explorer un extrait de plante possédant un fort potentiel antioxydant pour ses propriétés anticancéreuses serait une approche intéressante. D'entrée de jeu, le criblage des composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* a révélé la présence des composés phénoliques (6-gibgéról, 6-paradol, Quercétine), des alcaloïdes (Piperine et isoprinosine) et des terpenoïdes (α -pinène, β -caryophyllène, β -bisabolène). Ces résultats concordent avec les données de la littérature rapportant la présence de ces classes de composés bioactifs dans les graines et les peaux de ce fruit (Inkoto *et al.*, 2021 ; Baser et Kürkcüglü, 2001). La mise en évidence du potentiel antioxydant de ces différentes classes de composés a déjà fait l'objet de nombreuses études (Kandylis, 2022 ; Vidinamo *et al.*, 2021). Ceci justifierait du potentiel antioxydant de l'EEAa relevé dans ce travail (Figures 29 à 33). Les potentiels observés (antiradicalaire et réducteur) seraient dus aux capacités de ces composés (Quercétine, α -Pinène) à céder un proton ou un électron aux agents oxydant, favorisant ainsi le passage d'une forme instable à une plus stable (Bougandoura et

l'utérus (10,6%) et de la prostate (8,7%). En termes de décès, environ 29% des patients sont décédés ces 5 dernières années. Le cancer du sein a fait plus ravages avec suivit des cancers de la prostate et du foie (**Ferley et al., 2024**).

Le Cameroun a présenté les mêmes tendances que l'Afrique en générale. Cependant, une baisse du nombre de nouveaux cas de 1181 a été noté entre 2020 et 2022 (**Ferley et al., 2024 ; 2021**).

Au regard de ces statistiques, fort est de constater que les cancers gynécologiques (cancer du sein en particulier) sont les plus à craindre en Afrique et au Cameroun en particulier; d'où la nécessité d'y accorder un intérêt particulier.

I.2 Le cancer du sein

La glande mammaire est une glande exocrine qui se développe chez la femme du stade fœtal jusqu'à sa ménopause. Tout au long de la vie, l'évolution de la glande est déterminée par des cycles de croissance et de différenciation de ses cellules épithéliales. Ceci augmente le risque que celles-ci accumulent des erreurs lors de la réplication des chromosomes. Une accumulation de ces erreurs peut être à l'origine des pathologies dont le cancer du sein qui est la plus à craindre (**Feng et al., 2018**).

En 2022, le cancer du sein occupait le premier rang avec environ 11% de cas sur le nombre total de cancers diagnostiqués dans le monde, soit 2.480.675 nouveaux cas (**Ferley et al., 2024**). Au Cameroun, il représente plus du tiers des cancers diagnostiqués chez la femme depuis 2020. Sa prévalence a augmenté de 2,3% et le nombre de décès de 1,9% entre 2020 et 2022 (**Ferley et al., 2024 ; 2021**). Les études menées par **Engbang et al. (2015)** dans quelques régions du pays avaient révélé que le carcinome invasif était la forme la plus rependue de la maladie et les femmes en âge de procréer les plus atteintes.

I.2.1 Anatomie du sein et de la glande mammaire

Le sein est un organe pair qui se développe davantage chez la femme dès l'âge pubère, et se présente sous forme atrophié chez l'homme. Il est situé sur la partie supérieure du corps et repose sur le muscle pectoral entre la 2^e et la 6^e côte (**Bistoni et Farhadin 2015**).

I.2.1.1 Composition tissulaire du sein

De l'extérieure vers l'intérieure, le sein est constitué de la peau (dont le derme est lié au fascia superficiel) ; du parenchyme mammaire, du complexe mamelon-auréole et du fascia profond.

Le parenchyme mammaire est constitué de 3 tissus principaux que sont l'épithélium glandulaire, le stroma fibreux et le tissu conjonctif de soutien auxquels s'ajoute la graisse. Le tissu épithélial est constitué de 15 à 20 lobes, eux même contenant 20 à 40 lobules. Ces dernières contiennent chacune 10 à 100 acini (petits conduits terminaux) qui sont le siège de production du lait. Le conduit épithélial est constitué de cellules myoépithéliales qui sont chargées de transporter le lait tout au long du conduit. Au niveau du complexe mamelon-auréole, les conduits s'élargissent pour former les sinus lactifères, et le lait est excrété à travers les orifices mamelonnaires (10 à 15). La glande mammaire est ainsi constituée d'un réseau interconnecté entre les lobules et les canaux (**Bazira et al., 2024 ; Javed et Lteif, 2013**). Les 2 autres tissus forment le ligament de Cooper qui est un ensemble de fibres traversant la glande mammaire et s'insérant dans le derme pour la soutenir (**Bistoni et Farhadi, 2015**).

De plus, des structures neuro-vasculaires traversent le sein. Ils sont constitués des artères, des veines, des neurones (sensitifs) et des vaisseaux lymphatiques. Ces structures se rejoignent dans les ganglions axillaires, qui sont des structures contigües au sein (**Bazira et al., 2024**).

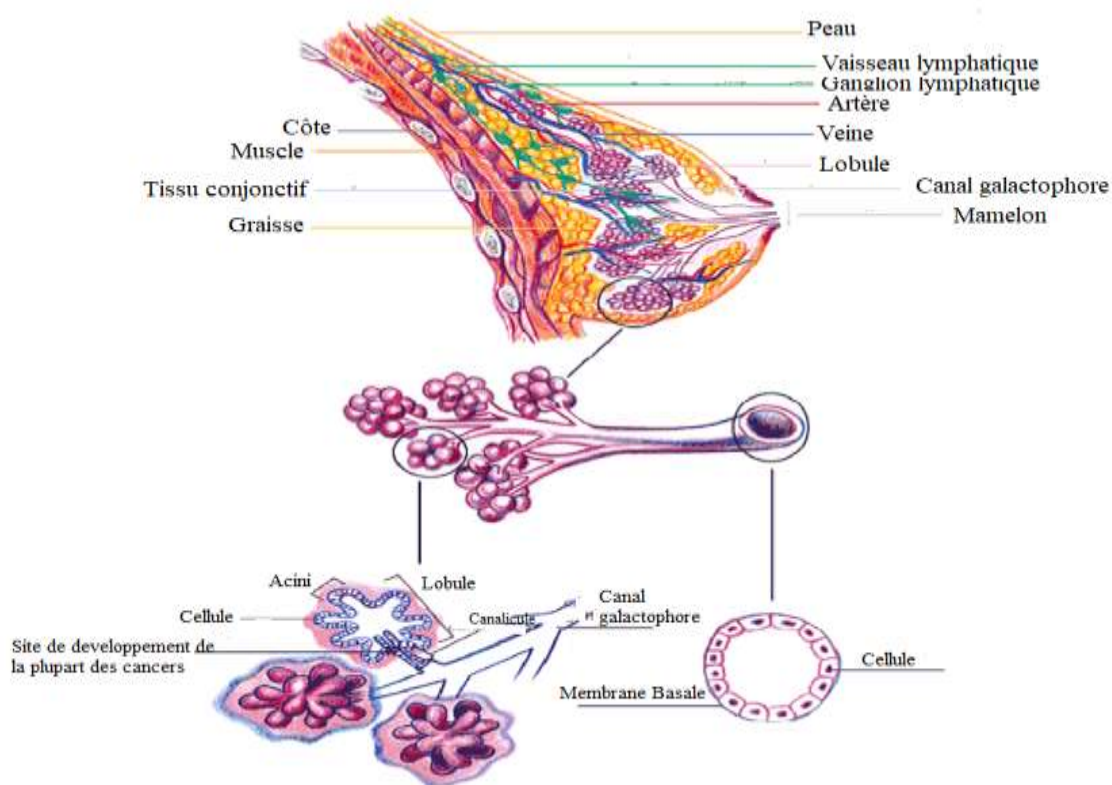


Figure 11: Anatomie du sein et de la glande mammaire (Bistoni et Farhadi, 2015)

1.2.1.2 Mammogenèse

Le développement de la glande mammaire est un processus qui commence au stade fœtal et est modifié selon le stade gynécologique de la femme. Avant la puberté, le système excréteur de la glande mammaire ne contient pas d'acinus. A la puberté, le développement de la glande mammaire est sous l'influence des estrogènes et de la progestérone. En effet, à cette période, l'axe hypothalamo-hypophysaire devient peu sensible au rétrocontrôle négatif des estrogènes. Ceci concourt à une augmentation de la libération de l'hormone de libération des gonadotrophines *GnRH* (*gonadotrophine releasing hormone*) par l'hypothalamus. Il s'en suit une libération des gonadotrophines *FSH* (*folicle-stimulating hormone*) et *LH* (*luteinizing hormone*) par l'antéhypophyse. Ces dernières en se fixant sur leurs récepteurs ovariens vont stimuler la libération des estrogènes et de la progestérone. Au niveau de la glande mammaire, la progestérone va stimuler le développement lobulaire et la différenciation épithéliale tandis que les estrogènes vont stimuler le développement canalaire (Bistoni et Farhadi, 2015). Pendant la grossesse et la lactation, la prolactine est en majeure partie responsable de la régulation à la hausse des récepteurs hormonaux, le développement épithélial et la galactogénèse (Brunicardi et al., 2005).

En dehors des estrogènes, la progestérone et la prolactine, d'autres facteurs de croissance agissent également sur le développement de l'épithélium mammaire. L'IGF (*insuline-like growth factor*) est produit par les cellules mammaires elles-mêmes et agit sur leur croissance (Neville *et al.*, 2013). L'EGF (*epidermal growth factor*) et le TGF- α (*transforming growth factor alpha*) quant à eux se fixent sur les récepteurs ERB2 ou NEU, stimulant la prolifération épithéliale, la synthèse de la lame basale et inhibant la production du lait (Hynes et Watson, 2010).

La différenciation des cellules mammaires à partir de la puberté est accompagnée d'une multiplication rapide de ces dernières, augmentant pour elles le risque d'accumuler des mutations. La perpétuation de ces mutations peut conduire à l'âge adulte au développement d'un cancer du sein.

I.2.2 Facteurs de risque du cancer du sein

Plusieurs facteurs de risque entrent dans l'étiologie du cancer du sein. Les plus incriminés semblent être les facteurs liés à la reproduction et aux hormones stéroïdiennes (Basset, 2014 ; Davidson, 2013). A côté de ceux-là, on note d'autres facteurs de risques tels que la prédisposition génétique, l'adiposité, la nutrition, l'exposition aux radiations ionisantes, l'exposition aux toxines chimiques etc. (Gurer-Orhan *et al.*, 2017; Basset, 2014).

I.2.2.1 Facteurs de risques liés à la reproduction et aux hormones stéroïdiennes

L'un des facteurs de risque les plus établis du cancer du sein est l'exposition de la femme pendant toute sa vie aux oestrogènes (Davidson, 2013). Ceci implique donc la nulliparité, la puberté précoce (< 12 ans), le premier accouchement à un âge tardif (≥ 30 ans) et la ménopause tardive (> 55 ans) (Gurer-Orhan *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'utilisation des contraceptifs oraux et des traitements substitutifs hormonaux semblent également jouer un rôle dans la carcinogenèse mammaire. En effet, l'estradiol est un facteur de croissance pour les cellules mammaires ; par ailleurs, son métabolisme génère des espèces oxygénées réactives, susceptible d'induire des dommages à l'ADN selon le mécanisme illustré par la figure 12.

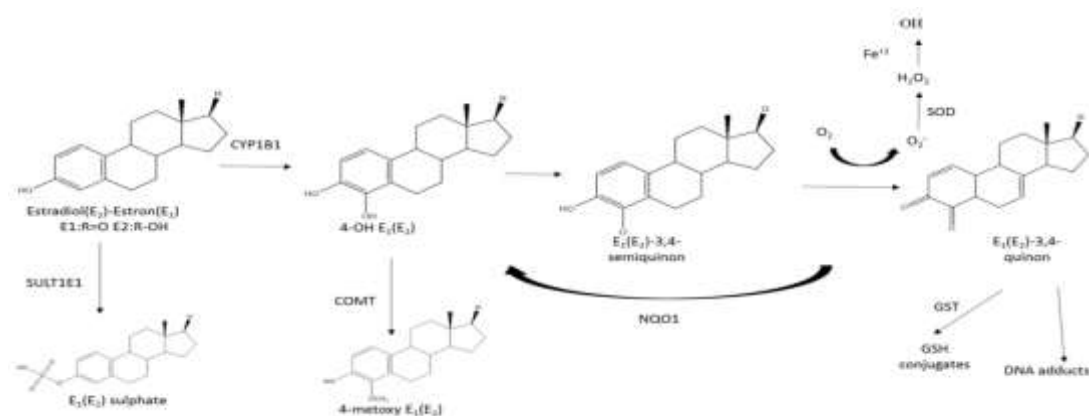


Figure 12: Métabolisme oxydatif de l'estradiol (Gurer-Orhan *et al.*, 2017)

I.2.2.2 Facteurs de risque génétiques et antécédents familiaux

Les études portant sur les antécédents familiaux et sur les jumeaux montrent l'implication importante de la susceptibilité génétique dans le développement des carcinomes mammaires. Bien que 20 à 25% des patients atteints de cancer du sein aient des antécédents familiaux positifs, seuls 5 à 10% des cas démontrent une dominance autosomale héritée (Bayraktar et Arun 2019). Les mutations les plus importantes en clinique sont associées aux gènes BRCA-1 (BRCA1), BRCA2 et de TP53 (Nunes *et al.*, 2019). Ils sont hérités de façon autosomique dominante, et plus de 50% des cas proviennent du syndrome BRCA-1 et BRCA-2. Les gènes sont en temps normal impliqués dans la réparation des lésions cellulaires dans le sein et les ovaires. Les mutations TP53 quant à elles se caractérisent principalement par la survenue de sarcomes, de carcinomes mammaires, de tumeurs cérébrales et de la surrénale. Son incidence mondiale est de 0.02 % à 0,005% (Lakhani *et al.*, 2012). À côté de ces 2 gènes, on a également une mutation des gènes PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) concourant au syndrome de Cowden, STK11 causant le syndrome de Peutz-Jegher, la neurobromatose (NF1), et l'E-cadherin (CDH-1) (Davidson, 2013).

I.2.2.3 Facteurs de risques liés à l'alimentation et au mode de vie

Il s'agit de l'alimentation, le syndrome métabolique, l'activité physique, l'alcoolisme, l'exposition aux polluants environnementaux et aux radiations ionisantes.

- L'alimentation

La consommation d'aliments riches en graisse, de viande rouge, surtout grillée a été associée à un risque accru de carcinomes mammaires (Kabat *et al.*, 2009). Par contre, le régime à base de fruits et de légumes n'est pas associé aux risques de carcinomes mammaires (Ronco *et al.*,

2010). De même, les régimes alimentaires riches en phyto-œstrogènes (présents dans de nombreux végétaux comme les fèves de soja), qui partagent des similitudes de structure avec les œstrogènes sont inversement liés à l'incidence du cancer du sein (**Mense et al., 2008**)

- **Le syndrome métabolique et l'activité physique**

Chez les femmes pré-ménopausées l'augmentation de la masse adipeuse s'associe à des cycles anovulatoires plus fréquents et donc à une exposition hormonale endogène plus faible. Cependant, le surpoids et l'obésité ont été incriminés dans 10% des cas de carcinomes mammaires chez la femme ménopausée aux Etats Unis (**Lakhani, 2012**). Les graisses viscérales sont riches en aromatase, enzyme qui converti la testostérone en estrone. Ce dernier stimule la prolifération des cellules canalaire (Tian et al., 2007). Les graisses intra abdominales quant à elles en plus de leur richesse en acides gras libres et d'adiponectine, sont une source de facteurs promoteurs de tumeurs comme le *TNF-α*, *IL-1*, *IL-6* et *IAP-1*. Par ailleurs un indice de masse corporel élevé est associé à une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie chronique, conduisant à une baisse du taux de protéine *IGF binding protein 2 (IGFBP 2)* et donc une augmentation de la biodisponibilité de l'*IGF-1* (**Capasso et al., 2010**) impliqué dans la progression tumorale.

L'activité physique impactant sur le poids corporel, un niveau d'activité physique modéré ou élevé serait corrélé à une réduction du risque de cancer du sein 15% à 20% (**Desnoyers et al., 2017**).

- **Exposition aux polluants environnementaux**

Il s'agit des agents ayant une origine chimique, notamment les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), les résidus de pesticides et le tabagisme. Ces contaminants environnementaux peuvent induire la formation de cancers en modulant les récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, particulièrement les récepteurs EGFR et erbB2. Ils peuvent également moduler des médiateurs intracellulaires tels que la protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB, la *Integrin-Linked Kinase (ILK)* et la E-cadhérine impliquées dans la communication cellulaire (**Girard, 2015**). Ces messagers secondaires ont une influence directe sur la différenciation, la prolifération, la communication et l'invasion cellulaire. Au cours du métabolisme des HAPs tel que le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA), le cycle redox des o-quinones et, dans une moindre mesure, l'activité catalytique des CYP450 peuvent induire des quantités trop importantes d'ERO (**Keyte et al., 2013**) et ainsi faciliter la création d'adduits covalents entre ADN et ces métabolites, l'induction d'un stress oxydant et une immunotoxicité (**Liamin, 2019**).

- L'alcoolisme

Le risque relatif de carcinome mammaire augmente de 7,1% pour chaque 10g d'alcool ingéré par jour. En 2020, le cancer du sein occupait la 3^{ème} place parmi les cancers causés par l'alcool avec 98300 cas (**Rumgay et al., 2021** ; Basset, 2014). Ce risque s'est avéré associé aux cancers positifs aux récepteurs hormonaux (**Clinton et al., 2020** ; **Sun et al., 2020**). Des évidences scientifiques soutiennent que, la carcinogenèse mammaire induite par l'éthanol passerait par son métabolisme oxydatif. En effet, L'acétaldéhyde issue de l'action de l'alcool déshydrogénase est capable de former des adduits avec la molécule d'ADN (**Nakamura et al., 2003**) et d'inhiber la O-méthyl-guanine transférase, enzyme responsable de la réparation de l'ADN (**Dumitrescu et Shields, 2005**). Par ailleurs, la consommation d'alcool modifie le cycle menstruel en le rallongeant et entraîne une augmentation du taux urinaire et plasmatique des métabolites estrogéniques (**Seitz et al., 2012**).

I.2.3 Physiopathologie du cancer du sein

Comme tous les types de cancers, celui de sein s'installe en 3 phases avec des modifications structurales, génétiques et moléculaires définies.

I.2.3.1 Modifications structurales associées à la physiopathologie du cancer du sein.

Après initiation de la cancérogenèse du sein sous l'influence des agents mutagènes tels que les radiations ionisantes, les polluants environnementaux et les métabolites oxydatifs, survient la promotion. Elle donne naissance au cancer du sein précoce caractérisée par une hyperplasie atypique. Elle est représentée par de lésions bénignes prolifératives et est réversible. C'est lors de l'étape de progression que les lésions malignes proprement dites s'installent. On passe ainsi à la phase intermédiaire, caractérisée par le développement d'un carcinome *in situ*, en passant par une dysplasie. Puis survient la phase finale au cours de laquelle, les cellules cancéreuses épithéliales acquièrent des propriétés invasives donnant place à un carcinome invasif ; ce dernier pouvant par la suite se disséminer dans l'organisme et former des foyers métastatiques (**Moyret-Lalle et al., 2016** ; **Kahia, 2012**). La figure 13 ci-dessous présente les modifications structurales survenant lors du développement des cancers mammaires.

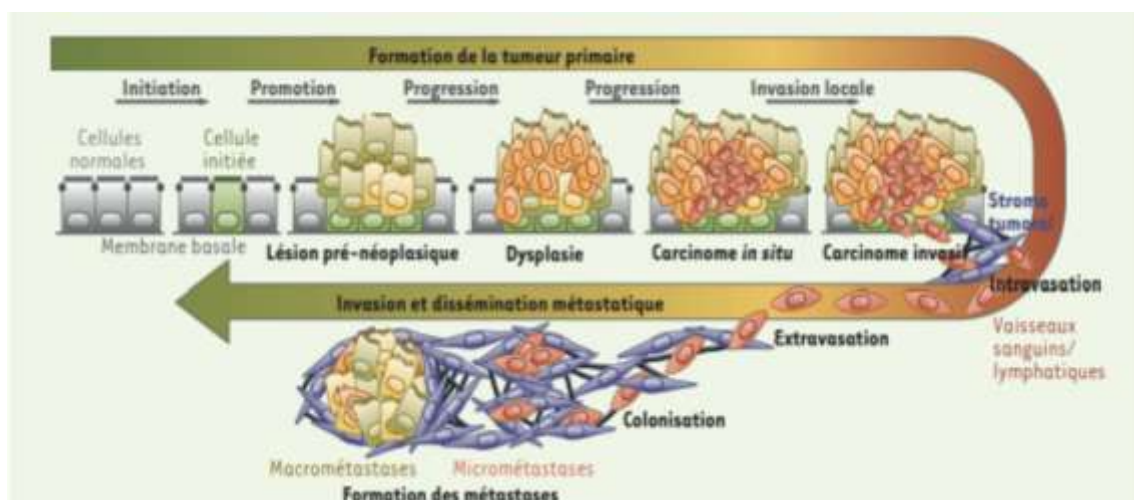


Figure 13: Modifications structurales au cours de la cancérogenèse mammaire Etapes d'évolution du cancer du sein (Moyret-Lalle *et al.*, 2016)

I.2.3.2 Altérations moléculaires dans le cancer du sein

Les altérations moléculaires dans le cancer peuvent être d'ordre génétique, épigénétique ou protéique.

I.2.3.2.1 Altérations génétiques dans le cancer du sein

Les gènes les plus fréquemment mutés et/ou amplifiés dans les cellules tumorales sont TP53 (41% des tumeurs), PIK3CA (30%), MYC (20%), PTEN (16%), CCND1 (16%), ERBB2 (13%), FGFR1 (11%) et GATA3 (10%) tel que relevé dans une série de cancers du sein précoces (Nik-Zainal *et al.*, 2016). Ces gènes codent pour des modulateurs du cycle cellulaire qui sont soit réprimés (p53) ou activés (cycline D1). Ces mutations soutiennent la prolifération et/ou inhibent l'apoptose, en activant les voies oncogènes (MYC, HER2 et FGFR1) ou en inhibant des éléments qui ne sont plus réprimés (PTEN). La plupart des cancers du sein sont causés par de multiples mutations à faible pénétration qui agissent de manière cumulative (Harbeck *et al.*, 2019).

I.2.3.2.2 Altérations épigénétiques dans le cancer du sein

Il s'agit généralement d'une hypométhylation globale, qui entraîne l'activation des gènes, la régulation positive d'oncogènes et l'instabilité chromosomique. Dans de rares cas, on assiste à une hyperméthylation de façon focale (locus spécifique), entraînant la répression des gènes et l'instabilité génétique due à la mise sous silence des gènes de réparation de l'ADN. D'autres mécanismes épigénétiques impliquent des modifications de la queue des histones par méthylation de l'ADN, induisant des modifications de la structure de la chromatine, mettant

sous silence l'expression des gènes et le remodelage nucléosomal. Ces modifications sont réversibles, médiées par des enzymes et potentiellement ciblables (Heitzer *et al.*, 2019).

1.2.3.2.3 Altérations protéiques dans le cancer du sein

Ceci concerne essentiellement les récepteurs de facteurs de croissance (récepteurs à œstrogènes, récepteurs de facteurs de croissance), les transducteurs du signal intracellulaires et les régulateurs du cycle cellulaire.

a) Altération de la voie des récepteurs à œstrogènes

Les récepteurs à œstrogènes (RE) sont surexprimés dans environ 60 % des cancers du sein invasifs (Malhotra *et al.*, 2010). Il en existe les isoformes α (RE α) et β (RE β) ; les RE α sont impliqués dans les processus de prolifération associé au cancer du sein, tandis que les RE β exercent un effet contraire (Fuentes *et al.*, 2019). Ce sont des facteurs de transcription nucléaires détectables dans la membrane plasmique, le cytoplasme et le noyau.

➤ Voie génomique d'action des récepteurs à œstradiol

L'action génomique ou classique du RE α a lieu dans le noyau. Après activation des RE α cytosolique par son ligand, le RE α se lie de manière coordonnée avec un certain nombre de protéines co-régulatrices aux éléments de réponse aux œstrogènes dans la région promotrice des gènes sensibles aux œstrogènes. Ceci dirige à son tour la transcription ou la répression de nombreux gènes favorisant la croissance (Williams et Lin, 2013). Ainsi, au niveau du noyau, le RE α peut activer l'action transcriptionnelle de *Stimulating protein-1* (Sp-1), aboutissant à l'expression des récepteurs à *Low Density Lipoprotein* (LDL), les récepteurs B à progestérone, l'oxyde nitrique synthase endothéliale et *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT 5). Le RE peut également se fixer à la sous-unité c-rel de NF- κ B, inhibant ainsi son action transcriptionnelle. Il peut aussi interagir avec les modulateurs transcriptionnels tels que *activating transcription factor* (ATF)-2, *c-jun*, ATF-1/cAMP response element binding protein (ATF-1/CREB), et le *nuclear transcription factor-Y* (NF-Y) (O'Lone *et al.*, 2004). Par ailleurs, Le RE α peut induire l'expression des gènes contenant les sites pour le facteur de transcription *activator protein-1* (AP-1). Ce dernier étant impliqué dans la régulation des processus tels que la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Fuentes *et al.*, 2019). Ainsi, l'AP-1 peut induire l'expression de l'IGF-1 et son récepteur, la collagénase, ovalbumine et la cycline D1.

➤ Voie non génomique d'action des récepteurs à œstradiol

L'action non génomique des RE est extrêmement rapide après l'exposition des RE membranaire aux œstrogènes. Au niveau de la membrane plasmique, il existe des RE 1

couplés à la protéine G (REPG1) qui agissent par activation des voies de transduction intracellulaire du signal (**Prossnitz et Barton, 2011**). Ces voies concourent à la production des seconds messagers, la régulation de l'AMPc, l'activation des protéines kinases via les cascades de signalisation (**Lösel & Wehling, 2003**). Cette dernière peut se faire à travers la voie de la protéine kinase C (PKC), la cascade Ras/Raf/MAPK, la cascade PI3K/Akt ou la voie AMPc/PKA (**Fuentes et al., 2019**). Par ailleurs les REGP1 peuvent promouvoir l'activation dépendante des estrogènes de l'adenylate cyclase et de l'EGFR ; ceci conduisant à une phosphorylation activatrice des voies de signalisation susmentionnées avec pour point culminant, l'activation des facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes cibles (**Arnal et al., 2017 ; Levin, et Pietras, 2008**). Ces facteurs de transcription peuvent être *Elk-1*, CREB, *CCAAT-enhancer-binding protein beta* (C/EBP β), le complexe *NF- κ B* et la famille des *STAT* (**Cavalcanti, et Porto, 2015; Furth, 2014; Laliotis et al., 2013 ; Kousteni et al., 2003**).

b) Altération de la voie des récepteurs de facteur de croissance

Le gène des récepteurs du facteur de croissance épidermique est muté dans certains cancers mammaires. Il s'agit d'une famille des 4 récepteurs transmembranaires étroitement liés EGFR/ErbB1, HER2, HER3/ErbB3, et HER4/ErbB4, structurés par deux domaines extracellulaires riches en cystéine et un domaine transmembranaire de liaison au ligand (**Hynes et MacDonald, 2009**). Parmi ces récepteurs, le gène HER2/ErbB2/neu est amplifié et/ou sa protéine surexprimée dans 13-15% de tous les cancers du sein invasifs primaires (**Harbeck et al., 2019**). Ces récepteurs sont spécifiques à une large gamme de ligands dont l'EGF et le TGF- α . L'interaction ligand-HER2 conduit à des changements conformationnels, associé à une homo ou hétéro-dimérisation (**O'Donovan et al., 2011**). Il s'en suit une transphosphorylation des résidus tyrosine situés sur les domaines intracellulaires. Les tyrosines phosphorylées vont recruter de nombreux transducteurs de signaux tels que la protéine RAS. Elles pourront activer une multitude de voies de signalisation en aval à travers MAPK et PI3K pour assurer la survie prolongée des cellules, la prolifération, la motilité accrue, l'invasion et les métastases (**Song et Hu, 2017 ; Hynes et MacDonald, 2009**)

c) Les voies de second messenger

Les évidences scientifiques suggèrent que les voies PI3K/AKT et Ras-MAPK sont particulièrement importantes dans le cancer du sein en raison de la fréquence des mutations, de l'amplification et/ou de l'activation de ces voies.

- **Mutation de la voie PI3K-AKT/mTOR**

PI3K-AKT/mTOR est une voie de signalisation centrale en aval de nombreuses tyrosine kinases réceptrices, ou des récepteurs couplés aux protéines G, qui régule le métabolisme, la croissance, la prolifération cellulaires et l'angiogenèse (Miricescu *et al.*, 2020). Les mutations activatrices de la famille des gènes AKT (protéine kinase B) sont observées dans 2 à 4 % des cancers du sein. Plus particulièrement, environ 80% des cancers du sein hormonaux présente des mutations de cette voie, 39% des cancers positifs aux récepteur HER2 et 8–25% des cancers triples négatifs (Prever *et al.*, 2021). L'hyperactivation de AKT est d'une part due à la mutation de PTEN, responsable de son inactivation par déphosphorylation, ou de la mutation de sa sous unité catalytique p110 α . Cette dernière conduit à l'activation de la voie PI3K, concourant à l'activation par la kinase 3-phosphoinositide-dépendante, de plusieurs kinases connues, notamment les protéines kinases B (AKT1, AKT2 et AKT3). Les AKT activées vont faire perdre aux protéines membranaire leur connexion avec la membrane cellulaire ; il va s'en suivre leur relargage dans le cytosol où elles vont phosphoryler les protéines cytosoliques et celles de la membrane nucléaire ; stimulant ainsi la survie et la croissance cellulaire (Miricescu *et al.*, 2020).

Par ailleurs, les effecteurs prolifératifs en aval de la voie PI3K comprennent *Forkhead box other 1* (*Foxo 1*), le complexe *mTOR* composé de mTOR, raptor et *mamalian lethal with SEC13 protein* (mLST8) (Miricescu *et al.*, 2020 ; Lien *et al.*, 2016). Ce complexe active la S6-kinase 1 (activateur de la protéine S6 ribosomale) et la suppression de 4E-BP1, un inhibiteur de la traduction cap-dépendante. Il s'en suit une surproduction des ribosomes et une synthèse des protéines favorisant la croissance cellulaire. *Foxo 1* quant à lui est impliqué dans la synthèse des enzymes de la neoglucogenèse, l'inhibition de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphate et de la formation des triacylglycérols (Lien *et al.*, 2016).

- **Mutation de la voie Ras-MAPK**

Bien que seulement 2 % des cancers du sein humains présentent des mutations *RAS*, plusieurs RTK associés au cancer du sein tels que l'*EGFR*, l'*IGF-1R*, et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (*PDGFR*) peuvent maintenir *RAS* dans un état d'activation favorisant la progression néoplasique (Saini et Piccart-Gebhart, 2013). Encore appelée GTPase car liée au guanosine diphosphate (GDP) dans leur forme actives, les petites protéines *RAS* conduisent une série de phosphorylation en allant de Raf à *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (*ERK*), en passant par *Mitogen-Activated, Extracellular-Signal Regulated Kinase* (*MEK*). Après activation, les kinases *ERK1/2* catalysent la phosphorylation de nombreux substrats dont certains sont localisés dans le cytoplasme, au niveau d'organites

intracellulaires et d'autres dans le noyau après translocation de ERK1/2. Il active de ce fait certains facteurs de transcription comme *Ets1/2*, *c-Myc*, *c-Jun* qui sont impliqués dans l'initiation et la régulation de la prolifération et dans la transformation oncogénique (Chauvin, 2015 ; Shaul & Seger, 2007). Une signalisation aberrante de la voie RAS se produit dans environ 50 % des tumeurs mammaires en raison d'une signalisation constitutive en amont (comme dans le cas de la surexpression de HER) (Nolan *et al.*, 2023).

d) Dérégulation du cycle cellulaire

L'axe cycline D1-CDK4/6-RB est le régulateur clé de la transition G1-S du cycle cellulaire. Plusieurs voies mitogènes pertinentes pour le cancer du sein, y compris les voies de signalisation des œstrogènes et HER2-PI3K, augmentent l'activité de CDK4/6 par une régulation transcriptionnelle à la hausse de CCND1 (qui code pour la cycline D1) ou par la stabilisation post-traductionnelle de cette cycline. De plus, l'amplification de CCND1 et de CDK4 est fréquemment observée dans les cancers du sein luminal B (80 %) et HER2+ (60 %) (Nolan *et al.*, 2023). Contrairement aux cancers luminal, l'activation du cycle cellulaire dans les tumeurs de type *basal-like* se fait par perte de RB1 (TCGA, 2012), les rendant ainsi non sensibles aux inhibiteurs de CDK4/6. En effet, la liaison physique des cyclines de type D (D1, D2 ou D3) à la CDK4 ou à son homologue CDK6, entraîne une activation enzymatique de CDK4/6, qui phosphoryle ensuite la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (Rb). Ceci entraîne l'inactivation de la fonction antiproliférative de Rb à la fin de la phase G, et la libération des protéines prolifératives que sont les facteurs de transcription E2F. Non seulement les protéines Rb sont mutées dans le cancer du sein, mais la signalisation par le réticulum endoplasmique augmente l'expression de la cycline D1, activant les CDK et phosphorylant Rb, favorisant ainsi la prolifération tumorale (Lim et Kaldis, 2013 ; Roy *et al.*, 2010). La résistance aux inhibiteurs de CDK4/6 survient par des mécanismes pléiotropes incluant la perte de RB, l'activation de cycline E-CDK2, la cooptation d'autres CDK comme CDK7, et l'activation d'autres voies oncogéniques, y compris RAS/MAPK et PI3K/AKT (Goel *et al.*, 2022).

La figure 14 ci-dessous résume les différentes aberrations moléculaires survenant dans la cancérogenèse mammaire.

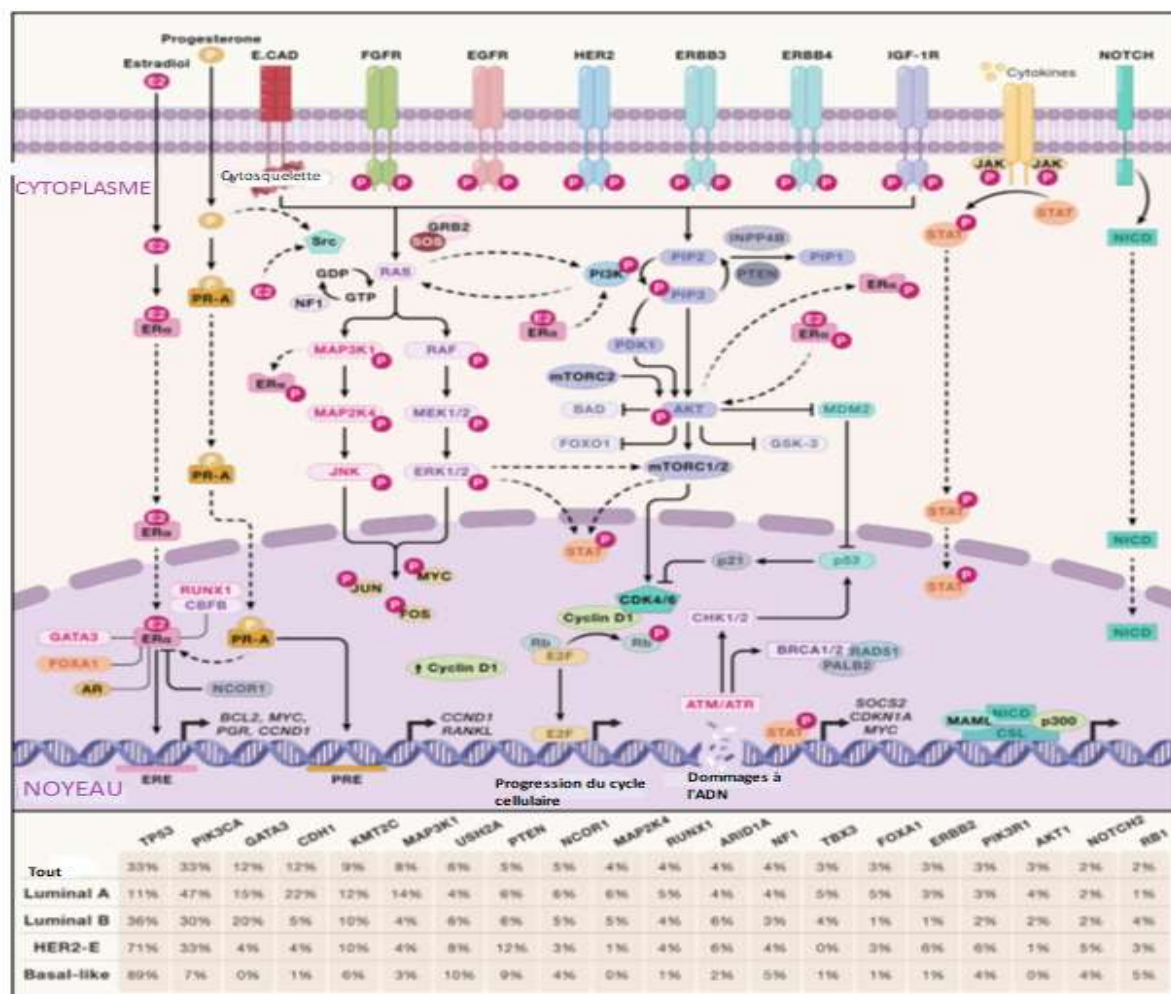


Figure 14: Altération moléculaire dans le cancer du sein du signal dans le cancer du sein (Nolan *et al.*, 2023)

I.2.4 Diagnostic du cancer du sein et classification des tumeurs mammaires

Le diagnostic du cancer du sein part de l'observation des signes cliniques généralement fait par le patient lui-même, aux examens histopathologiques, en passant par les examens d'imagerie médicale.

I.2.4.1 Manifestations cliniques

Le cancer du sein ne présente généralement aucun symptôme lorsque la tumeur est petite. Une fois que la tumeur a atteint une taille qui peut être ressentie, une bosse indolore est le signe physique le plus courant (Farhadihosseinabadi *et al.*, 2018). Peu à peu, d'autres symptômes peuvent se ressentir telles que (Davidson *et al.*, 2013) :

- Une anomalie de la peau se présentant sous forme de peau d'orange ;

- Une inflammation qui se matérialise par la rougeur, la chaleur et l'œdème, reflétant souvent une infiltration cellulaire tumorale des vaisseaux lymphatiques dermiques du sein ;
- Un écoulement du mamelon qui peut être d'aspect laiteux (Rarement malin), clair ou sanguinolent.

Ces différents symptômes sont généralement constatés par le patient même lors de l'examen physique d'autopalpation. Ces signaux d'alerte poussent le clinicien à prescrire des examens plus poussés tel que la mammographie. A cette dernière, est souvent ajoutée une biopsie exérèse de toute zone suspecte. Si les résultats sont normaux, une échographie ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) pourront exclure la faible probabilité de tumeur maligne.

1.2.4.2 Examens d'imagerie médicale

Les examens d'imagerie médicale incluent la mammographie, l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique.

a) Mammographie

Il s'agit de l'examen radiologique du sein. Elle est utilisée sur une patiente présentant des signes cliniques ou des symptômes de maladie du sein et sur une personne pour laquelle une évaluation plus approfondie a été demandée en raison d'un dépistage anormal ou pour le suivi de résultats d'imagerie antérieurs (**American College of Radiology, 2014**). Par ailleurs les femmes ayant des antécédents personnels de cancer du sein et traitées par conservation du sein peuvent choisir de subir une mammographie de diagnostic. Puisque l'apparence du tissu mammaire normal varie sur la mammographie, la comparaison avec des mammographies antérieures est extrêmement précieuse et peut permettre au radiologue de détecter une malignité subtile en développement. En outre, des vues mammographiques supplémentaires notamment les vues latérales vraies, les vues cranio-caudale roulées, les vues cranio-caudales exagérées, les vues tangentielles et les vues de clivage sont nécessaires pour permettent de mieux caractériser la lésion et son emplacement (**Ganott et al., 2019**).

b) Echographie

Il s'agit d'une technique d'analyse qui utilise des ultrasons et permet de générer des images plus précises de la partie interne des seins et des ganglions. Elle est essentielle pour l'imagerie des anomalies non visibles à la mammographie (**Gharekhanloo et al., 2018**). Elle est précieuse pour guider les biopsies à l'aiguille des lésions suspectes et aspirer les

collections de liquide. Elle peut également être utilisée pour suivre les lésions peu suspectes et pour évaluer la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. En plus de cela, l'élastographie et la sonographie Doppler sont des outils connexes permettant une caractérisation plus poussée, afin de pouvoir classer correctement une lésion en fonction de sa rigidité et de sa vascularisation **Ganott et al., 2019**).

c) Imagerie par résonance magnétique

Le Collège Américain de Radiologie (**ACR, 2014**) recommande un dépistage annuel par IRM en complément de la mammographie pour les patientes présentant une mutation connue du gène BRCA, les patientes non testées dont un parent au premier degré est porteur d'une mutation BRCA, Les patientes considérées comme à haut risque avec un risque calculé de 20 % ou plus sur la durée de vie, celles qui ont des antécédents d'irradiation thoracique avant l'âge de 30 ans, ainsi que les patientes présentant les gènes Li-Fraumeni, Cowden et Bannayan-Riley-Ruvalcaba et leurs parents au premier degré (**National Comprehensive Cancer Network, 2017**). L'IRM est également employée pour guider l'aiguille à la biopsie des lésions uniquement détectables par résonance magnétique (**Ganott et al., 2019**).

I.2.4.3 Analyse histopathologique et diagnostic moléculaire

Elle va de l'observation des cellules colorées à l'hématoxyline/éosine, à l'analyse des marqueurs moléculaire par immunohistochimie pour déterminer le type moléculaire. D'autres méthodes consistent en la culture des fragments tissulaire, suivit de la mesure des taux d'expression des gènes par RT-PCR (**Cao et al., 2016**). L'interprétation des résultats de cette analyse devrait s'inspirer de la classification des tumeurs mammaires établie par l'OMS.

a) Histologie à l'hématoxyline et éosine (H&E)

Ces colorants histologiques permettent de mettre en évidence le cytoplasme (éosine), le réticulum endoplasmique granuleux et le noyau (Hématoxyline). Ce test est fait sur de fines couches de tissu mammaire sous paraffine et permet de renseigner sur le type de lésion pathologique du sein (**Nengtai et Lin, 2016**).

b) Analyse immunohistochimique

Cette analyse a permis de mettre en évidence des types moléculaires de cancers du sein. Elle est basée sur la recherche des marqueurs moléculaires tels que les récepteurs à estrogènes (RE), les récepteurs à progestérone (RP), le récepteur du facteur de croissance épidermique humain (HER-2) et les marqueurs de prolifération telle que la cytokératine, Ki-67 (**Prat et Perou, 2011**). A côté de ces marqueurs, l'antigène cancéreux 15-3 (CA 15-3),

l'antigène carcino-embryonnaire, l'activateur de l'urokinase plasminogène et ses inhibiteurs sont également analysés comme marqueurs tissulaires pronostic (He *et al.*, 2020).

I.2.4.4 Typologie des tumeurs mammaires

La classification des cancers du sein a évolué au fil des années, les unes et les autres se complétant. On distingue de ce fait une classification histologique, moléculaire et fonctionnelle du cancer du sein.

a) Types histologiques des tumeurs mammaires et grades

La classification histologique des tumeurs mammaires est en première ligne basée sur son niveau d'expansion et le type de cellules impliquées. On distingue dans ce cas les tumeurs in-situ (localisée) des tumeurs infiltrantes ou invasives, et les tumeurs lobulaires des tumeurs canalaire (Malhotra *et al.*, 2010). En fonction de l'architecture cytologique à l'histologie des tumeurs canalaire *in-situ*, des sous-types ont également été répertoriés (Figure 15).

Les grades histologiques basé sur le niveau de différenciation, sont généralement appliqués aux carcinomes invasifs de tout type. Trois caractéristiques tumorales sont évaluées : la formation de tubules comme expression de la différenciation glandulaire, le pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses. Un système de notation numérique de 1 à 3 est utilisé

- Lors de l'évaluation des tubules et des acini glandulaires, seules les structures présentant des luminescences centrales claires entourées de cellules néoplasiques polarisées sont comptées ; les points de coupure (PC) de 75% et 10% de la surface glandulaire/tumorale sont utilisés pour attribuer le score ($PC > 75\% = 1$, $10\% \leq PC \leq 75\% = 2$, $PC < 10\% = 3$) ; (Tavassoli et Devilee, 2003)

Le pléomorphisme nucléaire est quant à lui évalué pour la zone présentant le plus mauvais degré de pléomorphisme. Il est évalué par rapport à la régularité de la taille et la forme des noyaux des cellules épithéliales normales dans le tissu mammaire adjacent. Les noyaux de score 1 ont une taille très similaire ($< 1,5$) à celle des cellules épithéliales bénignes préexistantes et présentent un pléomorphisme minimal. Les noyaux de score 2 sont 1,5-2 fois la taille des noyaux des cellules épithéliales bénignes, avec un pléomorphisme léger à modéré et des nucléoles visibles. Le score 3 correspond aux noyaux de taille plus de 2 fois supérieure à celle des cellules épithéliales bénignes, avec une chromatine vésiculaire ; (Cioroboreanu et Lazăr 2012).

- Enfin, le comptage mitotique est effectué pour la zone présentant le plus de prolifération. Seules les figures mitotiques définies excluant les noyaux hyperchromatiques et pyknotiques seront comptées. La sélection du champ pour le comptage des mitoses doit se faire à partir du bord périphérique de la tumeur afin de trouver la zone avec la plus grande activité mitotique, et seuls les champs présentant une charge en cellules tumorales représentative doivent être évalués (Ellis et Elston, 2006).

La somme des scores issus des 3 paramètres permettra de définir 3 grades tumoraux dont le grade I (2-5 points) bien différencié, le grade II (6-7 points) modérément différencié et le grade III (8-9 points) faiblement différencié (Cioroboreanu et Lazăr 2012).

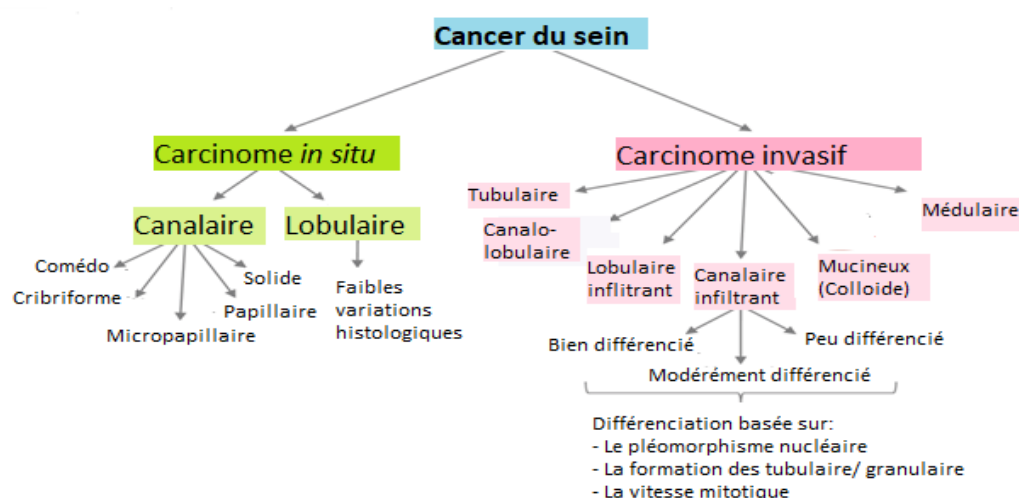


Figure 15: Classification histologique des tumeurs du sein (Malhotra et al., 2010)

b) Types moléculaires des tumeurs mammaires

Dans l'optique d'affiner les pronostics de réponses aux traitements, l'association des marqueurs moléculaires à l'histologie (immunohistochimie) a fait naître une autre classification des carcinomes mammaires (Figure 16). Elle tient en compte en première ligne le niveau d'expression des récepteurs à estrogènes (RE), les récepteurs à progestérone (RP), et *human epidermal growth factor receptor* (HER). A côté de ceux-là, il y'a des marqueurs émergents tel que le taux de claudine, et les marqueurs de la prolifération tel que Ki-67 (McDonald et al., 2016). Statistiquement, environ 70% des cancers mammaires sont RE+ (Nolan et al., 2023).

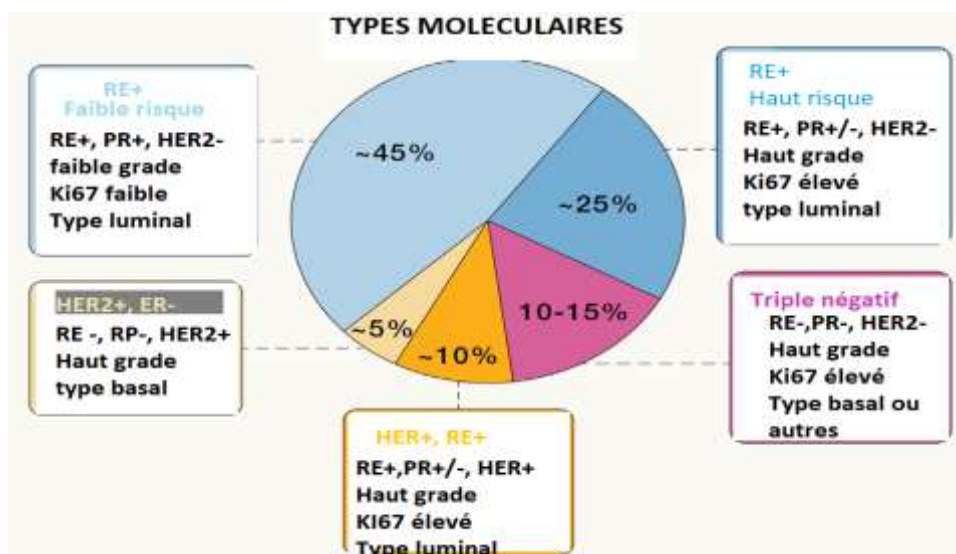


Figure 16: Classification moléculaire du cancer du sein (Nolan *et al.*, 2023).

c) Classification fonctionnelle du cancer du sein

Cette classification est basée sur l'origine des cellules responsables de l'initiation et la progression tumorale, appelées cellules souches cancéreuses (CSC). Elles sont discriminées des autres cellules cancéreuses ayant un potentiel tumorigène plus faible. 2 hypothèses ont donc été prise en considération ; l'une stipulant que, les CSC responsables des différent sous-types moléculaires du cancer du sein proviennent des cellules normales dans la hiérarchie des cellules souches, tandis que l'autre soutient que ces CSC proviennent d'une cellule souche commune (Malhotra *et al.*, 2010).

d) Les phases d'évolution de la maladie

Dans le but d'assurer une meilleure politique de prise en charge, le stade de la maladie est défini en tenant compte de la taille de la tumeur (T), la présence des nodules ganglionnaires (N) et les métastases (M). Ces paramètres ont donc permis de stratifier les tumeurs mammaires en 8 stades (Farhadihosseinabadi *et al.*, 2018; Davidson, 2013).

Tableau I: phases d'évolution selon le critère Taille de la tumeur, présence des nodules et Métastases

Stades	Catégorie TNM
0	TisN0M0 Tis : carcinome canalaire/ lobulaire invasif ou maladie de Paget
I	T1N0M0 , T1 : tumeur de plus grande dimension < 2 cm T0N1miM0/ T1N1miM0 N1 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux et non mobilisable
IIA	T1N1M0 N1 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux et mobilisables T0N1M0/ T2N0M0 , T2 : Tumeur > 20 mm mais ≤ 50 mm dans sa plus grande dimension
IIB	T2 N1M0 T3N0M0 , T3 : Tumeur > 50 mm dans sa plus grande dimension
IIIA	T0/ T1/T2N2M0 ou T3N1/N2M0 , N2 : Métastases dans des ganglions axillaires de niveaux I, II, homolatéraux qui sont non mobilisables et agrégés
IIIB	T4N0 ou N1 ou N2M0 , T4 : Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau (y compris le carcinome inflammatoire)
IIIC	Tout T, N3M0 , N3 : Métastases dans les ganglions sous-claviculaires homolatéraux (niveau axillaire III) avec ou sans implication ganglionnaire axillaire de niveaux I, II
IV	Tout T, tout NM1 , M1 : Métastases à distance décelables et/ou prouvées histologiquement, et de taille supérieure à 0,2 mm

T : taille de la tumeur ; N : présence des nodules nodules ; M : présence des métastases

I.3 Modèles expérimentaux d'étude du cancer du

Trois grands modèles expérimentaux d'étude du cancer en général et celui du sein en particulier ont été développés par la communauté scientifique. Il d'agit des modèles cellulaires, les modèles *in-silico* et les modèles animaux induits.

I.3.1 Modèles cellulaires

En fonction des types moléculaires de cancers mammaires, des lignées cellulaires ont été isolées. Le tableau suivant donne une classification sommaire des lignées cellulaires de cancer du sein (Costa *et al.*, 2020).

Tableau II: Lignées cellulaires de cancer du sein et leurs caractéristiques

Lignées cellulaires		Type	Profil		Marqueurs de
		moléculaire	immunologique		prolifération
MCF-7, SUM185	T47D,	Luminal A	ER+, HER2–	PR+/-,	Ki67 bas
BT474, ZR-75		Luminal B	ER+, HER2+	PR+/-,	Ki67 élevé
SKBR3, 453	MDA-MB-	HER	ER–, PR–, HER2+		Ki67 élevé
MDA-MB-468, SUM190		Basale	ER–, PR–, HER2–		EGFR ⁺ et/ou cytokératine 5/6 ⁺ , Ki67 élevé
BT549, 231, SUM1315	MDA-MB- Hs578T,	Claudine bas	ER–, PR–, HER2–		Ki67, E-cadherin, claudin-3, -4 et -7 bas

I.3.2 Modèles animaux

En fonction de la méthode l'induction de la carcinogénèse chez les animaux, on distingue les modèles transgéniques, les modèles transplantés et les modèles chimiques

I.3.2.1 Modèle transgénique

Cette technique consiste en le transfert d'un gène cloné dans le génome des animaux, faisant naître des organismes génétiquement modifiés (OGM). Ces gènes sont capables d'induire des changements dans les cellules cultivées, conduisant au bout de 6 à 18 mois à des tumeurs dans ce modèle (**Bazm et al., 2018**). Les souris portant une modification d'un seul oncogènes sont dit monogéniques, comparativement aux multigénique portant les modifications d'au moins 2 oncogènes. Des souris transgéniques ERBB2/HER2/neu, TGFβR2, IGF-IR, c-MET sont utilisé en laboratoire comme modèles d'étude dans le cancer du sein (**Regua et al., 2021**). Il existe également des modèles transgéniques induits par des oncogènes dérivés des virus. Il s'agit notamment du modèle induit par l'antigène *Polyoma middle T*, dont la forme hyperplasique montre des niveaux élevés de ER et PR avec des niveaux plus faibles de HER2/neu. Leurs cellules tumorales PyMT perdent l'expression de ER/PR et augmentent les niveaux de HER2 au fur et à mesure de la progression intraépithéliale mammaire et/ou carcinome tardif (**Lin et al., 2003**).

I.3.2.2 Modèles transplantés

Dans cette approche, les cellules sont généralement isolées à partir du tissu tumoral de différentes manières avant d'être transplantée chez l'animal. D'une part, les lignées de cellules tumorales sont cultivées dans des milieux de culture bidimensionnels (2D) ou tridimensionnels (3D) de façon individuelle ou en co-culture (**Bazm et al., 2018**). D'autre part, ces cellules peuvent être extraites de tumeurs humaines, puis cultivées et transplantée. La xénogreffe des cellules est généralement accompagnée d'une induction hormonale pour la promotion de la croissance tumorale. Cette technique implique l'utilisation de lignées cellulaires présentant des phénotypes CD+ 44/CD-24 comme lignées cellulaires initiatrices de tumeurs. La xénogreffe de cellules tumorales est réalisée de trois façons (**Ingvarsson, 1999**) :

- Par injection sous-cutanée (SC) de cellules tumorales dans le dans le coussinet adipeux mammaire des animaux, auquel cas les cellules se reproduisent rapidement dans la région cible.
- Par injection directe des cellules dans les ganglions lymphatiques de la région (xénogreffe orthotopique) ou même dans le coussinet adipeux mammaire, ce qui s'accompagne généralement de la métastase des cellules tumorales.
- Par injection intraveineuse (IV vers la veine caudale) pour induire des métastases pulmonaires ou à d'autres organes. Dans la xénogreffe de coussinet adipeux mammaire.

Par ailleurs, des fragments tumoraux peuvent être cultivés et transplantés en sous-cutané au niveau de l'abdomen (**Rezakhani et al., 2014**)

I.3.2.3 Modèles chimiques

Les composés chimiques cancérigènes sont divisés en composés métalliques (arsenic, plomb et cadmium), hormonaux et chimiques. Les métaux comme le plomb développent différentes tumeurs de diverses manières, notamment en endommageant l'ADN et en empêchant sa synthèse et sa réparation, la formation de radicaux libres, l'augmentation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de facteurs suppresseurs de tumeurs tels que P53 (**Silbergeld et al., 2000**). Par ailleurs, **Mense et al. (2008)** ont induit un cancer du sein par administration sous-cutanée d'une dose de 3 mg d'estradiol (17 β -estradiol) avec développement d'une hyperplasie lobulaire au jour 7 et des tumeurs au jour 120.

Les composés chimiques utilisés pour induire des tissus tumoraux nécessitent des caractéristiques telles qu'une forte tumorigénicité, un tissu cible spécifique, une longue demi-vie, une disponibilité et une capacité de bioprocédé. L'une des classes les plus utilisées pour induire les tumeurs mammaires est celle des hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Bazm et**

al., 2018). Parmi elles on a le N-méthyl-N-nitroso-2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine, le Methylcholanthrene et le 7,12-Diméthylbenz(a)anthracène (DMBA). Ces composés sont utilisés sous forme de promutagène, procarcinogène et tératogène. C'est à l'issue de leur métabolisme hépatique dépendamment par le cytochrome P450, que ses métabolites actifs sont produits et transférés vers les tissus cibles (**Xu et al., 2006**).

Le DMBA est l'un des plus utilisés pour induire les tumeurs mammaires seul, ou suivi par l'administration de promoteurs. Il est administré à une dose unique comprise entre 50 et 80 mg/Kg de PC par voie orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée. Ses métabolites actifs sont le 7-hydroxy méthylbenz(a)anthracène (7-OH-12-MBA) et le 7,12-diOHMBA qui peuvent former des dérivés époxydes (Figure 17). Ces 2 composés peuvent entraîner une dépurination de la molécule d'ADN, conduisant à des mutations et plus tard une tumorigenèse (**Bazm et al., 2018**). Pour accroître sa spécificité, le DMBA est administré par voie sous-cutanée à des jeunes rats d'âge compris entre 4 et 7 semaines dont les cellules mammaires sont encore non différenciées (**Karimi et al., 2018**). Ceci est également favorable au développement ultérieur des tumeurs RE positives (**Tsubura et al., 2011**).

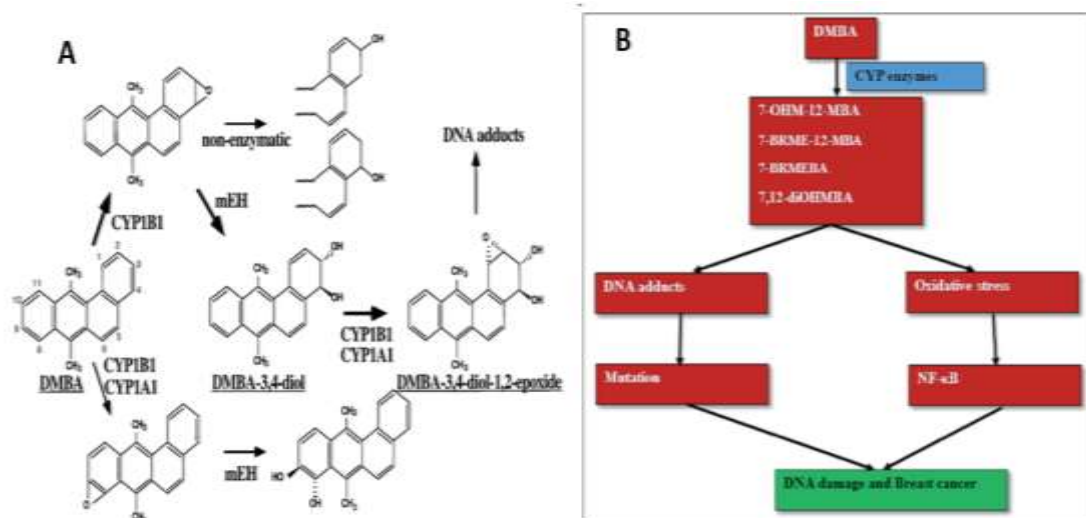


Figure 17 : Métabolisme du DMBA (A) et induction de la tumorigenèse mammaire (B) (**Bazm et al., 2018**)

I.4 Prise en charge du cancer du sein

La stratégie thérapeutique dépend du stade et les caractéristiques biologiques du cancer, l'âge du patient, et les risques et bénéfices (**Farhadhosseinabadi et al., 2018**).

I.4.1 Stratégie de prise en charge du cancer de sein précoce

La plupart des femmes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce subiront une chirurgie suivie d'autres traitements tels que la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie (endocrinienne) et/ou une thérapie ciblée en fonction du type moléculaire et des risques de récurrences (**Cardoso et al., 2016 ; Goss et al., 2016**)

a) Chirurgie

Le principal moyen de traitement local et régional du cancer du sein reste l'intervention chirurgicale qui peut être conservatrice ou totale. La chirurgie de conservation ou tumorectomie consiste à enlever la tumeur et juste une portion de tissu normal. Il existe cependant un risque plus élevé de récurrence locale chez les femmes plus jeunes (moins de 40 ans) et les patientes présentant des tumeurs plus grosses et/ou plus agressives. La chirurgie totale ou mastectomie quant à elle consiste à enlever le sein malade dans son intégralité. L'un ou l'autre procédé est généralement accompagné de l'ablation d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques régionaux de l'aisselle ; ceci dans le but de déterminer l'étendue de la maladie, et s'il faille envisager une intervention chirurgicale ultérieure, une radiothérapie ou des traitements systémiques (**McGuire et al., 2009**).

La chirurgie entraîne cependant une asymétrie mammaire, des douleurs et la raideur de l'épaule ainsi qu'une altération de l'image corporelle (**ARC, 2021**).

b) Radiothérapie

Il s'agit d'une thérapie utilisant des faisceaux ou des particules à haute énergie pour tuer les cellules cancéreuses. Cette thérapie est souvent effectuée après une intervention chirurgicale de conservation pour détruire les cellules cancéreuses restantes dans le sein, la paroi thoracique ou dans la région de l'aisselle. Elle réduit le risque de récurrence et de décès d'environ 50 % et 20 %, respectivement chez les patients ayant subi une tumorectomie. Elle est également prescrite chez les patientes traitées par mastectomie ayant une tumeur supérieure à 5 cm ou si le cancer est présent dans les ganglions lymphatiques (**McDonald et al., 2016**).

La radiothérapie entraîne une fatigue, des douleurs, des œdèmes du sein, une fibrose mammaire, une toxicité cardiaque, la rétraction mammaire et les maux de tête (**American Cancer Society, 2020**).

I.4.2 Stratégie de prise en charge des cancers avancés du sein

La prise en charge du cancer du sein métastatique doit être fonction du sous-type ainsi que des caractéristiques de la maladie et des préférences du patient. Les thérapies systémiques sont les plus sollicitées dans ce cas. Le traitement endocrinien (hormonothérapie), avec ou sans thérapie ciblée, est le pilier de la maladie de type luminal (**Pagani et al., 2014**). Dans le cas d'une maladie triple négative, la chimiothérapie est le traitement principal et doit se faire de façon séquentielle (**Minckwitz et al., 2012**). Pour les tumeurs triple-négatives associées aux cellules immunitaires exprimant PD-L1 et HER2+, les thérapies ciblées ou immunothérapies sont recommandées (**Harbeck et al., 2019**).

a) Chimiothérapie

Les médicaments de chimiothérapie sont des cytotoxines ayant pour propriété commune l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales en agissant sur le cycle. Selon les cibles les cytotoxines peuvent être (Figure 18) :

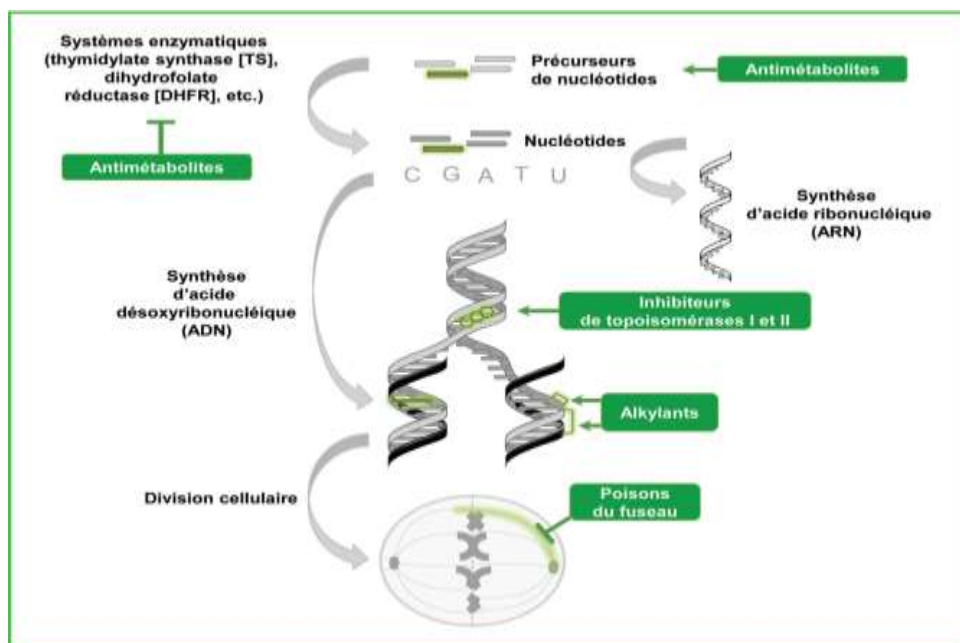


Figure 18: Mécanismes d'action des médicaments de chimiothérapie (**Abotaleb et al., 2018**)

- Les agents alkylants

Ils peuvent être des moutardes azotées des alkylsulfonates, des triazènes. Ils possèdent un ou plusieurs groupements alkyles ou alcoyles, très réactifs, capables de former des liaisons covalentes avec des sites très nucléophiles. Au niveau de l'ADN, ces médicaments se lient préférentiellement à l'azote N7 de la guanine tandis que de nombreux autres sites de liaison sont possibles avec l'ADN, l'ARN ou les protéines via leurs groupements thiol. En établissant

des liaisons covalentes, les alkylants créent des ponts extra- ou intercaténaires, qui inhibent la transcription et la réplication et conduisent à la mort de la cellule. Par ailleurs, ces agents sont responsables de la libération de radicaux libres entraînant des cassures de la chaîne d'ADN (Sadiq *et al.*, 2020).

- **Les antimétabolites**

Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques de l'ADN (et parfois de l'ARN), en empêchant l'activité de diverses enzymes clés. Ils sont à cet effet efficace sur les cellules en phase S du cycle cellulaire. Ils peuvent être des analogues de l'acide folique reconnus par les enzymes clés du cycle des folates. Ils bloquent ainsi le cycle des folates, inhibant de manière indirecte la thymidylate synthase (TS), enzyme indispensable pour la synthèse des bases pyrimidiques telles que la thymine. Certains antimétabolites sont des analogues pyrimidiques qui ont la capacité d'inhiber la synthèse des nucléotides pyrimidiques. Parmi eux, la 5-fluorouracile interagit avec les enzymes du métabolisme des pyrimidines et peut être phosphorylée en triphosphate et incorporé à la place de l'uracile dans les ARN messagers. La dernière catégorie des antimétabolites regroupe les analogues de purines qui agissent principalement en inhibant l'adénosine désaminase, enzyme clé pour la synthèse des purines (Abotaleb *et al.*, 2018).

- **Les agents intercalant et inhibiteurs des topoisomérases :**

Les agents intercalants sont une famille d'agents antitumoraux qui peuvent s'insérer dans la double hélice de l'ADN par le biais d'interactions non covalentes, entraînant des modifications structurelles de l'ADN et l'arrêt de la réplication (Zhao *et al.*, 2023 ; Tenconi et Rigali, 2018). L'effet cytotoxique est obtenu suite à l'inhibition des topoisomérases (ou DNA-gyrase) par des composés administrés en complément tel que l'étoposide (Mastrangelo *et al.*, 2022).

- **Les poisons du fuseau ou poisons mitotiques :**

Ces médicaments se lient à la tubuline qui entre dans la composition du fuseau mitotique et qui joue un rôle important dans le maintien du cytosquelette. Ils agissent ainsi au moment de la mitose et entraînent la mort de la cellule. Plusieurs types de poisons du fuseau sont distingués en fonction de leur structure, de leur origine (souvent naturelle) et de leur site de liaison sur la tubuline ce sont généralement les taxanes et les alcaloïdes (Renard, 2013).

De façon générale, les agents alkylants, les antimétabolites et les inhibiteurs de topoisomérases altèrent les capacités de réplication et de transcription des gènes, en induisant

des modifications des acides nucléiques, tandis que les poisons du fuseau inhibent les capacités de mitose de la cellule tumorale.

La chimiothérapie peut être responsable des effets indésirables tels que l'alopécie, les nausées, l'immunodépression, l'anémie, les dysménorrhées, l'infertilité, l'insuffisance cardiaque, et l'hépatotoxicité (Adamowicz et Baczkowska-Waliszewska, 2020).

b) Thérapies ciblées dans la prise en charge du cancer du sein

Différents inhibiteurs de récepteurs membranaires ont montré une activité dans le cancer du sein. Ils comprennent les anticorps monoclonaux, qui bloquent les récepteurs de surfaces des cellules cancéreuses tel que le récepteur de la mort programmée PD-1, les récepteurs de facteurs de croissance, les modulateurs de l'angiogenèse. L'autre classe concerne les petites molécules pouvant traverser la membrane plasmique et inhiber les protéines anti-apoptotiques, les seconds messagers intracellulaires ou moduler les voies métaboliques et épigénétiques (Figure 19). Par ailleurs, différents inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) ont démontré une bonne efficacité chez les patientes atteintes d'un cancer du sein présentant une mutation germinale du gène BRCA (Hu et McArthur, 2018 ; Rugo *et al.*, 2016).

Bien que spécifiques, ces médicaments peuvent entraîner des effets indésirables tels qu'une l'asthénie, les lésions cutanées, l'hypertension et les malaises gastro-intestinaux (Du *et al.*, 2021).

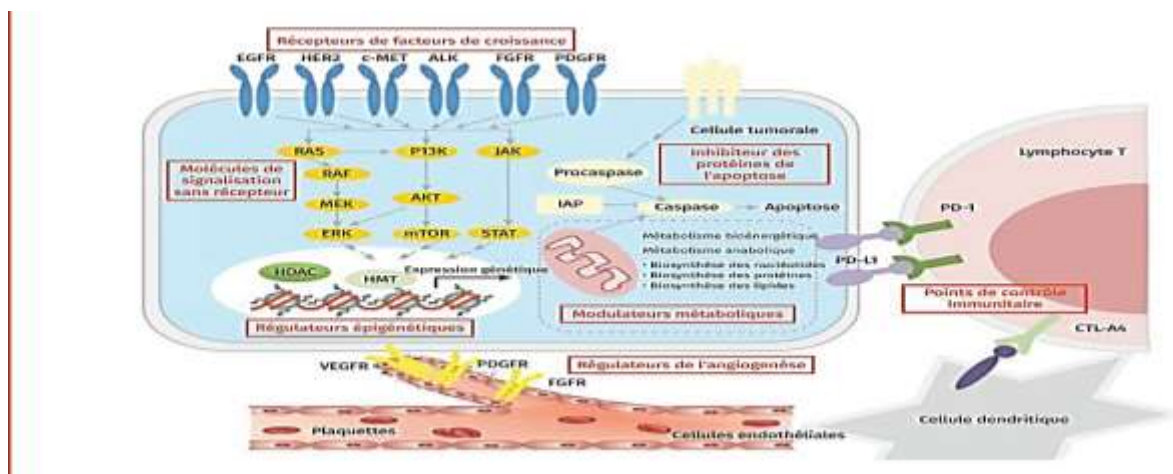


Figure 19: Stratégies thérapeutiques en thérapie ciblée (Shuel, 2022)

c) Immunothérapie dans la prise en charge du cancer du sein

Elle est plus adaptée pour les cancers du sein triple négatif dont le pronostic est faible (Abotaleb *et al.*, 2018). L'enjeu de l'immunothérapie est de réactiver ou de renforcer l'immunité anticancéreuse, afin de contrôler le développement tumoral, en ciblant entre autres des *checkpoint* (Verret et Loirat, 2016). En effet, il existe au sein de la tumeur différents types de cellules immunitaires avec des rôles opposés soit pro- (LT régulateurs, MAT) ou antitumoral (LT effecteurs, MAT). Toutes ces cellules interagissent entre elles et avec les cellules tumorales par le biais de différentes protéines de surfaces, ce qui constitue des *checkpoints* accessibles à un traitement ciblé (Demaria *et al.*, 2011). Ces molécules peuvent établir des liaisons avec la *PD-1* et la *cytotoxic T-lymphocytes-associated protein-4* (*CTLA-4*) (Figure 20). Cette dernière régule négativement les lymphocytes T, et son blocage permet une restauration de l'action des lymphocytes. La *PD-1* quant à elle est une protéine exprimée à la surface des lymphocytes T activés, qui lorsqu'elle est stimulée par son ligand (*PD-L1*), exprimé à la surface des cellules tumorales et stromales, inhibe l'activation lymphocytaire (Topalian *et al.*, 2012).

L'autre stratégie consiste en l'administration des vaccins antitumoraux dont le principe est d'éduquer ou de renforcer le système immunitaire, principalement les lymphocytes T CD8+ et CD4+, à reconnaître la tumeur, via les épitopes dérivés des antigènes spécifiques de la tumeur et présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Emens *et al.*, 2012).

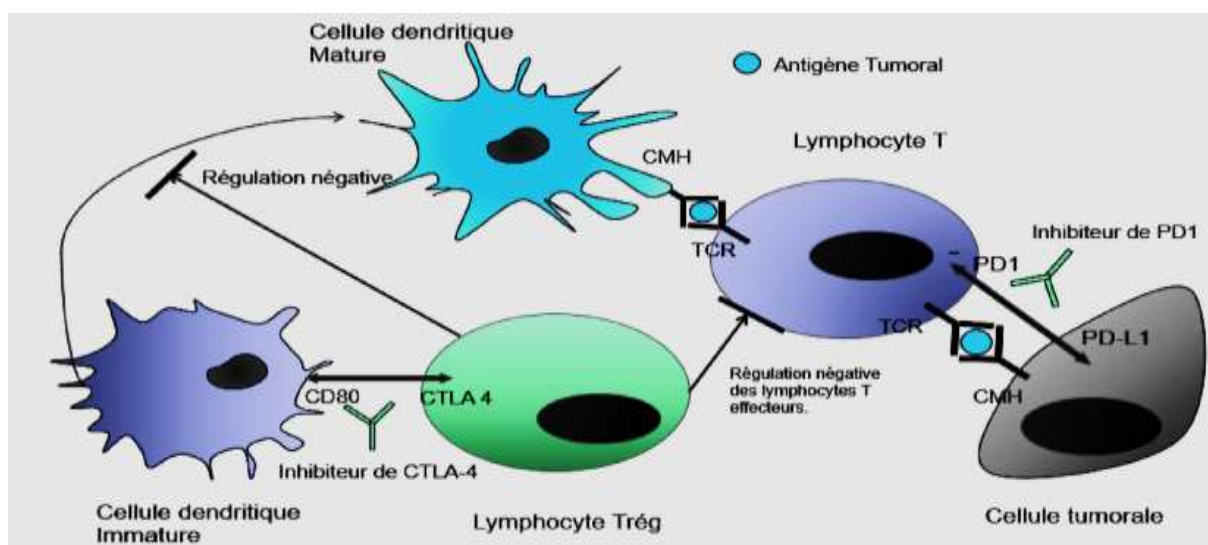


Figure 20: Mécanismes d'action des modulateurs de l'immunité (Verret et Loirat, 2016)

d) Hormonothérapie dans la prise en charge du cancer du sein

L'hormonothérapie est administrée aux patientes atteintes d'un cancer du sein ER+/PR+ afin de diminuer le taux d'œstrogènes ou de bloquer la croissance cancéreuse du sein. Ces traitements sont de 3 catégories (Figure 21) ; d'une part il y a les inhibiteurs de l'aromatase, limitant la synthèse des œstrogènes au niveau des tissus adipeux. Si l'on craint un risque accru d'ostéoporose ou une intolérance aux, les modulateurs sélectifs des RE tel que le tamoxifène peuvent être prescrits. Cependant, il est suggéré d'associer au tamoxifène des supprimeurs de la fonction ovarienne (Inhibiteurs de GnRH) et l'exémestane, uniquement chez les patients ayant subi une chimiothérapie (Pagani *et al.*, 2014).

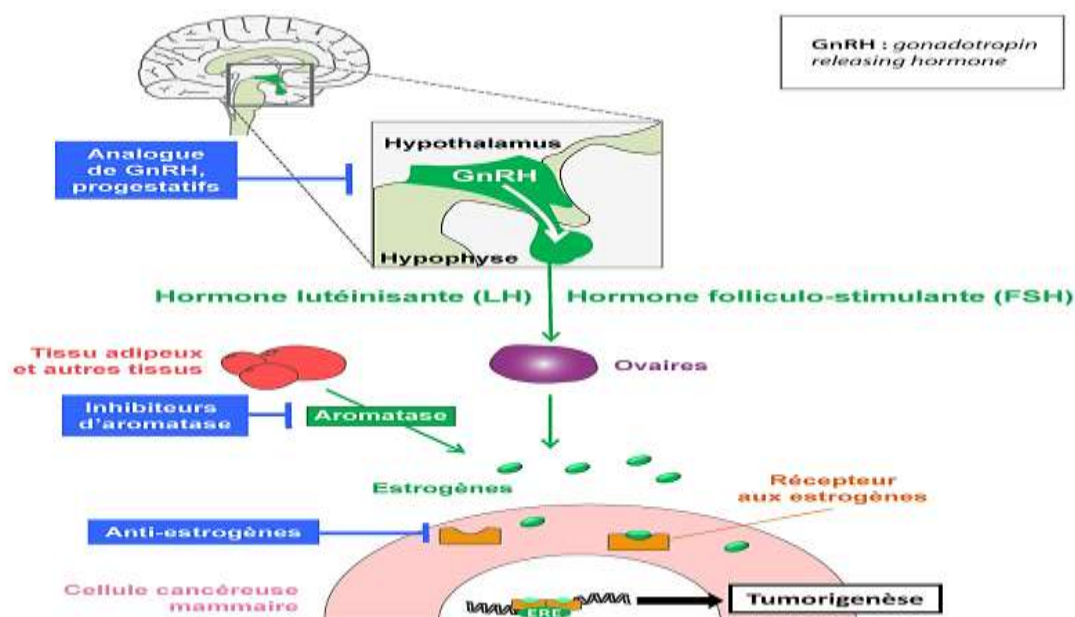


Figure 21: Mécanisme d'action des médicaments utilisés en hormonothérapie (Pagani *et al.*, 2014)

L'hormonothérapie peut cependant entraîner des bouffées de chaleur, la sécheresse vaginale, la baisse de la Libido, le cancer de l'endomètre, ostéoporose et les douleurs articulaires (Adamowicz et Baczkowska-Waliszewska, 2020).

I.5 Généralités sur le tamoxifène

Le tamoxifène (TAM), de son nom chimique (Z)-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-diméthylethanamine, est un traitement chimio/hormonal largement et fréquemment prescrit pour la prévention et le traitement de tous les stades du cancer du sein RE positif chez les femmes pré et post-ménopausées (Chunjie *et al.*, 2016). Il est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) comme traitement adjuvant du cancer du sein métastatique et post-chirurgical pour éliminer les micrométastases (Ahmed et Lennard,

2009) et sert de médicament préventif pour les personnes saines à haut risque (**Rong et al., 2015**). Il est commercialisé sous le nom de Nolvadex®

I.5.1 Pharmacocinétique du tamoxifène

La pharmacocinétique est l'étude du déroulement temporel de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (ADME) d'un médicament après son administration dans l'organisme (**Jianghong et Lannoy, 2013**).

I.5.1.1 Administration et absorption

Le TAM est disponible sous forme de comprimés enrobés administré par voie orale. Le schéma posologique utilisé pour le traitement et la prévention du cancer du sein invasif est de 10 mg deux fois par jour ou 20 mg une fois par jour pendant 5 ans. La biodisponibilité orale de la TAM est élevée, environ 100 % (**Huda et al., 2020**).

I.5.1.2 Distribution

Le tamoxifène est insoluble dans l'eau et se répartit dans les membranes lipidiques, ce qui entraîne une destruction oxydative accrue. Une fois dans l'organisme, le tamoxifène se lie à 99% aux protéines sériques, principalement l'albumine et la globuline, afin de faciliter son transport (**Shahbaz et al., 2017**). Son volume de distribution est de 50-60 L/kg (**Lien et al., 1991**).

I.5.1.3 Métabolisme du tamoxifène

Le tamoxifène est un pro-médicament, ne possédant donc que peu ou pas d'activité pharmacologique. Son activation se fait *in vivo* par des réactions enzymatiques ou chimiques ou par une combinaison des deux (**Hansten, 2018**). Après administration orale, le TAM est largement métabolisé dans le foie par des enzymes de phase I et de phase II du complexe enzymatique lié au cytochrome P450 notamment le CYP2D6 et du CYP3A (**Shahbaz et al., 2017**). Sous l'action de ces enzymes, le TAM subit une série de réactions, notamment, la N-déméthylation, la N-oxydation, l'époxydation, l'hydroxylation et l'isomérisation, aboutissant respectivement à l'aminotamoxifène, au N-déméthyl tamoxifène et au 4-hydroxyl-N-déméthyltamoxifène (endoxifène), au N-oxyde de tamoxifène, à l'époxitamoxifène, l'alpha hydroxytamoxifène et au 4-hydroxyltamoxifène (Figure 22) (**Musa et al., 2007**). Cependant, seul le 4-hydroxytamoxifène, le N-desméthyltamoxifène et le 4-hydroxy-N-desméthyltamoxifène (endoxifène) ont une forte affinité pour le RE (**Nazarali et Narod,**

2014). En outre, le principal métabolite responsable de l'activité antiproliférative du tamoxifène est l'endoxifène (Hansten, 2018).

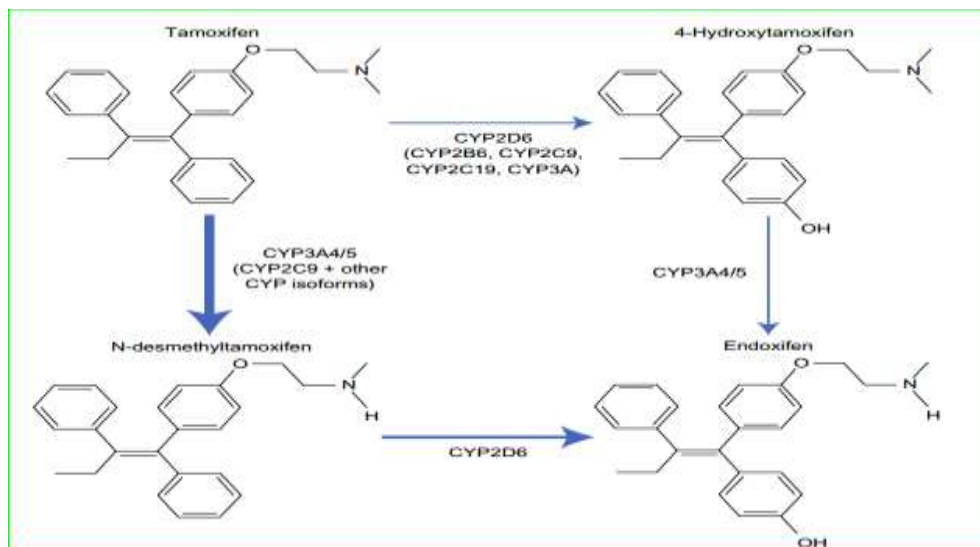


Figure 22: Métabolisme du tamoxifène (Musa *et al.*, 2007)

1.5.1.4 Excrétion

La demi-vie du TAM et de ses métabolites est d'environ 5 à 7 jours après une dose unique (Fedro *et al.*, 2020). Le TAM est éliminé via les réactions de détoxification de phase II catalysées par les glycosyltransférases sous forme de TAM-O-glucuronide dans l'urine. De même, le tamoxifène et/ou ses métabolites peuvent subir le cycle entéro-hépatique important.

1.5.2 Mécanisme d'action antitumorale du tamoxifène

Le TAM se lie de manière compétitive ou antagoniste au RE sur tissu mammaire, empêchant ainsi l'apport d'œstrogènes nécessaire à la croissance des cellules cancéreuses à RE positifs (Adikwu *et al.*, 2020 ; Schuurman *et al.*, 2019). Cette liaison produit un complexe nucléaire qui diminue la synthèse de l'ADN, inhibe l'action des œstrogènes et bloque l'angiogenèse (Karn *et al.*, 2010), la croissance, la prolifération et la survie des cellules (Colleoni et Munzone, 2015). De plus, le tamoxifène a des effets cytostatiques provoquant l'accumulation des cellules dans les phases G0 et G1 du cycle cellulaire (Derya *et al.*, 2018). Il induit une activation de la protéine kinase C ainsi que l'augmentation de l'activité des cellules NK (Karn *et al.*, 2010). Par ailleurs, le 4-hydroxytamoxifène inhibe la transcription des gènes sensibles aux œstrogènes en formant le complexe ER/tamoxifène qui amène des protéines co-répressives telles que le corépresseur des récepteurs nucléaires (NCoR) à réguler les fonctions de plusieurs gènes (Wong *et al.*, 2014).

I.5.3 Effet indésirables associés à la prise du tamoxifène

Le tamoxifène a montré son succès dans la prise en charge du cancer mais avec des effets toxiques graves, notamment une myélosuppression, une toxicité gastro-intestinale, une cardiotoxicité, une hépatotoxicité, une neurotoxicité, et bien d'autres (**Liu et al., 2018**).

I.5.3.1 Induction du cancer de l'endomètre

Des recherches récentes ont prouvé que le tamoxifène augmente le risque de cancer de l'endomètre chez les femmes d'environ 2 à 7 fois via l'élévation des niveaux d'œstradiol (**Günter et al., 2020**). Chez les patientes souffrant d'affections endométriales telles que l'hyperplasie avant le traitement au tamoxifène, le taux de progression vers des lésions endométriales de stade plus avancé est de près de 50 % (**Garuti, 2006**). Par ailleurs, le tamoxifène en lui-même agirait comme agoniste des RE au niveau de l'endomètre.

I.5.3.2 Hépto-toxicité et Néphro-toxicité du tamoxifène

Le TAM est connu pour provoquer une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) chez les patients concernés (**Yoo et al., 2020 ; Hamid et al., 2015**) et d'autres effets secondaires hépatiques tels que l'élévation des tests de la fonction hépatique, l'ictère, la diminution des protéines totales, la cholestase et la nécrose hépatique massive (**Pan et al., 2015 ; Cole et al., 2010**). Le mécanisme par lequel le TAM provoque l'hépatotoxicité n'est pas bien compris ; cependant il a été démontré que le TAM provoque une diminution de la β -oxydation mitochondriale et des dommages oxydatifs hépatiques. Ceci passerait par une augmentation de la peroxydation lipidique hépatique, ainsi qu'une déplétion des enzymes antioxydantes hépatiques, la libération d'ions fer libres qui participent à la génération de radicaux hydroxyles (**Miyamura et al., 2016**). C'est par ces mêmes mécanismes que le TAM induirait des dommages rénaux tel que répertorié dans la littérature (**Saleh et al., 2016 ; Zuhair, 2011**).

I.5.3.3 Autres effets toxiques du tamoxifène

Des évidences scientifiques indiquent que, le TAM causerait également des troubles dans le système immunitaire (**Hugo et al., 2019 ; Panchal et al., 2014**), digestif (**Jordan and Assikis, 1995**) et oculaire (**Garima, 2018**). On note également des signes généraux de toxicité tel que l'alopecie, l'agressivité, la perte de poids, les saignements vaginaux et la fatigue (**Panchal et al., 2014**).

Face aux effets indésirables associés aux différents traitements, les patients ont recours à des thérapies alternatives et complémentaires telle que l'acupuncture et la phytothérapie.

I.6 Traitement alternatif et complémentaire dans la prise en charge du cancer du sein : la phytothérapie

Des enquêtes menées auprès des patients sous traitement conventionnels ont indiqués que ces derniers avaient également recours à la phytothérapie pour booster l'efficacité des traitements ou pour faire passer les effets indésirables associés à ceux-ci (**Chin et al., 2020 ; Liao et al., 2013**). Ces données ont donc été à la base de nombreux travaux scientifiques visant à évaluer l'effet des suppléments alimentaires et extraits de plantes dans la prise en charge des cancers. Les composés bioactifs qu'ils contiennent sont en principe capables d'agir à différents niveaux de la carcinogenèse (**Prasad et al., 2017**) à travers des mécanismes variés (Figure 23).

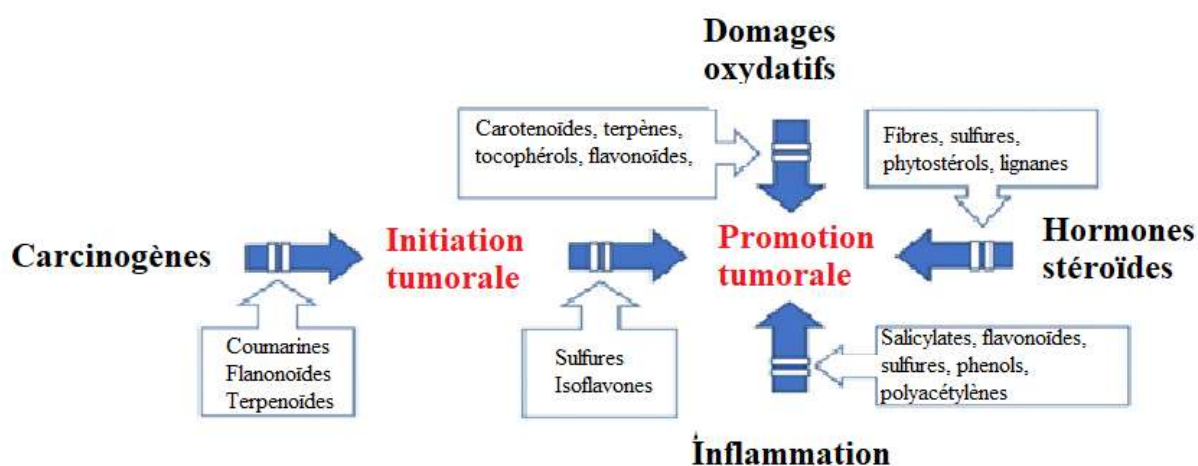


Figure 23: Inhibition de la progression tumorale par les composés bioactifs de plantes (**Prasad et al., 2017**)

I.6.1 Mécanismes d'action des composés bioactifs dans la lutte antitumorale

Les classes de composés bioactifs les plus étudiés sont les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes. Ces composés agissent en modulant la transcription des gènes, l'expression des protéines, en bloquant les récepteurs membranaires, en inhibant les voies internes de transduction du signal ou en induisant un stress intracellulaire. Ces différentes actions ont pour conséquences un arrêt du cycle cellulaire, une inhibition des mécanismes de survie, une inhibition de l'angiogenèse tumorale et invasion, une induction de la mort cellulaire (**Rampogu et al., 2022 ; Ateba et al., 2018 ; Mocanu et al., 2015**). La Figure 24

ci-dessous présente quelques mécanismes d'action antiproliférative des métabolites secondaires des plantes.

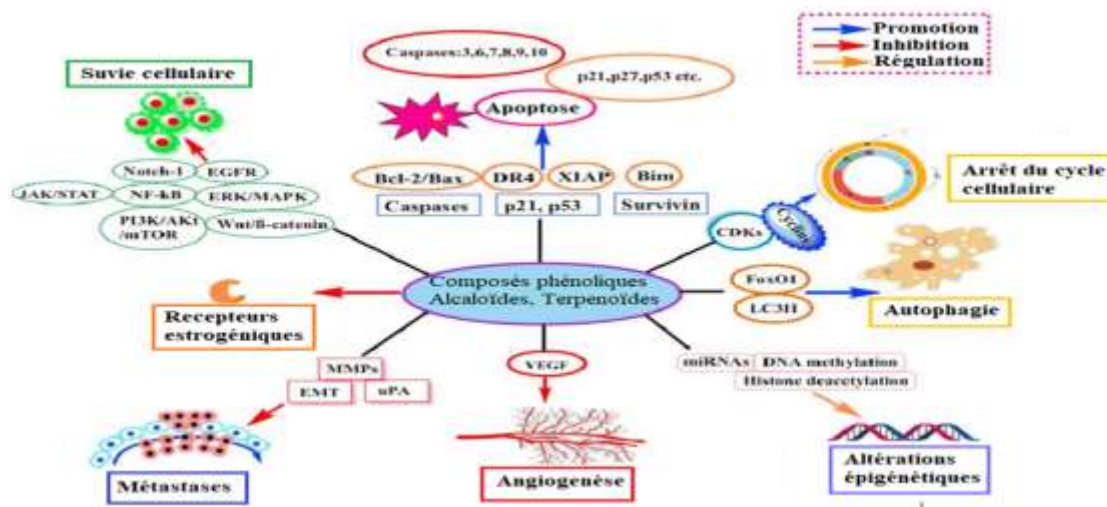


Figure 24: Mécanisme d'action antiproliférative des composés bioactifs adapté de **Kamran et al. (2022)**

I.6.2 Phytothérapie et prise en charge complémentaire du cancer du sein

Il a été montré que, la supplémentation en acide décoxahexanoïque (DHA) facilite l'action de la Doxorubicine dans les cellules MDA-MB-231 et chez les souris nu/nu, via l'amplification de l'effet de la doxorubicine sur l'apoptose et les gènes du cycle cellulaire (**Ewashuck et al., 2012**). Par ailleurs une enquête a révélé que, des produits végétaux tels que le gingembre, la camomille, la menthe, la cardamome et l'oignon étaient utilisés par les patientes pour réduire la nausée et les vomissements associés aux traitements conventionnels (**Habibeh et al., 2020**). Il a également été rapporté que, *Uncaria tomentosa* utilisé en médecine traditionnelle chinoise aiderait à la restauration de l'ADN cellulaire, prévenant ainsi les mutations et les dommages cellulaires causés par les médicaments de chimiothérapie et la radiothérapie (**Santos et al., 2012**).

En outre, **Mbong et al. (2020)** avaient montré que, les extraits de *Coffea arabica* et *Cola anomala* protégeaient les rats Wistar contre le stress oxydant et le désordre métabolique associés à la prise du méthotrexate par les rats Wistar. De même, **Mvondo et al. (2020)** ont montré que, les extraits des noyaux de *Pearsea americana* protégeaient l'endomètre utérin contre une hyperplasie induite par le tamoxifène chez des rates Wistar ovariectomisées.

Face à ces données intéressantes, il convient que la phytothérapie reste une approche prometteuse pour l'amélioration de la prise en charge des cancers. Les recherche devraient donc être continuellement menées dans ce sens.

I.7 Généralités sur la plante d'intérêt : *Aframomum angustifolium*

Aframomum angustifolium est une plante de la famille des Zingibéracée poussant dans les vallées et les régions humides. En Afrique *A. angustifolium* est présente dans les pays tels que l'Angola, le Benin, le Burundi, le Cameroun, le Congo, la Côte d'Ivoire, la Guinée Equatoriale, l'Éthiopie, le Gabon, le Ghana, le Kenya, le Madagascar, le Malawi, la Mozambique, le Nigeria, l'Ouganda, la RDC, le Rwanda, le Soudan, la Tanzanie, le Togo, la Zambie et le Zimbabwe (www.lavierebelle.org/afmomum-angustifolium-igitunguru). Elle appartient à une grande famille de plantes à activités anticancéreuses et anti-inflammatoires prouvées (Amadi *et al.*, 2016 ; Kuété *et al.*, 2014).

I.7.1 Classification botanique d'*A. angustifolium*

Le tableau III ci-dessous résume la classification botanique d'*A. angustifolium*

Tableau III: Classification botanique d'*A. angustifolium*

Domaine	BIOTA
Règne	PLANTAE
Classe	LILIOPSIDA
Sous-classe	LILIIDAE
Ordre	ZINGIBERALES
Famille	ZINGIBERACEAE
Genre	<i>Aframomum</i>
Espèce	<i>angustifolium</i>

Noms usuels : En français, cette plante est connue sous le nom de cardamome. Au Madagascar, elle est appelée *Longoza*, *sintogno*, *Longozakely* (Rakotonirina, 2019). Au Cameroun, son appellation varie d'une langue vernaculaire à l'autre. Ainsi on l'appelle « *tsouh* » en *Ghomala* dans les Hauts-Plateaux et le Nkung-khi, « *tchouh* » en *Guemba* dans la Mifi, « *chuchu* » en *Fèfè* dans le Haut-Nkam et *Ngwaka* en *Bulu*.

I.7.2 Description botanique d'*A. angustifolium*

Aframomum angustifolium se présente comme une grande plante herbacée vivace, de 1,5 à 4 m de haut, issue de rhizomes étendus et possédant des grandes feuilles simples, alternes et caduques, de couleur verte. Elle possède des fleurs en forme de trompette, de couleur jaune ou rosée qui s'organisent en épis. Ces fleurs groupées en inflorescences de 4 à 10 fleurs, apparaissant à la base des pousses feuillées. Elles ont des pétales rouges, un labelle jaune ou orange pâle. Les fruits sont ovoïdes à sub-globuleux dont la taille pourrait varier de 7 à 9,5 cm de long, y compris le calice dont la couleur est rouge à maturité. La tige est très rigide lorsqu'elle atteint une hauteur 1,50 m à 2 m. La plante a une odeur fruitée, avec des notes d'abricot, épicée et sucrée, légèrement poivrée. Les graines ressemblent à celles du poivre et de la cardamone par leur goût épicé, piquant avec un arrière-goût légèrement âcre (Rakotonirina, 2019).



Figure 25: Photographie d'un plant (A), des fruits (B) et des graines (C) d'*A. angustifolium* (Photographié par Makamwé, 2019)

I.7.3 Utilisations traditionnelles d'*Aframomum angustifolium*

Toutes les parties de la plante sont utilisées seules ou en association, sous différentes préparations. Elle est très utilisée en médecine traditionnelle congolaise (RDC) et malgache. On note également leur utilisation au Libéria, Kenya, Cameroun, Congo Brazzaville, Nigéria, Burundi, Tanzanie, Angola, Ouganda, et République Centrafricaine (Inkoto *et al.*, 2021). Le tableau ci-dessous est un résumé de l'utilisation traditionnelle d'*A. angustifolium*.

Tableau IV: Utilisation ethnopharmacologique d'*A. angustifolium*

Partie de la plante	Voie d'administration (préparation)	Affections prises en charge	References
Plante entière	Cutanée (pâte)	plaies	Konda et al., 2012
Tige	Orale (Décoction)	hémorroïdes	Konda et al., 2012
	Mastication	vers intestinaux	Kamatenesi et al., 2011
	Orale (Macération)	diarrhée et choléra	Abondo et al., 1991
Feuilles	Orale (Décoction)	toux, tachycardie	Ngezahayo et al., 2015
	Bain de vapeur	Diabète	Ratovondramamy, 2008
	Massage (pâte)	Pneumonie	Konda et al., 2012
	;Orale (macération)	Douleur articulaire, céphalées, fièvre Mal gastrique	
Fruits	Orale (décoction)	Splénomégalie,	Konda et al., 2012
		ascite, rougeole	Walsh, 2009
		Aliment	Ratovondramamy, 2008
			Tarashima et Ishikawa, 2003
Grains	Orale (décoction)	Anti helminthes	Githiori, 2004
Racines	Orale (décoction)	Epilepsie, fièvre jaune,	Lautenschläger et al., 2018 ; Tugume et al., 2016 ; Konda et al., 2012
		renforcement du système immunitaire	

I.7.4 Synthèse des travaux antérieurs effectués sur *Aframomum angustifolium*

Les travaux effectués sur *A. angustifolium* portent sur sa valeur nutritive, la phytochimie et les propriétés biologiques

I.7.4.1 Valeur nutritive d'A. angustifolium

Les grains, la pulpe et la peau des fruits d'*A. angustifolium* peuvent être de bonne source de macro et micronutriments. Selon les travaux de **(Kaana et Samuel, 2018)**, les graines contiennent environ 3,55% de cendres, 2,59% de lipides, 13,72% de fibres, 23,5% de protéines et 43,96% d'hydrates de carbone. La pulpe et la peau sont moins riches en ces différents éléments, excepté le taux de lipide qui varie de 65,30% pour la pulpe à 41,06% pour la peau.

I.7.4.2 Criblage phytochimique et toxicité

le criblage photochimique des extraits de graines et de peau d'*Aframomum angustifolium* a montré qu'ils contiennent des flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les saponines, les glucosides cardiques et des triterpènes **(Anywar et Kirimuhuzya, 2015)**. Par ailleurs, les huiles essentielles extraites des graines d'*A. angustifolium* se sont montrés riches en β -pinene, (24.8%), β -caryophyllène (17.8%) Cis-pinocarvyle acetate (11%), Myrtenyl acetate (8.5%), Trans-pinocarvyle (5.3%), Caryophyllène oxide (3.5%), α -pinene (3.3%), Sabinene (2.7%), α -humulene (2.9%) et le α -terpineol **(Baser et Kürkçüglu, 2001)** qui sont des composé à potentiel antiprolifératif prouvés **(Inkoto et al., 2021)**.

Il a été montré que, l'extrait hydro-éthanolique des fruits présente un effet toxique chez les souris. Par ailleurs, les travaux **d'Ebhohimen et Okolie (2021)** ont révélé un effet hépatotoxique de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*, administré pendant 28 jours à une dose de 1000mg/Kg de poids corporel. Cependant, à des doses inférieures (750 et 350 mg/Kg,PC), cet extrait s'avère non toxique dans les mêmes conditions.

I.5.4.3 Propriétés pharmacologiques d'A. angustifolium

Le peu d'études antérieures réalisées avec *A. angustifolium* fait état de ses activités antimicrobienne, anti oxydant, antiâge, hépato et néphroprotecteur **(Inkoto et al., 2021)**.

- Activité antimicrobienne

Les extraits à l'éther et au méthanol des peaux mûres d'*A. angustifolium* inhibent la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec des concentrations inhibitrice 50 de 125 mg/mL **(Anywar et Kirimuhuzya, 2015)**

- Activité antioxydante

Ebhohimen et al. (2017) ont montré que, la chaleur réduisait le potentiel chélateur et piègeur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*. Egalemeant, le pouvoir réducteur

des extraits aqueux et éthanolique serait réduit par un traitement thermique de 30 minutes tandis que le pouvoir piégeur de l'oxyde nitrique augmenterait avec le traitement thermique. Par ailleurs, les travaux effectués par **Edemhanria et al. (2020)** ont montré que, les huiles essentielles de grains d'A. *angustifolium* ont la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique des tissus hépatiques et rénaux congelés de bœufs.

- Activité antiâge

Les études d'**Andre et al. (2008)** ont révélé que le cosméceutique contenant l'extrait de graines d'A. *angustifolium* produisait un effet de rajeunissement global en termes de rougeur, de pigmentation et de ridules similaire à celui constaté en utilisant une source de lumière pulsée intense. Ces extraits serviraient donc à préserver ou restaurer la structure de la peau, notamment par stimulation de la synthèse du collagène VII de la jonction dermo-épidermique et de l'élastine. Ils pourraient également agir sur les fibres d'oxytaline et/ou les fibres d'élaunine.

- Effet hépato et néphroprotecteur

Les travaux d'**Ebhohimen et al. (2020)** et **Ebhohimen et Okolie (2021)** ont révélés que, l'extrait éthanolique de graines d'A *angustifolium* administré aux doses de 10, 100 et 750 mg/Kg, PC accélérât la réparation de l'hépatite et la néphrotoxicité induite par le Bromure de potassium chez les rats. Cette réparation se ferait à travers la stimulation du système antioxydant endogène, avec une augmentation de l'activité de la catalase et une baisse du taux de malondialdéhyde **Ebhohimen et al. (2020)**.

-Autres potentiels pharmacologiques possibles mais non explorés.

Aframomum angustifolium est une plante riche en terpenoïdes, constituant environ 81,7% de sa composition en l'huile essentielle. La présence de ces composés tels que le β -caryophyllène, le limonène, le β -pinène et α -pinène (**Inkoto et al., 2021**) pourrait lui conférer des propriétés biologiques telles que antiinflammatoires, cytotoxiques, pro-apoptotiques et même antitumoraux. D'où l'intérêt d'évaluer les propriétés anticancéreuses d'un extrait éthanolique de ses graines ayant fait l'objet de la plupart des études antérieures.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel

Le matériel utilisé dans ce travail était constitué de matériel végétal, matériel animal, appareils et réactifs.

II.1.1 Matériel végétal

Du fait de sa vaste répartition géographique et de son appartenance à une famille de plante à potentiel anticancéreux prouvés *Aframomum angustifolium* était l'objet d'étude. Ses graines ont été utilisées de par la présence dans leur huiles essentielles, de composés à potentiel antiprolifératif et de la capacité de son extrait éthanolique à protéger le foie et les reins d'une toxicité, réguler les gènes liés au renouvellement épidermique (**Inkoto et al., 2021**). Le matériel végétal était constitué des graines de fruits d'*Aframomum angustifolium*. Les fruits matures (de couleur rouge) ont été récoltés entre Avril et Juillet 2019 dans la localité de Baham du Département des Hauts-plateaux (altitude ; 1700 mètres ; 5°20'04" Nord, 10°22'08" Est). La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun comparativement au spécimen enregistré au numéro 44827/HNC du 14 Février 1998. Les fruits ont été transportés au Laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle.

II.1.2 Matériel animal

Il était constitué de lignées cellulaires et de rats albinos femelles de souche *Wistar*.

II.1.2.1 Lignées cellulaires

Face à l'impérieuse nécessité de développer de nouvelles stratégies anticancéreuses, l'évaluation précoce d'agents thérapeutiques sur plusieurs modèles tumoraux s'impose. Les caractéristiques fondamentales communes aux cellules cancéreuses indépendamment de leur origine telles que la prolifération anarchique, l'évasion apoptotique ou l'adaptation métabolique, légitiment une approche transversale. Ainsi, les Lignées cellulaires cancéreuses murines adhérentes du gliome (CT2A et GL261) et du mélanome (YUMM1.7 et B16-F1) ainsi que celle du cancer du sein humain (MCF-7) ont été utilisées. Elles provenaient du laboratoire d'immunologie de la *Yale University School of Medicine*. La description de ces lignées est présentée à l'**annexe 1**.

II.1.2.2 Animaux expérimentaux

Pour cette étude, quarante-deux (42) rates albinos de souche *Wistar* et âgées de 6 semaines ont été utilisées. Elles provenaient de l'animalerie du Département de Biologie et Physiologie Animal de l'Université de Yaoundé I. Parvenus au LNNB elles ont aléatoirement été réparties dans les cages métaboliques, constituées de bassines en plastique recouvertes de grillages et tapissées copeaux de bois blanc. Les cages étaient nettoyées tous les 2 jours. L'environnement était plongé dans un cycle de 12 heures jour et 12 h nuit, à température ambiante ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$). Elles étaient nourries d'une diète standard et avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux ont été acclimatés pendant 7 jours avant leur utilisation.

II.1.3 Appareils, instruments et consommables

Les appareils et instruments utilisés étaient constitués d'une balance électronique sensible (AHAUS), un blender (*Sayonna, Chine*), une étuve ventilée (*Binder*), un spectrophotomètre UV-Visible (*Fisher*), un lecteur de microplaque (*DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter*), un thermocycleur (*Biorad*), un incubateur (*Thermofisher*), un bain marie (*Bioline Scientific*), un microtome (*Biobase*), une plaque réfrigérante (*Plac-center SELECTA*), un microscope optique (*Bresser Junior set*), un lecteur luminex (*Bioplex*), un spectromètre de masse (*Waters Inc., Milford, MA*), une colonne chromatographique (*Phenomenex Luna® Omega 1,6 μm EVO C18 100 Å*), le NANODROP (*Thermo Scientific*), une centrifugeuse (*Thermo fisher*), un compteur d'hématologie (*Accurex Biomedical Pvt Ltd*) un hemocytomètre, le dispositif d'immunotransfert, la membrane de polyvidilène difluoride, les microplaques, les boîtes de culture de 25Cm^3 , une sonde œsophagienne, des micropipettes, un pied à coulisse, des tubes à essai, des tubes eppendorf et coniques, des lames et lamelles.

Comme consommable les solvants (Ethanol ; eau distillée, méthanol, chloroforme), les kits de dosage (Chronolab, Labkit, Monobind, BioRad. Sigma), les milieux de culture, les sédatifs (kétamine, diazépam, éther) ont été utilisés. La liste de ces réactifs classés en fonction des dosages effectués est présentée à l'**annexe 2**.

II.2 Méthodes

II.2.1 Caractérisation phytochimique et détermination mécanismes d'action antiprolifératives de l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium*

Il était question ici de déterminer la composition phytochimique, le potentiel antioxydant et les voies d'action antiproliférative de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*.

II.2.1.1 Détermination de la teneur en quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Les composés bioactifs d'intérêt étaient les composés phénoliques dont les flavonoïdes et les tanins, les alcaloïdes et les terpenoïdes.

Préparation de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

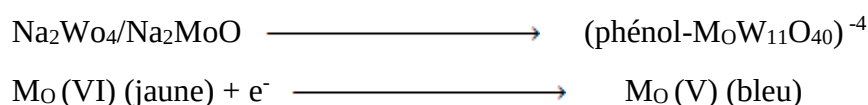
Pour la préparation de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* (EEAa), les fruits ont été préalablement lavés et séchés à température ambiante (et à l'abri du soleil) jusqu'à obtention d'un poids constant. Les fruits secs ont été épluchés et égrainés, puis les graines ont été finement broyées dans un *blender*. Cinq cent grammes (500 g) de poudre ont été macérés pendant 72 h dans 2L d'éthanol 95% (rapport 1/4, p/v). Puis, le macérât a été tamisé et filtré au papier Wattman N°3, le filtrat a été concentré au rota-vapor. Enfin, le solvant résiduel a été évaporé dans une étuve ventilée à 45°C pendant 48 h. L'extrait ainsi obtenu a été conservé dans un bocal en verre opaque à température ambiante. Le rendement d'extraction était calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement} = (\text{poids poudre de graines d}'A \text{ angustifolium} / \text{poids extrait}) * 100$$

II.2.1.1.1 Dosage des composés phénoliques (Waterhouse, 2002).

i) Principe

Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin, du réactif d'acide phosphotungstique phosphomolybdique (Folin-Ciocalteu) par les groupements oxydables des composés phénoliques pour former un complexe bleu-coloré dont l'absorbance est mesurée à 750 nm



ii) Mode opératoire

A 30 µL d'extrait (4 mg/mL) ont été ajoutés 1 mL de solution de Folin (0,2 N) et 1 mL de carbonate de sodium. L'absorbance a été mesurée à 750 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante (25°C). L'acide gallique a été utilisé comme standard à différentes concentrations (0, 100, 200, 400, 800 et 1000 µg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

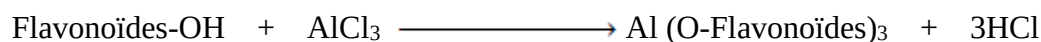
iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration en polyphénols totaux a été calculée et exprimée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme de matière sèche (µg d'EqAG/mg MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 3).

II.2.1.1.2 Dosage des flavonoïdes (Bahorun *et al.*, 1996)

i) Principe

Les flavonoïdes réagissent avec le trichlorure d'aluminium et l'acétate de potassium pour former un complexe de couleur rosâtre qui absorbe à 420 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes contenue dans l'échantillon. L'équation de la réaction est la suivante:



ii) Mode opératoire

A 1mL d'échantillon préparé dans l'éthanol à la concentration de 4 mg/mL ont été ajoutés 1 mL d'AlCl₃ (10%), 1 mL d'acétate de potassium (1 M) et 5,6 mL d'eau distillée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 420 nm. L'étalonnage a été fait avec la quercétine aux concentrations (0, 500, 600, 700, 800 et 1000 µg/mL).

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration des flavonoïdes a été calculée et exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme de matière sèche (µg d'EqQ/mg MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 4)

II.2.1.1.3 Dosage des tanins condensés (Sun *et al.*, 1998)

i) Principe

En milieu acide, le groupement flavonoïde des tanins condensés réagissent avec la vanilline pour former un complexe coloré rouge qui absorbe à 550 nm ;

iii) Mode opératoire

Un volume de 0,3 mL de HCl a été ajouté à 0,6 mL de vanilline dissoute dans de l'éthanol (4% v/v) et à 0,1 mL d'extrait (1 mg/mL). La solution a été homogénéisée et incubée à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc. L'acide gallique a été utilisé comme standard à différentes concentrations (0-100-200-400-800 et 1000 µg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

iv) Méthode de calcul et expression des résultats

La concentration en tanins a été calculée à partir de l'équation issue de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Annexe 5) et exprimée en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme de MS (µg EqAg/mg , MS).

II.2.1.1.4 Dosage des alcaloïdes (Singh *et al.* 2004)

i) Principe

Les alcaloïdes contenus dans l'échantillon réagissent avec le chlorure de fer, le chlorure d'hydrogène et le 1,10- Phénanthroline pour former une solution de couleur rouge qui absorbe à 510 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'alcaloïdes présents dans le milieu.

ii) Mode opératoire

Cent milligrammes (100 mg) de poudre d'extrait ont été soumis à l'extraction dans 10 mL d'éthanol 95%, ensuite filtrés et centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 minutes. A 1 mL de surnageant, ont été ajoutés 1 mL de FeCl_3 (0,025M) + HCl (0,5M) et 1 mL de 1,10 phénanthroline (0,05M) préparé dans de l'éthanol. Le mélange obtenu a été incubé au bain marie à 70°C pendant 30 minutes. L'absorbance de la coloration rouge du complexe formé a été lue à 510 nm contre le blanc. La Quinine a été utilisée comme standard à différentes concentrations (0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 et 0,1 mg/mL) afin d'établir la gamme d'étalonnage.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La teneur en alcaloïdes a été déterminée à partir de l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage établie avec la quinine (Annexe 6) et exprimée en microgramme d'équivalents de quinine par milligramme de matière sèche ($\mu\text{g EqQui/mg MS}$).

II.2.1.1.5 Dosage des terpenoïdes (Ghoraï *et al.*, 2012)

i) Principe

Les terpènes présents dans l'échantillon, en présence du chloroforme et de l'acide sulfurique concentré, forment un précipité brun rougeâtre qui est soluble dans le méthanol et absorbe à 538 nm

ii) Mode opératoire

Deux cent microlitres (200 μL) de solution méthanolique d'extrait (0,1g/mL) ont été ajoutés à 1,5 ml de chloroforme. L'ensemble a été mélangé au vortex puis, 100 μL d'acide sulfurique concentré y ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 2 h. Après incubation, le dépôt marron rougeâtre apparu au fond du tube a été délicatement séparé sur surnageant. A ce précipité, a été ajouté 1,5 mL de méthanol et l'ensemble a été mélangé au vortex. La DO a été lue à 538 nm contre le blanc réalisé avec du méthanol. Le monoterpène linalool a été utilisé comme standard.

iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalent de linalool par gramme de matière sèche (mg EqLi/g MS) à l'aide de l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 7).

II.2.1.1.6 Identification de quelques composés bioactifs par LC/MS

a) Principe

Cette méthode analytique combine la séparation des composés par chromatographie liquide et leur identification par spectrométrie de masse. En effet, les composés présents dans l'échantillon sont élués en fonction de leurs propriétés chimiques (polarité, poids moléculaires). Ensuite, ils sont ionisés et accélérés dans un champ électrique et dirigés dans un analyseur de masse où ils sont détectés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) dont

la mesure de l'abondance génère un spectre de masse. L'identification des composés se fait en comparant le spectre de masse obtenu avec les bases de données.

b) Mode opératoire

L'EEAa a été préparé pour la LC-MS en dissolvant 5 mg de l'extrait dans 1 mL de solvant hydrométhanolique (50:50, v/v). L'extrait a été dilué dix fois et 5 µL ont été injectés sur la colonne LC. L'analyse LC/MS était équipée d'une colonne C18 (2,1 mm de diamètre intérieur × 100 mm de longueur)]. Le système consistait en un mélange méthanol (Phase A) et acide formique 0,1%/ eau (Phase B). La colonne a été éluée à un débit fixé à 0,3 ml/min pendant toute la durée de l'analyse, soit une durée totale de 20 minutes, tandis que la température de la colonne a été maintenue constante à 50 °C. La séparation par étape en phase inversée a été réalisée sur la base d'un schéma d'élution en gradient commençant par 97 % de H₂O (0,1 % d'acide formique) jusqu'à 100 % de méthanol (0,1 % d'acide formique). Ensuite, la colonne a été lavée pendant 2 min, suivie d'un conditionnement et d'un rétablissement des conditions initiales. Pour séparer et identifier les différents composés, l'analyse Q-TOF-MS/MS a été réalisée par un spectromètre de masse muni d'une source ESI pouvant fonctionner en mode positif ou négatif. Le système de spectrométrie comprenait un système Waters Acquity UPLC® associé à l'instrument QTOF.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

Le logiciel MesRnova a permis de reconstituer les chromatogrammes obtenus en mode ion positif et négatif, et ressortir les spectres de masses des différents composés identifiés à l'aide des bases de données de la littérature.

II.2.1.2 Mesure du potentiel antioxydant de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

II.2.1.2.1 Mesure du potentiel anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Le potentiel antioxydant de l'extrait a été évalué à travers les tests anti radicalaires (piégeage des radicaux DPPH, ABTS et NO), et les tests de réduction (pouvoir réducteur du fer, capacité réductrice du molybdate).

a) Test de piégeage du radical DPPH· (Lee *et al.*, 2007)

i) Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]). Ce dernier est réduit sous forme d'hydrazine (de couleur violette) en acceptant un atome d'hydrogène.

ii) Mode opératoire

Un volume de 1,950 mL de la solution éthanolique du DPPH[•] (0.025 g/L) fraîchement préparée a été ajouté à 50 µL de chaque concentration (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) d'extrait éthanolique. L'absorbance à 515 nm a été mesurée après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La formule suivante a été utilisée pour le calcul du pourcentage de piégeage du radical libre :

$$\% \text{ de piégeage} = \frac{\text{Absorbance témoin} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance témoin}} \times 100$$

La courbe de régression concentrations-pourcentages de piégeage a permis de calculer la concentration en extrait qui piège 50% de radical (CP₅₀). Le pouvoir antiradicalaire (µmol de DPPH/g d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de DPPH utilisée (0.025 g/L) par cette CP₅₀

b) Test de piégeage du radical ABTS (Gill *et al.*, 1999)

i) Principe

En réagissant avec le permanganate de potassium, l'acide 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) forme le radical ABTS^{•+} de couleur bleue à verte, l'ajout d'un antioxydant réduit ce radical et provoque la décoloration du mélange. Cette décoloration est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm et est proportionnelle à l'activité des antioxydants présents dans l'échantillon.

ii) Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'extrait (1-2-3-4 et 5 mg/mL) préparé dans de l'éthanol a été ajouté à 1000 µL de la solution d'ABTS^{•+}. Après 30 minutes d'incubation à température

ambiante à l'abri de la lumière, L'absorbance a été lue à 734 nm contre le contrôle constitué de la solution d'ABTS⁺. La catéchine a été utilisée comme référence.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage du radical ABTS⁺ selon la formule suivante :

Piégeage du radical ABTS⁺ (%) = $(Ac - Ae/Ac) \times 100$; Ac représentant l'absorbance du contrôle et Ae celle de l'essai.

Le pouvoir antiradicalaire (μmol de ABTS/g d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de D'ABTS (7,4 mM) par cette CP₅₀

c) Capacité de piégeage du radical oxyde nitrique (Jayachandra *et al.*, 2011)

i) Principe

Au cours de l'expérience, le NO produit par le nitroprussiate de sodium au pH physiologique réagit avec l'oxygène pour donner les ions nitrites. Ces derniers sont mis en évidence par le réactif de Greiss. Le produit de la réaction absorbe à 540 nm ; et plus l'extrait sera actif, moins forte sera densité optique.

ii) Mode opératoire

A 1 ml de d'extrait à différentes concentrations (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) ont été ajoutés 2 ml de solution de nitroprussiate de sodium, et l'ensemble a été incubé pendant 2h 30 min à température ambiante. Par la suite, 500 μl de ce mélange ont été transférés dans un autre tube, auxquels a été ajouté 1 ml de solution d'acide sulfonique. Après 5 min d'incubation à température ambiante, y a été ajouté 1 ml de Naphtyl ethylene diamine (NED), puis s'en est suivit une incubation de 30 minutes dans les mêmes conditions. Passée cette étape, l'absorbance a été lue à 540 nm.

iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage selon la formule

% de piégeage= $(\text{Abs1}-\text{Abs2})/ \text{Abs1}) \times 100$

Abs1= absorbance du contrôle ; **Abs2**= absorbance de l'essai

II.2.1.2.2 Mesure du potentiel réducteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

a) Test de réduction du fer (Ou *et al.*, 2002)

i) Principe

La méthode est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu absorbant à 700nm.

ii) Mode opératoire

Un millilitre d'extrait à différentes concentrations (0, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/mL) a été mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $[K_3Fe(CN)_6]$ à 1%. L'ensemble a été incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique ont été ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10min à 25°C. Un aliquote (2,5ml) de surnageant a été combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été faite à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Une augmentation de l'absorbance correspondait à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Le pourcentage de réduction du fer a été calculé par la réaction suivant :

Pouvoir réducteur de fer (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$. A_0 : est l'absorbance de $FeCl_3$.

A_1 : est l'absorbance de $FeCl_3$ en présence de l'extrait. La courbe de régression dose réponse a permis de calculer la concentration réductrice 50. Le potentiel réducteur ($\mu\text{mol de } Fe^{2+}/g$ d'EEAa) a alors été obtenu en divisant la concentration de $FeCl_3$ utilisée (0,1%) par cette la concentration réductrice 50

b) Mesure de la capacité antioxydante totale (Prieto *et al.*, 1999)

i) Principe

En milieu acide, le molybdène [Mo (VI)] présent sous la forme d'ions molybdate (MoO_4^{2-}) est réduit en Mo (V) (MoO^{2+}) en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) qui absorbe à 695 nm

ii) Mode opératoire

Un volume de 0,3 mL d'extrait méthanolique à différentes concentrations (0, 5, 6,25, 7,5, 8,75 et 10 mg/mL) a été mélangé avec 3 mL de solution du réactif (0,6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes ont été vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc contenant 3 mL de la solution du réactif et 0,3 mL du méthanol et incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

La capacité antioxydante totale a été exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) à l'aide de la courbe d'étalonnage présentée à l'Annexe 8

II.2.1.3 Détermination des potentielles voies d'action antiprolifératives de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'extrait a été testé sur la viabilité de 04 lignées cellulaires provenant du gliome (GL261 et CT-2A) et du mélanome murin (B16-F1 et YUMM1.7). Chacune de ces lignées présentait au moins une des mutations généralement rencontrées dans les tumeurs mammaires. Celle qui a présenté une meilleure sensibilité a été utilisée pour explorer les potentielles voies d'action antiproliférative de l'EEAa

II.2.1.3.1 Culture des lignées cellulaires

Les cellules étaient cultivées en milieu liquide dans les boîtes de 25 Cm² contenant des milieux de culture spécifiques (Annexe 2) telle que décrit dans le guide procédures standards et opérationnelles du laboratoire.

Brièvement, les cellules souches stockées dans les cryotubes ont été dégivrées à 37°C, puis 1mL de milieu de culture spécifique y a été ajouté. L'ensemble a été transféré dans un tube conique de 15 mL contenant 9 mL de milieu de culture et centrifugé à 300g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été aspiré, le culot cellulaire suspendu dans 5mL de milieu de culture et transféré dans un flacon de 25 cm³ pour la culture. Après 48H d'incubation à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂ (jusqu'à confluence), le milieu de culture a été aspiré et les cellules lavées 2 fois avec 5mL de tampon phosphate salin (PBS 1X). Puis 4 mL de trypsine-EDTA 0,25% ont été ajoutés et l'ensemble incubé pendant 3 minutes pour permettre aux cellules adhérentes de se détacher du fond du flacon de culture. Ensuite, 4mL de milieu de culture ont été ajoutés pour suspendre les cellules et désactiver la trypsine. Après

homogénéisation, l'ensemble a été transféré dans un tube conique de 15 mL, centrifugé à 300 g pendant 5 minutes et le surnageant éliminé. Le culot a été re-suspendu dans 1mL de milieu de culture.

Préparation des charges cellulaires

La suspension cellulaire a été diluée au 1/10 avec du bleu trypan. 10µL de cette dilution ont été déposés dans chaque chambre de l'hémocytomètre. Les cellules viables (translucides) présentes dans 4 cadrans de chaque chambre ont été comptées au microscope optique. La charge cellulaire a alors été calculée selon la formule :

$$\text{Concentration cellulaire (Cellule/mL)} = \frac{\text{nombre de cellules comptées}}{\text{nombre de carrés comptés}} \times 10^4 \times fd$$

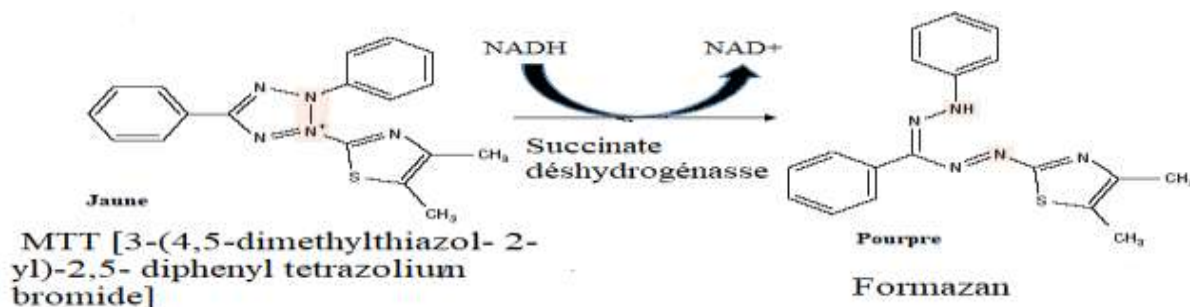
fd représentant le facteur de dilution et 10^4 l'inverse du volume de chaque cadran

II.2.1.3.2 Identification de la lignée cellulaire la plus sensible à l'EEAa : Mesure de la viabilité cellulaire

Les lignées cellulaires susmentionnées ont été utilisées pour tester l'effet de l'EEAa sur la viabilité cellulaire afin d'en sélectionner la plus sensible. La viabilité cellulaire a été mesurée par la méthode au 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT).

a) Principe (Van *et al.*, 2011)

Le principe du test repose sur l'utilisation d'un sel de térazolium qui est réduit en formazan par les déshydrogénases intracellulaires (succinate déshydrogénase mitochondriale) des cellules vivantes. La quantité de formazan (violet) produit est proportionnelle à l'activité métabolique de cellules. Ce composé insoluble est solubilisé par du DMSO ou de l'isopropanol pour permettre son dosage spectrophotométrique à 570 nm.



b) Mode opératoire

Les cellules ont étéensemencées dans les plaques de culture (96 puits) en raison de 5000 cellules/puits (YUMM 1.7, B16-F1), 10000 cellules/puits (CT2A), 15000 cellules/puits

(GL261) pour un volume total de 100 µL/puits. Les plaques ont été pré-incubées dans les conditions optimales de croissance (37°C ; 5% CO₂) pendant 12H (temps de latence des différentes lignées) pour permettre aux cellules d'atteindre un état physiologique stable, de se répartir de façon homogène dans la plaque et d'atteindre leur phase de croissance optimale. Puis, 100 µL d'extrait préparé dans les milieux de culture ont été ajoutés dans chaque puits pour des concentrations finales de 10, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/mL. Les plaques ont été incubées dans les mêmes conditions pendant 24 et 48 H, à la suite desquels le milieu de culture était aspiré. La viabilité cellulaire a été mise en évidence par ajout de 10 µL de MTT (0,5 µg/mL) dans chacun des puits (à l'abri de la lumière) suivi de 4 H d'incubation. La révélation a été faite par ajout de 100 µL de DMSO (100%) dans les puits. Les densités optiques ont enfin été lues à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentage de viabilité selon la formule :

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance témoin}} \times 100$$

Des courbes dose-réponse (pourcentage de viabilité en fonction de la concentration en extrait) ont été réalisées afin de déterminer la CI₅₀ (concentration qui tue 50% de cellules) de l'extrait pour chaque cellule et à chaque temps d'incubation. La lignée cellulaire pour laquelle l'extrait a présenté la plus faible CI₅₀ après 48H a été sélectionnée pour la suite.

II.2.1.3.3 Détermination de l'effet de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* sur la peroxydation lipidique induite par le RSL 3

Ce test a été effectué chez la lignée cellulaire la plus sensible à l'extrait.

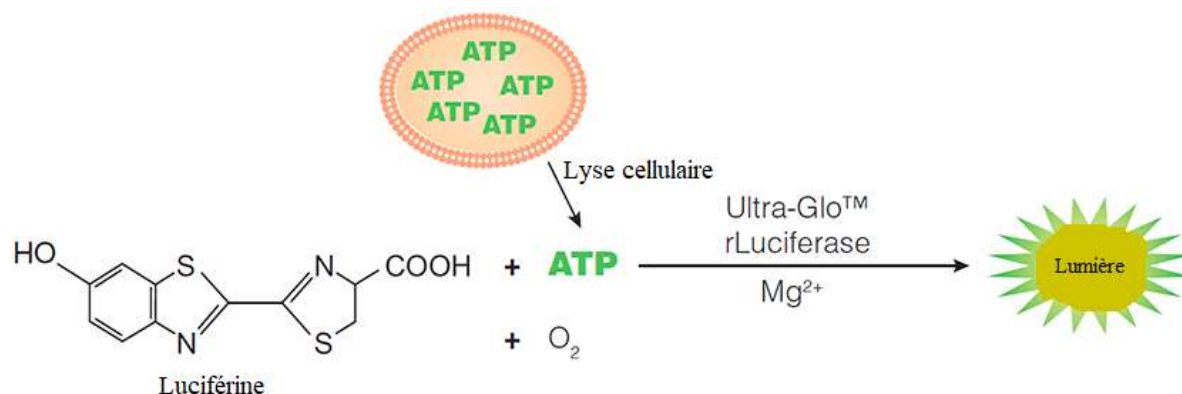
a) Principes

➤ Principe d'action du RSL-3

Le RSL-3 inhibe la glutathion peroxydase 4 indépendamment du glutathion réduit, conduisant à une accumulation des peroxydes lipidiques et donc la mort cellulaire (Yang *et al.*, 2014).

➤ Principe de la mesure de la viabilité cellulaire au CellTiter Glo 2.0

Il est basé sur la génération d'un signal lumineux issu de l'action de la luciférase sur l'oxyluciférine en présence de l'ATP produit par les cellules viables. Le signal généré est proportionnel à la quantité d'ATP présent. Cette quantité d'ATP est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes présentes en culture.



b) Mode opératoire

Les cellules ont étéensemencées 5000/puits durant une nuit. Puis, elles ont été traitées avec 100 μ L d'EEAa aux concentrations de 50, 100 et 150 μ g/mL ou la ferrostatine (2 μ mol/mL). Après 1 h d'incubation (37°C, 5% CO₂), le milieu de culture a été remplacé par 100 μ L de RSL-3 (0,004 mM) préparé dans le milieu de culture contenant l'extrait ou la ferrostatine. La plaque a été incubée pendant 4 h et la viabilité cellulaire a été mesurée après ajout de 90 μ L de *Cell Titer-Glo* dans chaque puits. La plaque a été couverte avec un film en aluminium pendant 15 min et la luminescence a été mesurée.

c) Méthode de calcul et expression des résultats

II.2.1.3.4 Détection par western blot des protéines clés des processus de mort cellulaire par apoptose et nécroptose chez les cellules traitées avec l'EEAa

Dans le but d'élucider les voies par lesquelles l'EEAa induit la mort des cellules cancéreuses, la recherche des protéines impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire a été faite par la technique de western blot. Deux voies d'induction de la mort cellulaire ont été explorées à savoir ; l'apoptose à travers la détection de la Caspase-3 clivée (active) et la nécroptose à travers la détection des formes phosphorylée (active) et déphosphorylée (inactive) de la protéine *Mixed Lineage Kinase-Like* (MLKL). La β -actine a été détectée comme gène de référence.

Les cellules (la lignée la plus sensible) ont été ensemencées dans des microplaques de 6 puits pour une densité de 350000 cellules/puits. Après une nuit d'incubation, (37°C, 5% CO₂), les cellules ont été traitées ou non avec l'EEAa à CI₅₀ pendant 24h puis, L'étoposide à la concentration de 2 µM a été utilisé comme composé pro-apoptotique de référence.

a) Extraction des protéines

➤ Mode opératoire

Après 24 h de traitement, les cellules ont été décollées par trypsinisation (ajout de 1mL/puit de trypsine-EDTA 0.25%) et centrifugé à 1200 tr/min pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été solubilisé dans 25 µL de tampon de lyse et les cellules soumises à trois cycles de chocs thermiques (azote liquide/bain marie 37°C) afin d'améliorer la lyse cellulaire. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 13 000 tr/min à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant constituant l'extrait protéique a ensuite été transféré dans un nouveau tube.

Quantification des protéines par la méthode de Bradford

Principe : en milieu acide, la forme anionique du bleu de Coomassie forme un complexe avec les résidus aromatiques des acides aminés constitutif des protéines, absorbant entre 465 et 595 nm.

Mode opératoire : l'échantillon a été dilué au 1/4, puis 25 µL ont été introduits dans une plaque 96 puits auxquels ont été ajoutés 200 µL de réactif de travail. Après 30 min d'incubation à 37°C, la densité optique a été mesurée à 562 nm. La quantité de protéine a été estimée à partir de l'étalonnage faite avec de l'albumine du sérum bovin (500 µg/mL – 2000 µg/mL).

b) Séparation des protéines par électrophorèse

i) Principe de l'électrophorèse en condition dénaturante

C'est une technique de séparation des molécules dans un champ électrique en fonction de leur poids moléculaire et leur charge. Le β-mercaptoéthanol rompant les ponts dissulfures et le sodium dodecyl sulfate (SDS) conférant à toutes les protéines une charge nette négative, elles migreront toutes vers l'anode en fonction de leur poids moléculaire ; les plus grosses migrant plus lentement.

ii) Mode opératoire

➤ **Préparation de l'échantillon**

A 12 µg de protéines ont été ajoutés du tampon Laemmli 5X ; puis les protéines ont été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. L'ensemble a été centrifugé à vitesse maximale pendant 10 sec, pour précipiter l'ensemble des protéines dans le mélange.

➤ **Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide**

Le gel de polyacrylamide à 12,5% a été coulé sur une lame de verre. Puis 150 mL de tampon cathodique 1X ont été versés dans le joint pour laver les puits et éliminer les bulles. Ensuite, le tampon anodique 1X a été introduit dans la partie extérieure du réservoir de tampon jusqu'au trait de jauge. Puis, 7,5 µL de marqueurs de poids moléculaires et 50 µL d'extrait protéique ont été introduits dans les puits correspondants. Enfin, la cuve électrophorétique a été connectée à un circuit d'alimentation électrique de 80V pendant 90 min.

c) Transfert des protéines séparées sur membrane de polyvidylene difluoride

i) Mode opératoire

La membrane a été activée dans le méthanol (100%) pendant 10 min puis, équilibrée dans le tampon de transfert pendant 5 min. Le gel issu de l'électrophorèse a été transféré dans un récipient en plastique avec du tampon de transfert pour l'équilibrer pendant 5 min également. De même, toutes les autres composantes du transfert (cassette, 2 éponges, 2 morceaux de papier filtre) ont été trempés dans le tampon froid. Un sandwich a été construit de bas en haut, en plaçant cassette (posée sur sa face noire), l'éponge, le papier filtre, le gel centré, la membrane de PVDF, le papier filtre, l'éponge et la face transparente de la cassette. La cassette a été fermée et serrée, puis placée dans la cellule de transfert. Puis la cellule de transfert a été placée dans le réservoir de tampon placé sur de la glace. Le réservoir de tampon a été rempli au 1/3, transféré dans la chambre froide et complété au plein avec du tampon. Enfin, un courant électrique constant de 0,2A et 15V a été appliqué au réservoir pendant 15h pour favoriser le transfert entre le gel et la membrane de PVDF.

- Blocage de la membrane PVDF

Passé le temps de transfert, la cassette a été retirée de la cellule de transfert, puis, les éléments du sandwich ont été soigneusement décollés du haut vers le bas jusqu'à ce que la membrane soit atteinte. Elle a immédiatement été rincée dans du TBST 1X (membrane côté protéine vers le haut) et 10 mL de tampon de blocage LI-COR Odyssey (TBS) y a été ajouté. L'ensemble a été incubé pendant 1h à 25°C (TA) pour bloquer la membrane.

d) Révélation immunologique des spots

La révélation a été faite en présence des anticorps primaires spécifiques à la β -actine, à la caspase-3 clivée et aux protéines pMLKL et MLKL. Le complexe immunitaire formé a été mis en évidence grâce à un anticorps secondaire couplé à un élément radioactif.

i) Mode opératoire

- Incubation avec l'anticorps primaire

La membrane a été sortie du tampon de blocage et placée sur du papier film, puis elle a été réhydratée avec ce même tampon. Après marquage de son orientation, la membrane a été placée à l'intérieur du tube conique avec l'anticorps primaire (côté protéine tourné vers l'intérieur du cône), et incubé pendant 12H dans une chambre froide et sous rotation (vitesse = 10-15). Enfin, la membrane a été retirée du tube conique et rincée 3 fois dans du TBST 1X pendant 5 min.

- Incubation avec l'anticorps secondaire et visualisation

La membrane a ensuite été incubée pendant 1 h, à TA, à l'abri de la lumière et sous agitation dans 10 ml de tampon de blocage Odyssey (LiCOR) contenant l'anticorps secondaire. La membrane a ensuite été lavée 3 fois dans du TBST (1X), pendant 5 minutes chacune sur l'agitateur et toujours à l'abri de la lumière.

Expression des résultats

L'image a été réalisée avec le logiciel ImageStudio et le système Odyssey.

II.2.1.3.5 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique de graine d'*A. angustifolium* sur l'expression de quelques gènes impliqués dans la cancérogenèse

La lignée cellulaire la plus sensible a également été utilisée comme système d'essai. Les gènes évalués étaient ceux impliqués dans l'inflammation (TNF- α , IL-10, IL-6, et IL-1 β , TGF- β), l'angiogenèse et l'invasion (VGEF, IGF-1, PDGFR), la progression du cycle cellulaire (E2F2 et E2F1) et la résistance à l'apoptose (BCL-2, BCL-6). Les cellules ont étéensemencées dans les microplaques de 6 puits et traitées comme dans la section précédente et l'ARN total a été extrait.

a) Extraction de l'ARN total

i) Principe (RNeasy mini kit)

La technologie combine les propriétés de liaison sélective d'une membrane à base de silice et la vitesse de la technologie de microspin. Un système de tampon spécialisé à haute teneur en sel permet de lier à la membrane de silice RNeasy jusqu'à 100 µg d'ARN de plus de 200 bases. Les échantillons biologiques sont d'abord lysés et homogénéisés en présence d'un tampon guanidine-thym hautement dénaturant contenant de la guanidine-thiocyanate, qui inactive immédiatement les RNases afin de garantir la purification de l'ARN intact. De l'éthanol est ajouté pour créer les conditions de liaison appropriées. L'échantillon est ensuite appliqué à une colonne d'essorage RNeasy Mini, où l'ARN total se lie à la membrane et les contaminants sont efficacement éliminés. L'ARN de haute qualité est ensuite élué dans 30-100 µl d'eau.

ii) Mode opératoire

➤ Lyse cellulaire et homogénéisation

Après traitement, le surnageant a été éliminé, les cellules trypsinées (ajout de 1 mL/puits de trypsine-EDTA 0.25% pendant 3 minutes) puis, 600 µL de tampon de lyse RLT a été ajouté à chaque puits et l'ensemble a été mélangé par pipetage. Ensuite, le lysat a été transféré dans la colonne d'essorage QIAshredder placé dans un microtube (2mL) de collecte. L'ensemble a été homogénéisé pendant 2 min à 14000 trs/min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée.

➤ Isolement de l'ARN

Un volume équivalent d'éthanol 70% a été ajouté à l'homogénat et l'ensemble a été mélangé par pipetage. Puis, 700 µL ont été transférés dans la colonne d'essorage RNeasy placé dans un microtube de collecte. L'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 15 secondes et le flux a été rejeté. A la colonne RNeasy, 350 µL de tampon RW1 ont été ajoutés, et l'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 15 secondes. Le flux a été éliminé et 80 µL du super mélange DNase ont été ajoutés à la colonne, puis l'ensemble a été incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Ensuite, le même volume de RW1 a été ajouté, la colonne a été centrifugée à 10000 tr/min pendant 15 secondes et le flux éliminé. Puis, 500 µL de tampon RPE ont été ajoutés dans la colonne, l'ensemble a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 2 min et le flux éliminé. Cette étape a été répétée une fois, et la colonne RNeasy a été transférée dans un autre tube de collecte et l'ensemble a été centrifugé à vitesse maximale pendant 1 min pour éliminer le maximum de tampon RPE. La colonne RNeasy a une fois de plus été transférée dans un autre microtube de collecte (1,5 mL), et 50 µL d'eau stérile dépourvue de RNase ont été ajoutés à la membrane de la colonne d'essorage. Après 5 min

d'incubation à température ambiante, l'ensemble a été centrifugé et le flux contenu dans le tube de collecte contenant l'ARN a été conservé.

La pureté de l'extrait d'ARN a été mesurée en faisant le rapport des densités optiques obtenues au NANODROP entre 260 nm et 280 nm (260/280).

b) Transcription inverse et synthèse de l'ADN complémentaire double brin

i) Principe

Il s'agit d'une réaction enzymatique qui convertit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), en utilisant une ADN polymérase dépendante de l'ARN (aussi appelée transcriptase inverse). L'ARNm est chauffé pour éliminer les structures secondaires. Une **amorce** (oligo-dT) La **transcriptase inverse** ajoute des nucléotides complémentaires à la matrice d'ARN, générant un brin d'ADNc. **Ensuite**, La transcriptase inverse est désactivée par chauffage (70–85°C) pour stopper la réaction. Une ADN polymérase est ajoutée en solution pour synthétiser un deuxième brin d'ADNc.

ii) Mode opératoire

L'ARN obtenu a été retro-transcrit en ADNc en prélude à la PCR. Pour cela, Un microgramme (1 µg) d'ARN total a été ajouté à 4 µL de mélange réactionnel 5X et 1µL de transcriptase inverse. L'ensemble a été complété à 20 µL avec de l'eau dépourvue de nucléase. Puis, le mélange a été introduit dans un thermocycleur programmé 5 min à 25°C (fixation des amorces), 20 min à 46°C (transcription inverse) et 1 min à 95°C (désactivation de la transcriptase inverse) puis Récupération à 4°C.

c) Polymerase Chaine Reaction à temps réel

i) Principe

Il repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant au cycle $n < 40$ (PCR semi-quantitative). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman3 et Beacon) ; ces sondes ne fluoresçant qu'une fois fixées à l'ADN. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un numéro de cycle PCR appelé Ct (Cycle Threshold) ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

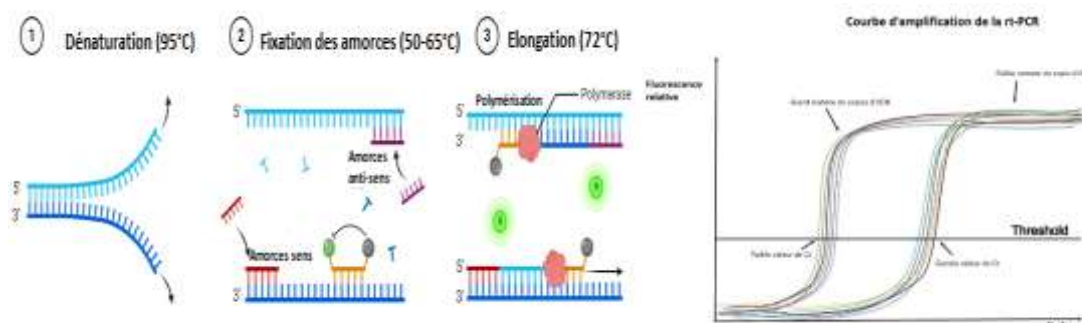


Figure 26: Principe rt-PCR

ii) Mode opératoire

Pour chaque gène, 10 μ L du super mélange KAPA SYBR FAST qPCR (2X), 0,4 μ L d'amorces (Tableau V) sens (200 mM dans le milieu réactionnel), 0,4 μ L d'amorce anti sens (200 mM) et l'ADNc extrait à partir d'1 ng d'ARN ont été introduits dans les microtubes pour PCR. Les tubes ont été introduits dans le thermo-cycleur et la température a été maintenue à 95°C pendant 3 min pour l'activation de l'enzyme. Ensuite 40 cycles de 95°C pendant 3 sec (dénaturation) et 60°C pendant 20 sec (fixation des amorces, élongation et acquisition des données) ont été effectués.

Tableau V: Séquences d'amorces spécifiques aux gènes étudiés

Gènes	Sens (5' - 3')	Anti sens (5' - 3')
<i>β-actin</i>	ACGACGTGGCAGCTCTCGTTGTGG	GGTGCTTCGGTCAGCAGCACGGA
<i>GAPDH</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	GAAGGTGGAAGAGTGGGTG
<i>HRPT</i>	TGGATACAGGCCAGACTTTGTT	CAGATTCAACTTGCCTCATC
<i>18s</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTACTAGCG
<i>VEGF</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	TTTACACGTCTGCGGATCTT
<i>IGF-1</i>	GTGTGGACCGAGGGCTTTTACT	GCTTCAGTGGGGCACAGTACATC
<i>PDGF-R</i>	TAGCGCGGAACCTCAGAGAGA	TGGGAGGTCCCCATAGCTCC
<i>BCL-2</i>	ATGCCTTTGTGGAATATATGCG	GGTATGCACCCAGAGTGATGC
<i>BCL-6</i>	CCTGAGGGAAGGCAATATCA	GTTTAAGTGCAGGGGCCATT
<i>E2F1</i>	GAGGCTGGATCTGGAGACTG	GAAGCGTTTGGTGGTCAGAT
<i>E2F2</i>	AGTTGCTCCCTGAGCTTCAA	GCTCCTTGAAGTTGCCTACG
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IL-10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>IL-6</i>	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTT
<i>IL-1β</i>	CTTGGGCCTCAAAGGAAAGAA	AAGACAAACCGTTTTTCCATCTTC
<i>TGF-β</i>	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA

iii) Méthode de calcul et expression des résultats

Les seuils de déclenchement (Ct) des gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport à ceux des gènes de référence. Et l'expression relative du gène d'intérêt par rapport au témoin non traité a été calculée selon la formule ci-après :

$$\text{Expression relative} = 2^{20 - \Delta\text{Ct échantillon}} - 2^{20 - \Delta\text{Ct témoin}}$$

Avec : $\Delta\text{Ct} = \text{Ct gène cible} - \text{moyenne Ct gènes domestiques}$

L'échantillon représentant les cellules traitées et le témoin les cellules non traitées.

Les gènes domestiques étaient la β -actine, le Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDHase), l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT) et le ribosome S18.

II.2.2 Exploration des activités antitumorales et immunomodulatrice de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* chez des modèles expérimentaux de cancer du sein

Le système d'étude était constitué de rates albinos de souche *Wistar* âgées de 6 semaines, avec un poids moyen de 78 g $\pm$ 10. Ce protocole expérimental a été approuvé par le comité éthique institutionnel de l'université de Yaoundé I, ceci marqué par la délivrance de la clairance éthique N° **BTC-JIRB2023-2024** (Annexe 9)

II.2.2.2.1 Protocole expérimental

Le protocole décrit par **Mvondo et al (2021)** avec des modifications a été exécuté.

a) Induction du cancer du sein au DMBA

Après la période d'acclimatation, 25 rats ont été soumis à une induction du cancer du sein au 7,12- Dimethylbenz(a)anthracène (DMBA) à la dose unique de 50mg/Kg de poids corporel (Pc).

Les animaux ont préalablement été mis sous anesthésie par injection intrapéritonéale de 5 mg/Kg, PC de diazépam (10 mg/mL) et 75 mg /Kg, PC de kétamine (50 mg/mL) au niveau de la patte arrière droite. Les volumes d'administrations étaient de 0.5 mL/Kg, PC et 1 mL/Kg, PC respectivement. Une fois endormis, la solution de DMBA précédemment préparée leur a été injectée par voie sous cutanée, au niveau du mamelon, situé sur la patte arrière gauche. Le volume d'administration du DMBA étant de 1mL/Kg, PC.

Le DMBA étant un composé hautement cancérigène, l'induction s'est faite par un personnel expérimenté, arborant une blouse à usage unique, un masque facial et des gants de protection.

Diagnostic

Les animaux ont été observés et les mamelles palpées (avec des mains gantées) à partir du deuxième mois. La réponse positive à l'induction était marquée par la modification de la peau au niveau de la zone d'induction, soit la peau sous forme de peau d'orange, ou l'apparition des tumeurs solides.

a) Traitement des animaux

Au bout du troisième mois après l'induction, les animaux ayant positivement répondu à l'induction (n = 20) ont été répartis en 6 groupes de 5 rats chacun (2 animaux avec tumeur par groupe) et traités comme suit :

- Un groupe témoin malade (DMBA) non traité
- Deux (2) groupes essais qui recevaient de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 mg/Kg, PC (EEAa 150) et 300 mg/Kg, PC
- Un groupe référence (TAM) qui recevait le tamoxifène à la dose de 3,3 mg/Kg, Pc
- A ces groupes a été joint le groupe de 5 rats n'ayant pas reçu du DMBA, représentant ici le témoin normal (TN)

NB: (1) les animaux n'ayant pas répondu positivement à l'induction avant le début du traitement ont été euthanasiés et ensevelis.

(2) le choix des doses s'est fait selon l'étude de toxicité menée par **Ebhohimen et Okolie (2021)** qui a relevé que l'EEAa était non toxique à des doses inférieures à 1000 mg/Kg, Pc. De plus cette étude a relevé la capacité de cet extrait à protéger d'une toxicité hépatique et rénale induite chez le rat aux doses de 350 et 750 mg/Kg, Pc. En se basant sur les recommandations de la FDA proposant d'utiliser des doses inférieures ou à égales à 400 mg/Kg, PC pour des extraits bruts, les doses ont donc été sélectionnées selon une suite géométrique d'ordre 2 d'une dose proche de la plus faible utilisée par **Ebhohimen et Okolie (2021)**.

Le traitement se faisait tous les matins par gavage œsophagien à l'aide d'une sonde. Le volume d'administration était de 5 ml/Kg,Pc pour les extraits et le tamoxifène, préparés dans de l'eau distillée. Le traitement a duré 28 jours au cours desquels les animaux étaient pesés de façon hebdomadaire.

b) Sacrifice des animaux

Au 29^{ième} jour, les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie à la vapeur d'éther après un jeûne non hydrique de 12 heures. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque et introduit en partie dans les tubes secs et les tubes avec anticoagulant (EDTA) en prélude à la préparation du sérum, plasma et la numération sanguine. Les animaux ont été disséqués. Le foie, les poumons, le thymus, la rate, et la glande mammaire ont été isolés, rincés dans une solution de NaCl 0,9%, essorés et pesés. Les carcasses après dissection ont été ensevelies.

Les diamètres tumoraux ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse puis, une portion de la glande mammaire et du foie a été prélevée pour la préparation des homogénats. Les portions restantes ainsi que les autres organes ont été fixés dans du formol 10% pour la réalisation ultérieure des coupes histologiques.

c) Préparation des différents échantillons biologiques

i) Préparation du sérum et du plasma

Les tubes secs et EDTA contenant du sang ont été laissé au repos à température ambiante (25 °C) puis centrifugé pendant 10 min à 3000g à 25 °C. Le surnageant constituant le sérum (tube sec) ou le plasma (tube EDTA) ont été collectés dans les tubes Eppendorf et conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

ii) Préparation des homogénats de glande mammaire et foie

0,5 g d'organe a été broyé dans un mortier en porcelaine en présence d'1 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7). Le broyat a été complété à 5mL avec le tampon phosphate (0,1 M, pH 7), puis centrifugé à 1500 g pendant 5min. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -20°C.

II.2.2.2 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium* sur la progression des tumeurs

L'effet des traitements sur la progression des tumeurs mammaires a été évalué à travers la détermination des paramètres tumoraux, de dosage de quelques paramètres

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

biochimiques associés et l'analyse histopathologique de la glande mammaire et quelques organes de métastases.

a) Détermination des paramètres tumoraux

Les mensurations tumorales (diamètres et épaisseur) prises lors du sacrifice, le nombre d'animaux par groupe ayant les tumeurs en fin de traitement ainsi que la masse ont permis de calculer l'incidence tumorale, le volume tumoral, la masse tumorale moyenne et les inhibitions relatives à ces paramètres selon les formules ci-après (**Faustino-Rocha et al., 2013**) :

$$\text{Incidence tumorale (\%)} = \frac{\text{Nombre d'animaux avec tumeur dans le groupe}}{\text{Nombre total d'animaux dans le groupe}} \times 100$$

$$\text{Masse relative de la tumeur} = \frac{\text{Masse de la tumeur}}{\text{Masse de l'animal}} \times 100$$

$$\text{Masse tumorale moyenne} = \frac{\text{Somme des masses des tumeurs dans le groupe}}{\text{Nombre d'animaux dans le groupe}}$$

$$\text{Volume tumoral (Cm}^3\text{)} = (\text{Grand diamètre} \times \text{petit diamètre} \times \text{Epaisseur})$$

Les pourcentages d'inhibition par rapport au témoin malade ont été calculés selon la formule générale suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Valeur du paramètre dans le groupe traité}}{\text{Valeur dans le groupe témoin malade}} \times 100$$

a) Mesure des taux sériques promoteurs de la croissance tumorale estradiol et EGF

En plus de la physiologie du sein, la caractéristique moléculaire HER et RE des cancers mammaires laissent comprendre que l'estradiol et le facteur de croissance épidermique (*EGF*) sont des agents de promotion de la tumorigenèse mammaire. Ainsi, les taux sériques de ces 2 facteurs de croissance ont été mesurés. Par ailleurs, l'approvisionnement en glucose et son utilisation sont impératifs pour la survie et la croissance des cellules cancéreuses ; d'où sa prise en considération comme facteur de survie.

i) Dosage des taux sériques d'EGF

Le dosage s'est fait à l'aide d'un kit commercial exploitant le principe du Luminex multiplex.

➤ Principe du test (BioRad)

La technologie Luminex multiplex permet de doser simultanément une large gamme de molécules dans un même puits à l'aide des billes colorées de l'intérieur. Ces billes

possèdent des régions spécifiques pour chaque biomarqueur. La réaction est basée sur le principe immuno-enzymatique en sandwich sur des microsphères ou billes (phase solide). En effet, les anticorps de capture dirigé contre l'élément à doser sont fixés de manière covalente aux billes. Les billes cotées réagissent avec l'élément à doser (biomarqueur) présent dans l'échantillon. un anticorps de détection biotinylé est ajouté pour créer un complexe sandwich. Le complexe final de détection est formé après addition de la streptavidine couplé à la phycoérythrine (PE) ; cette dernière (PE) servant d'indicateur fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'élément à doser présent dans l'échantillon.

Principe de mesure de la fluorescence : l'intensité du signal renvoyé par la PE est mesurée à l'aide d'un lecteur Luminex ou un système Bio-Plex. En principe, un laser rouge (635 nm) illumine les teintes fluorescentes à l'intérieur des billes afin de les classer et identifier les biomarqueurs. Simultanément, un laser vert (532nm) excite la PE pour générer un signal rapporteur, qui est détecté par un tube photomultiplicateur. Un processeur digital à haute vitesse gère l'entrée des données, et le logiciel Bio-Plex Manager les présente comme intensités fluorescentes médianes, associées aux concentrations correspondantes en pg/L (Figure 26).

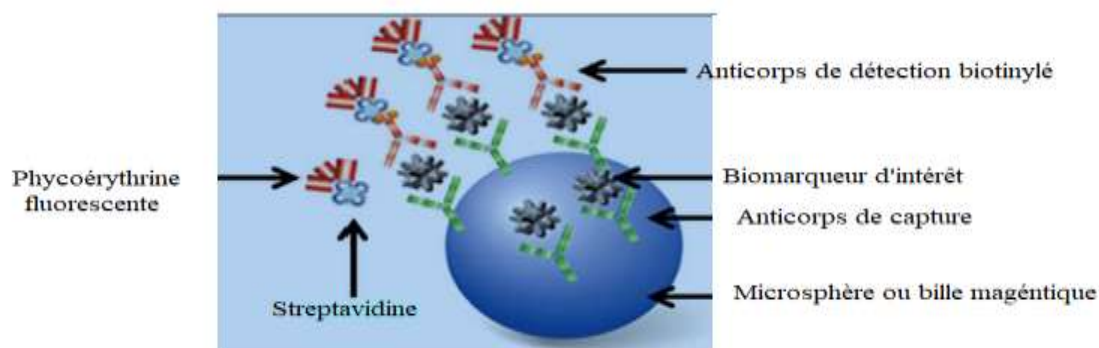


Figure 27: Schéma de principe d'ELISA multiplex

➤ Mode opératoire

Préparation : Les échantillons et les réactifs ont été tout d'abord ramenés à température ambiante. Puis les échantillons ont été dilués au 1 /4 avec le diluant pour échantillon. Le standard a été reconstitué par ajout de 500 µL du diluant de standard, puis une cascade de dilution a été effectuée à partir de 50 µL de standard pour des volumes finaux de 150 µL. les billes ont été diluées 10 fois avec le tampon de test.

Réalisation : 50 µL de billes cotées diluées ont été ajoutés à chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Les puits ont été lavés 2 fois avec 100 µL de tampon de lavage. Puis, 50 µL d'échantillon, standard ou blanc (tampon d'essai) ont été ajoutés dans les puits. La plaque a été couverte avec un papier scellant, et incubée 1 h à température ambiante sous agitation à 850 tr/min. Les puits ont ensuite été lavés 3 fois avec 100 µL de tampon de lavage. Puis, 25 µL d'anticorps de détection fraîchement dilué (au 1/10 avec le diluant requis) y ont été ajoutés. La plaque a une fois de plus été incubée dans les mêmes conditions que précédemment. Ensuite les puits ont été lavés 3 fois et 10 µL de streptavidine-PE (100 ×) fraîchement diluée au 1/100 dans le tampon d'essai ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été incubée comme précédemment. Les puits ont une fois de plus été lavés, et 125 µL de tampon de test ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été agitée pendant 30 secondes et la fluorescence a été mesurée au Bio-Plex 200.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats étaient exprimés en pg/L

ii) Dosage de l'estradiol (ELISA Compétitif retardé)

➤ **Principe**

La méthode reposait sur le principe d'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) compétitif retardé. En effet, en mettant l'anticorps biotinylé en présence du sérum antigénique, il se produit un complexe immun. L'ajout retardé d'un conjugué enzymatique déclenche une réaction de compétition entre ce dernier et l'antigène sérique pour les sites non liés de l'anticorps biotine. Après élimination des anticorps biotine non liés par lavages, l'ajout du substrat de l'enzyme déclenche une activité enzymatique dans la fraction liée qui est inversement proportionnelle à la concentration en estradiol dans le sérum.

➤ **Mode opératoire**

Avant de procéder à l'essai, tous les réactifs, le sérum, les calibreurs de référence et les contrôles ont été ramenés à température ambiante (20-27°C). Les microplaques ont été formatées pour chaque sérum de référence. Cinquante microlitre (50 µL) de réactif œstradiol biotine ont été introduits dans tous les puits. Puis, 25 µL du sérum de référence ou du spécimen ont été ajoutés dans les puits assignés. Ensuite, la microplaque a été homogénéisée pendant 20 à 30 min et incubée à température ambiante pendant 30 minutes. 50 µL de réactif enzymatique d'œstradiol y ont été ajoutés, la plaque a été agitée une seconde fois pendant 20 à 30 min et laissée incubée pendant 90 min. Le contenu de la microplaque a été décanté par aspiration et

350 µL de tampon de lavage ont été ajouté pour nettoyage, suivi de l'ajout de 100 µL de réactif de substrat. Après 20 min d'incubation du mélange à température ambiante, 50 µL de solution d'arrêt ont été ajoutés, l'ensemble a été homogénéisé pendant 20 min et les densités optiques ont été lues à 450 nm.

➤ Expression des résultats

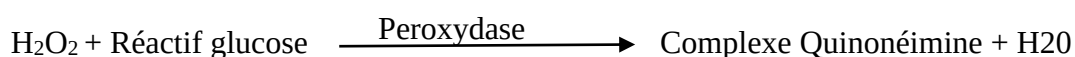
La détermination de la concentration d'œstradiol pour une inconnue s'est faite en plaçant l'absorbance de chaque sérum de référence en fonction de la concentration d'œstradiol correspondante (pg/L) sur un graphique linéaire (Annexe 10). Les points ont été reliés avec une courbe de meilleure qualité. Les concentrations (en pg/L) à partir de l'absorbance des moyennes.

b) Mesure de l'activité cellulaire dans la glande mammaire : dosage du glucose mammaire

Le fonctionnement des cellules mammaires a été évalué à travers le dosage du glucose dans l'homogénat de la glande mammaire, l'aide du kit Chronolab, utilisant la méthode de glucose oxydase. (Trinder, 1959)

i) Principe

Ce dosage est basé sur une double réaction enzymatique. La glucose-oxydase (GOD) oxyde le glucose en acide glucuronique et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier permet l'oxydation du 4-amino-antipyrine et du phénol en un complexe Quinonéimine coloré (rouge brique) qui absorbe à une longueur d'onde de 510nm grâce à une peroxydase. L'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration en glucose dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

Dix microlitres (10 µl) d'échantillon ou de standard ont été ajoutés à 1000 µL de réactif puis incubé pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance de l'échantillon contre le blanc réactif a été lue à la longueur d'onde de 510 nm.

iii) Expression des résultats

$$[Glucose] \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{D.O \text{ echantillon}}{D.O \text{ etalon}} \times Valeur \text{ etalon}$$

c) Analyse histologique de la glande mammaire et de quelques organes de métastase

i) Principe de la coloration à l'hématoxyline et l'éosine

Il est basé sur la coloration bichromatique des fragments tissulaires ; la nature cationique ou basique de l'hématoxyline lui confère une affinité avec les composantes cellulaires chargées négativement comme les acides nucléiques, conduisant à une coloration bleu-violet du noyau. L'éosine par contre, de par sa nature anionique ou acide, se lie aux éléments cellulaires cationiques présents dans le cytoplasme, conduisant à une coloration du cytoplasme allant du rose au rouge vif.

ii) Mode opératoire

Des coupes transversales de portions de glande mammaire, foie poumons, thymus et rate préalablement fixés dans le formol 10% ont été rangées dans des cassettes. Elles ont par la suite subit une déshydratation dans des séries d'alcool de concentration croissante (1 h dans de l'éthanol à 80%, 8h dans 4 solutions d'éthanol 95% et 6 heure dans 3 solution d'éthanol 100%). Elles ont ensuite été éclaircies dans 2 bains de Xylène (2 h/bain) et imprégnés dans 2 solutions de paraffine chaude (à raison de 2 h par passage). Les tissus ont par la suite été inclus de façon orientée dans un moule en inox contenant de la paraffine à 60°C, puis l'ensemble a été refroidi sur une plaque réfrigérante à 4°C. Les rubans de 5 µm d'épaisseur obtenus à l'aide d'un microtome ont été étalés dans un bain-marie (d'environ 40°C) contenant de l'eau gélatinée. Ces coupes ont par la suite été déposées sur des lames porte-objet et, séchées à 45°C à l'étuve pendant 24 heures. Ensuite, elles ont été colorées à l'hématoxyline et l'éosine. Une fois asséchées à TA, Les lames ont été recouvertes de lamelle et la microarchitecture a été observée au microscope optique (Axioskop 40) à l'objectif 400 pour la glande mammaire, 100 poumons et 200 pour le foie et les reins (Smith et Bruton, 1977).

iii) Expression des résultats

Les images des mircoarchitectures ont été réalisées sur ordinateur connecté au microscope. L'image a été transférée à l'aide des logiciels MRGrab1.0 et Axio Vision 3.1 (Zeiss, Hallbergmoos, Germany). L'Atlas et la classification histologique des tumeurs mammaires chez le rat (**Rousso et Rousso, 2000**) a été utilisé pour classer histologiquement les glandes mammaires.

II.2.2.2.3 Evaluation l'activité immuno-modulatrice de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* chez un modèle animal de cancer du sein

Elle a été effectuée à travers l'analyse hématologique, le dosage de quelques médiateurs cellulaires sériques et l'analyse l'histologie des organes lymphoïdes

a) Analyse hématologique

L'hémogramme s'est déterminé à l'aide d'un automate d'hématologie. Elle consistait en le dénombrement des globules rouges, plaquettes, globules blancs et ses sous classes. Le principe de fonctionnement repose sur la variation de la résistance électrique. En effet, le passage des cellules contenues dans l'échantillon de sang entre les électrodes de l'appareil entraîne une baisse de la conductivité électrique. Cette baisse de conductivité est proportionnelle à la taille de la cellule et est enregistrée sous forme d'impulsions électriques.

Le dosage de l'hémoglobine s'est fait par spectrophotométrie. En effet, l'agent de lyse des hématies se lie à l'hémoglobine pour former un complexe coloré qui absorbe à 525nm.

b) Dosage des cytokines TNF- α et INF- γ

Le dosage des médiateurs cellulaires s'est fait avec la technologie Luminex multiplex comme précédemment décrit (II.2.2.2.2 a). Il s'agissait précisément des taux sériques de *tumour necrosis factor* apha (TNF- α) et interféron gamma (INF γ) considérés respectivement comme cytokines pro et antiinflammatoires.

c) Dosage du radical oxyde nitrique (Manish *et al.*, 2006)

i) Principe

Il est basé sur la réaction de diazotation décrite par Griess. Il décrit la réaction chimique utilisant la sulfanilamide et le dichlorure de N-1-Naphtyléthylène diamine (NED) en milieu acide phosphorique avec obtention d'un produit coloré détectant le nitrite formé. La coloration pourpre est indicatrice de la présence de nitrites formés et la lecture est faite à 540 nm.

ii) Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'échantillon (glande mammaire ou sérum) ont été ajoutés à 100 µL d'une solution de sulfanilamide. Le mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après incubation, 100 µL de solution de NED y ont été ajoutés puis incubés de nouveau 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La lecture de la densité optique s'est faite à 540 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration en radical oxyde nitrique est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Concentration NO } (\mu\text{M}) = \frac{DO}{\epsilon \cdot l} ; \quad \text{Avec } \epsilon = 39500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ et } L=1\text{cm}$$

II.2.3 Exploration de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* contre les effets toxiques associés à l'administration du tamoxifène à des rats *Wistar* souffrant de cancer du sein

Le protocole expérimental était semblable à celui décrit dans la section précédente. A la seule différence que, les animaux traités avec l'EEAa aux doses susmentionnées (150 et 300 mg/Kg, Pc) recevaient 3,3 mg/Kg, Pc de TAM une heure après. Durant les 28 jours de traitement, le poids des animaux était pris.

Après sacrifice, le sang a été collecté dans les tubes EDTA et secs pour la préparation du plasma, du sérum et des hémolysât. Le foie et les reins ont été isolés pour la préparation des homogénats et la réalisation des coupes histologiques. L'utérus a également été isolé pour les coupes histologiques.

ii) Préparation de l'hémolysât

Après élimination du plasma et des globules blancs, dans le tube à anticoagulant EDTA, 100 µL du culot globulaire ont été introduits dans des tubes coniques puis lavé avec 2 ml d'une solution de NaCl (0,9%). L'ensemble a été centrifugé à 1500 g pendant 10 min à température ambiante et le surnageant jeté. Ce processus est répété 2 fois. L'hémolyse des érythrocytes a été réalisée après ajout de 2ml d'eau distillée ; le mélange a été centrifugé à 3400g pendant 10 min à 25 °C et le surnageant représentant l'hémolysât a été récupéré et conservé à -20 °C.

II.2.3.2 Evaluation de l'effet de l'extrait sur le développement d'une hyperplasie utérine induite par le tamoxifène

Le dosage de l'estradiol sérique, et l'analyse histologique de l'utérus ont été effectués comme décrits précédemment. La mesure de l'épaisseur de l'endomètre utérin a été faite à l'aide du logiciel image J

II.2.3.3 Evaluation de l'effet du traitement sur le statut métabolique

Le tamoxifène est connu pour entraîner une perte d'appétit conduisant à une perte de poids. Par ailleurs, sa prise altère le métabolisme lipidique, avec pour conséquence lointaine la stéatose hépatique non alcoolique. Par conséquent, la variation du poids et le profil lipidique ont été évalués pour apprécier l'effet du traitement sur le métabolisme.

II.2.3.3.1 Calcule de la variation de poids

Elle été calculée au début du traitement, après 2 semaines et à la fin du traitement selon la formule ci-après :

$$\text{Variation des poids (\%)} = \frac{P_x - P_{\text{initial}}}{P_{\text{initial}}} \times 100$$

P_x étant le poids à l'intervalle 2 semaines

II.2.3.3.2 Dosage des paramètres du profil lipidique

Il s'agissait particulièrement des taux de triglycérides et de cholestérol plasmatique

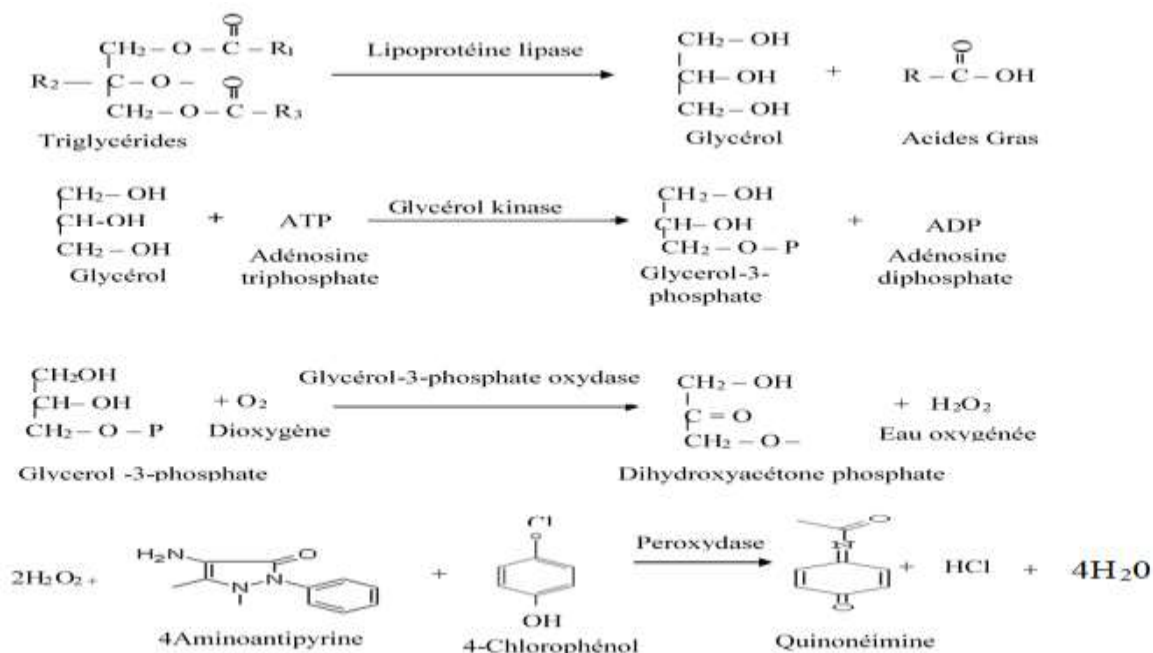
a) Dosage des triglycérides plasmatiques

Le dosage des triglycérides a été effectué à l'aide du kit Chronolab.

i) Principe (Fossati et principe, 1982)

Le glycérol, produit par hydrolyse enzymatique des triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase (EC 3.1.1.34), est phosphorylé par l'ATP pour produire le glycérol-3-phosphate et l'ADP à travers une réaction catalysée par le glycérol kinase (EC 2.7.1.30). La glycérol-3-phosphate oxydase (EC 1.1.3.21) catalyse ensuite l'oxydation du glycérol -3-phosphate pour produire le dihydroxyacétone-3-phosphate et H_2O_2 . Ce dernier se combine au 4-aminoantipyrine et au 4-chlorophénol pour former la quinonéimine sous l'influence

catalytique de la peroxydase (EC 1.11.1.9). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides présents dans l'échantillon.



iii) Mode opératoire

Dans des tubes étiquetés blancs, étalon et essai, ont été introduits respectivement 10 µL d'eau distillée, d'étalon ou d'échantillon plasmatique à analyser et 1000 µL de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 min à 25°C. L'absorbance de l'échantillon a été lue contre le blanc réactif à 505 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

iv) Expression des résultats

La concentration des triglycérides dans le plasma est donnée par la relation :

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance essai}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{valeur de l'étalon}$$

Avec : -Concentration étalon = 200 mg/dL ;

-Conversion en unité SI (mmol/L) = [triglycérides] en mg/dL × 0,0113.

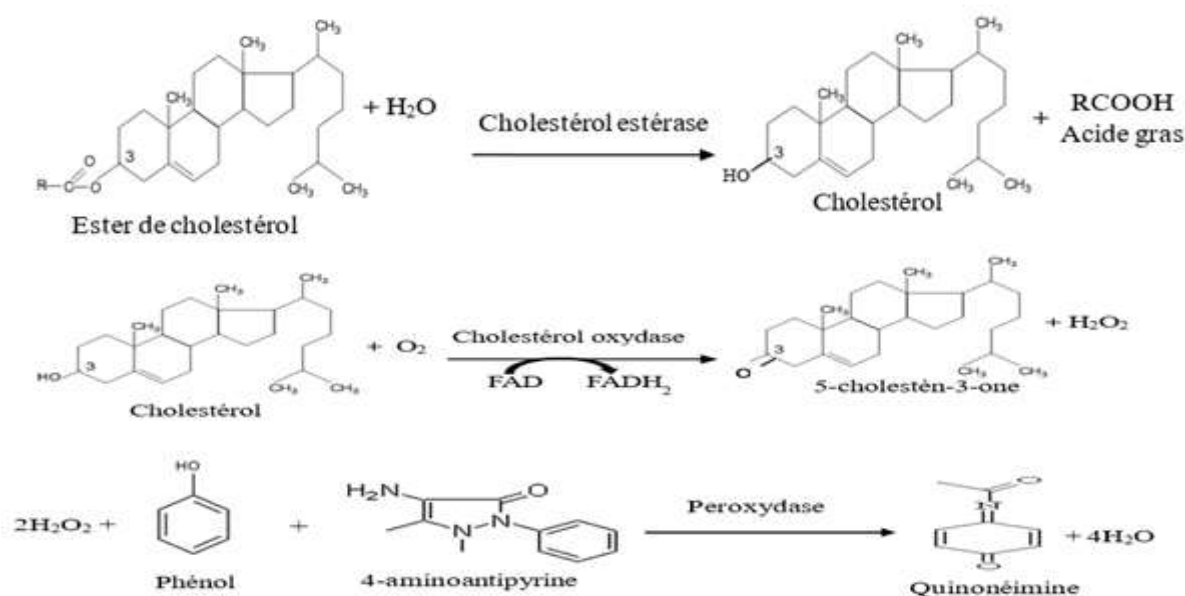
b) Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total a été fait à l'aide du kit Chronolab

i) Principe (Richmond, 1973)

La cholestérol estérase (EC 3.1.1.3) catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre y compris celui présent à l'origine est alors oxydé par la cholestérol oxydase (EC 1.1.1.6) en 4-cholestèn-3-one et en peroxyde

d'hydrogène. En présence de la peroxydase (EC 1.11.1.9), le phénol et le 4-aminoantipyrine se combinent avec le peroxyde d'hydrogène pour former un chromophore rouge (la quinonéimine) qui absorbe entre 500 et 550 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol total présent dans l'échantillon.



iii) Mode opératoire

Dans des tubes étiquetés blancs, étalon et essai ont été introduits respectivement 10 μ L d'eau distillée, d'étalon ou d'échantillon à analyser et 1000 μ L de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 min à 25°C. L'absorbance de l'échantillon a été lue contre le blanc réactif à 505 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

iv) Expression des résultats

La concentration en cholestérol total dans le plasma est donnée par la relation :

$$\text{Cholestérol total (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{valeur de l'étalon}$$

Avec : Concentration de l'étalon = 200 mg/dL ;

Conversion en unité SI (mmol/L) = [cholestérol total] en (mg/dL) $\times$ 0,0259.

II.2.3.4. Evaluation de l'effet du traitement sur l'intégrité du foie et des reins

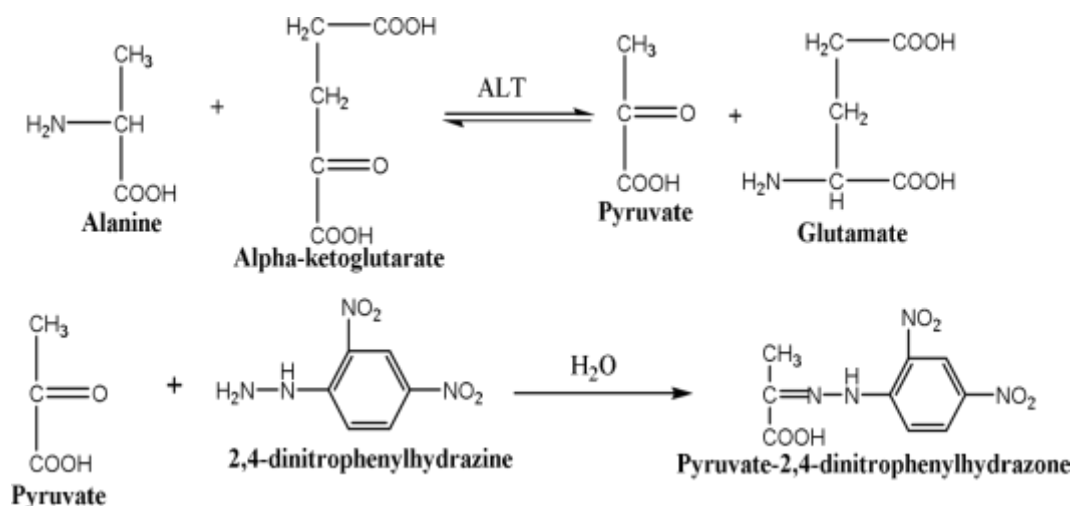
L'activité plasmatique des enzymes hépatique a été utilisée comme marqueur de l'intégrité hépatique et les taux plasmatiques d'acide urique et de créatinine ont été utilisés comme marqueurs de la fonction rénale. Le statut antioxydant a été évalué comme mécanisme de protection de ces organes.

II.2.3.4.1 Mesure des activités plasmatiques des enzymes hépatiques

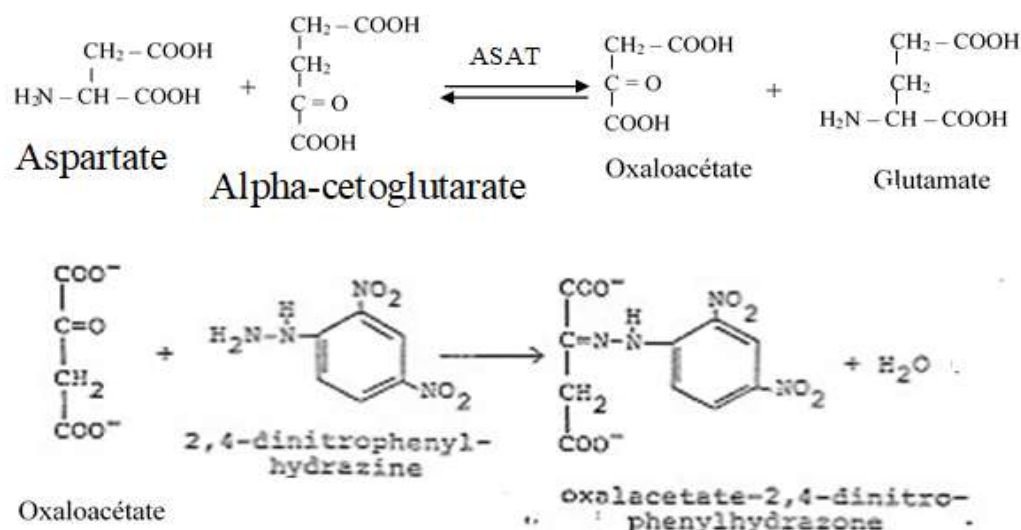
a) Mesure de l'activité plasmatique des transaminases (Reitman et Frankel, 1957)

i) Principes

L'alanine aminotransférase (ALAT) (EC 2.6.1.2) catalyse le transfert du groupement amine du L'alanine sur l' α -cétooglutarate pour former le pyruvate et le L-glutamate. Le pyruvate formé réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) pour donner le pyruvate-2,4-dinitrophénylhydrazone (complexe de couleur brun) dont l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité de pyruvate et présente un maximum d'absorption à 505 nm Selon la réaction ci-après :



L'aspartate aminotransférase (ASAT) (EC 2.6.1.1) catalyse le transfert du groupement amine de l'acide L- aspartique sur l' α - cétooglutarate pour former et le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate formé réagit avec le 2,4 DNPH (complexe de couleur brun). L'intensité de la coloration de dinitrophényhydrazine est directement proportionnelle à la quantité d'oxaloacétate et présente un maximum d'absorption à 505nm.



ii) Mode opératoire

Un volume (0,1 mL) de la solution substrat a été introduit dans les tubes à essai puis, pré-incubés à 37°C pendant 5 min. Ensuite, 0,02 mL de plasma y a été introduit suivit d'un ajout de 0,1mL d'eau distillée. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 30min (ALAT) ou 1H (ASAT) puis, 0,1mL de réactif de coloration y a été ajouté suivit d'une incubation à température ambiante pendant 20 min. La réaction a été arrêtée par ajout de 1 mL de NaOH (0,4N). Les densités optiques sont lues à 505 nm contre le tube blanc.

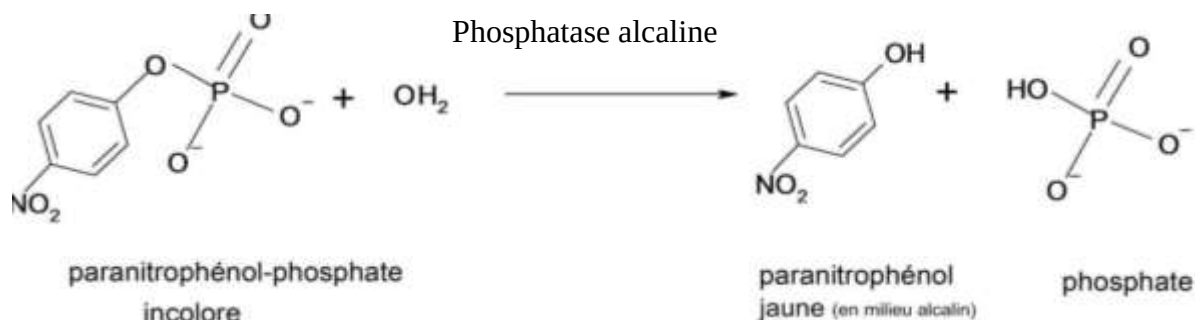
iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en activité d'ALAT et l'ASAT, déterminées à partir de l'équation des droites d'étalonnage présentée à l'annexe 10.

b) Dosage de la phosphatase alcaline (Bergmeyer *et al.*, 1974) :

i) Principe

La phosphatase alcaline (EC3.1.3.1) catalyse la réaction d'hydrolyse du groupement phosphate du paranitrophénol-phosphate, un chromogène à pH 10,4 libérant un produit coloré (jaune) appelé chromophore, le paranitrophénol et le phosphate suivant la réaction suivante :



ii) Mode opératoire :

1,2mL de réactif de travail a été introduit dans une cuve. Ensuite, 20µL de substrat y a été ajouté, puis homogénéisé et incubé pendant 1min. Les absorbances (A) ont été lues à 405 nm toutes les minutes pendant 3minutes.

iii) Expression des résultats

$$\text{PAL (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 330$$

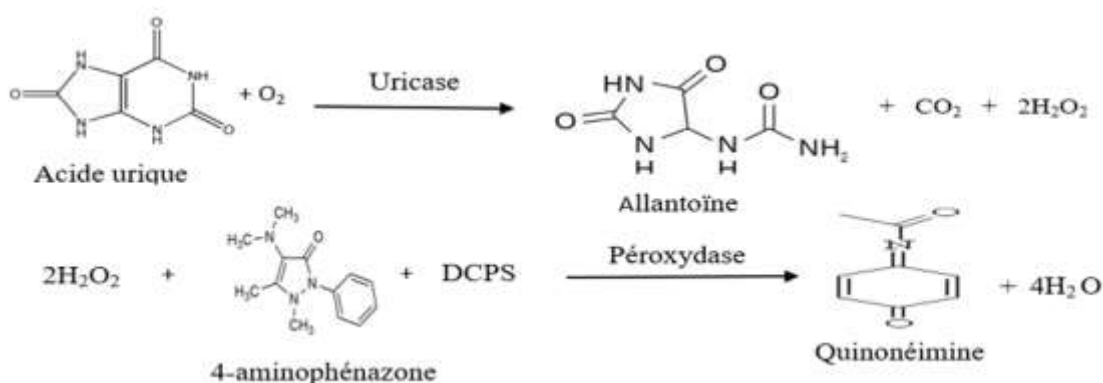
II.2.3.4.2 Dosage des paramètres biochimiques liés à l'intégrité du rein

L'acide urique et la créatinine ont été dosés dans le plasma des animaux, et l'analyse histologique des reins a été effectuée comme décrit précédemment

a) Dosage de l'acide urique plasmatique

i) Principe :

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$) qui, en présence de la peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et du 2,4-dichlorophenol sulfonate (DCPS) forme un composé rosacé : la quinonéimine. L'intensité de la quinonéimine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présente dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

A 25µL d'échantillon ou d'étalon, a été ajouté 1ml de réactif de travail. Le mélange a été incubé pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance a été lue à 520nm contre le blanc

iii) Expression des résultats

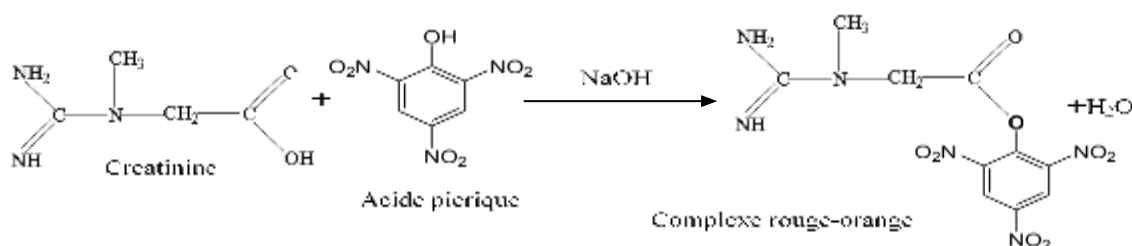
$$\text{concentration acide urique} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration étalon}$$

Avec : concentration étalon = 6mg/dL

b) Dosage de la créatinine (Bartels *et al.*, 1972)

i) Principe

En milieu alcalin, la créatinine forme un complexe jaune orange avec l'acide picrique. L'intensité de la coloration étant fonction de la concentration de la créatinine dans le milieu.



ii) Mode opératoire

Dans un tube à essai, 100µL d'échantillon ou de standard ont été ajoutés à 1mL de la solution de travail. Après agitation, l'absorbance à 520nm est lue à 30 et à 90 secondes après stabilisation du mélange. Le tube blanc a été réalisé avec de l'eau distillée.

iii) Expression des résultats

$$[\text{Créatinine}] = \frac{\text{DO essai}}{\text{DO étalon}} \times [\text{étalon}](\text{mg/dL})$$

Concentration de l'étalon=2 mg/dL

II.2.3.4.3 Evaluation de l'effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur le statut antioxydant

L'activité de la catalase a été mesurée aux niveaux érythrocytaire, hépatique et rénale et les taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique ont été déterminés dans le plasma, le foie et les reins

a) Mesure de l'activité de la catalase (Sinha, 1972).

i) Principe

Cette méthode est basée sur le fait que la catalase (EC1.11.1.6) présente dans l'échantillon hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau (H_2O) et en Oxygène (O_2). Le H_2O restant après action de la catalase se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu-vert d'acide perchlorique instable ; ce dernier va ensuite être décomposé par la chaleur pour former un complexe vert qui absorbe à la longueur d'onde de 620nm. L'activité de la catalase est proportionnelle à la densité optique et est déterminé grâce à une courbe d'étalonnage ;

ii) Mode opératoire

Dans un tube à essai, ont été introduits successivement 50 μL d'échantillon et 750 μL de tampon phosphate. A ce mélange, ont été ajouté 200 μL de peroxyde d'hydrogène. L'arrêt de la réaction a été fait après 1 minute par addition de 1 mL du dichromate d'acétate. Les tubes ont été chauffés à 100°C pendant 10minutes, et l'absorbance mesurée à 620 nm contre le blanc après refroidissement des tubes.

iii) Expression des résultats

L'activité de la catalase est exprimée en mM de peroxyde d'hydrogène consommé/min/mg de protéines. En utilisant la courbe d'étalonnage $Y = 0,0013X$ obtenu à partir du standard (**annexe 12**). Le protocole de dosage des protéines totales est décrit à l'Annexe 13

a) Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (Yagi, 1976).

i) Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à essai en verre et à vis, ont été introduits 100 μL d'échantillon, 400 μL de réactif TBA puis les tubes ont été fermés hermétiquement. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts, les tubes ont été centrifugés à 1500g pendant 5 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration du MDA est déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) selon la formule ci-après

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

II.2.4 Traitement des données et analyse statistique

Le logiciel Excel a permis de traiter les données et de tracer les graphes. L'analyse statistique a été faite à l'aide du logiciel SPSS (*Statistical Package for Social Science*) version 25.0 pour Windows. Le test ANOVA (*Analysis Of Variance*) à un facteur suivi d'un test post-hoc LSD (*least significant difference*) a été utilisé les comparaisons multiples. Le *t-test* de *student* a été utilisé pour comparer les variables quantitatives entre 2 groupes. Le seuil de significativité était fixé à $p < 0,05$. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type et pourcentage de variation. Les courbes de régression dose-réponse ont permis de déterminer les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀).

Le logiciel MesRenova a été utilisé pour traité des chromatogrammes et spectres de masse, Image Studio sur le système Odyssey a été utilisé pour le traitement des résultats de Western Blot et Image J a été utilisé pour le traitement des coupes histologiques.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre a été organisé en partie en fonction des objectifs spécifiques du travail.

Partie I : Teneurs en quelques composés bioactifs, potentiel antioxydant et mécanisme d'action antiproliférative de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

I.1 Teneur et identification de quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

I.1.1 Teneur en quelques composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Les phytoéléments évalués dans ce travail étaient les composés phénoliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes les terpenoïdes et les tanins. Il ressort du Tableau VI ci-dessous que, pour 1 gramme de matière sèche, l'EEAa contient environ 219,19 mg EAG de composés phénoliques avec 5,29 mg EQ de flavonoïdes et 1,27 mg EAG de tanins. Par ailleurs, il contient 62,83 mg EQui d'alcaloïdes, et 195 mg Eli de terpenoïdes.

Tableau VI Teneur de l'EEAa en quelques composés phytochimiques

Classes de composés bioactifs	Teneurs
Composés phénoliques (mg EAG/g, MS)	219,19 ± 13,37
Flavonoïdes (mg EQ/g, MS)	5,29 ± 0,62
Tanins (mg EAG/g, MS)	1,27 ± 0,22
Alcaloïdes (mg EQui/g, MS)	62,83 ± 3,16
Terpenoïdes (mg EQLinalool/g, MS)	195,5 ± 3,75

Expression des résultats : moyenne ± écart-type ; EAG : équivalent acide gallique ; EA : équivalent quercétine ; EQui : équivalent quinine, EQLinalool : équivalent de linalool ; MS : matière sèche.

I.1.2 Quelques composés identifiés dans l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

La Figure 28 ci-dessous représente les chromatogrammes obtenus en mode ESI positif.

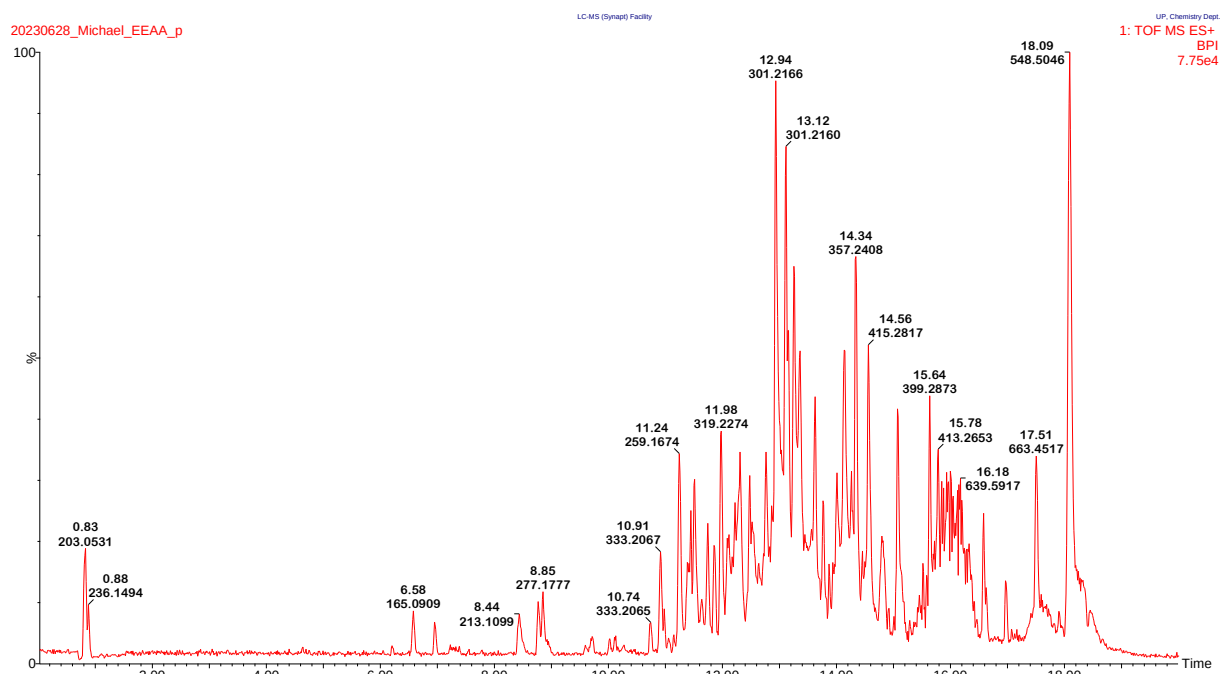


Figure 28: Chromatogrammes de l'EEAa en mode ESI positif

L'analyse spectrale des pics d'élution présents sur ce chromatogramme révèlent la présence probable de 6-paradole, 6-gingérol, quercétine, stigmasterol, α -pinène, caryophyllène ; pipérine et isoprinosine dont les spectres de masse sont présentés à l'annexe 14 et Les caractéristiques décrites dans le **Tableau VII**.

Tableau VII: Caractéristiques spectrales de quelques composés identifiés dans l'EEAa

Composés	Temps de rétention (minutes)	m/z expérimental	Erreur	Abondance (n)	Adduits
Pinène	8,31	194,12	-0,13	298	[M+K] ⁺ , [M+Cl] ⁻
Caryophyllène	13,44	205,088	-0,27	5500	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺
6-Paradol	11,56	279,23	-0,17	630	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ [M+H ₂ O] ⁺
6-Gingérol	11,77	295,22	-0,18	525	[M+H] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+H ₂ O] ⁺
Quercétine	12,55	303,21	-0,02	180	[M+H] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+Na] ⁺
Stigmastérol	15,79	413,26	-0,44	25000	[M+H] ⁺ , [M+H ₂ O] ⁺
Pipérine	12,55	325,25	-0,08	165	[M+K] ⁺ , [M+Na] ⁺
Isoprinosine	16,50	1116,32	+0,09	4750	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺

m/z : rapport entre masse atomique et charge

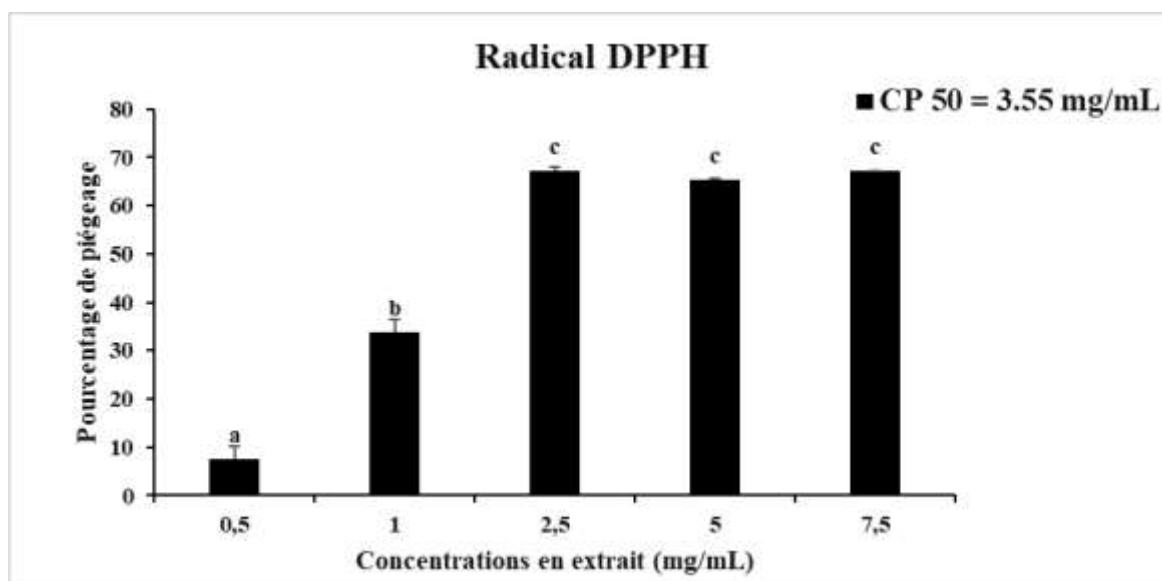
I.2 Potentiel antioxydant *in vitro* de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium*

Le potentiel antioxydant de l'EEAa a été évaluée à travers la mesure de son pouvoir anti-radicalaire du DPPH, de l'ABTS et NO, et son pouvoir réducteur du fer et du molybdate.

I.2.1 Potentiel antiradicalaire de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium*

a) Pouvoir anti-radicalaire de l'EEAa contre le radical DPPH

La mesure du potentiel de l'EEAa à piéger le radical synthétique DPPH a révélé que, l'extrait a piégé ce radical à toutes les concentrations testées (0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mg/mL). Le pourcentage de piégeage était proportionnel à la concentration en extrait jusqu'à la concentration de 2,5 mg/mL à partir de laquelle le potentiel anti-radicalaire a atteint son maximum (67,31%) et s'est plus ou moins stabilisé (Figure 29). La CP₅₀ était de 3,55mg/mL, soit un pouvoir antiradicalaire de 7,42µg de DPPH piégé par mg d'EEAa

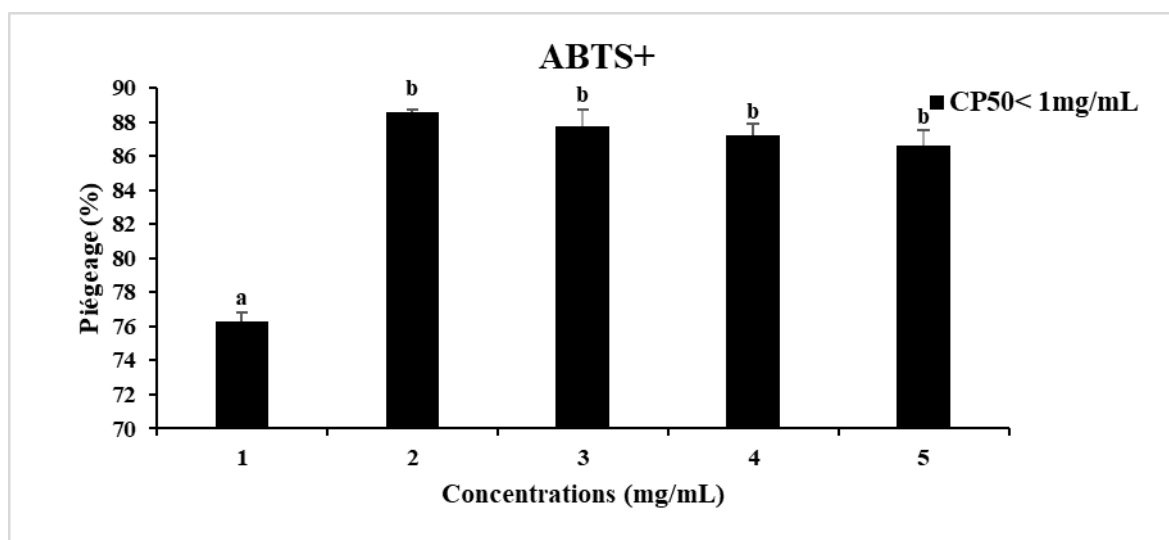


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pourcentages de piégeage différents à $p < 0,05$.

Figure 29: Piégeage du radical DPPH par l'EEAa à différentes concentrations

b) Potentiel piégeur du radical ABTS par l'EEAa

Il ressort de la figure 30 ci-dessous que, l'EEAa a piégé le radical cationique ABTS⁺ de façon inversement proportionnelle à sa concentration, avec une CP50 non déterminée car inférieure à la plus petite concentration en extrait testée (1mg/mL) soit un pouvoir antiradicalaire supérieur à 7,4 mmol d'ABTS piégé par mg d'EEAa.

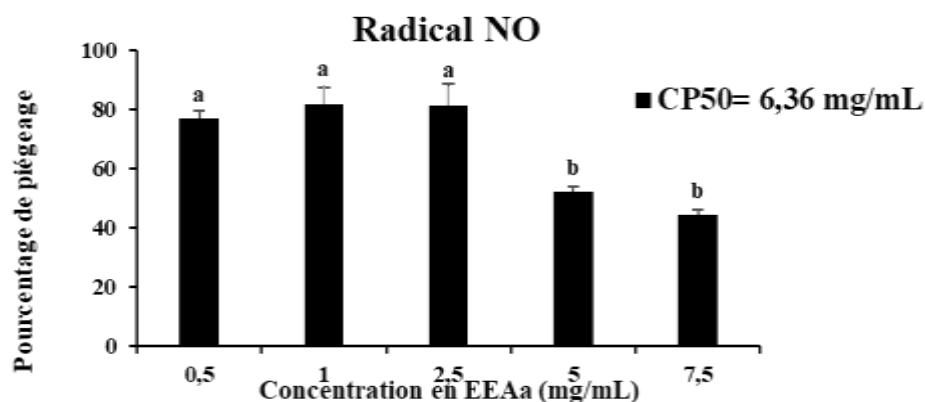


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b) ont des pourcentages de piégeage différents à $p < 0,05$.

Figure 30: Piégeage du radical ABTS⁺ par l'EEAa à différentes concentrations

c) Potentiel anti-radicalaire de l'EEAa contre le radical biologique NO

Il ressort du test de piégeage du radical NO que (Figure 31), l'EEAa aux concentrations testées (0,5-7,5 mg/mL) a piégé le radical NO avec une CP50 de 6,36 mg/mL. Le potentiel anti-radicalaire de l'extrait était inversement proportionnel à la concentration, avec un pic à 1 mg/mL (81,65%).



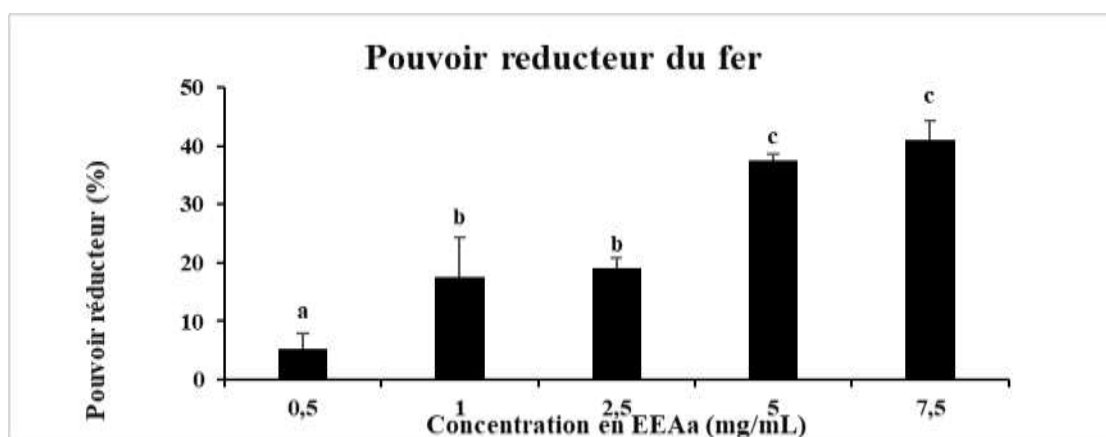
Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; CP50 : concentration Piégeuse 50 ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pourcentages de piégeage différents ($p < 0,05$).

Figure 31 : Piégeage du radical NO par l'EEAa à différentes concentrations

I.2.2 Potentiel réducteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

a) Potentiel réducteur du fer

La mesure du pouvoir réducteur du fer a révélé un potentiel proportionnel aux concentrations en extrait testées (Figure 32). Cependant, la CR50 était supérieure à la concentration maximale en extrait testée (7,5 mg/mL).

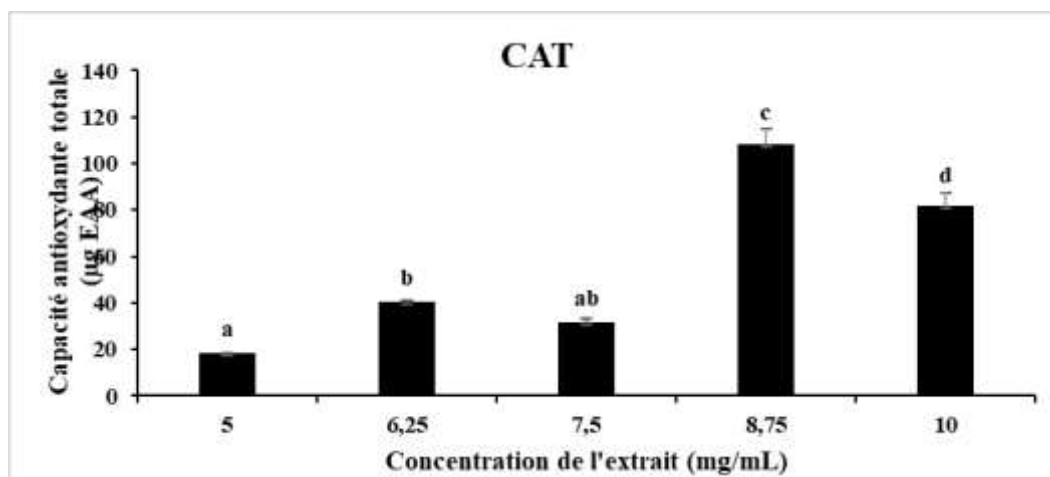


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c) ont des pouvoirs réducteurs statistiquement différents ($p < 0,05$).

Figure 32: Réduction du Fe^{3+} par l'EEAa à différentes concentrations

b) Capacité antioxydante totale

Les résultats (Figure 33) montrent que, la capacité antioxydante de l'EEAa varie de façon sinusoïdale avec la concentration en extrait ; le pic (108.12 µg EAA) de capacité a été atteint à la concentration de 8,5 mg/mL .



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; les concentrations affectées des lettres différentes (a, b, c, d) ont des CAT statistiquement différentes ($p < 0,05$).

Figure 33: Capacité antioxydante totale de l'EEAa à différentes concentrations

I.3 Potentiel antiprolifératif de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* sur quelques lignées de cellules cancéreuses

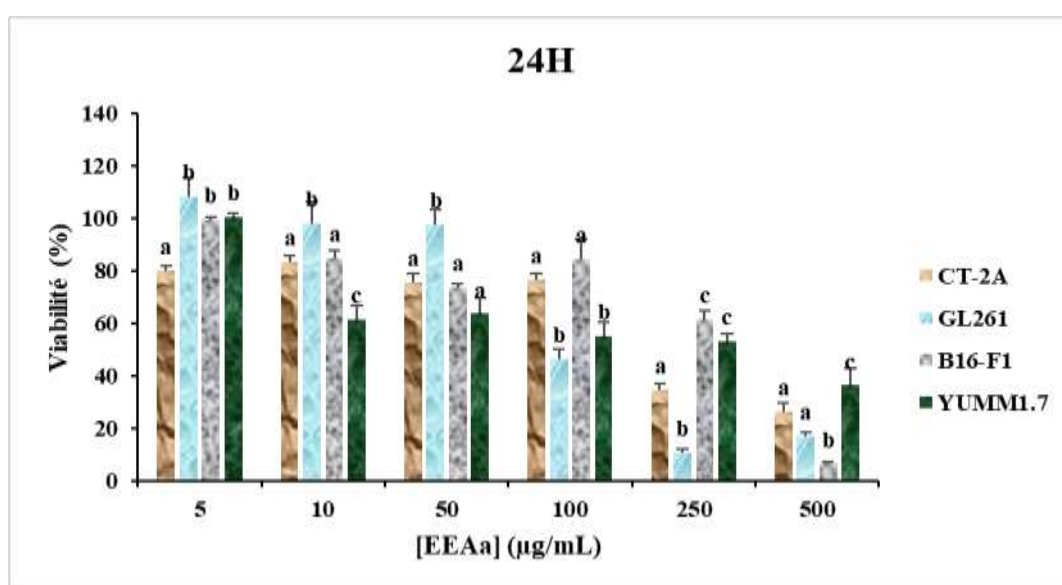
L'activité antiproliférative de l'extrait a été évaluée à travers la mesure de son activité cytotoxique sur une large gamme de lignées cellulaires cancéreuse. A la suite de ce test la lignée cellulaire la plus sensible après 48 H d'exposition à l'extrait a été utilisée pour l'exploration de quelques mécanismes d'action antiprolifératifs ; ceci a été réalisé à travers la mesure de l'expression de quelques gènes par qPCR et la détection des protéines par western blot.

I.3.1 Lignée cellulaire la plus sensible à l'EEAa

L'extrait a été testé sur trois (2) lignées cellulaires du gliome (CT 2Aet GL 261) et deux (2) lignées cellulaires du mélanome (B16-F1 et YUMM 1.7). Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentage de viabilité après 24 et 48 h de traitement.

I.3.1.1 Effet antiprolifératif de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium* sur les cellules cancéreuses après 24H d'exposition

L'activité cytotoxique sur les lignées cellulaires après 24H d'exposition est représentée par la Figure 34 ci-dessous. Il en ressort qu'après 24H d'exposition, L'EEAa à toutes les concentrations testées a inhibé la prolifération des cellules CT2A et GL261, B16-F1 et YUMM 1.7, excepté la plus petite concentration (5µg/mL) sur la lignée GL-261. Aux concentrations de 10 à 100 µg/m, l'EEAa a été plus antiprolifératif pour la lignée YUMM1.7. Cependant, aux concentrations en EEAa les plus élevées, les cellules GL261 ont été les plus sensibles.

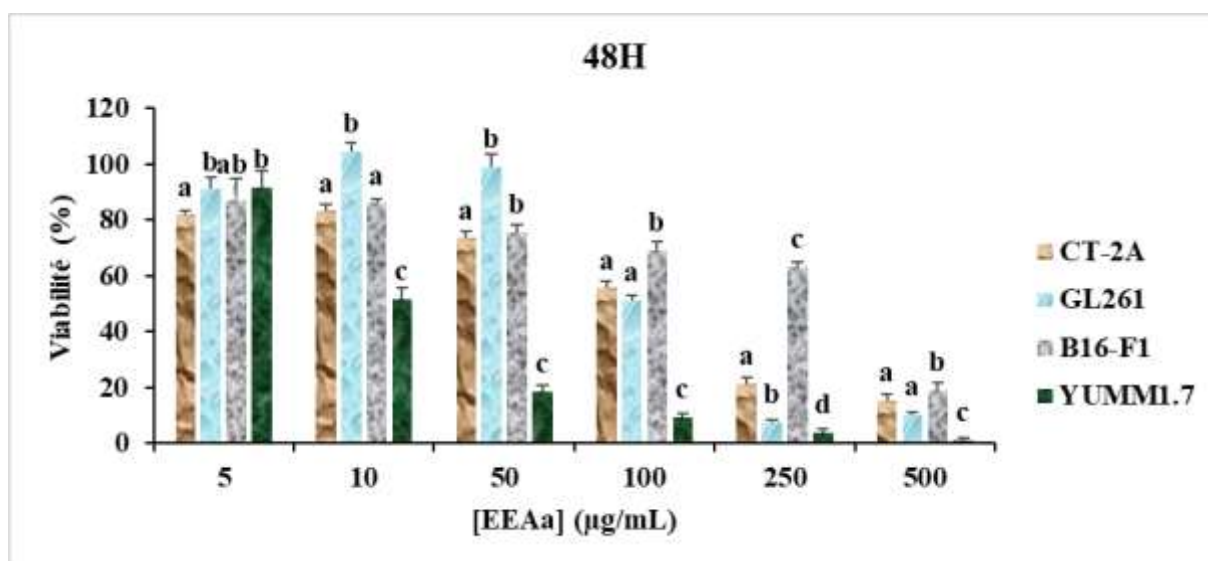


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type pour la viabilité. ; CT 2A, GL 261, B16-F1, YUMM1.7 : lignées cellulaires ; EEAa : extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* ; Pour chaque concentration en EEAa, les barres affectées de lettres différentes (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 34: Effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires CT-2A, B16-F1, GL261 et YUMM 1.7 après 24H d'exposition

I.3.1.2 Effet antiprolifératif de l'extrait éthanolique des graines d'*A. angustifolium* sur les cellules cancéreuses après 48H d'exposition

Le Figure 35 ci-après présente l'effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires après 48H. Il a été constaté que l'extrait aux concentrations testées a inhibé la prolifération de ces cellules. Une différence significative n'a été observée entre la viabilité des différentes cellules qu'à partir de la concentration en EEAa de 10µg/mL, avec une meilleure sensibilité des cellules YUMM1.7.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type pour la viabilité. ; YUMM, B16F : lignées cellulaires ; EEAa : extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* ; Pour Concentration en EEAa, les bandes affectées de lettres différentes (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 35: Effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires CT-2A, B16-F1, GL261 et YUMM 1.7 après 48H d'exposition

Concernant la CI_{50} (Tableau VIII) de l'EEAa vis-à-vis des différentes lignées cellulaires, la lignée GL261 a été la plus sensible après 24h d'exposition (215,04 µg/mL) tandis qu'à 48h, la lignée YUMM1.7 fut la plus sensible (31,5 µg/mL)

Tableau VIII: CI_{50} de l'EEAa vis à vis des différentes lignées cellulaires après 24H et 48H d'exposition

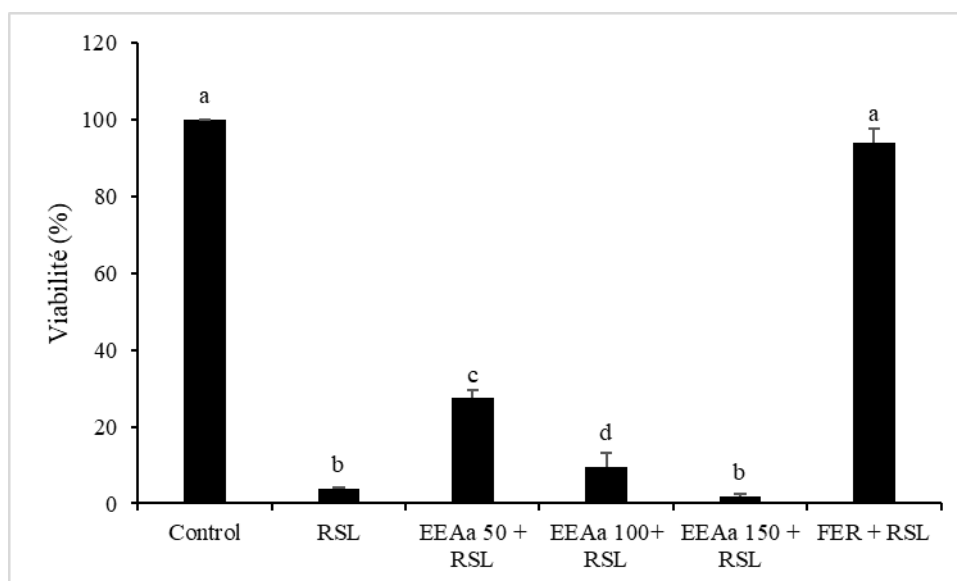
	Lignées	CT-2A	GL261	B16-F1	YUMM1.7
C50 (µg/mL)	24H	244,94	215,04	263,78	263,21
	48H	188,64	206,42	283,36	31,5

CI 50 : concentration inhibitrice 50

Le cancer étant une maladie dont le traitement se fait sur du long terme, la plus petite CI_{50} après 48H d'exposition à l'EEAa a été utilisée comme critère de sélection de la lignée cellulaire la plus sensible à l'extrait. De ce fait, la lignée YUMM 1.7 a été sélectionnée et utilisée pour l'exploration des mécanismes d'action.

I.3.2 Effet de l'extrait éthanolique d'*A. angustifolium* sur la mort cellulaire induite par le RSL-3 chez les cellules YUMM 1.7

L'effet de l'extrait sur la mort cellulaire induite l'agent pro-ferroptotique RSL-3 est représenté par la Figure 36 ci-dessous. Il en ressort que, comparativement au contrôle non traité, le traitement des cellules YUMM 1.7 avec 0,004 mM de RSL 3 a entraîné une baisse significative de la viabilité cellulaire. Cependant, le prétraitement des cellules avec de l'EEAa aux doses de 50 et 100 μ g/ml a limité la mort des cellules, conduisant à une augmentation de la viabilité cellulaire comparé au RSL-3 seul. Cette protection contre la mort induite par le RSL-3 était inversement proportionnelle à concentration en extrait, et moins efficace que la protection assurée par la ferrostatine.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; RSL : Ras small letal molecule ; EEAA : extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* : 50, 100 et 150 : concentration d'extrait en μ g/mL ; FER : Ferrostatine 1 ; les traitements affectées des lettres différentes (a, b, c, d) ont des nombres de cellules viables différents ($p < 0,05$).

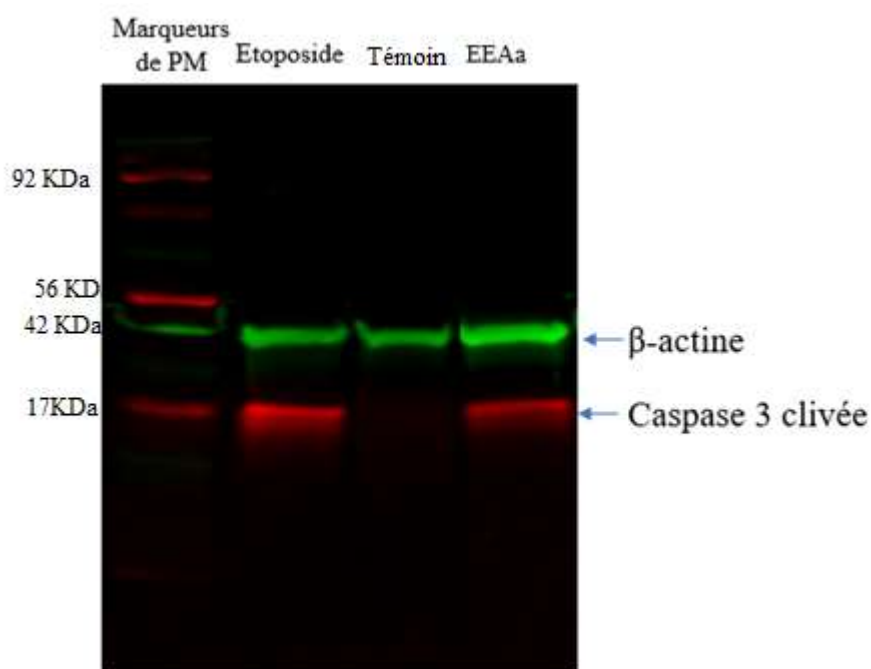
Figure 36: Effet de l'EEAa sur la peroxydation lipidique induite par el RSL-3 chez les cellules YUMM 1.7

I.3.3 Exploration des mécanismes de mort cellulaire induite par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* chez les cellules YUMM 1.7

Deux mécanismes de morts cellulaires ont été explorés, notamment l'apoptose et la nécroptose, à travers la détection des protéines impliquées par western blot

I.3.3.1 Mise en évidence de l'apoptose par détection de l'expression protéique de la Caspase-3 clivée

Les bandes électro-phorétiques pour la mise en évidence de l'apoptose chez les cellules YUMM 1.7 sont représentés sur la Figure 37 ci-dessous. On y déduit une expression de la β -actine (protéine de contrôle) tant chez les cellules non traitées (Contrôle) que chez celles traitées à l'étoposide (molécule pro-apoptotique de référence) ou l'EEAa. Cependant, seules les cellules traitées avec l'EEAa ou l'étoposide présentaient une expression protéique de la Caspase-3 clivée ou active. La Caspase-3 clivée étant l'un des effecteurs ultimes de la mort cellulaire par apoptose, l'EEAa induirait donc la mort des cellules YUMM 1.7 par apoptose.

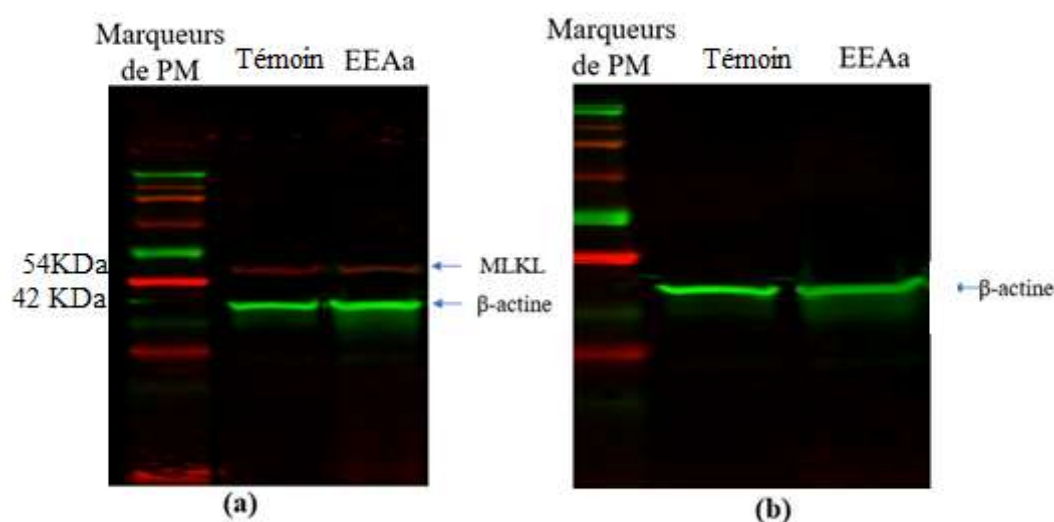


PM : poids moléculaire

Figure 37: Effet stimulateur de la caspase-3 active par l'EEAa chez les cellules YUMM1.7

I.3.3.2 Mise en évidence de la nécroptose par détection de l'expression protéique des formes inactives et actives de la protéine MLKL

Les bandes électrophorétiques de mise en évidence de la nécroptose, par détection de la protéine MLKL active (pMLKL) et inactive (MLKL) sont présentées sur la figure 38 ci-dessous. La β -actine a également été utilisée comme protéine de contrôle et a été exprimée par les cellules non traitées et les cellules traitées avec l'extrait. Concernant la protéine d'intérêt (MLKL), on note une expression de sa forme inactive (Figure 38a) tant par les cellules traitées que celles non traitées. Par contre, la forme active (pMLKL) n'a été exprimée autant par les cellules YUMM 1.7 non traitées que celles traitées avec l'EEAa (Figure 38b). Ce résultat traduit que, l'EEAa n'induit pas la mort cellulaire par nécroptose chez les cellules YUMM 1.7.



MLKL : Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase MLKL, pMLKL : phosphorylated Mixed Lineage Kinase domain Like, PM : poids moléculaire.

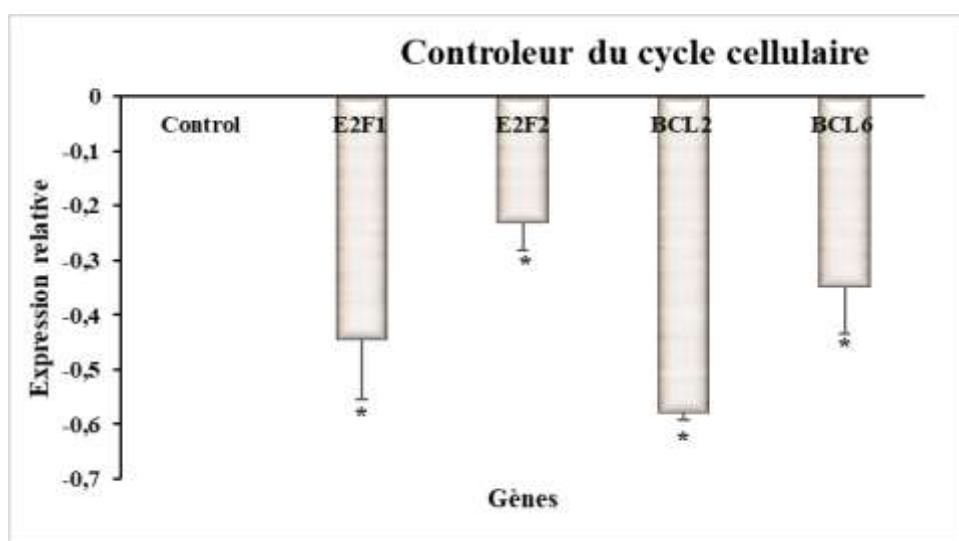
Figure 38: Effet inhibiteur de pMLKL (b) par l'EEAa chez les cellules YUMM1.7

I.3.4 Effet modulateur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur l'expression de quelques gènes chez les cellules YUMM 1.7

La mesure de l'expression des gènes codant pour les facteurs de croissance angiogéniques (VEGF, PDGF, et IGF), les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α), anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) et des facteurs de transcription et contrôleurs du cycle cellulaire (E2F1, E2F2, BCL-6 et BCL-2) a été effectuée par PCR en temps réel. Les résultats ont été exprimés en expression relative, par rapport aux cellules non traitées.

I.3.4.1 Effet de l'extrait sur l'expression des gènes E2F1, E2F2 BCL-2 et BCL-6 de contrôle du cycle

L'effet de l'extrait sur l'expression génique des contrôleurs du cycle cellulaire a montré que, la concentration en EEAA de 250 µg/mL a entraîné après 24 H une répression des facteurs de transcription E2F1 et E2F2, impliqués dans la progression du cycle cellulaire, ainsi qu'une répression des gènes anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-6. l'EEAA pourrait donc induire un arrêt de la progression du cycle cellulaire et conduire la cellule YUMM 1.7 vers une mort par voie intrinsèque de l'apoptose (Figure 39).

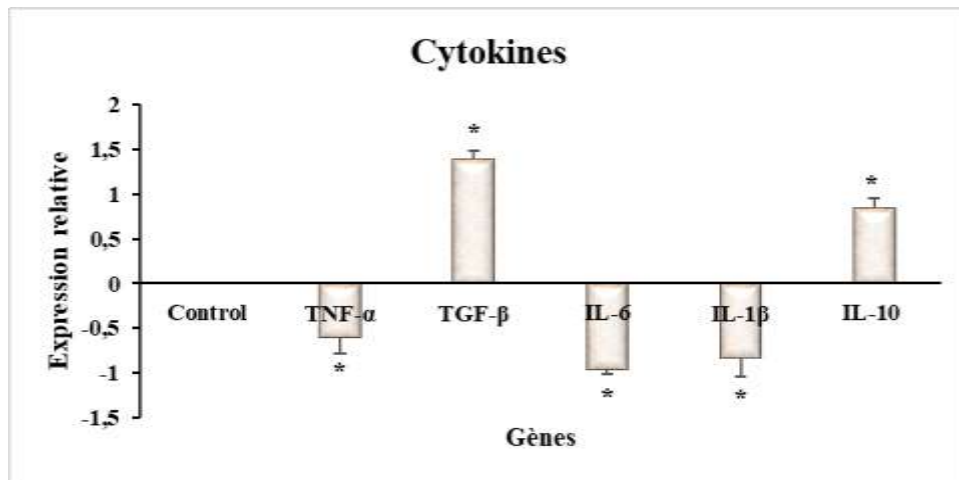


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; BCL-2 (6) : B-cell lymphoma -2 (6) ; E2F1 (2) : Eucaryotes transcription factor 1(2). les gènes affectées de l'Astérisk (*) ont des différences par rapport au à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 39: Effet inhibiteur de l'EEAA sur les contrôleurs du cycle cellulaire chez les cellules YUMM 1.7

I.3.4.2 Effet modulateur de l'extrait sur l'expression des gènes codant pour IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α et TGF- β

Le résultat de l'expression génique des cytokines pro et anti-inflammatoires est représenté sur la Figure 40 ci-dessous. Il en ressort que le traitement des cellules YUMM 1.7 a entraîné une régulation à la hausse et significative de la cytokine anti-inflammatoire (interleukine 10), tandis que, les cytokines pro-inflammatoires *Tumour Necrosis Factor alpha* (TNF- α), interleukine-1 beta (IL-1 β) et IL-6 était réprimés. Ceci traduisant un potentiel antiinflammatoire de l'EEAA. Le facteur de croissance transformant(TGF- β) a également été régulé à la hausse.

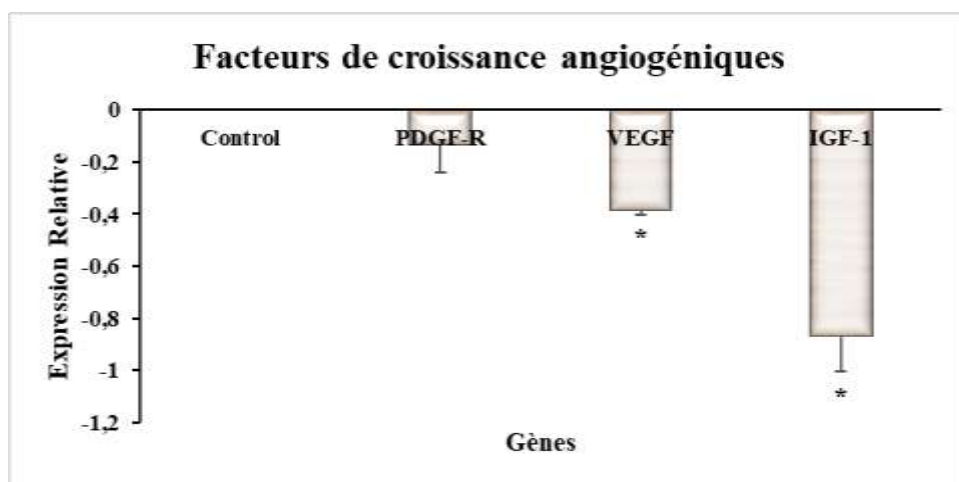


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; TNF- α : tumour necrosis facctor-alpha ; TGF- β : transforming growth factor-beta ; IL-1 β (6, 10) : interleukine-1beta (6, 10) ; les gènes affectées de l'Astérisk (*) ont des différentes par rapport au à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 40: Effet modulateur de l'EEAa sur l'expression des cytokines chez les cellules YUMM 1.7

I.3.4.3 Effet modulateur de l'extrait sur l'expression des gènes de facteurs de croissance angiogéniques *VEGF*, *IGF-1* et *PDGF-R*

L'effet de l'EEAa sur l'expression relative des gènes codants pour les facteurs de croissances angiogéniques *VEGF*, *IGF-1* et le de *PDGF* (*PDGFR*) est représenté sur la Figure 41 ci-dessous. Il en ressort que, le traitement des cellules YUMM 1.7 avec de l'EEAa sur une durée de 24h à réprimé de façon significative ($P < 0,05$). De ce fait, l'EEAa serait capable d'inhiber l'angiogenèse tumorale.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; PDGF-R : platelets-derived growth factor receptor ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; IGF-1 : insulin like growth factor-1 ; les gènes affectés de l'Astérix (*) ont des différences par rapport à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 41: Répression des facteurs de croissance relatifs à l'angiogenèse PDGFR, VEGF et IGF-1 par l'EEAa chez les cellules YUMM 1.7

I.4 Discussion partie I

Plusieurs études ont révélé le potentiel antiprolifératif des extraits de plantes et de leurs constituants dans la prise en charge du cancer. L'une des familles botaniques les plus explorées dans ce domaine est celle des *Zingiberaceae* (Kuété *et al.* 2014) à laquelle appartient *Aframomum angustifolium*, la plante étudiée dans le présent travail. Le stress oxydatif étant fortement impliqué dans les mécanismes cancérigènes (Jelic *et al.*, 2021), explorer un extrait de plante possédant un fort potentiel antioxydant pour ses propriétés anticancéreuses serait une approche intéressante. D'entrée de jeu, le criblage des composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* a révélé la présence des composés phénoliques (6-gibgéról, 6-paradol, Quercétine), des alcaloïdes (Piperine et isoprinosine) et des terpenoïdes (α -pinène, β -caryophyllène, β -bisabolène). Ces résultats concordent avec les données de la littérature rapportant la présence de ces classes de composés bioactifs dans les graines et les peaux de ce fruit (Inkoto *et al.*, 2021 ; Baser et Kürkcüglü, 2001). La mise en évidence du potentiel antioxydant de ces différentes classes de composés a déjà fait l'objet de nombreuses études (Kandylis, 2022 ; Vidinamo *et al.*, 2021). Ceci justifierait du potentiel antioxydant de l'EEAa relevé dans ce travail (Figures 29 à 33). Les potentiels observés (antiradicalaire et réducteur) seraient dus aux capacités de ces composés (Quercétine, α -Pinène) à céder un proton ou un électron aux agents oxydant, favorisant ainsi le passage d'une forme instable à une plus stable (Bougandoura et

Bendimerad, 2012). Ce potentiel pourrait ainsi conférer à l'EEAa la capacité d'inhiber l'initiation et la promotion des cancers (**Prasad et al., 2017**).

Pour apprécier ce potentiel anticancéreux, des tests sur lignées cellulaires ont été effectués. De prime à bord, le potentiel antiprolifératif de l'EEAa sur des lignées cellulaires de cancer du cerveau (CT2A, GL261) et de la peau (YUMM 1.7, B16F) a été évalué dans le but d'identifier la plus sensible. Il a été constaté que l'extrait provoquait la mort des cellules cancéreuses de manière dépendante de la concentration (Figures 34 et 35). Après 24 heures d'exposition, l'extrait était plus efficace sur les lignées cellulaires de cancer du cerveau. Cependant, lorsque le temps d'exposition était prolongé (soit 48 h), l'extrait était plus efficace sur la lignée cellulaire de la peau YUMM 1.7 (31,5 µg/mL). L'effet antiprolifératif de l'EEAa observé sur les différentes lignées cellulaires serait dû à la présence de composés bioactifs dans l'extrait, capables d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses. En effet, plusieurs études ont déjà montré que, les métabolites secondaires extraits des plantes, avaient la capacité d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses via différents mécanismes (**Rampogu et al., 2022 ; Siraj et al., 2021; Prasad et al., 2017 ; Mocanu et al., 2015**). En occurrence, l' α -pinène identifié dans l'extrait (Tableau VI) serait à lui seul capable d'induire la mort par apoptose des cellules cancéreuses (**Hou et al., 2019**) et un arrêt G2/M du cycle cellulaire (**Chen et al., 2015**). Les traitements anticancéreux étant fait sur du long terme, la lignée cellulaire YUMM 1,7 a été considérée comme étant plus sensible à l'EEAa et utilisée pour explorer les voies d'action antiproliférative de cet extrait.

Les cellules cancéreuses sont reconnues par un ensemble de caractéristiques qui leurs sont communes, dont l'une des principales est la résistance à la mort (**Fouad et Anei, 2017**). Le principal type de mort cellulaire est l'apoptose qui peut être induit par des stimuli extracellulaires impliquant les récepteurs de mort ou par voie intrinsèque (mitochondriale). Ces deux voies aboutissent à l'activation des caspases effectrices, dont la caspase-3 (**Mishra et al., 2018**). Les bandes électrophorétiques issues de la séparation des protéines extraites chez les cellules traitées avec l'EEAa ayant révélé la caspase-3 active (Figure 37). l'EEAa serait capable d'entraîner la mort des cellules YUMM1.7 par apoptose. Par ailleurs la qPCR a révélé une modulation négative de l'expression des gènes antiapoptotiques BCL-2 et BCL-6 par l'EEAa (Figure 38) suggérant une activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. En effet, l' α -pinène présent dans l'extrait serait capable d'entraîner un dysfonctionnement mitochondrial, ou de moduler les gènes de la famille des BCL-2. Ces actions seraient favorables à la libération du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol (**Ye et al.,**

2020). Ce cytochrome C avec apaaf-1 (*apoptotic protease activator factor 1*) va former l'apoptosome, avec activation de la caspase-9, qui va à son tour activer la caspase-3 par clivage. Il en résultera une translocation de la caspase-3 clivée dans le noyau où elle dégradera un large éventail de protéines, entraînant la mort cellulaire (**Mishra et al., 2018**).

Par ailleurs, il est connu que la voie extrinsèque de l'apoptose et la nécroptose sont toutes 2 activées par les voies sous-jacentes des récepteurs de la mort à l'instar des récepteurs à *TNF- α* (**Mishra et al., 2018 ; Maelfait et al., 2017**). Cependant la répression du *TNF- α* (Figure 40) par l'EEAa ainsi que et l'absence de la protéine pMLKL (Figure 38) dans les lysats de cellules traitées avec l'EEAa ont été observés dans cette étude. Cela pourrait suggérer une inactivation de la voie extrinsèque de l'apoptose et de la nécroptose. Néanmoins, il a été montré que, des métabolites secondaires des plantes tels que les tanins, étaient capables stimuler la mort par voie extrinsèque de l'apoptose malgré une répression de la pro-Caspase-8 enclenchant ainsi la mort par voie extrinsèque de l'apoptose (**Kandir et al., 2024**). La présence de cette classe de composés dans l'EEAa, présage que, l'EEAa pourrait également promouvoir la voie extrinsèque de l'apoptose, d'autant plus que le *TNF- α* n'est pas le seul ligand initiateur de cette voie (**Mishra et al., 2018**).

Hormis l'apoptose et la nécroptose comme mécanisme de mort cellulaire, il existe également la ferroptose. Elle est initiée par des petites molécules telles que le RSL-3, qui inhibe la glutathion peroxydase 4, entraînant une accumulation des radicaux peroxydes dans la cellule (**Zhang et al., 2022 ; Dixon et al., 2012**). La présente étude a montré que, l'EEAa à des concentrations de 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$, protège les cellules YUMM 1.7 de la peroxydation lipidique induite par le RSL-3 tandis qu'à 150 $\mu\text{g/mL}$, elle promeut d'avantage la mort de ces cellules (Figure 36). Le potentiel antioxydant de l'extrait démontré plus haut, serait à l'origine de la protection des cellules contre les effets des ERO, initiés par le RSL-3. Par contre à la plus grande concentration en EEAa testée, les métabolites secondaires présents dans l'extrait tels que les composés phénoliques, seraient à l'origine de l'effet observé. En effet, ils seraient capables d'induire la mort cellulaire par accumulation des ERO grâce à leur propriétés pro-oxydantes à forte dose (**NavaneethaKrishnan et al., 2019 ; Bishayee et al., 2013**).

La perte des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, conduisant à une prolifération illimitée est à l'origine de la progression cancéreuse. En effet, le cycle cellulaire est contrôlé par une panoplie de protéines dont les facteurs de transcription de la famille E2F, qui contrôlent la transition G1/S du cycle cellulaire. Ces derniers, comprenant des activateurs (*E2F1* à *E2F3*) et des répresseurs (*E2F4* à *E2F8*), sont de nouveaux biomarqueurs et des

cibles thérapeutiques dans la prise en charge du cancer (**Yao et al., 2020**). Dans la présente étude, l'EEAa a réprimé des gènes *E2F1* et *E2F2* (Figure 39), suggérant la capacité des constituants de l'extrait à prévenir la transition G1/S des cellules cancéreuses. La répression de ces facteurs de transcription serait associée à la surexpression de *TGF-β* par l'EEAa (Figure 40). En effet, dans ses voies de signalisation, le *TGF-β* activé réunit ses 2 paires de récepteurs de type II (TbRII) et I (TbRI) dont le type I va lier et activer les Smads régulés par les récepteurs (R-Smads) au niveau des sérines carboxy-terminales. Une fois activés, l'isoforme 3 (R-smad 3), va s'associer à *E2F4/5*, *DP1* et au corépresseur p107 pour former un complexe répresseur qui sera transloqué dans le noyau et se liera à l'élément inhibiteur du *TGF-β* situé au niveau du promoteur *Myc* (**Frederick et al., 2004 ; Chen et al., 2002 ; Yagi et al., 2002**). Cette répression de *Myc* va s'accompagner d'une induction transcriptionnelle de l'expression des inhibiteurs de CDK (p21CIP1 et p15INK4B) normalement inhibés par *c-Myc* dans les cellules en prolifération. Ceci conduirait donc à un arrêt du cycle cellulaire entre les phases G1 et S. l'effet observé serait dû à la présence des composés bioactifs tels que les alcaloïdes dans l'EEAa. En effets, il a été révélé que, les alcaloïdes extraits de *Pseuduvaria rugosa* avaient la capacité d'arrêter la progression des cellules de leucémie HL-60 and U937 à la phase G1 à travers l'inhibition des CDK médiée par la voie p21(WAF/Cip1) (**Uadkla et al., 2013**).

L'une des caractéristiques émergentes des cellules cancéreuses est leur capacité à induire une inflammation ; ce qui a conduit à l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires sélectifs dans la prise en charge des cancers. l'EEAa a provoqué une diminution significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL6- et IL-1 β) et une augmentation significative de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire (IL-10) (Figure 40). Ces résultats peuvent être dus à la présence de β -caryophyllène dans l'extrait comme l'a révélé le profil chromatographique. En effet, il a été montré que, l'administration d'un gel contenant 1% de caryophyllène à des rats *Wistar* souffrant d'une plaie d'excision entraînait une amélioration du statut anti-inflammatoire avec augmentation des niveaux d'IL-10, et diminution des niveaux de TNF- α , IL-6 et IL-1 β (**Gushiken et al., 2022**). Par ailleurs, il a été démontré que les récepteurs activés de l'IL-10 sont capables d'activer le facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) par l'intermédiaire de kinases sous-jacentes JAK 1 (*Janus Activating Kinase 1*) (**Murray, 2005**). L'activation de STAT3 conduit à l'expression de facteurs impliqués dans la réponse anti-inflammatoire dont Bcl-3 (*B*

lymphoma cell-3). Ce dernier empêcherait NF- κ b, de se lier à l'ADN pour induire la transcription de cytokines pro-inflammatoires (Kim *et al.*, 2014 ; Hutchins *et al.*, 2013).

Le potentiel angiogénique et invasif des cellules cancéreuses est responsable du caractère agressif des cancers et est associé à un mauvais pronostic (Trapp *et al.*, 2010). Ces différents processus sont influencés par certaines cytokines et facteurs de croissance produits par les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires environnantes. L'exposition des cellules YUMM 1.7 à l'EEAa a entraîné une répression des gènes codant pour les promoteurs angiogéniques *VEGF* et *IGF-1* (Figure 41). Cela refléterait la présence de composés bioactifs dans l'EEAa, tels que les polyphénols, qui sont capables d'inhiber l'angiogenèse et l'invasion des tumeurs. En effet, une étude précédente avait révélé que, le Resvaratrol inhibait l'angiogenèse des cellules endothéliales en coculture avec des cellules de mélanome par la répression de l'expression du *VEGF* (Naginei *et al.*, 2014). Ceci se ferait par liaison direct aux transducteurs de signaux intracellulaires tels que *HIF-1 α* (*hypoxia inducible factor*) (Zhang *et al.*, 2014). L'inhibition de *HIF-1 α* par le resvératrol empêchera donc sa translocation dans le noyau où, il était supposé s'associer à *HIF-1 β* pour activer la transcription de *VEGF*, par liaison à l'élément de réponse à l'hypoxie, situé son site promoteur (Fu *et al.*, 2015). Par ailleurs il a été rapporté que la Quercetine était capable d'inhiber les récepteurs de l'IGF-1 et réprimer son gène (Chen *et al.*, 2021 ; Gaban *et al.*, 2019). Ceci entraînerait un défaut d'activation de *HIF- α* , par inactivation des voies de signalisation MAPK et PI3K et donc un défaut d'expression de *VEGF* (Fukuda *et al.*, 2002). La répression des promoteurs angiogéniques serait ainsi favorable à la réduction des moyens d'approvisionnement en nutriments et en oxygène au sein des tumeurs cancéreuses, et donc la mort des cellules cancéreuses.

Conclusion partielle I

Au terme de cette partie où il était question de faire une caractérisation phytochimique de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* et d'explorer son potentiel antiprolifératif, il en ressort que,

- Cet extrait contient des composés phénoliques, terpenoïdes et alcaloïdes et a présenté un meilleur effet antiprolifératif sur la lignée cellulaire cancéreuse YUMM1.7 (CI50: 31,5 μ g/mL)
- Chez ces cellules (YUMM1.7) l'EEAa (250 μ g/mL) a inhibé l'angiogenèse, par répression des promoteurs angiogéniques (*VEGF* et *IGF-1*) induit un arrêt G1/S du

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

cycle cellulaire par répression des facteurs E2F1 & 2 et promu la mort par voie intrinsèque de l'apoptose en réprimant les gènes antiapoptotiques BCL-2 & 6.

Du fait de la similitude de comportement des cellules cancéreuses indépendamment de leurs origines, et de la forte recrudescence des cancers du sein, l'utilisation de l'EEAa dans la prise en charge du cancer du sein chez un modèle animal a été envisagé pour la suite de l'étude

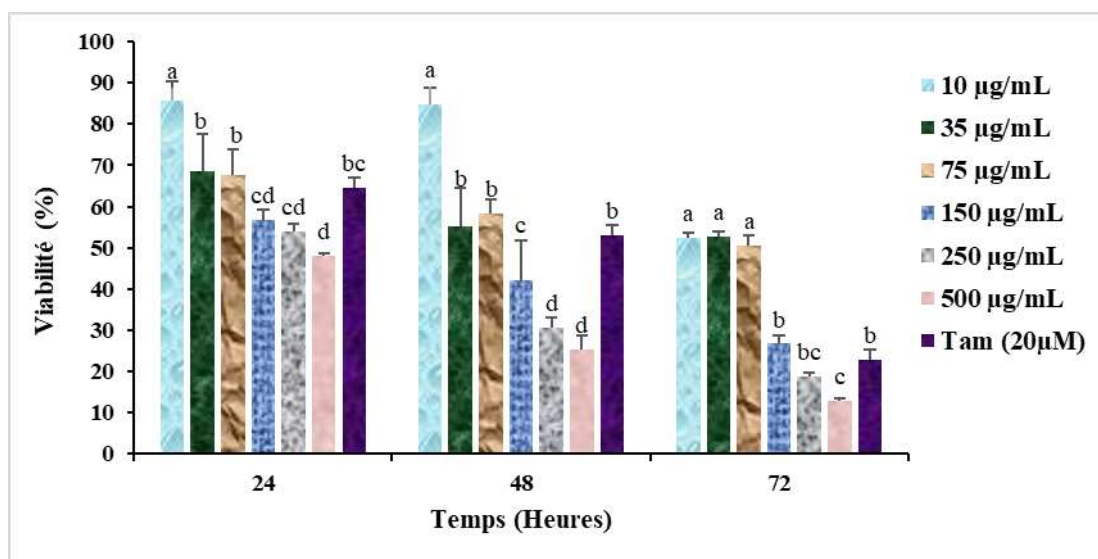
Partie II : Activités antiproliférative, antitumorale et immuno-modulatrice de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium*

La cytotoxicité de l'extrait sur les cellules du carcinome mammaire humain a d'abord été vérifiée avant d'envisager les études *in vivo* chez un modèle animal de cancer du sein induit au DMBA

II.1 Activité antiproliférative de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium* sur la lignée MCF-7 du cancer du sein

Le test de viabilité cellulaire au MTT sur les cellules MCF-7 du carcinome mammaire a révélé que, toutes les concentrations en extrait testées (10, 35, 75, 150, 250 et 500 µg/mL) ont eu un effet cytotoxique sur cette lignée cellulaire (Figure 42). L'activité antiproliférative de l'EEAa était concentration dépendante et temps dépendant. En effet, le pourcentage de viabilité était inversement proportionnel à la concentration en extrait dans le milieu et au temps d'exposition (24, 48 et 72 H). En 24H d'exposition, l'EEAa aux concentrations allant de 35 à 250 µg/mL, a présenté un potentiel antiprolifératif similaire au tamoxifène (20 µM). Après 48H L'extrait aux concentrations de 150 à 500 µg/mL s'est montré plus efficace que le tamoxifène tandis que seule la plus grande dose d'extrait testée était significativement plus efficace que le tamoxifène après 72H d'exposition.

L'efficacité antiprolifératif temps dépendant de l'EEAa sur les cellules MCF-7 a été marquée par une diminution des CI50 avec la durée d'exposition à l'extrait, allant de 389,46 µg/mL après 24 heures à 9.66 µg/mL après 72 heures (Tableau VIII).



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type pour la viabilité. ; EEAA : extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* ; Tam : tamoxifène ; Pour chaque temps, les barres affectées de lettres différentes (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 42: Effet de l'EEAa sur la prolifération des cellules MCF-7 à différents temps et à différentes concentrations

Tableau IX: CI₅₀ de l'EEAa vis-à-vis des cellules MCF-7 aux différents temps

Temps d'exposition	24 H	48H	72H
CI ₅₀ (µg/mL)	389,46	94,16	9,66

CI₅₀ : concentration inhibitrice 50

II.2 Activité antitumorale de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

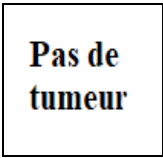
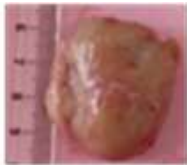
L'activité antitumorale de l'EEAa a été évaluée à travers des analyses macroscopiques, biochimiques et microscopiques.

II.2.1 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les paramètres tumoraux

L'administration de 50 mg/Kg, Pc de DMBA a au bout de 3 mois chez les animaux a entraîné des modifications physiques des mamelles. Quarante pourcent (40%) de ces animaux avaient une tumeur de diamètre moyen à $0,5 \pm 0,2$ Cm, les 60% restant avaient une modification de la peau autour du mamelon (peau d'orange). Après un mois de traitement, une incidence tumorale de 100% a été observée dans le groupe DMBA. Cependant, l'administration de l'EEAa aux doses respectives de 150 mg/Kg, Pc et 300 mg/Kg, Pc a réduit cette incidence de 40%. Le tamoxifène a quant à lui été plus efficace que l'EEAa en

maintenant cette incidence à 40%. De même, le volume tumoral moyen et la masse tumorale moyenne ont été réduits avec l'administration de l'EEAa. La meilleure performance a été enregistrée avec l'extrait à la dose de 150 mg/Kg, Pc qui a entraîné une baisse significative ($p < 0,05$) de la masse tumorale de 30,38% comparé au groupe DMBA. Le tamoxifène était également plus efficace que l'EEAa aux doses testée (Tableau X).

Tableau X: Effet régressif de l'EEAa sur les paramètres tumoraux

Paramètres tumoraux	TN	DMBA	EEAa 150	EEAa 300	TAM
					
Incidence tumorale (%)	/	100	60	60	40
Inhibition relative à l'IT	/	/	40	40	60
Volume Tumoral moyen (Cm ³)	/	12,51 ± 3,75 ^a	8,55 ± 4,95 ^b	9,16 ± 2,96 ^{ab}	6,37 ± 1,60 ^b
Inhibition relative au VT (%)	/	/	31.65	26.77	49.08
masse tumorale moyenne (g)		14,40 ± 4,76 ^a	10,01 ± 4,93 ^b	10,24 ± 2,08 ^b	7,15 ± 1,43 ^b
Inhibition relative à la MT (%)	/	/	30,48	28,89	50,34

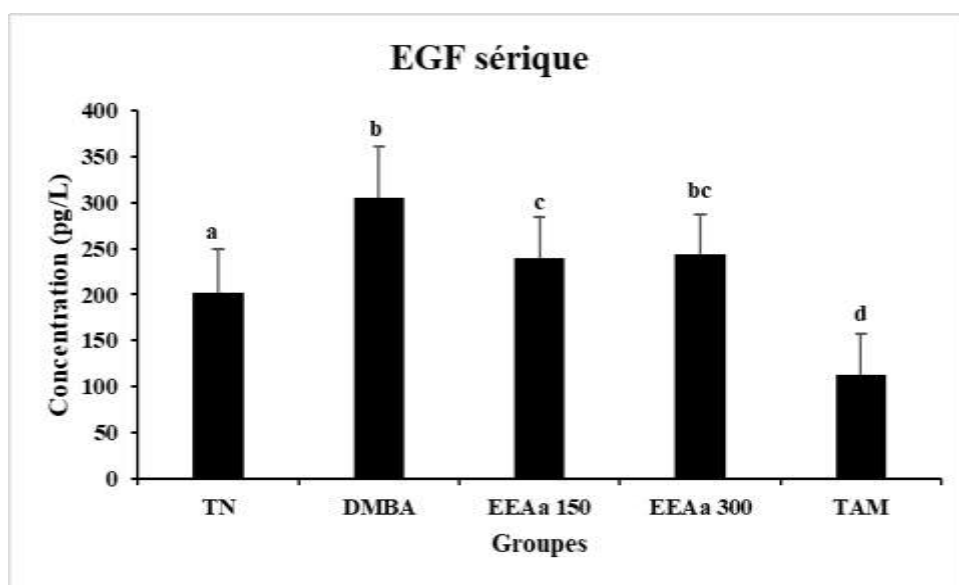
Expression des résultats : moyenne ± écart type ; TN : témoin normal, DMBA : 7,12-diméthylbenz(a)anthracène ; EEAa : extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* ; 150 & 300 : doses d'administration ; IT : incidence tumorale ; VT : volume tumoral ; MT : masse tumorale ; pour un même paramètre, les groupes affectés des lettres différentes (a & b) sont significativement différents ($p < 0,05$).

II.2.2 Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les facteurs de croissance et de survie

Il s'agissait des taux circulant d'EGF, d'estradiol et du taux de glucose dans la glande mammaire

a) Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur le taux sérique d'EGF

Pour mieux apprécier l'effet de l'EEAa sur la croissance tumorale, le taux sérique du facteur de croissance épidermique a été dosé. Il en ressort que, le DMBA a entraîné une augmentation significative ($P < 0,05$) du taux d'EGF ($305,4 \pm 56,44$ pg/L) comparé au groupe normal ($201,67 \pm 47,52$ pg/L). L'administration de l'extrait aux deux doses, a entraîné des baisses de ce taux, avec une différence significative avec la dose de 150 mg/Kg, PC ($239,6 \pm 44,24$ pg/L) par rapport au DMBA. Le tamoxifène a quant à lui entraîné une amélioration significative comparé aux doses testées de l'EEAa (Figure 43).

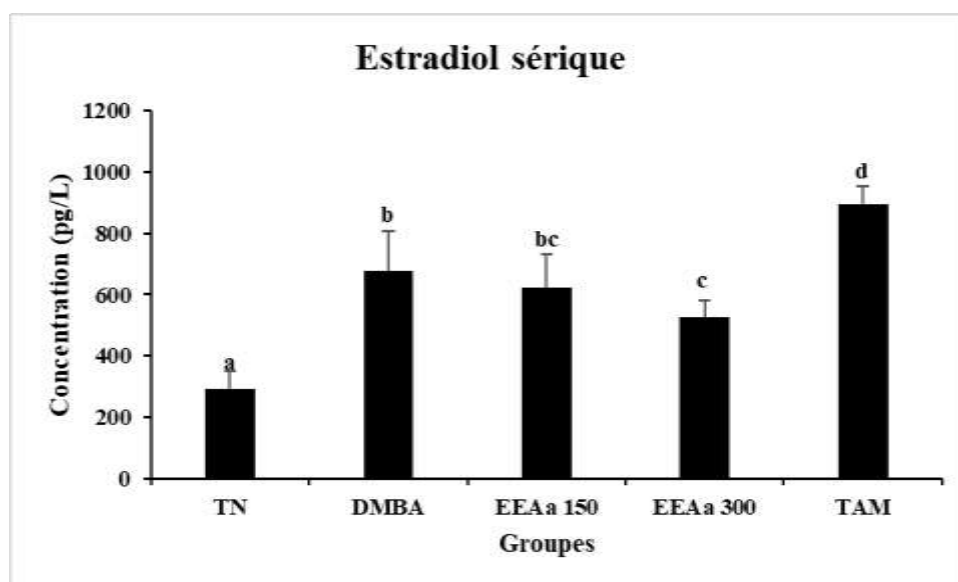


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 43: Effet inhibiteur de l'EEAa sur le taux sérique d'EGF

b) Effet l'extrait éthanolique de graines de d'A *angustifolium* sur le taux d'estradiol sérique

Le taux d'estradiol circulant a également été mesuré comme promoteur de la croissance tumorale. Il en ressort que (Figure 44), l'administration du DMBA a au bout de 4 mois entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux d'estradiol sérique ($667,34 \pm 40,92$ pg/L) comparativement aux animaux normaux ($293,30 \pm 57,21$ pg/L). L'administration de l'EEAa aux doses testées a au bout de 28 jours entraîné une baisse de ce taux, avec un différence significative à la dose de 300 mg/Kg, Pc ($525,26 \pm 56,87$ pg/L) comparé au DMBA. L'administration du tamoxifène a quant à elle entraîné une augmentation significative du taux d'estradiol ($896,85 \pm 54,57$ pg/L) en comparaison aux groupe DMBA et aux groupes traités avec l'EEAa.



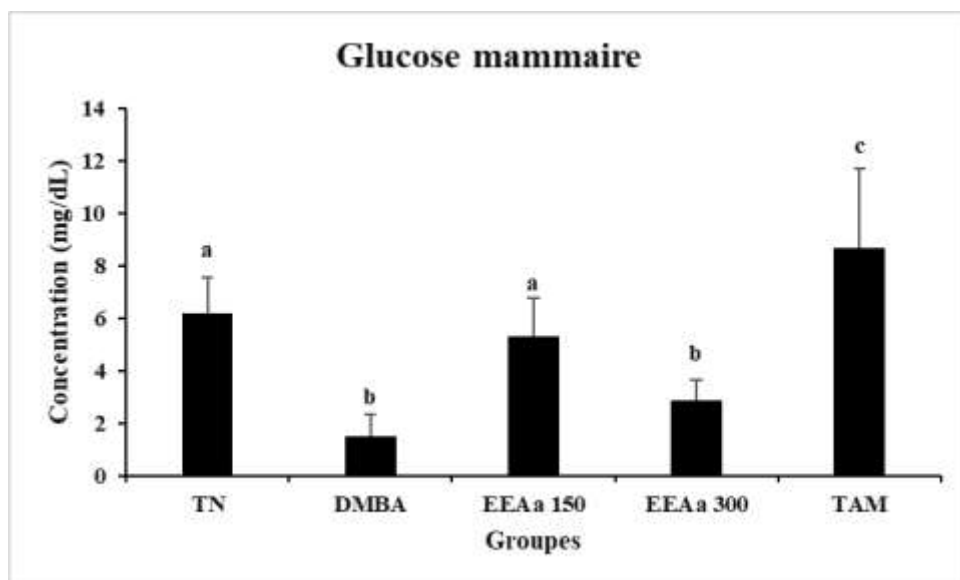
Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'A *angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 44 : Effet inhibiteur de l'EEAa sur le taux d'estradiol sérique

c) Effet de l'extrait éthanolique de graines d'A *angustifolium* sur le taux de glucose mammaire

Le glucose étant le métabolite énergétique le plus utilisé par les cellules cancéreuses, l'activité des cellulaires dans la glande mammaire a été appréciée par le dosage du glucose de cette glande. Il en ressort que (Figure 45), le taux de glucose était significativement ($p < 0,05$) plus faible dans le groupe DMBA non traité ($1,49 \pm 0,82$ mg/dL) comparé au groupe normal ($6,19 \pm 1,38$ mg/dL). L'administration de l'EEAa aux doses testées était associée à des taux

plus élevés de glucose comparé au groupe DMBA, avec une différence significative ($p < 0,05$) à la dose de 150 mg/Kg, PC ($5,32 \pm 1,43$ mg/dL). Le tamoxifène à quant à lui entraînée une augmentation significative du taux de glucose mammaire par rapport aux groupes traités, allant même au-delà de la normale (TN).



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAA 150 & EEAA 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 45 : Effet de l'EEAA sur le taux de glucose mammaire

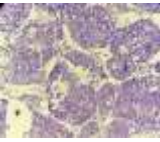
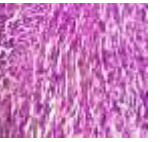
II.2.3 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur la microarchitecture de la glande mammaire et quelques organes de métastase

a) Effet de l'EEAA sur l'histologie de la glande mammaire

Le Tableau XI ci-dessous présente les effets de l'EEAA sur la microarchitecture de la glande mammaire. Il en ressort que, les glandes mammaires des animaux normaux avaient un parenchyme mammaire normal avec des lobules mammaires contenant des cellules acinaires mononuclées entourées par d'abondants adipocytes. Les animaux du groupe DMBA présentaient cependant tous un carcinome canalaire invasif majoritairement de haut grade (SBR 2 ou SBR3) avec une faible infiltration lymphocytaire ($< 10\%$) et environ 30% de comédonécrose. Ceux traités à la dose de 150 mg/Kg, PC présentaient des tumeurs mammaires de type carcinome canalaire cribriforme de grade SBR II sans infiltration lymphocytaire mais avec 30% de comédonécrose, tandis que les tumeurs mammaires retrouvées chez les animaux traités avec la dose de 300 mg/Kg, PC, sont de type fibrosarcome de grade SBR II sans infiltration lymphocytaire avec 30% de comédonécrose. Les animaux

traités avec le tamoxifène présentent quant à ceux en majorité un fibrosarcome de faible grade (SBR1) sans infiltration lymphocytaire et de comédonécrose.

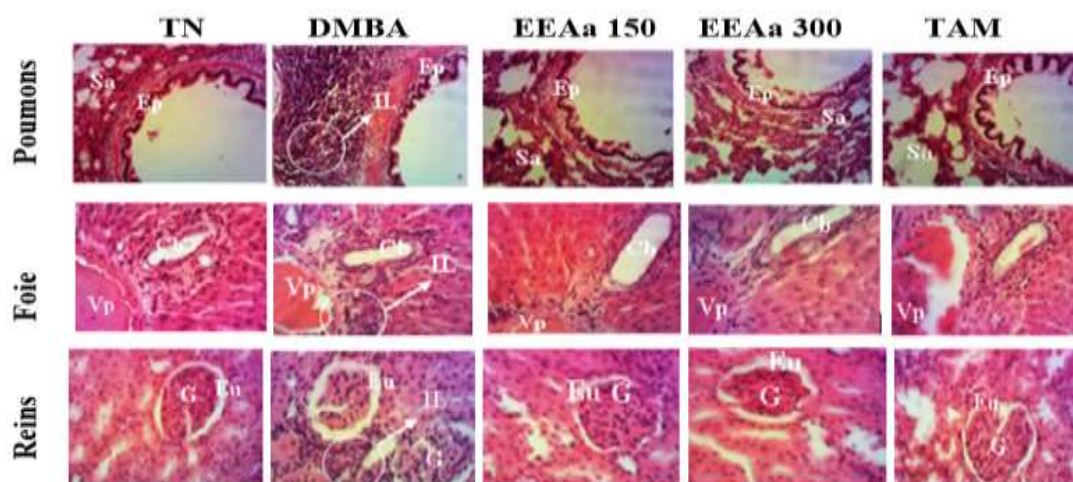
Tableau XI: Effet de l'EEAa sur l'histologie de la glande mammaire (H&E ×400)

Items	TN	DMBA	EEAa 150	EEAa 300	TAM
					
Type histologique	Sein normal	Carcinome canalaire invasif SBR III	Carcinome canalaire cribriforme SBR II	Fibrosarcome	Fibrosarcome
Grade	/			SBR II	SBR I
Infiltration lymphocytaire	/	~10%	0%	0%	0%
Nécrose	/	30%	30%	30%	0%

TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène

b) Effet de l'EEAa sur la microarchitecture de quelques organes de métastase

L'administration du DMBA a entraîné une infiltration leucocytaire rénale, pulmonaire et hépatique, comparativement au groupe normal qui présente une structure normale du rein avec un espace urinaire et un glomérule bien différencié, du foie et du poumon. Le tamoxifène et l'EEAa aux doses testées ont réduit infiltrations leucocytaires rénales, hépatiques et pulmonaires (Figure 46).



TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; Ep : Epithélium pulmonaire ; Sa : Sac alvéolaire ; IL : infiltration leucocytaire ; Vp : Veine porte ; Cb : Canalicule biliaire ; Eu : Espace urinaire ; G = Glomérule.

Figure 46: Effet de l'EEAa, du poumon (H&E × 100), du foie (H&E ×200) et des reins (H&E × 200)

II.3 Activité immunomodulatrice de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Elle a été appréciée à partir de la numération sanguine, la mesure du taux de cytokines pro et antiinflammatoires, le taux de NO mammaire et l'analyse histologique des organes lymphoïdes primaires et secondaires.

II.3.1 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur la composition cellulaire sanguine

Pour apprécier le potentiel immuno-modulateur de l'EEAa, la numération sanguine a été effectuée et les résultats sont répertoriés dans le tableau XII ci-dessous. Il en ressort que, l'administration du DMBA a au bout de 4 mois entraîné une baisse significative du taux de globules blancs, globules rouges, hémoglobine, d'hématocrites et une augmentation significative des taux de plaquettes et neutrophiles comparativement à ceux animaux normaux. L'administration de l'EEAa aux 2 doses a après 28 jours entraîné une augmentation ($p < 0,05$) des taux de GB, et une baisse ($p < 0,05$) du taux de neutrophiles. Seule l'EEAa à la dose de 150 mg/Kg, Pc a conduit à une augmentation significative des hématocrites, plaquettes et monocytes, tandis que l'EEAa 300 a entraîné une augmentation significative du taux de lymphocytes. L'administration du TAM a quant à elle occasionné une baisse significative du taux de GB et de monocytes comparé aux différentes doses d'extraits, et une augmentation ($p < 0,05$) du taux de plaquettes.

Tableau XII: Effet de l'EEAa sur les paramètres hématologiques

Paramètres	TN	DMBA	EEAa 150	EEAa 300	TAM
GR (10⁶/uL)	8,00 ± 1,46 ^a	5,36 ± 1,69 ^b	7,05 ± 0,96 ^{ab}	6,39 ± 1,14 ^{ab}	7,85 ± 1,36 ^a
Hgb (g/dL)	13,80 ± 2,65 ^a	9,27 ± 2,43 ^b	12,40 ± 1,61 ^{ab}	11,23 ± 1,62 ^{ab}	13,10 ± 1,45 ^a
Hct (%)	50,1 ± 10,59 ^a	35,67 ± 10,56 ^b	46,53 ± 6,39 ^a	41,4 ± 7,56 ^{ab}	49,67 ± 5,23 ^a
Plt (10³/uL)	64,00 ± 1,00 ^a	291,5 ± 18,50 ^b	473,33 ± 104,15 ^c	359,33 ± 2,89 ^b	895,50 ± 78,50 ^d
GB (10³/uL)	13,61 ± 3,53 ^a	0,43 ± 0,06 ^b	12,63 ± 5,07 ^a	15,44 ± 0,65 ^a	0,56 ± 0,08 ^b
Neu (%)	16,20 ± 3,95 ^a	25,55 ± 6,29 ^b	19,90 ± 3,90 ^a	13,73 ± 3,27 ^a	14,13 ± 2,48 ^a
Mono (%)	5,20 ± 1,50 ^a	6,35 ± 2,85 ^a	11,45 ± 2,35 ^b	5,55 ± 1,15 ^a	1,35 ± 0,25 ^c
Lymp (%)	69,87 ± 8,97 ^a	66,00 ± 1,40 ^a	69,36 ± 8,65 ^a	78,63 ± 5,01 ^a	79,73 ± 4,54 ^a

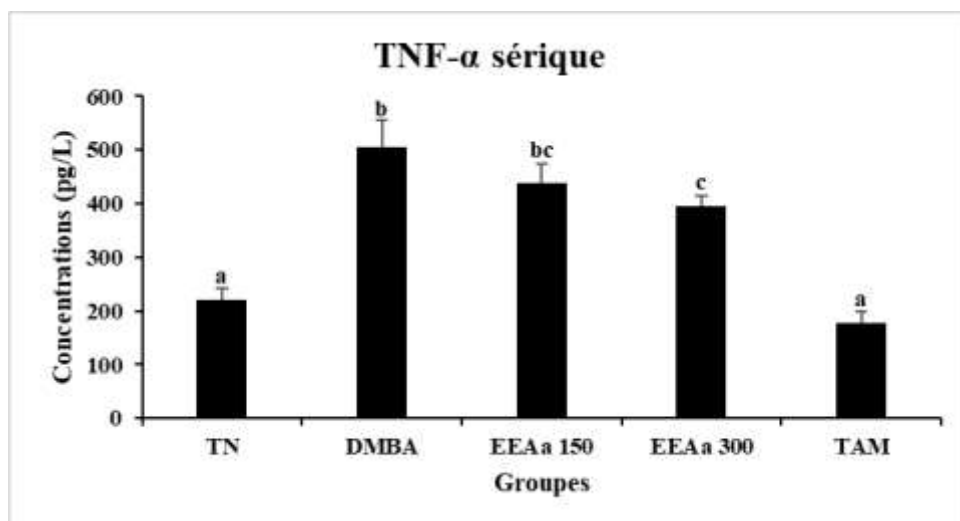
Expression des résultats : moyenne ± écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* TAM : animaux malades traités le tamoxifène ; GB : globules blancs ; GR : globules rouges ; Hgb : hémoglobine ; Hct : hématocrites ; Plt : plaquettes ; Neu : neutrophiles ; Mono : monocytes ; Lymp : lymphocytes ; pour un même paramètre, les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

II.3.2 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les taux sériques de cytokines TNF- α et INF- γ

La cytokine pro-inflammatoire TNF- α et celle anti-inflammatoire INF- γ ont été dosées au niveau sérique.

II.3.2.1 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les taux sériques de TNF- α

L'administration du DMBA chez les animaux a au bout de 4 mois entraîné une augmentation significative du taux sérique de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α ($504,87 \pm 50,95$ pg/L) comparativement au taux chez les animaux normaux ($221,39 \pm 22,00$ pg/L). L'administration de l'EEAa à la dose de 300 mg/Kg, Pc a significativement réduit le taux de TNF- α ($395,71 \pm 18,10$ pg/L) comparativement au taux obtenu chez les animaux du groupe DMBA. Le tamoxifène a présenté une meilleure efficacité que l'EEAa avec un taux de $178,4 \pm 20,34$ pg/L chez les animaux qui en recevaient (Figure 47).



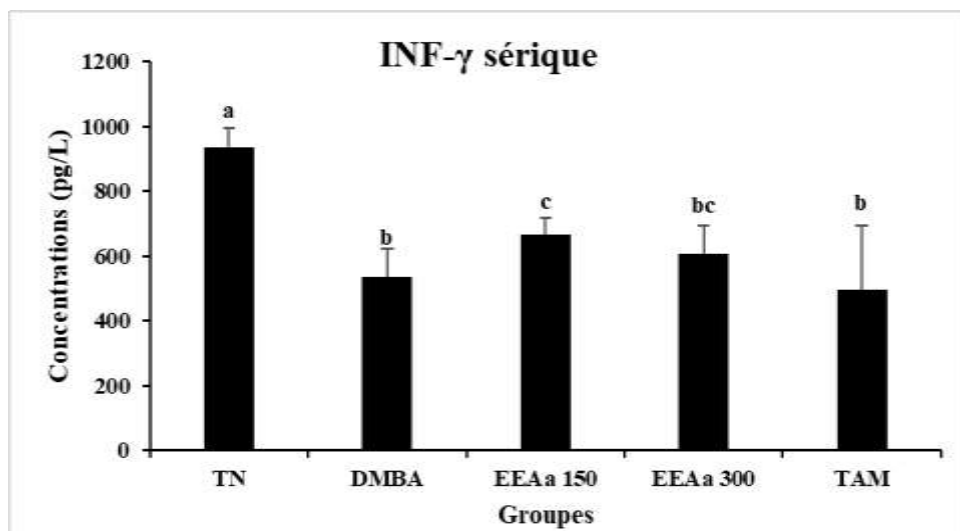
Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; TNF- α : tumour necrosis factor alpha pour un même paramètre, les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 47: Effet de l'EEAa sur les taux sériques de TNF- α

II.3.2.2 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les taux sérique d'INF- γ

Quatre mois après l'administration SC du DMBA, on a noté une baisse significative du taux de la cytokine antiinflammatoire INF- γ ($534,00 \pm 87,12$ pg/L) comparé aux valeurs obtenues chez les animaux du groupe TN ($935,98 \pm 58,24$ pg/L). Cependant, l'administration

de 150 mg/Kg, Pc d'EEAa durant le 4^{ème} mois après l'administration du DMBA a entraîné une augmentation significative du taux sérique d'INF- γ (664,00 $\pm$ 54,45 pg/L) comparativement aux taux obtenus chez les animaux non traités (DMBA). Le tamoxifène a été moins efficace que l'EEAa car, il n'a pas entraîné une amélioration du taux de cette cytokine anti-inflammatoire (Figure 48).

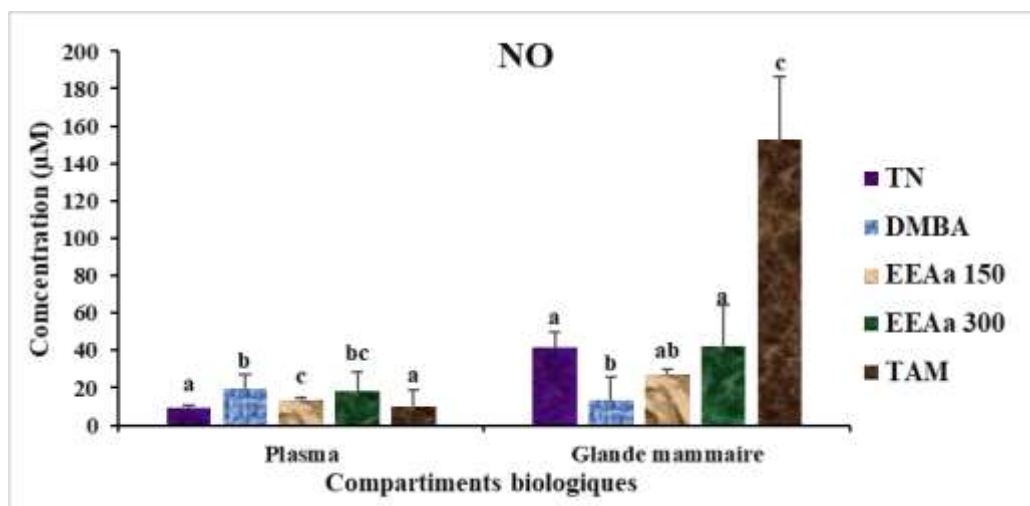


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; INF- γ : interféron gamma ; pour un même paramètre, les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 48: Effet de l'EEAa sur les taux sériques d'INF- γ

II.3.3 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur le taux d'oxyde

L'oxyde nitrique (NO) a été dosé dans le plasma et les homogénats de glande mammaire. Il en résulte une augmentation significative du taux de NO dans le plasma et une baisse non significative dans la glande mammaire des animaux du groupe DMBA comparé au groupe normal (TN). Le traitement des animaux avec l'EEAa à la dose de 150 mg/Kg, PC a entraîné une baisse significative ($P < 0,05$) de son taux dans le plasma comparativement au groupe DMBA. Cependant la dose de 300 mg/Kg, Pc D'EEAa a entraîné une augmentation significative du taux de NO dans la glande mammaire comparativement au groupe DMBA. Par ailleurs, le TAM a été plus efficace de l'EEAa dans les deux cas (Figure 49).

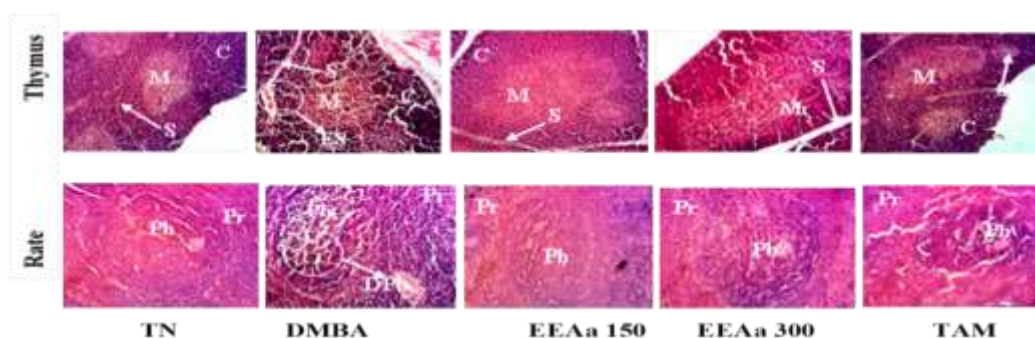


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEaA 150 & EEaA 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; pour un même compartiment, les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 49: Effet de l'EEaA sur les taux plasmatiques et mammaires de NO

II.3.4 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur l'histologie des organes lymphoïdes

Il ressort de la Figure 50 que le DMBA a entraîné une désorganisation de la pulpe blanche au niveau de la rate et au niveau du thymus, une diminution de la densité des lymphocytes corticales et un épaississement du septum interlobulaire comparativement au groupe normal qui présente une structure normale de la rate avec une pulpe blanche et rouge bien différenciées. L'administration de l'EEaA ou du tamoxifène, a rehaussé la densité des lymphocytes corticales et amélioré l'organisation de la pulpe blanche de la rate comparativement au groupe DMBA.



TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEaA 150 & EEaA 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; Pb : pulpe blanche ; Dpb = Désorganisation de la pulpe blanche ; Pr : pulpe rouge ; S : septum interlobulaire ; M : Couche médullaire ; C = Cortex, ES = Epaississement du septum interlobulaire.

Figure 50: Effet de l'EEaA sur la microarchitecture de la rate (H&E $\times$ 100) et du thymus (H&E $\times$ 40)

II.3 Discussion partielle II

Selon l'*American Cancer Institute*, un extrait végétal est déclaré antiprolifératif pour une lignée cancéreuse et capable de présenter une efficacité *in vivo* lorsque sa CI_{50} après 72 d'exposition est inférieure à 30 $\mu\text{g/mL}$ (Ogbole *et al.*, 2017). L'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* (EEAa) pourrait donc être considéré comme tel car, il a inhibé la prolifération des cellules MCF-7 du cancer de sein avec une CI_{50} de 9,66 $\mu\text{g/mL}$ après 72h d'exposition (Tableau VIII). Avec une telle CI_{50} ($5\mu\text{g/mL} < CI_{50} < 10\mu\text{g/mL}$), on classerait l'EEAa comme modérément antiprolifératif pour la lignée cellulaire MCF-7 selon le même organisme. Pour mieux apprécier la potentielle efficacité *in vivo*, l'activité anticancéreuse de l'extrait a été évaluée chez un modèle animal de cancer du sein induit au 7, 12-diméthylbenz-(a)-anthracène (DMBA). Etant donné que dans les pays en voie de développement et au Cameroun en particulier, le cancer du sein est généralement diagnostiqué à un stade avancé (MINSANTE, 2020 ; Nguefack *et al.*, 2012), une approche curative a été envisagée dans cette étude afin de satisfaire aux besoins de notre société.

Le DMBA est un hydrocarbure aromatique polycyclique, hautement cancérigène utilisé en laboratoire pour induire des tumeurs dont celui du sein (Karimi *et al.*, 2018). Dans la présente étude, après administration d'une dose unique de 50 mg/Kg, PC de DMBA des tumeurs se sont développées chez les rates au bout de 4 mois (Tableau IX). Ces résultats sont conformes aux données de la littérature, faisant mention d'une nécessité de 16 à 20 semaines pour le développement des tumeurs mammaires après une administration du DMBA à dose unique (Balzm *et al.*, 2018 ; Zingue *et al.*, 2018 ; Bishayee *et al.*, 2016). La progression tumorale chez ces animaux était accompagnée d'une augmentation des taux circulants de facteurs de croissance (EGF et estradiol) et d'une baisse du taux de glucose dans la glande mammaire (Figures 42, 43 et 44). Il a été montré que, le DMBA entraînait chez les rats de souche *Sprague Dawley* une diminution de l'expression de la GnRH, et de son récepteur hypophysaire, bloquant ainsi les poussées de FSH et LH et maintenant le taux sanguin d'estradiol élevé (Kerdelhué *et al.*, 2016). Par ailleurs des évidences scientifiques soutiennent que, le DMBA induit les tumeurs mammaires par stimulation de l'expression des gènes des voies des RE et récepteurs à EGF (Ma *et al.*, 2018). Le glucose étant le métabolite de préférence des cellules cancéreuses, une croissance tumorale serait naturellement accompagnée d'une consommation excessive de glucose par ces cellules. Par ailleurs, similairement aux résultats obtenus dans la présente étude (Figure 47), Akhouri *et al.* (2020) et Kong et Xu (2018) avaient montré que l'administration du DMBA chez les rats était

associée à une augmentation des médiateurs de l'inflammation tels que, TNF- α , Interleukin-1 β (IL-1 β) et Interleukin-6 (IL-6), à travers l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B. De même, une baisse du taux d'INF- γ noté dans ce travail (Figure 48) serait favorable à la progression tumorale (**Jorgovanovic et al., 2020**).

Le traitement des animaux avec l'EEAa aux doses testées a entraîné une baisse de l'incidence tumorale de 40% comparativement au groupe DMBA. Cela était accompagné d'une réduction significative du poids moyen des tumeurs (EEAa 150) et une diminution de la taille des tumeurs (EEAa 300). Ceci s'expliquerait par la capacité des composés bioactifs de l'extrait à empêcher la transition G1/S du cycle des cellules tumorales ou à entraîner leur mort par apoptose tel qu'obtenue dans la première partie de ce travail. En effet, il avait été constaté que le traitement des cellules YUMM 1.7 avec l'EEAa entraînait une surexpression du TGF- β , conduisant à la répression des facteurs de transcriptions E2F1 et E2F2 selon le mécanisme décrit par **Zhang et al. (2017)**. Ces 2 facteurs de transcription étant nécessaires à la transcription des gènes impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire (**Vantura et Giodano, 2019**). Par ailleurs, il avait été obtenu une répression du gène anti-apoptotique BCL-2 et une expression protéique de la caspase-3 active, témoignant une stimulation de la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose. Ces activités pourraient être attribuées aux terpenoïdes présents dans l'extrait tel que l' α -pinène dont les propriétés anticancéreuses ont déjà été démontrées (**Araújo-Filho et al., 2021 ; Hou et al., 2019**). De plus, la présence de composés phénoliques (Quercetine) dans l'extrait ne serait pas en reste car ils ont la capacité d'empêcher l'angiogenèse, en réduisant l'expression du facteur de croissance de l'épithélium vasculaire (VEGF), facilitateur de la vascularisation et du développement tumoral (**Chojnacka et Lewandowska, 2020**).

L'inhibition de la progression tumorale par l'EEAa était également accompagnée d'une baisse du taux sérique des facteurs de croissance et de survie notamment l'estradiol à la dose de 300 mg/Kg, Pc, l'EGF aux 2 doses et le taux mammaire de glucose à la dose 150 mg/Kg, Pc. De plus, comme prédit par l'étude *in vitro* (Partie I), une baisse du taux de TNF- α a été noté, et ceci accompagné d'une augmentation du taux de cytokine antiinflammatoire INF- γ . L'amélioration des taux de ces cytokines serait due à la protection assurée par l'EEAa au niveau des organes lymphoïdes. En effet, les alcaloïdes Isoprinosines et piperine présents dans l'extrait seraient capables de stimuler respectivement la synthèse des GB au niveau des organes lymphoïdes (**Patil et al., 2012**) et la différenciation lymphocytaire (**Sinula et Kuttan, 2004**). Ces activités auraient donc entraîné l'augmentation du taux de globule blanc, avec un taux

élevé de monocytes et lymphocytes telle qu'observée à la numération sanguine (Tableau XI). Les monocytes auraient ainsi produit de l'IL-10 dont les voies de signalisation en aval de son récepteur auraient entraîné la baisse du taux de TNF- α selon le mécanisme décrit par **Gushiken et al. (2022)** et **Hutchings et al. (2013)** et rappelé dans la partie I. De même, les lymphocytes en se différenciant en Lymphocytes T (LT) CD4⁺ et CD8⁺, produiraient d'avantage l'INF- γ (**Burke et Young, 2019**) dont les taux élevés stimuleraient l'activité cytotoxique des LT effecteurs (**Hu et Ivashkiv, 2009**). L'INF- γ pourrait également agir directement en forçant l'expression des caspases 3 et 7 au sein des cellules cancéreuses par l'intermédiaire de la signalisation JAK-STAT1, conduisant à la mort par apoptose (**Song et al., 2019**). Cette voie de signalisation pourrait également conduire à une répression des protéines *SLC7A11* et *SLC3A2*, constituant du système anti-porteur glutamate-cystine. Ceci aurait pour conséquence une inhibition de l'activité de la glutathion peroxydase, une accumulation des radicaux peroxydes et donc la mort des cellules cancéreuses par ferroptose (**Wang et al., 2019**).

Cette activité immunomodulatrice avec baisse du taux de TNF- α et la capacité de l'EEAa à réprimer l'IL-6 (Figure 40) seraient à l'origine de la baisse du taux d'estradiol dans les groupes traités avec l'EEAa. En effet il est connu que, les cellules tumorales et les cellules immunitaires associées à la tumeur peuvent produire des facteurs tels que la prostaglandine E2, le TNF- α et l'IL-6 qui vont stimuler l'expression de l'aromatase par les fibroblastes associés à la tumeur (**Johnston et Dowsett, 2003**). De plus, le Stigmasterol, un phytosterol identifié dans l'EEAa serait un précurseur de la synthèse la testolactone, un inhibiteur de l'aromatase (**Lone et Bhat, 2015**). Ces actions auraient pour conséquence une baisse de la synthèse de l'estradiol à partir des androgènes. La baisse du taux d'estradiol limiterait ainsi l'activité transcriptionnelle de ses récepteurs, avec pour conséquence une baisse de l'expression RE-dépendante des gènes tels que l'EGF.

Concernant le taux de glucose dans la glande mammaire, la capacité de l'EEAa à réprimer l'IGF-1 et inhiber la signalisation par son récepteur tel que présenté dans la partie I serait à l'origine de la baisse d'utilisation du glucose par ces cellules mammaires. En effet le facteur de transcription HIF-1 α dont l'activation est dépendante des voies en aval du récepteur à IGF-1 (**Fukuda et al., 2002**), induirait la transcription des gènes codant pour des enzymes glycolytiques (**Kierans et Taylor, 2021**). Par ailleurs, les composés phénoliques seraient également capables d'agir comme inhibiteurs spécifiques des transporteurs de glucose dans les lignées cellulaires du cancer du sein (**Xintaropoulou et al., 2015 ; Moreira et al., 2013**).

La modulation du taux de NO ne serait non plus à négliger car, son taux bas observé dans la glande mammaire des rates du groupe DMBA aiderait à la résistance à la mort, l'angiogenèse et l'invasion tumorale par augmentation de l'hyperperméabilité de l'endothélium vasculaire. Cette dernière favoriserait la libération du VEGF, l'augmentation de la perméabilité du système vasculaire tumoral et la régulation de l'expression des métalloprotéases de la matrice (MMP2 et MMP9) (Huang *et al.*, 2016). L'administration de l'extrait a entraîné une baisse du taux de NO plasmatique (150mg/kg, Pc) et une augmentation du taux de NO mammaire (300mg/kg de Pc). Au niveau tumoral, il est connu que la plupart des médicaments cytotoxiques agissent par induction d'un stress oxydant au sein de la cellule tumorale (Holotiuk *et al.*, 2019). Tel est le cas du tamoxifène utilisé comme traitement de référence dans ce travail. Il a été montré que, le tamoxifène augmente la concentration intra mitochondriale de Ca^{2+} et stimule l'activité de la NO synthase mitochondriale (mtNOS) de cellules MCF-7 du cancer du sein humain. Il s'en suit tour à tour une nitration de certaines protéines mitochondriales, une diminution de l'activité catalytique de la succinyl-CoA:3-oxoacide CoA-transférase, une entrave à la respiration mitochondriale, une augmentation de la peroxydation lipidique mitochondriale, une libération du cytochrome c conduisant à la mort par apoptose des cellules (Nazarewicz *et al.*, 2007 ; Masarone *et al.*, 2018). Ce mécanisme serait utilisé par l'EEAa pour induire la mort des cellules tumorale. Par ailleurs, cette activité serait due à la capacité des composés bioactifs de l'EEAa à stimuler la production de NO par les cellules immunitaires infiltrant la tumeur, favorisant ainsi la lutte anti-tumorale (Vanini *et al.*, 2015). Au niveau plasmatique, la baisse du taux de NO jouerait un rôle modulateur de la réponse immunitaire antitumorale par sa capacité à supprimer la prolifération et l'infiltration leucocytaire, (Babykutty *et al.*, 2012) telle qu'observé à l'histologie.

Conclusion partielle II

En somme pour cette partie, l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* ralentit laprogression tumorale *in-vivo* en réduisant les taux circulant d'estradiol et d'EGF. Cet extrait réduit le taux de cytokine pro-inflammatoire TNF- α et augmente le taux de cytokine anti-inflammatoire INF- γ , en modulant la production des cellules immunitaires. Il pourrait inhiber l'angiogenèse et l'invasion tumorale par la baisse le taux plasmatique de NO. Par ailleurs, il induirait un stress oxydant au niveau des cellules tumorales par induction de la production de NO, pouvant conduire à la mort cellulaire.

Au regard des effets anti-estrogénique de l'EEAa au niveau plasmatique contrairement au tamoxifène, il a été envisagé d'évaluer l'effet protecteur de l'EEAa contre les effets toxiques associés à la prise du tamoxifène (modulateur sélectif des RE) chez un modèle animal de cancer du sein.

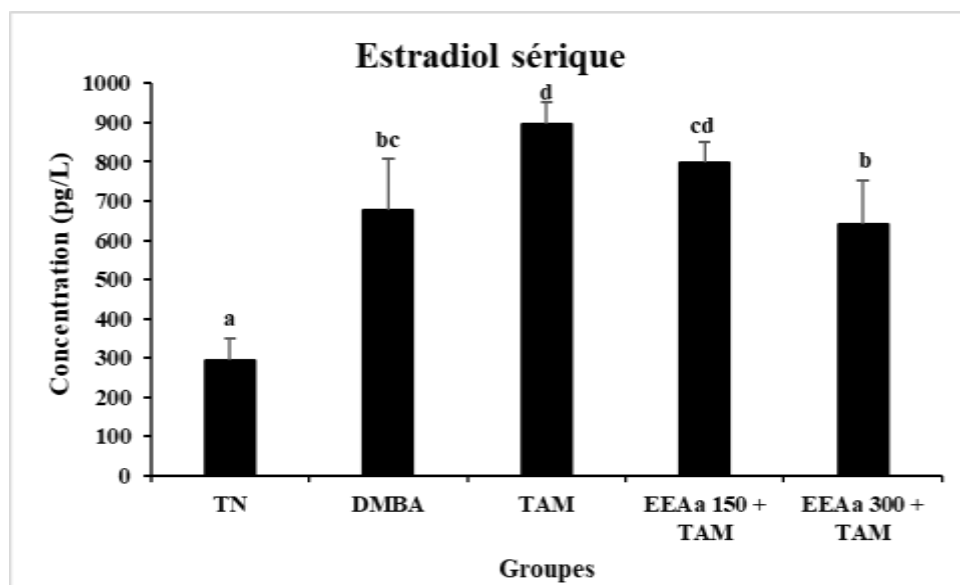
Partie III : Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* contre quelques effets indésirables associés à la prise du tamoxifène chez un modèle animal de cancer du sein

III.1 Effet protecteur de l'EEAa contre le développement d'une hyperplasie de l'endomètre utérin induite par le tamoxifène

Deux paramètres ont été exploités pour évaluer l'effet protecteur de l'EEAa contre une hyperplasie induite par le tamoxifène chez les rats femelles souffrant de cancer. D'une part le taux d'estradiol sérique et d'autre part l'épaisseur de l'endomètre utérin à l'histologie.

III.1.1 Réduction du taux d'estradiol sérique par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'effet de l'EEAA sur le niveau sérique d'estradiol est enregistré sur la Figure 51. L'administration d'une dose unique de DMBA ($667,34 \pm 40,92$ pg/L) a entraîné une augmentation significative du taux d'estradiol comparé aux TN ($293,30 \pm 57,21$ pg/L). Le tamoxifène (TAM) administré seul a exacerbé cette augmentation ($p < 0.05$) ($896,85 \pm 54,57$ pg/L) par rapport au groupe DMBA non traité. Cependant, la co-administration avec 300 mg/Kg, PC d'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* (EEAA 300 + TAM) a significativement réduit ce taux ($639,82 \pm 43,41$ pg/L) par rapport à celui du groupe TAM. ($p < 0.05$) en le ramenant à des valeurs proches du groupe DMBA.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 51: Effet de l'EEAa sur le taux d'estradiol sérique chez les rats traités au TAM

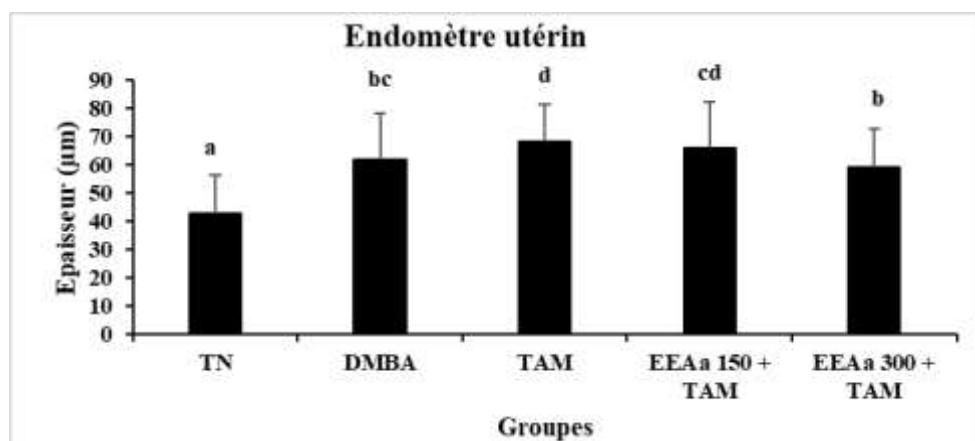
III.1.2 Protection de l'épithélium utérin par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'histologie H&E de l'endomètre utérin a montré une désorganisation structurale de ce tissu chez les animaux recevant le tamoxifène (TAM) tandis que, l'endomètre des animaux co-traités présentait une amélioration de cette architecture de façon dose dépendante (Figure 52). Par ailleurs, la mesure de l'épaisseur de l'épithélium utérin (Figure 53) a révélé un épaissement de l'endomètre utérin dans le groupe DMBA comparé au groupe TN. L'administration du TAM seul a d'avantage favorisé une augmentation de cette épaisseur comparée au groupe DMBA ($p < 0.05$). En revanche, l'association de l'EEAa aux 2 doses a concouru à la réduction de cette épaisseur, avec une nette différence à la dose de 300 mg/Kg, Pc, comparé au groupe TAM ($p < 0.05$).



DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 + TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène.

Figure 52: Effet de l'EEAa sur la microarchitecture de l'endomètre utérin chez les rats traités au TAM



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 + TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

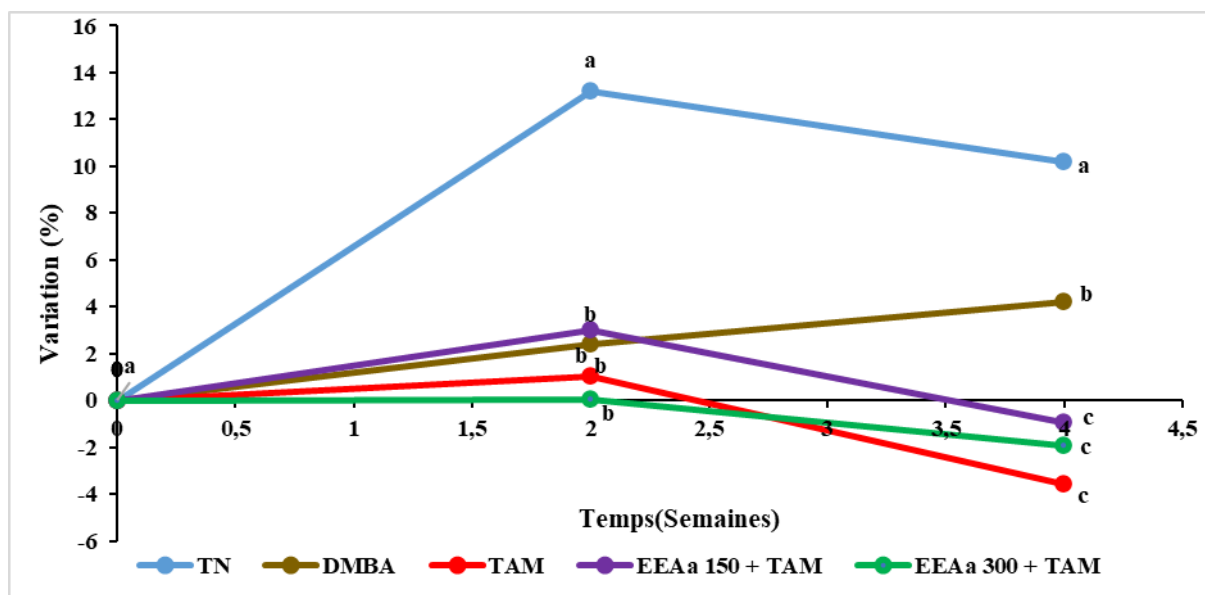
Figure 53: Effet de l'EEAa sur l'épaisseur de l'épithélium de l'endomètre utérin chez les rats traités au TAM

III.2 Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* contre quelques troubles métaboliques induits par le tamoxifène

Il s'agissait de la variation du poids corporel et des taux plasmatiques de CT et TG

III.2.1.1 Effet protecteur de l'EEAa contre la perte de poids corporel induite par le tamoxifène

Au cours des deux premières semaines de traitement, tous les animaux, à l'exception de ceux du groupe EEAA 300+TAM, ont montré un gain de poids. En revanche, au cours des 2 dernières semaines, tous les animaux, à l'exception de ceux du groupe DMBA, ont présenté une perte de poids. A la fin du traitement, le gain de poids était significativement plus faible chez le groupe DMBA comparativement au TN. L'administration du TAM seul a entraîné une perte de poids plus prononcée que celle observée dans le groupe DMBA ($p < 0.05$). Cependant l'administration préalable de l'EEAa aux doses testées avant le TAM a limité la perte de poids bien que la différence n'ait pas été significative comparé au groupe TAM (Figure 54).

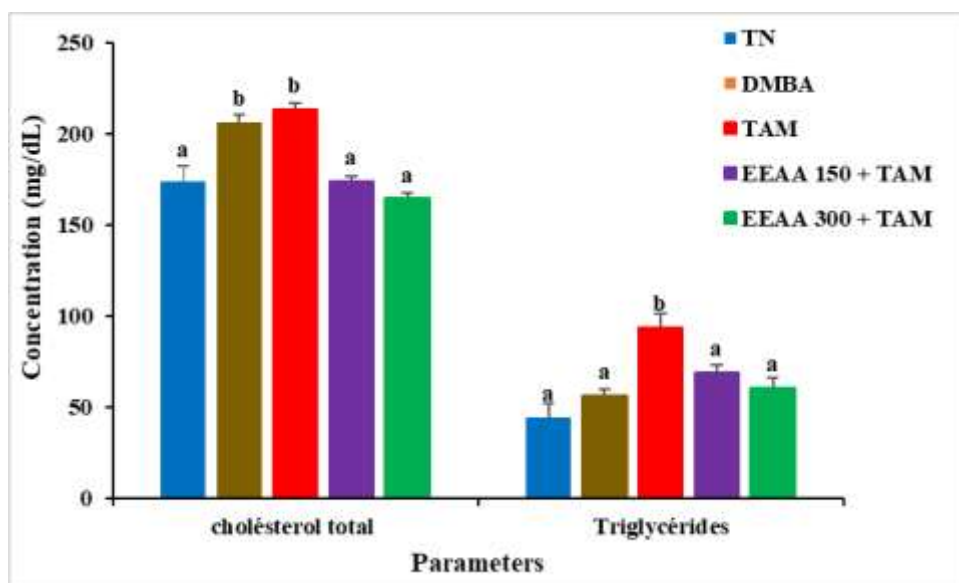


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 54: Effet de l'EEAa sur la variation du poids des rats traités au TAM

III.2.1.2 Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* contre les dyslipidémies induites par le tamoxifène

L'effet de l'EEAa sur le profil lipidique est représenté par la Figure 55 ci-dessous. Il en ressort que, le DMBA a entraîné une augmentation significative du taux de CT ($206,44 \pm 4,13$ mg/dL) comparé au groupe TN ($173,65 \pm 8,40$ mg/dL) tandis que le taux de TG n'a pas été impacté. L'administration du tamoxifène a entraîné chez les rats cancéreux une augmentation significative du taux de triglycéride ($93,89 \pm 7.23$ mg/dL) comparativement aux animaux malades non traités ($56,343.52$ mg/dL) tandis qu'aucune modification significative du taux de cholestérol total n'a été observée entre ces deux groupes. L'administration concomitante du tamoxifène et de l'extrait aux doses testées (150 et 300 mg/Kg, PC) a entraîné une amélioration significative ($P < 0,05$) des taux de triglycérides (69,01 et 60,56 mg/dL respectivement) et de cholestérol total (173,99 et 164,43 mg/dL respectivement) comparativement à l'administration seule du tamoxifène., ramenant les valeurs proches de celles du TN.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$)

Figure 55 : Effet de l'EEAa sur la cholestérolémie et la triglycéridémie des rats traité au TAM

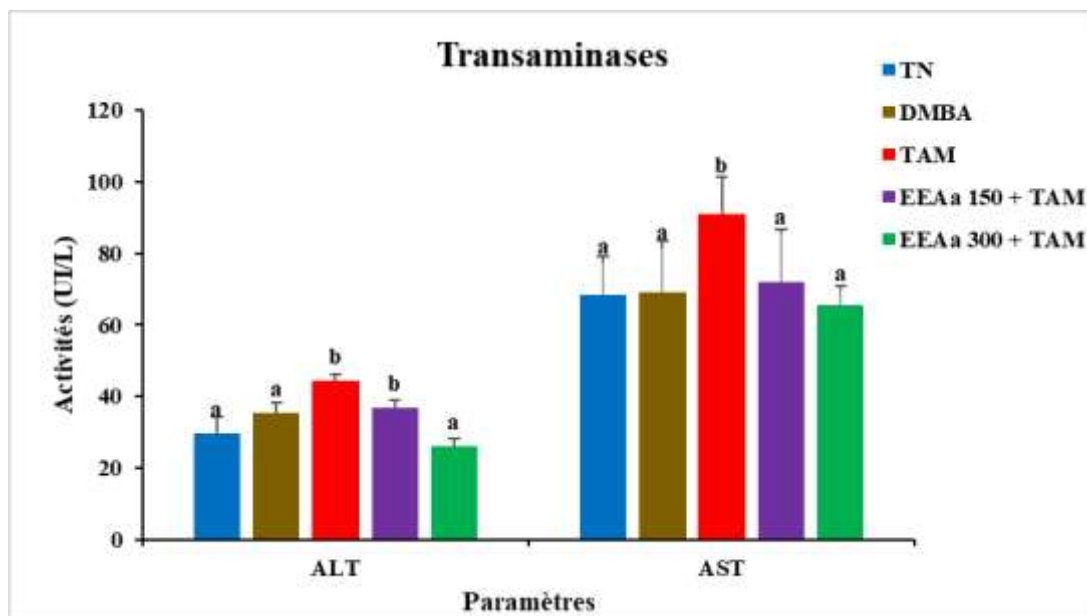
III.3 Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graine d'*A angustifolium* contre une toxicité hépatique et rénale induite par le tamoxifène

Le foie et les reins étant également les organes cibles des effets indésirables associés à la prise du tamoxifène, leur intégrité a également été évaluée

III.3.1 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* sur les marqueurs d'atteinte hépatique

a) Réduction de l'activité plasmatiques des transaminases par l'EEAa

L'administration d'une dose unique de 50 mg/Kg, Pc de DMBA n'a au bout de 4 mois pas entrainé une modification significative de l'activité plasmatique des transaminases comparé au groupe TN (Figure 56). Le traitement des animaux avec le TAM durant le 4^{ème} mois a entrainé une augmentation significative des activités de l'ALT ($44,5 \pm 1,57$ UI/L) et de l'AST ($91,8 \pm 10,16$ UI/L) par rapport au groupe non traité (DMBA). Le co-traitement avec la dose de 300 mg/Kg, Pc de l'EEAA a cependant réduit significativement l'activité ALT ($26,25 \pm 2,13$ UI/L) alors que, les activités de l'AST ont diminué ($p < 0.05$) avec les deux doses ($71,93 \pm 14,61$ UI/L et $65,42 \pm 5,61$ UI/L respectivement).

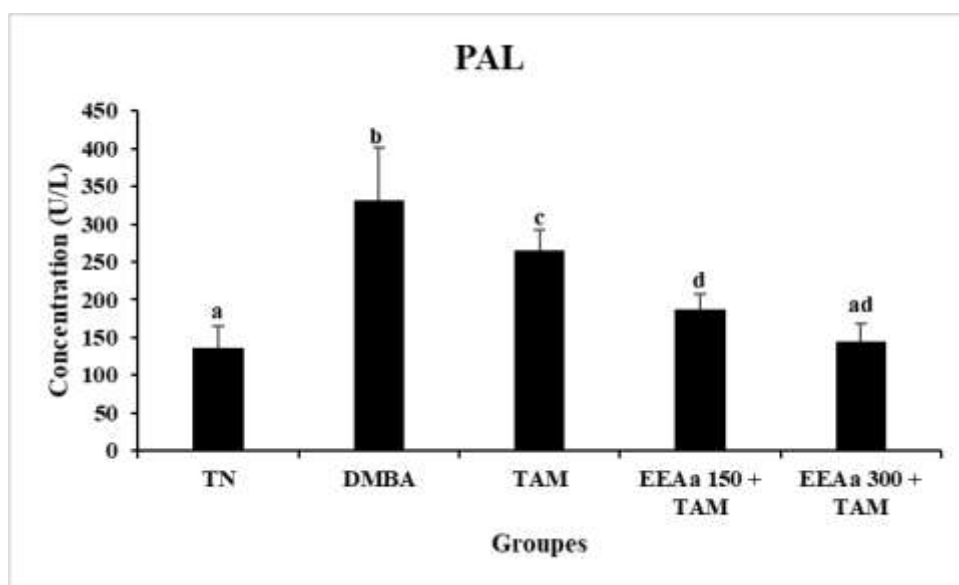


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; pour chaque paramètre, les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 56: Effet de l'EEAa sur l'activité plasmatique des transaminases chez les rats traités au TAM

b) Réduction de l'activité plasmatique de la phosphatase alcaline par l'EEAa

L'administration du DMBA a entraîné une augmentation significative de l'activité plasmatique de la PAL (331.65 ± 69.51 U/L) comparativement au groupe TN ($135,3 \pm 29,14$ U/L). Le traitement avec le tamoxifène a entraîné une diminution significative ($p < 0.05$) de son activité ($265,98 \pm 26,77$ U/L) par rapport au groupe DMBA. Le co-traitement avec le TAM et l'EEAA aux doses testées a significativement ($p < 0.05$) réduit l'activité ($186, 45 \pm 21,81$ U/L et $144,54 \pm 24,63$ U/L respectivement) par rapport à l'administration du tamoxifène seul (Figure 57).



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

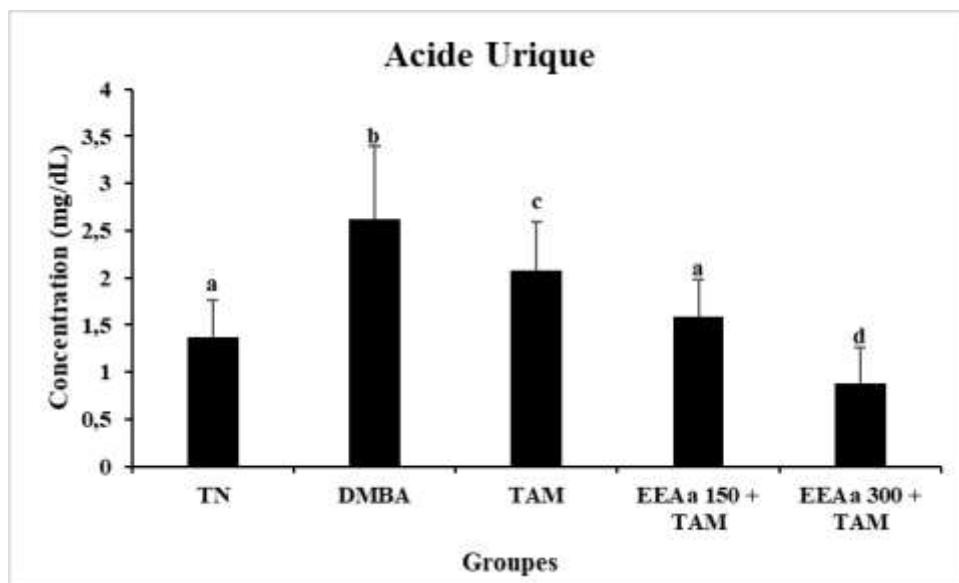
Figure 57: Effet de l'EEAa sur l'activité plasmatique de la phosphatase alcaline chez les rats traités au TAM

III.3.2 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les atteintes d'atteinte rénale

a) Réduction du taux plasmatique d'acide urique par l'EEAa

Il ressort de la Figure 58 que, L'administration du DMBA a entraîné une augmentation ($p < 0,05$) du taux d'acide urique plasmatique ($2,62 \pm 1,16$ mg/dL) comparé au groupe TN ($1,37 \pm 0,39$ mg/dL). Le traitement des animaux malades avec le TAM seul entraîne une diminution non significative du taux plasmatique d'acide urique par rapport au groupe DMBA. Cependant, le co-traitement avec l'EEAA aux deux doses a réduit son

niveau, avec une différence significative à la dose 300 mg/Kg, Pc ($0,87 \pm 0,37$ mg/dL) par rapport au groupe TAM ($2,08 \pm 0,52$ mg/dL).

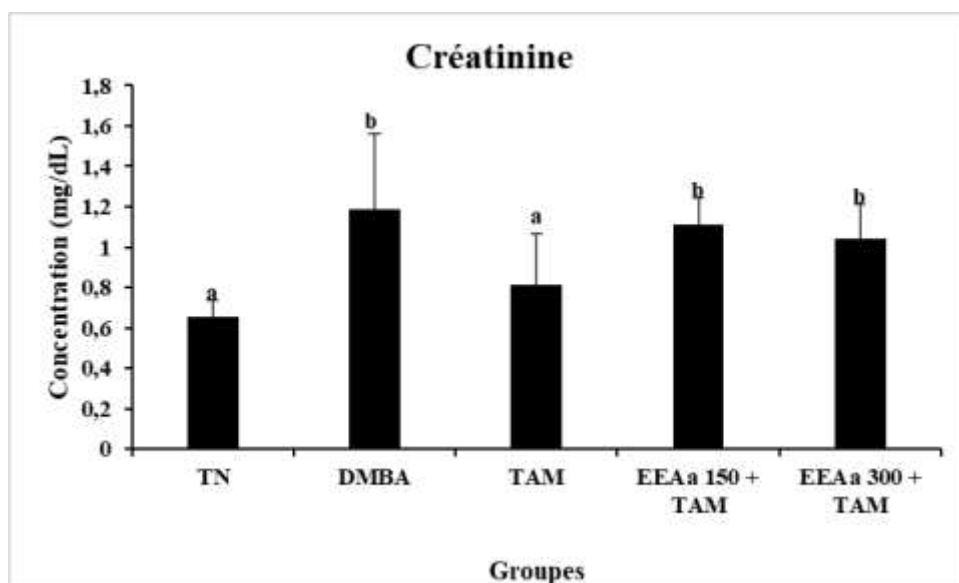


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 + TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 58: Effet de l'EEAa sur le taux plasmatique d'acide urique chez les rats traités au TAM

b) Réduction du taux plasmatique de créatinine par l'EEAa

La Figure 59 ci-dessous montre que, le DMBA a entraîné une augmentation significative de la concentration plasmatique en créatinine comparé au groupe TN. Le traitement des animaux avec le TAM a entraîné une baisse significative de son taux comparativement au groupe TAM. L'administration conjointe des extraits aux doses testées a entraîné une augmentation significative de taux plasmatique de créatinine comparativement au groupe TAM.

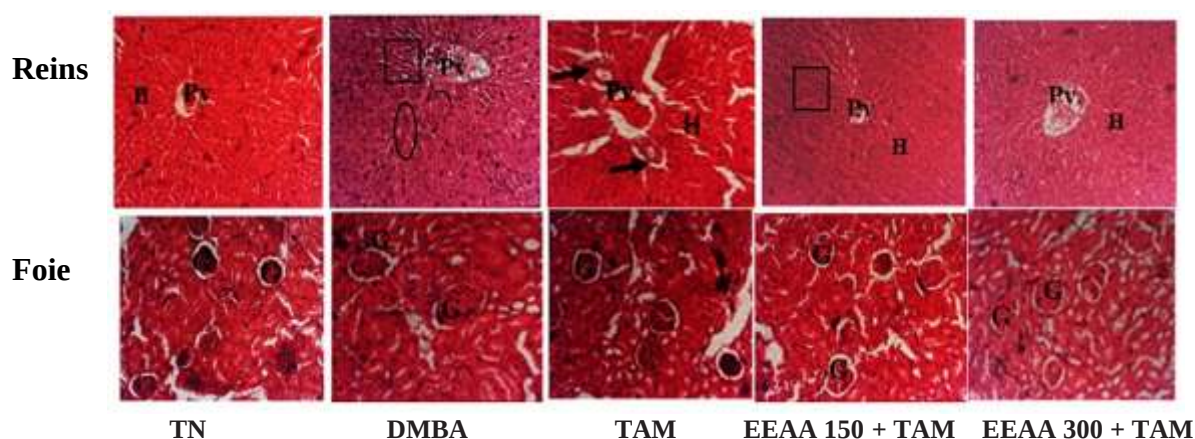


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 + TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes (a, b) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 59: Effet de l'EEAa sur le taux plasmatique de créatinine chez les rats traités au TAM

III. 3. 4 Effet protecteur de la microarchitecture du foie et des reins par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'administration de DMBA conduit à une détérioration de la structure des glomérules. Tous les groupes traités ont présenté une amélioration du nombre et de la structure des glomérules, et la meilleure observation a été obtenue à 300 mg/Kg, pc d'EEAA. L'histologie du foie dans le groupe DMBA a montré une infiltration lymphocytaire dans la zone périphérique alors qu'une détérioration de la veine centrale est observée dans le groupe TAM. Dans les groupes traités par l'extrait, l'architecture de la veine centrale est améliorée au fur et à mesure que la concentration de l'extrait végétal augmente (Figure 60).



DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 +TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène. H : hépatocytes ; PV : veine porte; → : gouttelette lipidique, G : glomérule

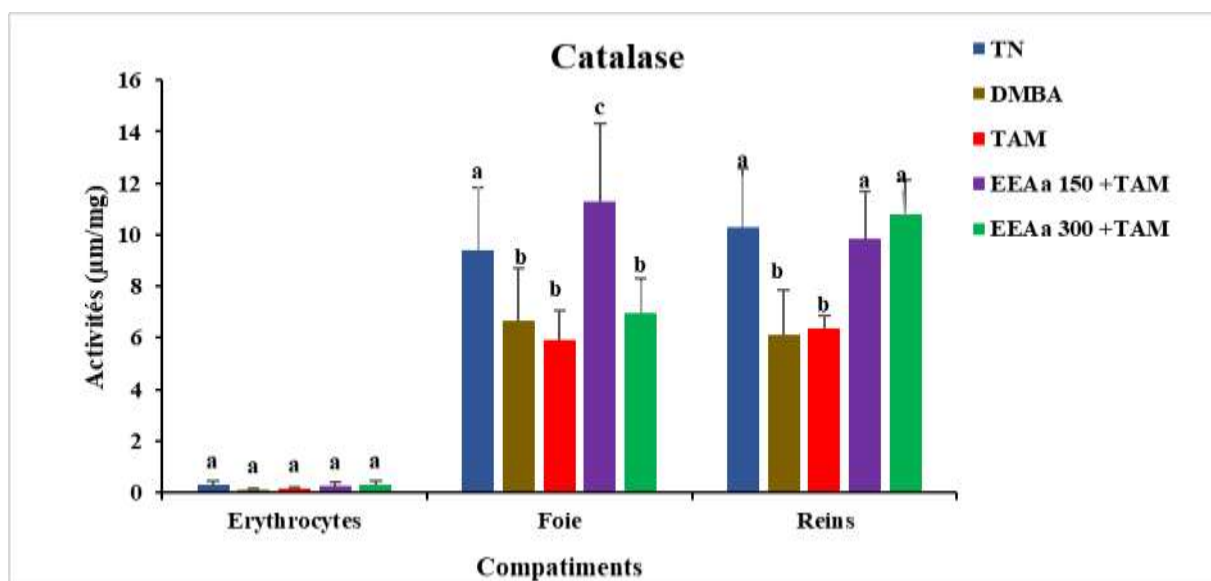
Figure 60: Effet de l'EEAa sur les microarchitectures du foie et des reins à l'histologie H&E (x200)

III.3.4 Mécanisme de protection du foie et des reins : activité antioxydante de l'EEAa

L'induction du stress oxydant par le tamoxifène étant l'un des mécanismes plausibles par lequel il favorise les atteintes hépatiques et rénales, l'activité de la catalase et le taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique ont été mesurées pour évaluer l'effet de l'EEAa sur le stress induit par le TAM.

III.3.1 Effet stimulateur de l'EEAa sur l'activité de la catalase

L'activité de la catalase a été mesurée dans les homogénats de foie et de rein, ainsi que dans l'hémolysât érythrocytaire. Aucun changement significatif n'a été noté dans les activités de la catalase au niveau érythrocytaire. Le DMBA a cependant entraîné une baisse significative de l'activité de la catalase hépatique ($6.64 \pm 2.05 \mu\text{mol/min/mg}$) et rénale ($6.12 \pm 1.71 \mu\text{mol/min/mg}$) comparativement au groupe TN (9.38 ± 2.47 et $10.32 \pm 2.27 \mu\text{mol/min/mg}$ respectivement). Aucune variation significative de l'activité n'a été observée au niveau hépatique et rénal entre les groupes TAM et DMBA. L'administration conjointe de TAM et d'EEAa a amélioré de façon significative l'activité de cette enzyme dans les reins aux deux doses (9.83 ± 1.86 et $10.79 \pm 1.35 \mu\text{mol/mg}$ respectivement), et dans le foie à 150 mg/Kg, P.c. ($11.31 \pm 3.01 \mu\text{mol/min/mg}$) comparativement au TAM administré seul (Figure 61).

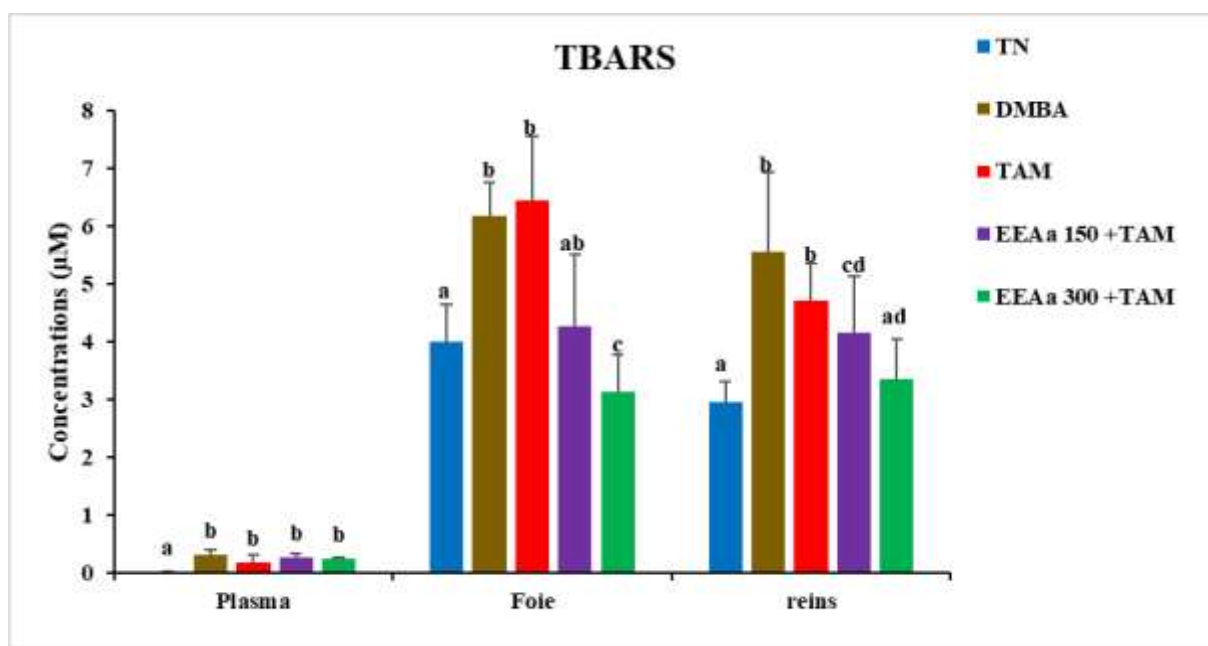


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEa 150 + TAM & EEa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; pour chaque compartiment biologique, les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 61: Effet de l'EEa sur l'activité érythrocytaire, hépatique et rénale de la catalase chez les rats traités au TAM

III.3.2 Réduction de taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique par l'EEa

La peroxydation lipidique étant l'une des conséquences du stress oxydant, le taux de TBARS a été mesuré et les résultats sont représentés par la Figure 62 ci-dessous. Au niveau hépatique et rénal, le DMBA a entraîné une augmentation significative du taux de TBARS (6.17 ± 1.36 et 5.55 ± 1.36 μM respectivement) comparativement au groupe TN (3.99 ± 0.66 et 2.95 ± 0.35 μM respectivement). Le TAM a de façon non significative exacerbé l'observation faite avec le groupe DMBA dans le foie tandis qu'il a entraîné une baisse non significative du taux de TBARS dans les reins comparativement au groupe DMBA. Le co-traitement avec l'EEa à 300 mg/Kg, PC a réduit significativement le niveau des TBARS dans le foie (3.12 ± 0.66 μM) et les reins (3.35 ± 0.71 μM) comparé au TAM administré seul (6.44 ± 1.01 et 4.70 ± 0.65 μM respectivement).



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEa 150 + TAM & EEa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; pour chaque compartiment biologique, les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 62: Effet de l'EEa sur le taux plasmatique, hépatique et rénal des TBARS chez les rats traités au TAM

III.5 Discussion partie III

La plupart des tumeurs du sein diagnostiquées sont positives aux récepteurs ostrogéniques, et leur prise en charge passe donc par des thérapies endocriniennes adjuvants comme le tamoxifène (Burstein *et al.*, 2018). Cependant, la récurrence des effets indésirables liés à ce médicament est responsable de la détérioration de la qualité de vie de la patiente (Cella et Fallowfield, 2008). Depuis quelques années, tel que suggéré par Thompson *et al.* (2011), les recherches dans le cancer s'orientent également vers celle des substances naturelles à la fois antitumorales et capables de limiter les effets indésirables des médicaments. Au regard de cela, l'extrait éthanolique de graine d'*Aframomum angustifolium* s'inscrit comme un candidat prometteur dans ces recherches ; d'où l'évaluation de son effet protecteur contre les effets indésirables associés à la prise du tamoxifène envisagée dans cette partie du travail.

Le risque de développement d'un cancer de l'endomètre est l'effet secondaire le plus redouté de la prise de TAM qui agirait comme agoniste des RE utérin. Cet effet indésirable passe par une augmentation de l'épaisseur de l'endomètre (Hyperplasie) et l'augmentation du taux circulant d'estradiol (Mvondo *et al.*, 2020, Gu, 2017) comme obtenu dans cette étude (Figures 51 à 53). En plus de son effet antagoniste des RE mammaires, il a été rapporté que le

tamoxifène a la capacité de stimuler la synthèse de l'estradiol dans les tissus non-gonadotropes à partir des androgènes par l'activité de l'aromatase (**Mvondo et al., 2020**). L'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* co-administré à la dose de 300 mg/Kg, PC avec le TAM a conduit à une diminution du taux d'estradiol sérique et de l'épaisseur de l'endomètre par rapport au TAM seul. Cette observation pourrait s'expliquer par la présence de composés bioactifs (stigmsterol) capables d'inhiber l'activité de l'aromatase, responsable de la synthèse de l'estradiol à partir du tissu adipeux (**Blakemore et Naftolin, 2016 ; Lone et Bhat, 2015**). Cela peut également être dû à la présence de métabolites secondaires dans l'EEAa à l'instar des flavonoïdes, qui peuvent agir comme des inhibiteurs compétitifs du RE, limitant la fixation de l'estradiol ou du tamoxifène, et donc empêchant la mitose des cellules épithéliales de l'endomètre (**Feng et al., 2017 ; O'Brien et al., 2006**).

Il a été révélé par **Klötting et al., (2020)** que, L'administration de tamoxifène entraînait une perte d'appétit et par conséquent une perte de poids comme obtenu dans cette étude (Figure 54). Cependant, il a été rapporté qu'une utilisation à long terme du tamoxifène pouvait entraîner la nécrose des cellules adipeuses, et conduire à une stéatose hépatique (**Owoade et al., 2022**). Dans la présente étude, il a été noté une augmentation des taux de triglycérides et de cholestérol total plasmatiques (Figure 55) et une accumulation des lipides dans le foie des animaux (Figure 61), suggérant une altération du métabolisme lipidique (**Hesselbarth et al., 2015**) chez les animaux traités uniquement au TAM. Bien que l'EEAa ait entraîné une légère augmentation du poids corporel, on a noté une baisse des taux de TG et de CT. Ces observations seraient dues à la présence des terpenoïdes dans l'EEAa. En effet, ces composés ont montré des aptitudes à inhiber la tyrosine phosphatase 1b hypothalamique, inductrice de l'activité antiobésogène de la leptine (**Kumar et al., 2022**). En effet, la leptine produite par les cellules adipeuses, pourrait induire la production neuronale du neurotransmetteur l'AgRP (*agouti-related protein*), qui va stimuler l'hyperphagie et donc entraîner la prise de poids (**Palmiter, 2018 ; Ahima et Antwi, 2006**). Cependant la baisse de la cholestérolémie et de la triglycéridémie observée serait due à la présence des flavonoïdes dans l'EEAa. Ces composés sont doués d'activité antiobésogène par inhibition de la lipase pancréatique, empêchant ainsi la digestion et l'absorption des lipides alimentaires (**Rufino et al., 2021 ; Nakai et al., 2005**). Par ailleurs, les flavonoïdes seraient capables d'améliorer le profil lipidique en inhibant l'adipogénèse par réduction de l'activité transcriptionnelle de la PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) (**Garcia-Barrado et al., 2020 ; Valli et al., 2018**).

La stéatose hépatique causée par le TAM est généralement accompagnée d'une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, PAL) au niveau plasmatique (**Yoo et al., 2020 ; Panchal et al., 2019**) tel que noté dans ce travail (Figure 56 et 57). L'amélioration de l'activité de la phosphatase alcaline avec l'administration du tamoxifène (Figure 58) reflèterait le potentiel de ce médicament à limiter les métastases osseuses. En effet, il est connu qu'une activité élevée de la phosphatase alcaline au niveau plasmatique chez les personnes souffrant de cancer pourrait être le reflet d'une invasion osseuse (**Lim et al., 2016**). Par ailleurs, l'administration du TAM a également entraîné une amélioration du taux plasmatique d'acide urique (Figure 59) suggérant une protection de la fonction rénale. L'administration conjointe de l'EEAa et du tamoxifène a entraîné une amélioration des activités plasmatique de enzymes hépatiques, du taux d'acide urique et une amélioration de la micro architecture du foie et des reins. Ces résultats suggèrent que l'EEAa pourrait protéger contre l'hépto-toxicité et une nephro-toxicité induites par le TAM lors d'une utilisation à long terme. **Ebhohimen et Okilie (2021) et Ebhohimen et al., (2020)** avaient déjà montré que, l'EEAa protégeait le foie et les reins des rats *Wistar* contre des dommages hépatiques et rénaux induits par le bromure de potassium. Ces résultats s'expliqueraient par le potentiel antioxydant de l'EEAa.

En effet, le tamoxifène stimulerait l'activité de la NO synthase mitochondriale, associé à la formation des peroxy-nitrites et par conséquent la peroxydation lipidique mitochondriale (**Nazarewicz et al., 2007**). Ceci concourt à la libération du cytochrome C, qui va induire une production accrue de peroxydes d'hydrogènes, responsable d'un stress oxydant (**Masarone et al., 2018**). L'extrait de plante (EEAa) aux doses testées a également réduit ($p < 0.05$) la concentration de TBARS dans le foie, et augmenté l'activité de la catalase, avec une significativité à 150 mg/Kg, PC dans le foie et aux deux doses dans les reins (Figures 61 et 62), suggérant une protection des membranes biologiques. Conformément aux résultats présentés dans la partie I de ce travail, le potentiel antioxydant des métabolites secondaires présents dans l'EEAa serait mis à profit pour protéger le foie et booster la protection rénale chez les animaux traités au TAM.

Les activités antioestrogéniques, antihyperlipidémiantes et antioxydantes de l'EEAa auraient ainsi contribué à empêcher l'accumulation des lipides dans le tissu hépatique tel qu'observé à l'histologie.

Conclusion partielle III

Au terme de cette partie ou il était question de d'explorer l'effet protecteur de l'EEAa contre les effets toxiques associé à la prise du tamoxifène chez un modèle animal de cancer du sein, il en ressort que :

- L'EEAa (300 mg/Kg,Pc) a prévenu d'une hyperplasie de l'endomètre utérin en réduisant le taux sérique d'estradiol
- L'EEAa aux doses testées a prévenu de la perte de poids et de l'hypertriglycémie induites par le TAM
- L'EEAa a prévenu d'une toxicité hépatique en boostant l'activité de la catalase (150 mg.Kg; Pc) et réduisant le taux de TBARS hépatiques (150 et 300 mg/Kg,Pc).

Discussion générale

Les cancers continuent de faire les ravages dans le monde malgré les avancées dans les moyens de prise en charge. En Afrique et particulièrement au Cameroun ; les cancers gynécologiques sont les plus prépondérants. Le cancer du sein à lui seul y représente plus du tiers des cancers féminin depuis 2020, avec une augmentation du taux de décès de 1,7% entre 2020 et 2022 (**Ferley et al., 2024, 2021**). En effet, au Cameroun, le niveau de pauvreté non favorable au diagnostic précoce de la pathologie serait en majeure partie responsable des taux de décès associés à cette pathologie (**MINSANTE, 2020**). Associé à cela, la faible disponibilité des médicaments anticancéreux, les couts élevés des traitements et leurs effets indésirables peu tolérés, poussent les patients à l'usage des thérapies complémentaires et alternatives (**His et al., 2021**). L'une d'elle est la phytothérapie, qui de façon générale est utilisée par plus de 80% de la population africaine pour la prise en charge de nombreuses pathologies (**Dibong et al., 2011**). Ainsi, la recherche de substances bioactives capables de limiter la prolifération des cellules cancéreuses et les effets indésirables associés aux traitements existants serait une approche prometteuse pour répondre aux besoins de notre société. La présente étude permet de classer l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* parmi ces substances, exploitables dans la prise en charge alternative et complémentaire d'un cancer du sein hormonodépendant.

En effet, les premières activités réalisées dans ce travail ont révélé la capacité de cet extrait (EEAa) à limiter la prolifération des cellules YUMM1.7 par arrêt G1/S du cycle cellulaire, réduction de l'inflammation tumorale, inhibition de l'angiogenèse et induction de la mort cellulaire par voie intrinsèque de l'apoptose. Ces différentes actions antiprolifératives de l'EEAa ont été attribuées à ses métabolites secondaires (α -pinène, β -caryophyllène, et Quercétine) identifiés par LC/MS. Les activités anticancéreuses et antiinflammatoires de ces composés ayant déjà fait l'objet de nombreuses études (**Gushiken et al., 2022 ; Ye et al., 2020 ; Gaban et al., 2019 ; Uadkla et al., 2013**). Les cellules cancéreuses partageant en commun ces caractéristiques, ces observations ont permis d'envisager l'exploration de cet extrait dans la prise en charge alternative et complémentaire d'un cancer du sein hormonodépendant induit chez le rat *Wistar*.

D'entrée de jeu, un test de cytotoxicité au MTT sur les cellules cancéreuses du sein de la lignée MCF-7 (RE+) a permis de classer l'EEAa comme modérément antiprolifératif, selon l'*American Cancer Institute*. *In vivo* chez les rats ayant subi l'induction d'un cancer du sein avec du DMBA, le potentiel antiinflammatoire de l'EEAa a été confirmé. Ceci était associé à

une immunomodulation antitumorale, attribuée aux composés tels que la pipérine, l'isoprinosine et le 6-gingérol identifiés dans l'EEAa. Ces composés seraient capables de stimuler la production des globules blanc par les organes lymphoïdes, stimuler la différenciation lymphocytaire et améliorer l'index phagocytaire (**Patil et al., 2012 ; Sinula et Kuttan, 2004**). Grace à cette activité antiinflammatoire et immunomodulatrice de l'extrait, associée à l'action antiaromatase du stigmastérol présent dans l'extrait, la production de l'estradiol par action de l'aromatase sur les androgènes serait réduite. (**Lone et Bhat, 2015 ; Johnsto et Dowsett, 2003**). On assisterait ainsi à la baisse de l'activité transcriptionnelle des RE, avec pour conséquence une baisse de la survie, de la prolifération et de la croissance tumorale ; marqué par la diminution des paramètres tumoraux physiques observé dans ce travail.

Par ailleurs, simultanément à cet effet antitumoral, la baisse du taux circulant d'estradiol a été favorable à la protection de l'endomètre utérin contre une hyperplasie induite par le tamoxifène. En plus de lu potentiel antiinflammatoire de l'extrait évoqué, l'activité antihyperplasique observé serait également due à la présence d'autres flavonoïdes dans l'extrait. Ces derniers pourraient agir comme inhibiteur compétitif des RE utérin, limitant l'effet agoniste du TAM sur ces récepteurs (**Feng et al., 2017**). En plus de protéger de l'hyperplasie de l'endomètre, l'EEAa a également limité la perte de poids chez les animaux tout en empêchant l'hyperlipidémie. Cette activité a été associé à la présence conjointe de terpenoïdes et flavonoïdes dans l'EEAa. L'un stimulant l'hyperphagie via l'activation de la leptine (**Kumar et al., 2022**) et l'autre limitant la digestion des lipides par la lipase pancréatique et la synthèse des TG et CT via la réduction de l'activité transcriptionnelle de la PPAR- γ (**Rufino et al., 2021**). Par ailleurs, de par son potentiel antioxydant prouvé dans la première partie de ce travail, l'EEAa a protégé le foie des dommages oxydatifs causés par le métabolisme du TAM. En effet, la présence des composés tel que l' α -pinène dans l'EEAa aiderait à la stabilisation des EROs produit lors du métabolisme de tamoxifène, empêchant ainsi l'attaque des membranes cellulaires par peroxydation lipidique (**Karthikeyan et al., 2019**). Ce composé serait également à même d'activer l'expression des enzymes antioxydantes telle que la catalase, concourant à détoxifier du peroxyde d'hydrogène libéré suite à la peroxydation mitochondrial induite par le tamoxifène (**Masarone et al., 2018 ; Nazarewicz et al., 2007**). La protection des hépatocytes contre les effets du stress étant ainsi marqué par la baisse de l'activité plasmatique des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, PAL).

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au terme de ce travail dont l'objectif général était d'évaluer les activités anticancéreuses de l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* *in vitro* et *in vivo*, ainsi que son effet protecteur contre les effets indésirables associés à la prise du tamoxifène, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

L'EEAa contient les composés phénoliques les alcaloïdes et les terpenoïdes. L'extrait a exhibé des potentiels anti-radicalaires contre le DPPH, ABTS et du NO, et réducteur du fer et du molybdate. Il a inhibé la prolifération des cellules cancéreuses YUMM1.7 (IC₅₀ = 31,5 µg/mL) chez lesquelles à la concentration de 250 µg/mL, il a entraîné un arrêt G1/S du cycle cellulaire, limité l'inflammation induit la mort cellulaire par voie intrinsèque de l'apoptose ;

L'EEAa a modérément inhibé la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF-7 (CI₅₀ : 9,66µg/mL). Aux doses de 150 et 300 mg/Kg,Pc, il a présenté une activité antitumorale en réduisant le taux circulant promoteurs de croissance (EGF et estradiol) en limitant l'utilisation du glucose par les cellules mammaires. L'EEAa a exercé une activité anti-immunosuppresseur en entraînant une augmentation du taux de globules blancs, du taux d'INF et en réduisant le taux de TNF-α ;

✚ L'extrait aux doses testées a protégé d'une hyperplasie induite par le TAM en réduisant le taux circulant d'estradiol. Il a limité la perte de poids, prévenu et d'une hypertriglycémie induite par le TAM. Par son potentiel antioxydant, L'EEAa a par ailleurs prévenu les atteintes hépatiques conduisant à une baisse de l'activité plasmatique des transaminases. Il a boosté la protection rénale chez les animaux recevant du tamoxifène.

L'EEAa se veut donc comme une potentielle source de substances naturelles exploitables dans la prise en charge alternative et complémentaire du cancer du sein hormono-dépendant.

PERSPECTIVES

Pour affuter ce travail, il serait envisageable :

- D'évaluer la cytotoxicité de l'EEAa sur les cellules normales afin de déterminer son degré de sélectivité ;
- D'évaluer l'effet de l'EEAa sur l'expression de quelques gènes impliqués dans la cancérogenèse mammaire ;
- Faire en fractionnement bioguidé de l'EEAa en vu de mettre sur pied un alicament efficace pour la prise en charge du cancer du sein

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abondo A, Mbenkum F, Thomas D. (1991)** Ethnobotany and the medicinal plants of the Korup rainforest project area, Cameroon dans: Traditional Medicinal Plants. Dar Es Salaam University Press - Ministry of Health - Tanzania; 391
- Abotaleb, M., Kubatka, P., Caprnda, M., Varghese, E., Zolakova, B., Zubor, P., ... & Büsselberg, D. (2018).** Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomedicine & Pssharmacotherapy*, 101, 458-477.
- ACR practice guidelines for the performance of screening and diagnostic mammography.** Amended 2014 (Resolution 39);
- Adamowicz K & Baczkowska-Waliszewska Z. (2020).** Quality of life during chemotherapy, hormonotherapy or antiHER2 therapy of patiens with advanced, metastatic breast cancer in clinical practice. *Health Quality Life Outcomes*. 18, 134.
- Adikwu E., Ebinyo N. & Ozeke B. (2020).** Protective Effect of Lycopene against Tamoxifen-Induced Hepatotoxicity in Albino Rats. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*. 4, 69-75.
- Ahima R S, & Antwi A,(2008).** Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(4), 811–823.
- Ahmed M. & Lennard T. (2009).** Breast cancer: Role of neoadjuvant therapy. *International Journal of Surgical Pathology*, 7:416-420.
- Akhouri,,V., Kumari, M. & Kumar, A.(2020).** Therapeutic effect of Aegle marmelos fruit extract against DMBA induced breast cancer in rats. *Nature Research*, 10:18016.
- Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A. E., & Mallei, M. I. (2021).** DNA damage/repair management in cancers. *Advances in Medical Biochemistry, Genomics, Physiology, and Pathology*, 309-339.
- Alix-Panabières C. & Pantel K. (2016).** Clinical applications of circulating tumor cells and circulat ing tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery*; 6, 479-491.
- Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016).** From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 619-634.
- Amadi, S. Zhang, W.Y. & Wu, G., (2016).** Research progress in phytochemistry and biology of *Aframomum* species. *Pharmaceutical Biology*,54(11):2761-2770.
- American Cancer Society (2021).** Types of Breast Cancer.
- Andre, P. Isabelle R., Nancy S., & Hanitriniaina R.. (2008).** "Cosmetic composition in particular with anti-ageing activity comprising an extract of *Aframomum angustifolium* or longoza plant." U.S. Patent N° 7,381,436,
- Anywar, U.G. & Kirimuhuzya, C. (2015).** Phytochemical profile and antibacterial activity of crude extracts of the pod of *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum. *European Journal of Biological Research*. 5(2), 36-41.

Arnal JF., Lenfant F., Metivier R., Flouriot G., Adlanmerini M., Fontaine., ...& Katzenellenbogen J. (2017). Estrogen Receptor Alpha Action: From Tissue Specificity Implications. *Physiological Reviews*. 97(3). 1045-1087.

Ateba, S.B. Mvondo, M.A., Tchoukouegno Ngeu, S., Tchoumtchoua J., Awounfack C.H., Njamen, D. & Krenn L. (2018). Natural Terpenoids Against Female Breast Cancer: A 5-year Recent Research. *Current Medicinal Chemistry*;25, 3162-3213

Azuma T., Yao S., Zhu G., Flies A.S., Flies S.J. & Chen L. (2008). B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood*; 111:3635-43.

Babykutty, S., Suboj, P., Srinivas, P., Nair, A. S., Chandramohan, K., & Gopala, S. (2012). Insidious role of nitric oxide in migration/invasion of colon cancer cells by upregulating MMP-2/9 via activation of cGMP-PKG-ERK signaling pathways. *Clinical & experimental metastasis*, 29, 471-492.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., ... & Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46, 1086 – 1089

Barsoum, I. B., Smallwood, C. A., Siemens, D. R., & Graham, C. H. (2014). A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Research*, 74(3), 665-674.

Bartels H., Böhmer M. & Heierli. (1972). Serum creatinine determination without protein precipitation. *International Journal of Clinical Chemistry*. 37: 193-197.

Baser K.H.C. & Kürkçüglu M. (2001). The essential oils of *Aframomum corrorima* (Braun) Jansen and *A. angustifolium* K. Schum. from Africa. *Journal of Essential Oil Research*;13:208-209.

Basset C.(2014) Api5 : un nouveau co-facteur du récepteur aux œstrogènes ER α impliqué dans la progression tumorale des carcinomes mammaires. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse : France.

Basu A. (2018). DNA damage, mutagenesis and cancer. *International Journal Molecular Sciences*. 19(4), 970.

Bayraktar S. & Arun K.B.(2019). Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. Dans A. Aydiner, A. Igci & A. Soran, *Breast Disease: Diagnosis and Pathology*, Volume 1, Edition 2 (P.49-63). Suisse: Springer.

Bazira, P. J., Ellis, H., & Mahadevan, V. (2022). Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (Oxford)*, 40(2), 79-83.

Bazm, M. A., Naseri, L., & Khazaei, M. (2018). Methods of inducing breast cancer in animal models: A systematic review. *World Cancer Research Journal*, 5(4), e1182.

Becker J.C., Houben R., Schrama D., Voigt H., Ugurel S. & Reisfeld R.A.(2010). Mouse model for melanoma: a person's perspective. *Experimental Dermatology*, 19: 157-64

Benz, C. C., Scott, G. K., Sarup, J. C., Johnson, R. M., Tripathy, D., Coronado, E., ... & Osborne, C. K. (1992). Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Research and Treatment*, 24, 85-95.

Bergmeyer H.U., Bernt E. & Lachenicht R. (1974), Alkaline Phosphatase in Serum Determination with Automatic Analysers. *Method of Enzymatic Analysis*, 2, 864-868,

Bishayee, A., Mandal, A., Bhattacharyya, P., & Bhatia, D. (2016). Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. *Nutrition and Cancer*, 68(1), 120-130.

Bishayee, A., Thoppil, R. J., Darvesh, A. S., Ohanyan, V., Meszaros, J. G., & Bhatia, D. (2013). Pomegranate phytoconstituents blunt the inflammatory cascade in a chemically induced rodent model of hepatocellular carcinogenesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 178-187.

Bistoni, G., & Farhadi, J. (2015). Anatomy and physiology of the breast. Plastic and reconstructive surgery: *Approaches and Techniques*, 477-485.

Blakemore J and Naftolin F, (2016). Aromatase: contributions to physiology and disease in women and men. *Physiology*, 31(4):258–269.

Bonnet-Duquennoyn M., Dumas, M., Debacker, A., Lazou, K., Talbourdet, S., Franchi, J., Heusèle, C., André, P., Schnebert, S., Bonté, F. & Kurfürst, R. (2007). Transcriptional effect of an *Aframomum angustifolium* seed extract on human cutaneous cells using low-density DNA chips. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6, 128–134

Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. *Nature & Technologie*, (9), 14 – 19.

Brown, J. M. (2014). Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy. *The British Journal of Radiology*, 87(1035), 20130686.

Brunnicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, et al. (2005). editors. Schwartz's principles of surgery. 8th ed. New York: McGraw-Hill, Health Publishing Division;

Burke J.D. & Young H.A. (2019). IFN- γ : a cytokine at the right time, is in the right place. *Seminar in Immunology*, 43:1–8.

Burstein H.J, Lacchetti C., Anderson H., Buchholz T.A., Davidson N.E., Gelmon K.A., et al. (2018). Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of Clinical Oncology*, 37, 423–38.

Campbell, K.J. & Tait, S.W.G. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biology*; 8, 180002.

Cao, J. (2016). Breast Cancer Methods and Protocols. Hatfield, Hertfordshire: *Springer*.

Capasso, I., Esposito E., Pentimalli F., Crispo A., Montella M., Grimaldi M., ... & Giodano A. (2010). Metabolic syndrome affects breast cancer risk in postmenopausal : National Institute of Naples experience. *Cancer Biology and Therapy*, 10 (12), 1240-43.

Cardoso, F., van't Veer, L. J., Bogaerts, J., Slaets, L., Viale, G., Delaloge, S., ... & Piccart, M. (2016). 70-gene signature as an aid to treatment decisions in early-stage breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(8), 717-729.

Cavalcanti FN, Lucas TF, Lazari MF, & Porto CS (2015). Estrogen receptor ESR1 mediates activation of ERK1/2, CREB, and ELK1 in the corpus of the epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 54(3), 339–349.

Cella, D., & Fallowfield, L. J. (2008). Recognition and management of treatment-related side effects for breast cancer patients receiving adjuvant endocrine therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 107, 167-180.

Chanika D., Nayanathara T., Gayathree N., Uthpala J. & Nayanakanthi N. (2020). Cancer chemoprevention through functional food of plant origin. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 6, 132-143

Chauvin, L. (2015). Voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation des tumeurs mammaires au docétaxel par les acides gras polyinsaturés n-3 ; *Thèse de doctorat. Université François – Rabelais de Tours*

Chen C. R., Kang Y., Siegel P.M. & Massague J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to cmyc repression. *Cell*, 110, 19–32

Chen, P. H., Wu, J., Ding, C. K. C., Lin, C. C., Pan, S., Bossa, N., ... & Chi, J. T. (2020). Kinome screen of ferroptosis reveals a novel role of ATM in regulating iron metabolism. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 1008-1022.

Chen, W. J., Tsai, J. H., Hsu, L. S., Lin, C. L., Hong, H. M., & Pan, M. H. (2021). Quercetin blocks the aggressive phenotype of triple-negative breast cancer by inhibiting IGF1/IGF1R-mediated EMT program. *Journal of Food and Drug Analysis*, 29(1), 98.

Chen, W.; Liu, Y.; Li, M.; Mao, J.; Zhang, L.; Huang, R.; Jin, X.; Ye, L.(2015). Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127, 332–338.

Chew, S. M., Liu, B., Shen, S., & Iyengar, N. M. (2024). The Role of Obesity and Inflammation in Breast Cancer Recurrence. *Current Breast Cancer Reports*, 1-14.

Chin, C. Y., Chen, Y. H., Wu, S. C., Liu, C. T., Lee, Y. F., & Tsai, M. Y. (2020). Complementary and alternative medicine use in breast cancer patients at a medical center in Taiwan: a cross-sectional study. *Integrative Cancer Therapies*, 19, 1534735420983910.

Chojnacka K. & Lewandowska U. (2020). The angiogenic activity of Polyphenol-Rich Extracts and its implication on Cancer Chemoprevention. *Food Reviews International*. 36, 77-103.

Chunjie W., Lanxiang W. & Zhang H. (2016). Berberine enhances the antitumor activity of Tamoxifen in drug-sensitive MCF-7 and drug resistant MCF-7/Tamoxifen cells. *Oncology Letters*; 5490, 2250-2256.

Cimpean, A. M., Tamma, R., Ruggieri, S., Nico, B., Toma, A., & Ribatti, D. (2017). Mast cells in breast cancer angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 115, 23-26.

Cioroboreanu, R., & Lazăr, E. (2012). HISTOLOGICAL GRADE OF THE BREAST CANCER. *Journal of Hygiene and Public Health.*, 62(1) : 35-41

Clinton, S. K., Giovannucci, E. L., & Hursting, S. D. (2020). The world cancer research fund/American institute for cancer research third expert report on diet, nutrition, physical activity, and cancer: impact and future directions. *The Journal of Nutrition*, 150(4), 663-671.

Cole, K., Jacobs, L. and Vance, F. (2010). Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty synthesis. *Hepatology Journal*, 52, 1258-1265.

Colleoni, M. and Munzone, E. (2015). Navigating the challenges of endocrine treatments in premenopausal women with ER-positive early breast cancer. *Drugs*, 75,1311–1321

Costa, E., Ferreira-Gonçalves, T., Chasqueira, G., Cabrita A.S., Figueiredo I.V. et Reis C.P. (2020). Experimental Models as Refined Translational Tools for Breast Cancer Research. *Scientia Pharmaceutica*, 88 (32), 29 pages.

Crespi E., Bottai G. and Santarpia L. (2016). Role of inflammation in obesity-related breast cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 31:114–122

Dalgård, C., Benetos, A., Verhulst, S., Labat, C., Kark, J. D., Christensen, K., ... & Aviv, A. (2015). Leukocyte telomere length dynamics in women and men: menopause vs age effects. *International Journal of Epidemiology*, 44(5), 1688-1695.

Davidson N. (2013). Cancer du sein et maladies mammaires bénignes. Dans Goldman's Cecil Medicine, 24th edition (P. 259-272).

De Araújo-Filho H.G., Dos Santos J.F., Carvalho M.T.B., Laurent Picot L., Fruitier-Arnaudin I., Groult H., Quintans-Júnior L.J., Quintans J.S.S. (2021).Anticancer activity of limonene: A systematic review of target signaling pathways. *Phytotherapy Research*: 1–14.

Deberardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200.

Demaria, S., Pilonis, K. A., & Adams, S. (2011). Cross-talk of breast cancer cells with the immune system. Breast Cancer-Carcinogenesis, *Cell Growth and Signalling Pathways*, 457, 482.

Derya Y., Ebru B., Gülsen B., Deniz K. & Merve T. (2018). The Investigation of the Effects of Tamoxifen and Vitamin D Combination on the Expression of P53, Bcl-2 and Bax and Cell Cycle in Mcf-7 Cell Line. *Proceedings*, 2, 1-4.

Desnoyers, A., Riesco, E., Fülöp, T., & Pavic, M. (2016). Activité physique et cancer: mise au point et revue de la littérature. *La Revue de médecine interne*, 37(6), 399-405.

Dhyani, P., Quispe, C., Sharma, E., Bahukhandi, A., Sati, P., Attri, D. C., ... & Cho, W. C. (2022). Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. *Cancer Cell International*, 22(1), 1-20.

Dibong S. D., Mpondo M. E., Ngoye A., Kwin M. F. & Betti, J. L. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37, 2496 -2507

Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 297-306.

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060-1072.

Du R., Wang X., Ma L., Larcher LM., Tang H., Zhou H., ... & Wang T. (2021). Adverse reactions of targeted therapy in cancer patients: a retrospective study of hospital medical data in China. *BMC Cancer*, 21, 206.

Dumitrescu R.G. & Shields P.G. (2005). The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol* 35 : 213–225

Ebhohimen I.E. & Okolie N.P. (2021). Effect of Ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seed on the induction of nephrotoxicity by Bromate in Wistar rats. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 9(1), 8-14

Ebhohimen IE., Edemhanria L., Ekozin A and Okolie NP. (2017). Effect of heat treatment on the antioxidant capacity of aqueous and ethanol extracts of *Aframomum angustifolium* seed. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 1(3), 1125-128.

Ebhohimen, I. E., Ebhomielen, J. O., Edemhanria, I., Osagie, A. O. And Omoruyi, L. I., (2020). Effect of ethanol extract of *afmomum angustifolium* seeds on potassium bromate induced liver and kidney damage in wistar rats. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 26 :1-8.

Edhemhanria L., Ebhomielen JO and Ebhohimen I. (2020). Antioxidant effect of *Aframomum angustifolium* seed essential oil in freeze storage of lean meat. *Journal of Science Education and Technology*, 5(1), 97-103

Ellis, I.O. & Elston, C.W., (2006). Histologic Grade, In: O'Malley FP, Pinder SE, *Breast Pathology*, Elsevier Inc, 225-233

Emens, L. A., Silverstein, S. C., Khleif, S., Marincola, F. M., & Galon, J. (2012). Toward integrative cancer immunotherapy: targeting the tumor microenvironment. *Journal of Translational Medicine*, 10, 1-5.

Engbang J.P.N., Essome H., Koh V. M., Simo G., Essam J.D.S., Mouelle A.S., Essame J.L.O.(2015). Cancer du sein au Cameroun, profil histo épidémiologique: à propos de 3044 cas. *Pan african Medical Journal*, 21, 242

Ewaschuk, J. B., Newell, M., & Field, C. J. (2012). Docosahexanoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER– breast cancer cells. *Lipids*, 47, 1019-1030.

Faguet G. (2014). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer*, 136, 1-15

Farhadihosseinabadi B., Hosseini F., Larki P., Bagheri N., Abbaszadeh-Goudarzi K., Sinehsepehr K., Johari B., Abdollahpour-Alitappeh M. (2018). Breast cancer: risk factors, diagnosis and management. *Medical Laboratory Journal*, 12(5): 1-9.

Faustino-Rocha P, Oliveira J, Pinho-Oliveira et al. (2013). Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Animal*, 42(6): 217–224.

Fedro A., Giovanni C., Gunnar M., Barbara B., Eleonora B., Ernst A., ... & Thomas H. (2020). First- in- human pharmacokinetics of tamoxifen and its metabolites in the milk of a lactating mother: a case study. *European Society for Medical Oncology*, 2020,1-6.

Feng L., Li J., Yang L., Zhu L., Huang X., Zhang S., ... & Jin H. (2017). Tamoxifen activates Nrf2-dependent SQSTM1 transcription to promote endometrial hyperplasia. *Theranostics*, 7(7),1890–1900.

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., ... & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77-106.

Ferlay, J., Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263..

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789.

Fleten, K. G., Flørenes, V. A., Prasmickaite, L., Hill, O., Sykora, J., Mælandsmo, G. M., & Engesæter, B. (2016). hvTRA, a novel TRAIL receptor agonist, induces apoptosis and sustained growth retardation in melanoma. *Cell Death Discovery*, 2(1), 1-11.

Fossati, P. & Prencipe, L. (1982). Enzymatic colorimetric method of the determination of uric acid in serum. *Clinical Chemistry* 26, 227.

Fouad Y.A. & Aanei C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5), 1016-1036.

Frederick J.P., Liberati N.T., Waddell D.S., Shi Y. & Wang X.F. (2004). Transforming growth factor b-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Molecular Cell Biology*, 24, 2546–2559

Fu, Z., Chen, D., Cheng, H., & Wang, F. (2015). Hypoxia-inducible factor-1 α protects cervical carcinoma cells from apoptosis induced by radiation via modulation of vascular endothelial growth factor and p53 under hypoxia. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 21, 318.

Fuentes, N. & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry structural biology*. 116. 135-170.

Fukuda, R., Hirota, K. Fan, F., Do Jung, Y., Ellis, L. M. & Semenza G.L. (2002). Insulin-like Growth Factor 1 Induces Hypoxia-inducible Factor 1-mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Which is Dependent on MAP Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Colon Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (41), 8205-38211.

Furth, P. A. (2014). STAT signaling in different breast cancer sub-types. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 612-615.

Gaban, M., Owczarek, K., Chojnacka, K., & Lewandowska, U. (2019). Overview of polyphenols and polyphenol-rich extracts as modulators of IGF-1, IGF-1R and IGFBP expression in cancer disease. *Journal of Functional Foods*, 52, 389-407.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... & Turk, B. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.

Ganott, M., Griffith, B., & Rudzinski, S. M. (2019). Breast Imaging and Image-Guided Biopsy Techniques. *Breast Disease: Diagnosis and Pathology*, Volume 1, 63-94.

Garcia-Barrado M, Iglesias-Osma M, Perez-Garcia E, et al. (2020) Role of flavonoids in the interactions among obesity, inflammation, and autophagy. *Pharmaceuticals*, 13(11), 342

Garima M. (2018). Serious adverse effects of anticancer drugs- a review. *An International Multidisciplinary e-Journal*, 3, 1-14.

Garuti G., Cellani F., Centinaio G., Sita G., Nalli G. and Luerti M. (2006). Histopathologic behavior of endometrial hyperplasia during tamoxifen therapy for breast cancer. *Gynecology and Oncology Journal*, 101, 269-273.

Gharekhanloo F., Haseli M.M., Torabian (2018). Value of Ultrasound in the Detection of Benign and Malignant Breast Diseases: A Diagnostic Accuracy Study. *Oman Medical Journal*, 33(5), 380-386

Ghorai N., Chakraborty S., Gucchait S., Saha S.K. & S.Biswas, (2012). Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*, 2529: 6 pages.

Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal*, 278(1), 16-27.

Gill, M.J., Brenwald, N.P. & Wise, R. (1999). Identification of an Efflux Pump Gene, pmrA, Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 43: 187- 189.

Girad S. (2015). Organochlorés et Cancer du sein : modulation de la signalization cellulaire des épithéliales mammaires humaines. *Mémoire. Université du Quebec*. 116.

Githiori J. B (2004). Evaluation of Anthelmintic Properties of Ethnoveterinary Plant Preparations Used as Livestock Dewormers by Pastoralists and Small Holder Farmers in Kenya. Thèse de Doctorat, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala;72

Goel, S., Bergholz, J.S., & Zhao, J.J. (2022). Targeting CDK4 and CDK6 in cancer. *Nature Review in Cancer* 22, 356–372.

Goss, P. E., Ingle, J. N., Pritchard, K. I., Robert, N. J., Muss, H., Gralow, J., ... & Parulekar, W. R. (2016). Extending aromatase-inhibitor adjuvant therapy to 10 years. *New England Journal of Medicine*, 375(3), 209-219.

Green D.R. (2011). Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Gu W., Xu W., Sun X., Zeng B., Wang S., Dong N., ... & Yang J. (2017) Anordrin eliminates tamoxifen side effects without changing its antitumor activity. *Scientific Report*, 7:43940.

Günter E., Alexander M. & Clemens T (2020). Tamoxifen and Endometrial Cancer: A Janus-Headed Drug. *Cancers*, 12, 1-11.

Gurer-Orhan, H., Ince, E., Konyar, D., Saso, L., & Suzen, S. (2018). The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 25(33), 4084–4101.

Gushiken L.F.S., Beserra F.P., Hussni M.F., Gonzaga M.T., Ribeiro V.P., De Souza P.F., ... & Takahira R.K. (2022). Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, Article ID 9004014.

Habibeh, B., Fatemeh, B. S., Naser, J., & Shirin, N. N. T. (2020). The role of herbal medicine in the side effects of chemotherapy. *Revista Latinoamericana De Hipertensión*, 15(1), 64-70.

Hall, L. H., King, N. V., Graham, C. D., Green, S. M., Barber, A., Neal, R. D., ... & Smith, S. G. (2022). Strategies to self-manage side-effects of adjuvant endocrine therapy among breast cancer survivors: an umbrella review of empirical evidence and clinical guidelines. *Journal of Cancer Survivorship*, 1-43.

Hamid, B., Nasrin, Z., Roghayeh, A., Abolfazl, N. & Sara, S. (2015). Therapeutic Effect of *Silybum marianum* Plant Extract on Tamoxifen-Induced Fatty Liver in Rats. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 3,1-5.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144(5):646–674.

Hansten, P. (2018). The Underrated Risks of Tamoxifen Drug Interactions. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 43, 495–508.

Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J., Gnant M., Houssami N., Poortmans P., ... & Cardoso F.(2019). Breast cancer. *Disease Primers*, 5, 66.

Haupt, S., Raghu, D., & Haupt, Y. (2016). Mutant p53 drives cancer by subverting multiple tumor suppression pathways. *Frontiers in Oncology*, 6, 12.

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 635-649.

He, Z., Chen, Z., Tan, M., Elingarami, S., Liu, Y., Li, T., ... & Li, W. (2020). A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. *Cell proliferation*, 53(7), e12822.

Hecht, F., Pessoa, C. F., Gentile, L. B., Rosenthal, D., Carvalho, D. P., & Fortunato, R. S. (2016). The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biology*, 37, 4281-4291.

Heitzer, E., Haque, I. S., Roberts, C. E., & Speicher, M. R. (2019). Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature Reviews Genetics*, 20(2), 71-88.

Hesselbarth, N., Pettinelli, C., Gericke, M., Berger, C., Kunath, A., Stumvoll, M., ... & Klötting, N. (2015). Tamoxifen affects glucose and lipid metabolism parameters, causes browning of subcutaneous adipose tissue and transient body composition changes in C57BL/6NTac mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(3), 724-729.

His M. (2016). Surpoids, obésité et survie après cancer du sein dans la cohorte E3N. *Thèse de Doctorat. Université Paris Saclay (COMUE)*. 253.

Hiyama, E., & Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer*, 96(7), 1020-1024.

Holotiuk V.V., Kryzhanivska A.Y., Churpiy I.K., Tataryn B.B., Ivasiutyn D.Ya. (2019). Role of nitric oxide in pathogenesis of tumor growth and its possible application in cancer treatment. *Experimental Oncology*, 41(2), 210–215.

Hou J., Zhang Y., Zhu Y., Zhou B., Ren C., Liang S. & Guo Y.(2019). α -pinene induces apoptotic cell death via caspase activation in Human Ovarian Cancer Cells. *Medicine Science Monitor*, 25, 6631-6638.

Hu X. & Ivashkiv L.B. (2009). Cross-regulation of signaling and immune responses by IFN- γ and STAT1. *Immunity*, 31(4):539–50.

Hu Z.I. & McArthur H.L. (2018). Immunotherapy in Breast Cancer: the New Frontier. *Current Breast Cancer Reports*, 10:35–40.

Huang, M., Qiu, Q., Xiao, Y., Zeng, S., Zhan, M., Shi, M., ... & Xu, H. (2016). BET bromodomain suppression inhibits VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability by blocking VEGFR2-mediated activation of PAK1 and eNOS. *Scientific reports*, 6(1), 23770.

Hubert, S., & Abastado, J. P. (2014). Les étapes précoces du processus métastatique. *Médecine/Sciences*, 30(4), 378-384.

Huda A., Falah H., Raghdah M., Younus J., Mohanad K. and Atyaf A. (2020). Tamoxifen from Chemotherapy to Antiviral Drug: Possible Activity against COVID-19. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 4, 108-116.

Hugo H., Julie L. and Thierry P. (2019). Agranulocytosis Induced by Tamoxifen in a Breast Cancer Patient. *Breast Care*, 15:72–74

Hutchins A.P., Diez, D. Miranda-Saavedra, (2012). The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings In Functional Genomics*, 12 (6): 489-498.

Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 177-184.

Hynes, N. E., & Watson, C. J. (2010). Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a003186.

Ingvarsson S. (1999) Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol*; 9: 277-288.

Inkoto L.C., Koto-Te-Nyiwa Ngbolua T.K., Bokungu E.P., Masengo A.C., Itoku B.J., Tshilanda DD., ... & Mpiana T.P. (2021). Phytochemistry and Pharmacology of *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum (Zingiberaceae): A Mini Review. *South Asian Research Journal of Natural Products*, 5(1), 21-36.

Institut National du Cancer.(2016). *Cancers du sein /du diagnostic au suivi*, INCa, novembre 2016.201pages

Javed, A., & Lteif, A. (2013, February). Development of the human breast. In *Seminars in plastic surgery* (Vol. 27, No. 01, pp. 005-012). Thieme Medical Publishers.

Jayachandra, K., Maheswaran, A., & Murali, M. (2012). In-vitro evaluation of nitric oxide scavenging activity of methanolic and aqueous extract of *syzygium cumini* Linn. Bark (Myrtaceae). *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 3(2), 615.

Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., & Srdjenovic, B. U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, 17(1), 22-28.

Jesinger, R. A. (2014). Breast anatomy for the interventionalist. *Techniques in vascular and interventional radiology*, 17(1), 3-9.

Jianghong F. and Lannoy I. (2013). Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, 87, 93-120.

Johnston, S. R., & Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nature Reviews Cancer*, 3(11), 821-831.

Jordan, V. C., & Assikis, V. J. (1995). Endometrial carcinoma and tamoxifen: clearing up a controversy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 1(5), 467-472.

Jorgovanovic D., Song M., Wang L. & Zhang Y.(2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research?* (2020) 8:49

Kaana A. & Samuel S.O. (2018). Proximate and antinutritional analyses of seed, pulp and peel of *Aframomum Angustifolium* (Sonn) K.Schum. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*;7(3), 120-124.

Kabat, G. C., Cross, A. J., Park, Y., Schatzkin, A., Hollenbeck, A. R., Rohan, T. E., & Sinha, R. (2009). Meat intake and meat preparation in relation to risk of postmenopausal breast cancer in the NIH-AARP diet and health study. *International journal of cancer*, 124(10), 2430-2435.

Kahia, K. B. (2012). Etude des voies de signalisation associées à la stabilité des microtubules et au chimiotactisme induits par le récepteur à tyrosine kinase ErbB2, dans le cancer du sein (*Doctoral dissertation, Institut Curie*).

Kamatenesi M.M., Oryem-Origa H., Acipa A. (2011). Medicinal plants of Otwal and Ngai Sub Counties in Oyam District, Northern Uganda. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7, 7

Kamran, S.; Sinniah, A.; Abdulghani, M.A.M.; Alshawsh, M.A.(2022) Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review. *Cancers*, 14, 1100.

Kandir, S., Karakurt, S., Gökçek-Saraç, Ç., & Karakurt, S. (2024). Tannic acid elicits differential gene regulation in prostate cancer apoptosis. *Acta Pharmaceutica*, 74(3), 539-550.

Kandyli, P. (2022). Phytochemicals and antioxidant properties of edible flowers. *Applied Sciences*, 12(19), 9937.

Karimi, B., Ashrafia, M., Shomali, T. & Yektaseresht A., (2018). Therapeutic effect of simvastatin on DMBA-induced breast cancer in mice. *Original article*, 30 pages,

- Karn A., Jha A., Shrestha S., Poundel S., Bhandari R. and Acharya B. (2010).** Tamoxifen for Breast Cancer. *Journal of Nepal Medical Association (JNMA)*, 49 :662-67.
- Karwacz, K., Bricogne, C., MacDonald, D., Arce, F., Bennett, C. L., Collins, M., & Escors, D. (2011).** PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8⁺ T cells. *EMBO Molecular Medicine*, 3(10), 581-592.
- Kerdelhué B., Forest C., Coumoul X. (2016).** Dimethyl-Benz(a)anthracene: a mammary carcinogen and a neuendocrine disruptor. *Biochimistry Open*, 3: 49-55.
- Keyte IJ., Harrison RM and Lammel G. (2013).** Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-A Review. *Chemical Society Reviews*. 42. 9333-9391.
- Kierans S.J., Taylor C.T. (2021).** Regulation of glycolysis by the hypoxia inductible factor (HIF): implication for cellular physiology. *Journal of Physiology*, 599(1): 23-37.
- Kim C., Cho S.K., Kim K.D., Nam DW., Chung W.S., Jang H.J., ... & Ahn KS. (2014).** β -Caryophyllène oxide potentiates TNF α -induced apoptosis and inhibits invasion through down-regulation of NF- κ B-regulated gene products. *National Library of Medicine*. 19(4). 708-18.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2005).** Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biology & Therapy*, 4(9), 924-933.
- Kim, W., Lee, W. B., Lee, J. W., Min, B. I., Baek, S. K., Lee, H. S., & Cho, S. H. (2015).** Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, 23(4), 626-632.
- Koch, A. E., & Distler, O. (2007).** Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Research & Therapy*, 9, 1-9.
- Koff J.L. (2015).** Ramachandiran S and Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*; 16: 2942-2955
- Konda K.M., Kabakura M., Mbembe B., Itufa Y., Mahuku K., Mafuta ...&., Paul L. (2012).** Plantes médicinales de traditions. Province de l'Equateur – R.D. Congo, *Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Kinshasa*;419
- Kong Y., Xu S. (2018).** Salidroside prevents skin carcinogenesis induced by DMBA/TPA in a mouse model through suppression of inflammation and promotion of apoptosis. *Oncology Reports*. 39. 2513-2526
- Kousteni S, Han L, Chen JR, Almeida M, Plotkin LI, Bellido T, & Manolagas SC (2003).** Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *Journal of Clinical Investigations*, 111(11), 1651–1664.
- Kuete V., Ango P.Y., Yeboah S.O., Mbaveng A.T., Mapitse R., Kapche G.D., ... & Efferth T. (2014).** Cytotoxicity of four *Aframomum* species (*A. arundinaceum*, *A. albobolaleum*, *A. kayserianum* and *A. polyanthum*) towards multi-factorial drug resistant cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:340.

Kumar V., Singh D. D., Singh Lakhawat S., Yasmeen N., Pandey A. & Singla R.K. (2022). Biogenic Phytochemicals Modulating Obesity: From Molecular Mechanism to Preventive and Therapeutic Approaches. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, Article ID 6852276, 20 pages

Kuol, N., Stojanovska, L., Nurgali, K., & Apostolopoulos, V. (2017). The mechanisms tumor cells utilize to evade the host's immune system. *Maturitas*, 105, 8-15.

Lakhani, S.R., Ellis I.O., Schnitt, S.J, Tan, P.H, van de Vijier, M.J. (2012).WHO Classification of tumors, volume 4

Laliotis A, Vrekoussis T, Kafousi M, Sanidas E, Askoxilakis J, Melissas J, ...& Stathopoulos EN (2013). Immunohistochemical study of pElk-1 expression in human breast cancer: association with breast cancer biologic profile and clinicopathologic features. *Breast*, 22(1), 89–95.

Latunde-Dada, G. O. (2017). Ferroptosis: role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(8), 1893-1900.

Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G., Buc, E., Bachet, J. B., Lecomte, T., ... & Penault-Llorca, F. (2009). Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(35), 5924-5930.

Lautenschläger T., Monizi M., Pedro M., Mandombe J.L.M. Bránquima F.M., Heinze C. & Neinhuis C. (2018). First large-scale ethnobotanical survey in the province of Uíge, northern Angola. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2018 (14), 51

Lee A.V., Oesterreich S., Davidson N.E. (2015). MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv073.

Lee, J., Chung, H., Chang, P. S., & Lee, J. (2007). Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry*, 103(2), 662-669.

Lemaire J., Larrue R., Perrais M., Cauffiez C. & Pottier N. (2020). Aspects fondamentaux du développement tumoral. *Service de Toxicologie et Génopathies*, 107(11), 1148-1160.

Lemmon M.A. & Schlessinger J.(2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117-1134.

Levin, E. R., & Pietras, R. J. (2008). Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 108, 351-361.

Li Y, Zhou M., Hu Q., Bai X., Huang W., Scheres S.H.W. & Shi Y. (2017) Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 114, 1542–47

Liamin M. (2019). Exposition *in vitro* de lymphocytes T humains aux hydrocarbures aromatiques polycycliques : étude des effets immunotoxiques. *Médecine humaine et pathologie : Université Rennes 1*. 1-237.

Liao G-S., Apaya M.K., Shyur L-F.(2013). Herbal Medicine and Acupuncture for Breast Cancer Palliative Care and Adjuvant Therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 437948, 17 pages.

- Lien, E. A., Solheim, E., & Ueland, P. M. (1991).** Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Research*, 51(18), 4837-4844.
- Lien, E. C., Lyssiotis, C. A., & Cantley, L. C. (2016).** Metabolic reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR pathway in cancer. *Metabolism in Cancer*, 39-72.
- Lim S, Kaldis P (2013).** Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*; 140(15), 3079–3093
- Lim, S.M., Kim, Y.N., Park, K.H. Kang B., Chon H.J., Kim C., Kim J.H & Rha S.Y. (2016).** Bone alkaline phosphatase as a surrogate marker of bone metastasis in gastric cancer patients. *BMC Cancer*, 16, 385.
- Lin, E. Y., Jones, J. G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K. D., Muller, W. J., & Pollard, J. W. (2003).** Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 2113-2126.
- Liu, Z., Huang, P., Law, S., Tian, H., Leung, W., & Xu, C. (2018).** Preventive effect of curcumin against chemotherapy-induced side-effects. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1374.
- Lone, S.H. & Bhat, K.A. (2015).** Phytosterol as precursors for the synthesis of aromatase inhibitors: hemisynthesis of testololactone and testolacyone. *Steroids*, 95 (2015), 164-168
- Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015).** Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, 112(6), 957-962.
- Lorusso, G., & Rüegg, C. (2012, June).** New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 22, No. 3, pp. 226-233). Academic Press.
- Lösel, R., & Wehling, M. (2003).** Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), 46-55.
- Lu, W., Sun, J., Yoon, J. S., Zhang, Y., Zheng, L., Murphy, E., ... & Lenardo, M. J. (2016).** Mitochondrial protein PGAM5 regulates mitophagic protection against cell necroptosis. *PloS one*, 11(1), e0147792.
- Ma, Z., Kim, Y. M., Howard, E.W., Feng, X., Kosanke, S.D., Jiang,S.Y., ... & Yang, X., (2018).** DMBA promotes ErbB2 mediated carcinogenesis via ErbB2 and estrogen receptor pathway activation and genomic instability. *Oncology Reports*, 40, 1632-1640.
- Maciejowski J. & De Lange T. (2017).** Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Molecular Cell Biology*, 18, 175-187.
- Maelfait, J., Liverpool, L., Bridgeman, A., Ragan, K. B., Upton, J. W., & Rehwinkel, J. (2017).** Sensing of viral and endogenous RNA by ZBP 1/DAI induces necroptosis. *The EMBO Journal*, 36(17), 2529-2543.
- Malhotra G. K., Zhao X., Band H. & Band V. (2010).** Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955-960,
- Manish M., Kurt J., Phillip R (2006).** Inducible Nitric Oxide Synthase and apoptosis in Murine proximal Tubule Epithelial cells. *Toxicological sciences*, 91(2), 493-500.

Marsh J., Mukherjee P., Seyfried T.N.(2008). Akt-dependent proapoptotic effects of dietary restriction on late-stage management of a phosphate and tensin homologue/tuberous sclerosis complex 2-deficient mouse astrocytoma. *Clinical Cancer Research*, 14, 7751-62.

Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., ... & Persico, M. (2018). Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Massagué J. & Obenauf A.C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*; 529, 298-306

Mastrangelo, S., Attina, G., Triarico, S., Romano, A., Maurizi, P., & Ruggiero, A. (2022). The DNA-topoisomerase inhibitors in cancer therapy. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 15(2), 553-562.

Matthews H.K., Bertoli C. & De BruinR. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature*, 23, 74-88

Mbong M-A., Edoun F., Ngandi L., Youvop J., Orang R., Tienoue H., Nwang F., Ngondi J. and Oben J. (2020). Comparative Study of the Protective Effect of Cola anomala and Coffea arabica Against Induced Toxicity in Rats. *Journal of Food Research*, 9, 1-13.

McDonald E.S., Clark A.S., Tchou J., Zhang P., Freedman G.M. (2016). Clinical and Translational Molecular Imaging of Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 57, 9S–16S

Meeth K., Wang J.X., Micevic G., Damsky W., Bosenberg M.W.(2016). The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations Pigment. *Cell & Melanoma Research*, 29, 590-7.

Mense S.M., Remotti F., Bhan A., Singh B., El-Tamer M., Hei T.K., Bhat H.K.(2008). Estrogen-induced breast cancer: alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*; 232: 78-85.

Mense, S. M., Hei, T. K., Ganju, R. K., & Bhat, H. K. (2008). Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. *Environmental health perspectives*, 116(4), 426-433.

MINSANTE (2020).Plan Stratégique National de Prévention et de Lutte contre le Cancer (PSNPLCa) 2020-2024

Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I. I., Badoiu, S. C., Stefani, C., & Greabu, M. (2020). PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 173.

Mishra B.P., Salehi B., Sharifi-Rad M., Pezzani R., Kobarfard F., Sharifi-Rad J.& Nigam M. (2018). Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective:An Overview. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 22, 281–295.

Miyamura, M., Yokota, J., & Saibara, T. (2016). Drug-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 136(4), 579-582.

Mocanu M-M., Nagy P. & Szöll"osi J. (2015).Chemoprevention of Breast Cancer by Dietary Polyphenols. *Molecules*, 20, 22578–22620

Morana, O., Wood, W., & Gregory, C. D. (2022). The apoptosis paradox in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1328.

Moreira, L., Araújo, I., Costa, T., Correia-Branco, A., Faria, A., Martel, F., & Keating, E. (2013). Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental Cell Research*, 319(12), 1784-1795.

Moyret-Lalle C., Pommier R., Bouard C., Nouri E., Richard G. & Puisieux A. (2016). Plasticité des cellules cancéreuses et dissémination métastatique. *Médecine/Sciences*, 32 ; 725-31

Murphy, J. M., Czabotar, P. E., Hildebrand, J. M., Lucet, I. S., Zhang, J. G., Alvarez-Diaz, S., ... & Alexander, W. S. (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39(3), 443-453.

Murray P.J.(2005). The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *PNAS*, 102 (24), 8686–8691.

Musa M., Khan M. & Cooperwood J. (2007). Medicinal chemistry and emerging strategies applied to the development of selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1249–1261.

Mvondo M.A., Messongue Mbollo M-S., Njamen D. (2020). The ethanol extract of avocado [Persea Americana Mill. (Lauraceae)] seeds reduced the hyperplastic effect of tamoxifen on uterine endometrium without changing its effect on the mammary gland. *Advances in Traditional Medicine*, 21, 305–316.

Mvondo M.A., Wego Kamgaing M.T., Wansi Ngnokam S.L (2021). Aqueous Extract of *Dacryodes edulis* (Burseraceae) Leaves Inhibited Tumor Growth in Female Wistar Rats with 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Breast Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.

Nagineni, C.N., Raju, R., Nagineni, K.K, Kommineni, V .K, Cherukuri, A,...& Kutty, R.K. (2014). Resveratrol suppresses expression of VEGF by human retinal pigment epithelial cells: potential nutraceutical for age-related macular degeneration. *Aging Diseases*, 5, 88.

Nakai M., Fukui Y., Asami S., Toyoda-Ono Y., Iwashita T., Shibata H., Mitsunaga T., Hashimoto F., & Kiso Y.(2005). Inhibitory Effects of Oolong Tea Polyphenols on Pancreatic Lipase in Vitro. *Agriculture and Food Chemistry*, 53 (11), 4593–4598

Nakamura, K., Iwahashi, K., Furukawa, A., Ameno, K., Kinoshita, H., Ijiri, I., Sekine, Y., Suzuki, K., Iwata, Y., Minabe, Y., & Mori, N. (2003). Acetaldehyde adducts in the brain of alcoholics. *Archives in Toxicology* 77, 591–593

National Comprehensive Cancer Network,(2017). Breast Cancer Screening and Diagnosis. NCCN Guidelines Version 1.

NavaneethaKrishnan . S., Rosales J.L., Lee K-Y. (2019). ROS-Mediated Cancer Cell Killing through Dietary Phytochemicals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, Article ID 9051542, 16 pages.

Nazarali, S. & Narod, S. (2014). Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 6, 29–36.

Nazarewicz, R. R., Zenebe, W. J., Parihar, A., Larson, S. K., Alidema, E., Choi, J., & Ghafourifar, P. (2007). Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer research*, 67(3), 1282-1290.

Nengtai O. et Lin W. (2016). Basic Histopathological Methods and Breast Lesion Types for Research. Dans J. Cao & J.M. Walker (dir). *Breast Cancer Methods and Protocols* (P. 3-10). Hatfield, Hertfordshire: Springer.

Neville, M. C., Webb, P., Ramanathan, P., Mannino, M. P., Pecorini, C., Monks, J., ... & MacLean, P. (2013). The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(9), E1103-E1114.

Ng, S. W., Norwitz, S. G., & Norwitz, E. R. (2019). The impact of iron overload and ferroptosis on reproductive disorders in humans: implications for preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3283.

Ngezahayo J., Havyarimana F., Hari L., Stévigny C., Duez P. (2015). Medicinal plants used by Burundian traditional healers for the treatment of microbial diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 338–351.

Nguefack, C. T., Biwole, M. E., Massom, A., Kamgaing, J. T., Njamen, T. N., Ekane, G. H., ... & Priso, E. B. (2012). Epidemiology and surgical management of breast cancer in gynecological department of Douala General Hospital. *The Pan African medical journal*, 13, 35.

Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., ... & Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47-54.

Nolan, E. Lindeman, J.G.& Visvader, J.E. (2023). Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell* 186, 1708-1729

Nunes A.T., Berman T., Harris L (2019). Molecular Biology of Breast. Dans V.T. DeVita, T.S Lawrence & S.A. Rosenberg *Cancer Principles & Practice of Oncology 11ième Edition* (P. 2243-2260). Philadelphie : Wolters Kluwer

O'Brien J.E., Peterson T.J., Tong M.H., Lee E.J., Pfaff L.E., Hewitt S.C., ... & Jameson J.L. (2006). Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26683–26692.

O'Donovan N., Byrne A.T., O'Connor A.E., McGee S., Gallagher W.M. & Crown J. (2011). Synergistic interaction between trastuzumab and EGFR/HER-2 tyrosine kinase inhibitors in HER-2 positive breast cancer cells. *Investigational New Drugs* 29(5),752–759

O'Lone R., Frith M.C., Karlsson E.K., & Hansen U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular Endocrinology*, 18(8): 1859–1875.

Ogbole O.O, Segun P.A. & Adeniji A.J. (2017). In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 494.

Ohshima, K. & Morii, E. (2021). Metabolic Reprogramming of Cancer Cells during Tumor Progression and Metastasis. *Metabolites*, 11, 28p.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3122-3128.

Owoade O.A., Adetutu A., Ogundipe O.O., Owoade A. & Kehinde E. O. (2022). Effects of Tamoxifen Administration on Lipid Profile in Female Albino Rats. *Asian Journal of Research in Biochemistry*, 10(3): 10-22.

Pagani, O., Regan, M. M., Walley, B. A., Fleming, G. F., Colleoni, M., Láng, I., ... & Francis, P. A. (2014). Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 371(2), 107-118.

Palmiter R. D. (2018). The parabrachial nucleus: CGRP neurons function as a general alarm. *Trends in Neurosciences*, 41 (5): 280–293

Pan H., Chang H. & Lee C. (2015). Association between tamoxifen treatment and the development of different stages of nonalcoholic fatty liver disease among breast cancer patients. *Journal of Formosan Medical Association*; 115, 411-417.

Panchal V., Ghodasara D., Ghodasara P., Pandey S., Khorajiya J., Joshi B. & Dave C. (2014). Subacute toxicopathological studies of tamoxifen in wistar rats. *Indian Journal of Veterinary Pathology*; 38: 158-163.

Patel A. (2020). Benign and Malignant Tumors. *JAMA Oncology*, 6(9), 1488.

Patil, U.S., Jaydeokar, A. V. & Bandawane D.D. (2012). Immunomodulators: a pharmacological review. *International Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences*, 4(1), 30-36.

Pavlova N.N. & Thompson C.B. (2016). The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab*; 23: 27-47.

Peinado H., Alečković M., Lavotshkin S., Matei I., Costa-Silva B., Moreno-Bueno G., ... & Ghajar C.M. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a prometastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18, 883-891

Prasad, S.; Gupta, S.C. & Tyagi, A.K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105.

Prat, A. & Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 5, 5–23.

Prever, L, Li, H., Hirsch, E., & Gulluni, F. (2021). Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer. *Cancers*, 13(14), 3517.

Prieto P., Pineda M. & Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex : specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*; 269, 337–341.

Prossnitz, E.R. & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(12), 715–726.

Rakotonirina, A F N. (2019). Etudes chimique et toxicologique des extraits de fruits d'*Aframomum angustifolium* (ZINGIBERACEAE). *Mémoire Université d'Antananarivo*. 1-67.

Rampogu S., Balasubramaniyam T. & Lee J.H (2022). Phytotherapeutic applications of alkaloids in treating breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, 113760

Ratovondramamy, F.J.E.(2008) Projet de création d'une unité de production de confiture de « longoza » dans le district d'Andapa, Région de S.A.V.A. Mémoire de Master en Gestion, Université d'Antananarivo, Antananarivo ;109p.

Regua A.T., Arrigo A., Doheny D., Wonga G.L. Lo H-W. (2021). Transgenic Mouse Models of Breast Cancer. *Cancer Letters*, 516, 73–83.

Reitman S. & Frankel, S. A.(1957).Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathologies*, 28, 56–63.

Renard, P. Y. (2013). Délivrance des anticancéreux oraux: besoins et attentes du pharmacien d'officine. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(523), 44-47.

Rezakhani L., Rashidi Z., Mirzapour P. & Khazaei M.(2014). Antiproliferatory effects of crab shell extract on breast cancer cell line (MCF7). *Journal of Breast Cancer*; 17, 219-225.

Roeschlau P., Bernt E. & Gruber A. (1974). Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klinische Biochemie*, 12, 226.

Ronco, A. L., De Stefani, E., Aune, D., Boffetta, P., Deneo-Pellegrini, H., Acosta, G., & Mendilaharsu, M. (2010). Nutrient patterns and risk of breast cancer in Uruguay. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11(2), 519-24.

Rong H., Leena H. & Robert C. (2015). Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncology Letters*; 2015: 1495-1501.

Roy, P. G., Pratt, N., Purdie, C. A., Baker, L., Ashfield, A., Quinlan, P., & Thompson, A. M. (2010). High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *International Journal of Cancer*, 127(2), 355-360.

Rufino, A. T., Costa, V. M., Carvalho, F., & Fernandes, E. (2021). Flavonoids as antiobesity agents: A review. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 556-585.

Rugo, H. S., Delord, J. P., Im, S. A., Ott, P. A., Piha-Paul, S. A., Bedard, P. L., ... & Tan, A. (2016). Abstract S5-07: Preliminary efficacy and safety of pembrolizumab (MK-3475) in patients with PD-L1-positive, estrogen receptor-positive (ER+)/HER2-negative advanced breast cancer enrolled in KEYNOTE-028. *Cancer research*, 76(4_Supplement), S5-07.

Rumgay H., Murphy N., Ferrari P. & Soerjomataram I. (2021). Alcohol and cancer: Epidemiology and biological mechanisms. *Nutrients*, 13 (9), 3173.

Russo J. & Russo, I. H., (2000).Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis,” *Lab Invest*, vol. 5, pp. 187–200.

Sadiq, Z., Varghese, E., & Büsselberg, D. (2020). Cisplatin's dual-effect on the circadian clock triggers proliferation and apoptosis. *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms*, 9, 100054.

Saleh H., Basma M. & Mohamed-Assem S. (2016). Sodium Butyrate Attenuates Nephrotoxicity Induced by Tamoxifen in Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6, 66-72

Santos Araújo, M. D. C., Farias, I. L., Gutierrez, J., Dalmora, S. L., Flores, N., Farias, J., ... & Chitolina Schetinger, M. R. (2012). Uncaria tomentosa—adjuvant treatment for breast cancer: clinical trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

Schiliro, C. & Firestein, B.L (2021).Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells*; 10, 1056.

Schuurman T., Witteveen P., Wall E. & Passier. (2019). Tamoxifen and Pregnancy : an absolute contraindication ?. *Breast Cancer Research and Therapy*,175 :17-25.

Seitz H.K., Pelucchi C., Bagnardi V. and Vecchia C.L.(2012). Epidemiology and Pathophysiology of Alcohol and Breast Cancer: Update 2012. *Alcohol and Alcoholism*, 47 (3), 204–212

Seyfried T.N., El-Abbadi M. & Roy M.L. (1992). Ganglioside distribution in murine neural tumour. *Molecular and Chemical Neuropathologies*, 17,147-67.

Shahbaz K. (2017). Tamoxifen: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Research*, 1, 1-8.

Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1213-1226.

Shay, J.W. & Wright, W.E. (2019). Telomeres and telomerase: Three decades of progress. *Nature Reviews Genetics* 20, 299–309.

Shuel S. L. (2022). Thérapies ciblées contre le cancer Perles cliniques à l’intention des soins primaires. *Canadian Family Physician | Le Médecin de famille canadien* , 68 ; e199

Silbergeld, E. K., Waalkes, M., & Rice, J. M. (2000). Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *American Journal of Industrial Medicine*, 38(3), 316-323.

Singh S., Vats P., Suri S., Shyram R., Ranganathan S. & Sriatharan K., (2004). Effect of an antidiabetic extract of catharantus roseus on enzymatic activities in spectozotocin induced diabetes rats. *Journal of Ethnopharmacology*,76, 269-277

Sinha K. (1972). Colorimetric Assay of Catalase. *Analytical Biochemistry*. 47: 389-394.

Sinula, E. S. & Kuttan, G. (2004). Immunomodulatory and aniyumor activity of Piper longum Linn. And piperine. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2), 339-346

Siraj, M. A., Islam, M. A., Al Fahad, M. A., Kheya, H. R., Xiao, J., & Simal-Gandara, J. (2021). Cancer chemopreventive role of dietary terpenoids by modulating Keap1-Nrf2-ARE signaling system—a comprehensive update. *Applied Sciences*, 11(22), 10806.

Smith, A., & Bruton, J. (1977). Color atlas of histological staining techniques. In *Color atlas of histological staining techniques* (pp. 192-192).

Song E. & Hu H. (2017). Translational Research in Breast Cancer: Biomarker Diagnosis, Targeted Therapies and Approaches to Precision Medicine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1026; Springer

Song M, Ping Y, Zhang K, Yang L, Li F, Zhang C, et al. (2019), Low-dose IFN- γ induces tumor cell stemness in tumor microenvironment of non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 81771781:1–29

Stegner D, Dütting S and Nieswandt B. (2014). Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thrombosis Research*, 133, S149-S157

Sun J.S., Tsuang Y.W, Chen J.J., Hang Y.S. et Lu F.J. (1998). An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. *Burns*, 24, 225-231.

Sun Z., Dong J., & Wu J.(2016).Juglanin induces apoptosis and autophagy in human breast cancer progression via ROS/JNK promotion. *Biomed Pharmacotherapy*, 4539, 10 pages

Sun, Q.; Xie, W.; Wang, Y.; Chong, F.; Song, M.; Li, T.; Xu, L.; Song, C. (2020). Alcohol Consumption by Beverage Type and Risk of Breast Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Alcohol*, 55, 246–253

Swatmari T., Lumniczky K., Desalnai S., Trajcevski S. Hidvegi E.J., Hamada H., Safrany G.(2006). Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Science*, 97:546-53.

Szablewski, L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1835(2), 164-169.

Tait, S. W., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621-632.

Tavassoli, F.A., Devilee P., (2003). World Health Organization classification of tumours Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC Press*; 19-23

TCGA (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61–70.

Teillaud, J. L., & Kroemer, G. (2014). Microenvironnements tumoraux: conflictuels et complémentaires. *Médecine/Sciences*, 30(4), 343-344.

Tenconi, E., & Rigali, S. (2018). Self-resistance mechanisms to DNA-damaging antitumor antibiotics in actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 100-108.

Terashima, H. & Ichikawa, M. (2003).A comparative ethnobotany of the Mbuti and Efe hunter-gatherers in Itury forest, Democratic Republic of Congo African Study Monographs.24(1,2):1-168

Thakur M. & Rao V.G. (2016). Tumour Invasion and Metastasis: A review. *Saudi Journal of Pathology and Microbiology*; 1, Iss-2:65-72.

Thomson, C. A., Rock, C. L., Thompson, P. A., Caan, B. J., Cussler, E., Flatt, S. W., & Pierce, J. P. (2011). Vegetable intake is associated with reduced breast cancer recurrence in tamoxifen users: a secondary analysis from the Women's Healthy Eating and Living Study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 125, 519-527.

Tian, Y. F., Chu, C. H., Wu, M. H., Chang, C. L., Yang, T., Chou, Y. C., ... & Sun, C. A. (2007). Anthropometric measures, plasma adiponectin, and breast cancer risk. *Endocrine-Related Cancer*, 14(3), 669-677.

Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology*, 24(2), 207-212.

Trapp V., Parmakhtiar B., Papazian V., Willmott L. & Frue J.P. (2010). Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis*, 13, 305–315.

Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, 6(1), 24-27.

Tsubura A., Lai Y.C., Miki H., Sasaki T., Uehara N., Yuri T., Yoshizawa K.(2011). Animal models of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials. *In Vivo*, 25, 11-22.

Tugume P, Kakudidi EK, Buyinza M, Namaalwa J, Kamatenesi M, Mucunguzi P, Kalema J. (2016). Ethnobotanical survey of medicinal plant species used by communities around Mabira Central Forest Reserve, Uganda. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12, 5.

Uadkla O., Yodkeeree S., Buayairaksa M., Meepowpan P., Nuntasen N.& Limtrakul P. (2012). Antiproliferative effect of alkaloids via cell cycle arrest from *Pseuduvaria rugosa*. *Pharmaceutical Biology*, 51(3),400-404.

Valli, V., Heilmann, K., Danesi, F., Bordoni, A., & Gerhäuser, C. (2018). Modulation of adipocyte differentiation and proadipogenic gene expression by sulforaphane, genistein, and docosahexaenoic acid as a first step to counteract obesity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018(1), 1617202.

Van M., J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture: *Methods and Protocols*, 237-245.

Vannini, F., Kashfi, K., & Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox biology*, 6, 334-343.

Ventura, E., Giordano, A. (2019). Cell cycle. *Reference Module in Life Sciences*: 11 pages

Verret, B., & Loirat, D. (2016). Immunothérapie et cancer du sein. *Oncologie*, 18(9-10), 551-558.

Vidinamo, F., Fawzia, S., & Karim, M. A. (2021). Effect of drying methods and storage with agro-ecological conditions on phytochemicals and antioxidant activity of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 353-361.

- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A. & Kinzler K.W. (2013).** Cancer genome landscapes. *Science*, 339, 1546-1558.
- Von Karstedt, S., Montinaro, A., & Walczak, H. (2017).** Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(6), 352-366.
- Von Minckwitz, G., Eidtmann, H., Rezai, M., Fasching, P. A., Tesch, H., Eggemann, H., ... & Untch, M. (2012).** Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(4), 299-309.
- Wang, W., Green, M., Choi, J. E., Gijón, M., Kennedy, P. D., Johnson, J. K., ... & Zou, W. (2019).** CD8+ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature*, 569(7755), 270-274..
- Waterhouse, A. L. (2002).** Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 6(1), I1-1.
- Wei, T., Zhang, J., Qin, Y., Wu, Y., Zhu, L., Lu, L., ... & Shen, Q. (2015).** Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients. *American Journal of Cancer Research*, 5(7), 2190.
- Williams, C. & Lin, C.-Y. (2013).** Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *Ecancermedicalscience* 7, 370
- Witsch E, Sela M & Yarden Y (2010).** Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*, 25(2), 85–101.
- Wong M., Guo C. & Zhang J. (2014).** Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: mechanism, function and regulation. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 2, 169-187.
- Xintaropoulou, C., Ward, C., Wise, A., Marston, H., Turnbull, A. & Langdon, S.P (2015).** A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarge*, 6, 25677–25695
- Xu, C., Huang, M. T., Shen, G., Yuan, X., Lin, W., Khor, T. O., ... & Kong, A. N. T. (2006).** Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Research*, 66(16), 8293-8296.
- Yagi K., Furuhashi M., Aoki H., Goto D., Kuwano H., Sugamura K., ... & Kato M., (2002).** c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 854–861.
- Yagi, K. (1976).** Simple Fluorometric Assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemistry Medicine*, 15, 212-216.
- Yamamoto, N., Oyaizu, T., Enomoto, M., Horie, M., Yuasa, M., Okawa, A., & Yagishita, K. (2020).** VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration. *Scientific reports*, 10(1), 2744.
- Yang N. & Sheridan A.M. (2014).** Cell cycle. *Encyclopedia of Toxicology*, 1, 753-758.

Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., ... & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 156(1), 317-331.

Yao, H., Lu, F., & Shao, Y. (2020). The E2F family as potential biomarkers and therapeutic targets in colon cancer. *PeerJ*, 8, e8562.

Ye, Z., Liang, Z., Mi, Q. & Guo, Y., (2020). Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *JBUON*, 25(1), 281-285

Yoo, J. J., Lim, Y. S., Kim, M. S., Lee, B., Kim, B. Y., Kim, Z., ... & Kim, Y. S. (2020). Risk of fatty liver after long-term use of tamoxifen in patients with breast cancer. *PloS One*, 15(7), e0236506.

Zhang J., Sheng S., Wang W., Dai J., Zhong Y., Ren J, ... & Liu L. (2022) Molecular Mechanisms of Iron Mediated Programmed Cell Death and Its Roles in Eye Diseases. *Frontier in Nutrition*. 9, 844757.

Zhang Y., Alexander P.B., & Wang X-F. (2017). Cold Spring Harbor. *Perspectives in Biology*, 9: 22 pages.

Zhang, M., Li, W., Yu, L., & Wu, S. (2014). The suppressive effect of resveratrol on HIF-1 α and VEGF expression after warm ischemia and reperfusion in rat liver. *PLoS One*, 9(10), e109589

Zhao, Z., Zhao, G., Chai, Y., Li, W., Song, K., Zhao, W., ... & Du, Y. L. (2023). Targeted genome mining for microbial antitumor agents acting through DNA intercalation. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(3), 520-526.

Zingue, S., Njuh, A. N., Tueche, A. B., Tamsa, J., Tchoupang, E. N., Kakene, S. D., ... & Njamen, D. (2018). In vitro cytotoxicity and in vivo antimammary tumor effects of the hydroethanolic extract of *Acacia seyal* (Mimosaceae) stem bark. *BioMed Research International*, 2018(1), 2024602.

Zuazo-Gaztelu, I., & Casanovas, O. (2018). Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Frontiers in Oncology*, 8, 248.

Zuhair, Z. (2011). The role of vitamin C in alteration of enzymes responsible of energy metabolism induced by administration of tamoxifen to mouse. *Advances in Biological Chemistry*, 1(02), 15.

ANNEXE

ANNEXE

Annexe 1 : Caractéristiques des lignées cellulaires

a) Lignée cellulaire CT-2A

CT-2A est une lignée cellulaire générée à partir d'un astrocytome malin, après implantation du 20-méthylcholanthrène dans le cerveau de souris C57BL/6J par **Seyfried *et al.* (1992)**. Cette lignée est peu différenciée, angiogénique, très proliférative, invasive, infiltrante et tumorigène. Les cellules CT-2A sont marquées par une faible distribution des gangliosides anti angiogéniques et une déficience des suppresseurs de tumeur PTEN/TSC2 (**Marsh *et al.*, 2008**).

b) Lignée cellulaire GL261

Il s'agit des cellules de gliome issues des souris 261, suite à une injection intracrânienne du 3-méthylcholanthrène. Elles sont généralement utilisées dans les thérapies expérimentales de glioblastome. Elles sont partiellement immunogénique, et possèdent des mutations activatrices de K-ras et inhibitrices de P53. Elle présente également une déficience en PTEN et une forte expression de C-myc (**Swatmari *et al.*, 2006**)

c) Lignée cellulaire B16-F1

Il s'agit d'un sous-clone de la ligné B16, qui est la première lignée cellulaire utilisée en recherche pour étudier les mélanomes. Elles ont été établies d'une tumeur spontanée formée derrière l'oreille des souris C57BL/6J. Ce sont les cellules épithéliales productrices de mélanine. Leurs caractéristiques génétiques sont peu connues ; cependant, elles sous-expriment les glycoprotéines du CMH1. Le sous clone B16F1 est faiblement métastatique contrairement au sous clone B16F10, et est utilisé pour étudier les tumeurs primaires (**Becker *et al.*, 2010**).

d) Lignée cellulaire YUMM 1.7

Il s'agit de l'acronyme de *Yale University Mouse Melanoma*. Les cellules de lignée YUMM proviennent des mélanomes de souris génétiquement modifiées C57BL/6J. Le sous clone YUMM 1.7 porte des mutations inhibitrice de PTEN , CDK2na et activatrice de Braf. Elles ont un niveau minimal d'immunogénicité (**Meeth *et al.*, 2016**)

e) Lignée cellulaire MCF-7

MCF-7 signifie *Michigan Cancer Foundation*, en référence à l'institut de Détroit où la lignée fut établie au 7^{ème} essai. Elle a été obtenue par culture *in vitro* à partir d'un épanchement pleural prélevé chez une patiente de 69 ans atteinte d'un cancer du sein métastatique. Cette lignée est positive aux récepteurs estrogéniques, et récepteurs de progestérone. Elle ne présente pas d'amplification du gène ERBB2 (Her2 /neu), pas de mutation du gène TP53 et est tumorigène chez les souris à la base (**Lee et al., 2015**). Cependant, un modèle de cellules MCF-7 sur-exprimant HER2 a été généré par **Benz et al. (1992)**.

Annexe 2 : Réactifs et consommables

a) Réactifs de dosage des composés bioactifs

i) Dosage des polyphenols totaux

- Carbonate de sodium (7,5%)
- Acide gallique
- Réactif de Folin-ciocalteu (0,2N)
- Ethanol (95%)

ii) Dosage des flavonoïdes

- Acétate de potassium (1M)
- AlCl₃ (10% p/v)
- Quercétine
- Ethanol (95%)

iii) Dosage des tanins

- Acide gallique
- Ethanol
- HCl (1 N)
- Vanilline (4%)

iv) Dosage des alcaloïdes

- Chlorure de fer III (0,025 M)
- Chlorure d'hydrogène (0,5 M)
- 1,10 Phénanthroline (0,05 M)
- Ethanol (95 %)

v) Dosage des terpenoïdes

- Méthanol (95%) ;
- Chloroforme ;
- Acide sulfurique concentré.

vi) LC-MS

- Méthanol
- Acide formique

b) Réactifs pour les tests antioxydants

i) Test de Piégeage du radical DPPH

- DPPH : 0,025 g/L
- Ethanol : 95 %

ii) Test de piégeage du radical ABTS

- ABTS (7,4 mM) ;
- Permanganate de potassium (4,9 mM) ;
- Tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,1 mM) ;

Préparation de la solution d'ABTS+

- **Solution 1** : Elle a été obtenue en dissolvant 19 mg d'ABTS dans 5 mL d'eau distillée ;
- **Solution 2** : Elle a été obtenue en dissolvant 3,871 mg de permanganate de potassium dans 5mL d'eau distillée ;
- **Solution de travail** : Elle a été obtenue en mélangeant les 2 solutions. Puis le mélange obtenu a été laissé à l'obscurité, 12 à 16 h avant utilisation. Cette solution a été diluée avec le tampon phosphate afin d'avoir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm

iii) Test de piégeage du NO

- **Nitroprussiate de sodium** (10 mM) : 250 ml cette solution ont été préparés en dissolvant 745 mg de nitroprussiate de sodium dans 240 ml de tampon phosphate (pH 7,4 ; 50 mM), puis le volume été complété à 250 mL avec la même solution tampon ;
- **Acide sufonique (0,33%)** : 250 ml de cette solution ont été obtenus en dissolvant 42,90 mg d'acide sulfanilique dans 240 ml d'acide acétique 20%et le volume complété à 250 mL avec la solution d'acide acétique 20%
- **Naphtyléthylène diamine (NED)** ou réactif de Greiss (0,1 mg/ml) préparé dans de l'eau distillée.

iv) test de reduction du Fer

- Ferrocyanure De potassium [$K_3Fe(CN)_6$ (1%),]

- Tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6),
 - Acide trichloracétique (10%),
 - Chlorure ferrique (0,1%).

v) Capacité antioxydante totale

- Acide ascorbique
- H₂SO₄ (0,6M)
- Molybdate d'ammonium (4mM)
- Phosphate de sodium (28mM)

c) Réactifs pour tests sur culture cellulaire

i) Préparation des milieux de culture

- Les cellules CT-2A étaient cultivées dans le milieu *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) sans L-glutamine. Supplémenté à 10% de sérum fœtal de bovin (SFB), 1% de pénicilline/streptomycine (P/S) et du Glutamax 1X.
- Les cellules GL-261 étaient cultivées dans le milieu DMEM, supplémenté avec 10% de SFB, 20mM HEPES (Acide 4(2-hydroxyléthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), 1mM de pyruvate de sodium (1%) , 1% P/S et 1% d'acides aminés non essentiels (AANE).
- Les cellules YUMM 1.7 et B16F1 étaient maintenues dans le milieu DMEM/F12 contenant 10% de SFB et supplémenté 1% de P/S et 1% d'AANE.
- Les cellules MCF-7 étaient cultivées dans le milieu *Eagle Minimal Essential Medium* (EMEM), supplémenté avec 2mM de Glutamine, 1% d'AANE et 10% SFB.

ii) Réactifs pour le test de cytotoxicité

- Milieux de culture adaptés aux différentes cellules,
- Réactif MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
- DMSO (Diméthylsulfoxyde)

ii) test de peroxydation lipidique

- RSL 3 (Selleckchem, USA)
- Ferrostatine,
- Cell Titer- Glo (Promega Corporation)

iii) Extraction de l'ARN (RNeasy mini kit)

- Tampon de lyse RLT (QIAGEN) : il a été préparé en ajoutant à chaque millilitre de RLT, 10μL de β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich)
- Ethanol 70%,

- Super mélange DNase 1 : préparé en mélangeant 10µL de DNase et 70µL de tanpon RDD
- Eau dépourvu d'ARN (RNase-free water),
- Tampon RW1 contenat du thyocyanure de guanidine
- Tampon RPE : préparé en ajoutant de l'éthanol (96 -100%) jusqu'au trait de jauge indiqué sur le flacon.

iv) Transcription inverse (iScript cDNA synthesis, BioRad)

- Mélange réactionnel 5X iScript contenant les amorces
- Transcriptase inverse iScript
- Eau dépourvue de nucléase

v) rt-PCR

- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) contenant l'ADN polymérase KAPA SYBR FAST, le tampon de réaction, SYBR Green I fluorescent, le MgCl₂ (2,5 mM), les dNTP et les stabilisateurs.
- Amorces sens (10 µM) et anti sens (10 µM) de séquences suivante

gènes	sens (5'- 3')	Anti sens (5'- 3')
<i>β-actin</i>	ACGACGTGGCAGCTCTCGTTGTGG	GGTGCTTCGGTCAGCAGCACGGA
<i>GAPDH</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	GAAGGTGGAAGAGTGGGTG
<i>HRPT</i>	TGGATACAGGCCAGACTTTGTT	CAGATTCAACTTGCCTCATC
<i>18s</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTACTAGCG
<i>VEGF</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	TTTACACGTCTGCGGATCTT
<i>IGF-1</i>	GTGTGGACCGAGGGGCTTTTACT	GCTTCAGTGGGGCACAGTACATC
<i>PDGF-R</i>	TAGCGCGGAACCTCAGAGAGA	TGGGAGGTCCCCATAGCTCC
<i>BCL-2</i>	ATGCCTTTGTGGAATATATGGC	GGTATGCACCCAGAGTGATGC
<i>BCL-6</i>	CCTGAGGGAAGGCAATATCA	GTTTAAGTGCAGGGGCCATT
<i>E2F1</i>	GAGGCTGGATCTGGAGACTG	GAAGCGTTTGGTGGTCAGAT
<i>E2F2</i>	AGTTGCTCCCTGAGCTTCAA	GCTCCTTGAAGTTGCCTACG
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IL-10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>IL-6</i>	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC
<i>IL-1β</i>	CTTGGGCCTCAAAGGAAAGAA	AAGACAAACCGTTTTTCCATCTTC
<i>TGF-β</i>	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA

vi) Extraction des protéines pour western Blot

- Tampon de lyse : RIPA, sodium déoxycholate 10%, Tris (pH 7,5 1 M), NaCl (5 M), EDTA (200mM), cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (*Calbiochem*)
- Azote liquide
- Trypsine-EDTA

- Kit BCA

vii) Electrophorèse

- Tampon Laemmli 5X : 90 μ L [Tris/HCl (125 mM, pH 6,8), SDS (10%), saccharose (50%), bleu de bromophénol (0,05%), DTT (0,5 M)] + 10 μ L β -mercaptoéthanol
- Tampon d'anode (10X, pH 8,9) : Tris base 1M (60,57g) + HCl 1M (9,38ml du 12M) + 500 mL l'eau ultra pure (Milli-Q)
- Tampon de cathode (10X, pH 8,25) : Tris base 1M (12,1 g) + SDS 1% (5ml de 20%) + 17,9 g de Tricine (1M), compléter à 100 mL avec de l'eau ultra pure
- Marqueurs de poids moléculaire (LI-COR)

viii) Transfert des protéines

- Tampon de transfert 1X, pH 8,6 : 36.34g de Tris base (300 mM) + 5,7 mL d'acide acétique glacial (100 mM) + 1L d'eau ultra pure
- Solution de lavage TBST
- Tampon de blocage TBS (Li-COR Odyssey)
- Membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF)

ix)

Révélation

immuno-

radiologique

- Anticorps primaire : d'origine murine pour la β -actine, et provenant du lapin pour la caspase-3 le pMLKL et MLKL. L'anticorps primaire était préparé dans 5 ml de tampon de blocage LI-COR Odyssey (TBS)
- Les anticorps secondaires (LI-COR) provenant du singe, spécifique à l'anticorps de souris anti β -actine couplé à l'IR 800 et spécifique à l'anticorps de lapin anti caspase-3 clivée, ou pMLKL ou MLKL couplé à l'IR 680. Ils ont été dilués à 1:15.000 dans le tampon de blocage TBS.

d) Induction du cancer du sein

- 7,12-diméthylbenz-a-anthracène (DMBA)
- Diazépam injectable 5mg /mL
- Kétamine 50 mg/mL

Préparation de la solution de DMBA

Propriétés anticancéreuses de graines d'*Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

Le DMBA a été préparé 12 heures avant administration pour s'assurer de sa dissolution complète. La poudre a été dissoute dans de l'huile de maïs à la concentration de 50mg/mL.

f) Dosage des promoteurs cancéreux

i) Dosage EGF (Kit BioRad)

- Microsphères cotées (Multiplex 10×), anticorps de détection (Multiplex 10×),
- Standards,
- Diluant de l'anticorps de détection (HB),
- Diluant pour échantillons(HB), diluant pour standard (HB),
- Tampon de test et tampon de lavage ;
- Streptavidine-PE (100×).

iii) Dosage de l'œstradiol (Kit Monobind)

- Réactif enzymatique de l'œstradiol ;
- Œstradiol biotine ;
- Plaque de 96 puits induits de streptavidine,
- Solution de lavage concentrée,
- Réactif de substrat,
- Solution d'arrêt,
- Tampon de lavage,

iv) Dosage du glucose mammaire (Kit Chronolab)

- Etalon glucose 100mg/dl : Tampon pipes (50 mmol/L) pH 7,2 et Phénol (2,0 mmol/l)
- Réactif enzymatique (4-amino antipyrine 0,7mmol/L ; Glucose oxydase 4000U/l ; Peroxydase 4000U/L)

g) Analyse histologique

- Ethanol ;
- Xylène ;
- Paraffine ;
- Gélatine ;
- Hématoxyline ;

- Eosine.

h) Dosage du NO plasmatique

- NED (0,1 % dans l'eau distillée) ;
- Sulfanilamide (1 % dans 5 % d'acide phosphorique) ;

i)

Dosage des paramètres du profil

lipidique



Dosage des Triglycérides

- **R1 (Tampon) :**

Tampon GOOD pH 7,5	50 mmol/L
P -chlorophénol	2 mmol/L
- **R2 (enzymes) :**

Lipoprotéine lipase (LPL)	150 000U/L
Glycérol kinase (GK)	500U/L
Glycérol-3-phosphate oxydase (GPO)	2500U/L
Peroxydase (POD)	440U/L
4-Aminophénazone	0,1 mmol/L
- ATP
- **R3 (Solution étalon) :** Triglycérides standard 200 mg/dL



Dosage du Cholestérol total (Kit

Chronolab)

- R1 (Tampon) :**

Tampon PIPES pH 6,9	90 mmol/L
Phénol	26 mmol/L
- R2 (Réactif enzyme) :**

Cholestérol estérase	300U/L
Cholestéroloxydase	300U/L
Peroxydase	1250U/L
4-Aminoantipyrine	0.4 mmol/L
- R3 (Solution étalon) :** Cholestérol standard 200 mg/dL

J) Dosage des transaminases

- **Substrat ALAT :** L-alanine 1,78 g et α -cétoglutarate 30 mg. Ces deux réactifs ont été dissouts dans 20 mL de tampon phosphate pH 7,4, le pH de la solution a été ajustée à 7,5 avec du NaOH (0,4N). Le volume a été complété à 100 mL avec du tampon phosphate. Le substrat obtenu avait une concentration en α -cétoglutarate de 2 mM et en α -L alanine de 200 mM.
- **Substrat ASAT :** acide L-aspartique (2,66g) et α -cétoglutarate (30mg). Ces deux réactifs ont été dissouts dans 20ml de tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,4M) et le pH a été

ajusté à 7,5 avec du NaOH (0,4N). Ensuite le volume a été complété à 100ml avec le tampon phosphate. Un substrat avec des concentrations en α -cétoglutarate de 2 mM et en acide aspartique de 200 mM a été obtenu.

- **Tampon phosphate (0, 1M) pH 7,4** : Une masse de 13,40 g de phosphate disodique a été dissoute dans 500 mL d'eau distillée, parallèlement, une masse de 1,36 g de phosphate monopotassique a été dissoute dans 100 mL d'eau distillée. La solution de phosphate disodique a été titré par la solution de phosphate monopotassique jusqu'au pH 7,5, et le volume a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

- **Réactif de coloration** : Il a été préparé en dissolvant 0,0198 g de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans 100 mL de HCl (1N).
- **Solution d'arrêt** : 16g NaOH (0,4 N) ont été dissouts dans 1000 mL d'eau distillée.
- **-Etalon pyruvate (2 mM)** : 22 mg de pyruvate de sodium ont été dissouts dans 100 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,5)

k) Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (LABKIT)

R1 (Tampon) : Diéthanamine (DEA) Ph 10,4 (1 mmol/L) ; Chlorure de magnésium (0,5 mmol/L) ;

R2 (Substrat) : p-nitrophénylphosphate (pNPP) (10 mmol/L)

l) Dosage de l'acide urique (Kit Chronolab)

- **R1 (tampon)** : Phosphate pH 7,4 (50 mmol/L) ; 2-4 Dichlorophénol sulphonate (4 mmol/L) ; DCPS ; 4 - Aminophénazone (4-AF), (1 mmol/L)
- **R2 (enzymes)** ; Uricase (60 U/L) ; Peroxydase (660 U/L) ; Ascorbate oxydase (200 U/L)

m) Dosage de la créatinine

- Réactif 1 : acide picrique (8,8mM) ;
- Réactif 2 : NaOH (0,4M)

La solution de travail (picrate alcalin) est préparée en mélangeant à volumes égaux, l'acide picrique et la soude.

n) Mesure de l'activité de la catalase

- Peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (0.2M) ;

Propriétés anticancéreuses de graines d'*Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

- Tampon phosphate (0.01M ; PH 7.0) ;
- Dichromate - acide acétique (10Mm) : mélanger 100ml de Dichromate de potassium (5%) avec 300mL d'acide acétique concentré.

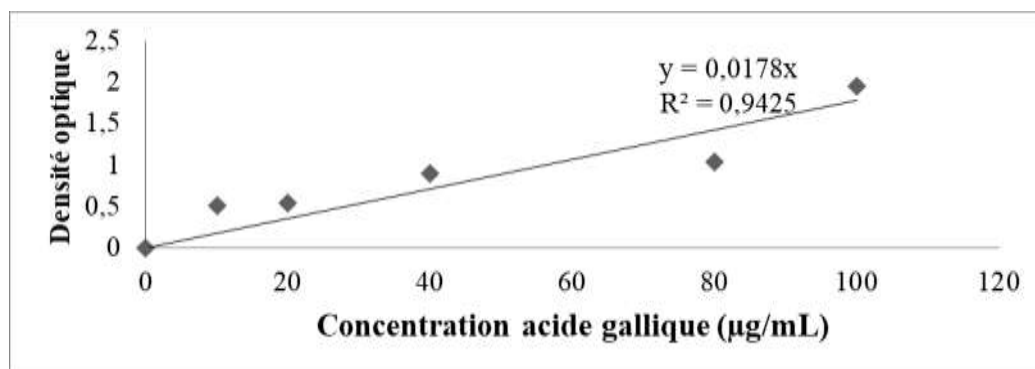
o) Dosage du MDA

- Acide trichloroacétique (TCA) 20% p/v ;
- Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% p/v ;
- HCl 1 N ;
- Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% p/v.

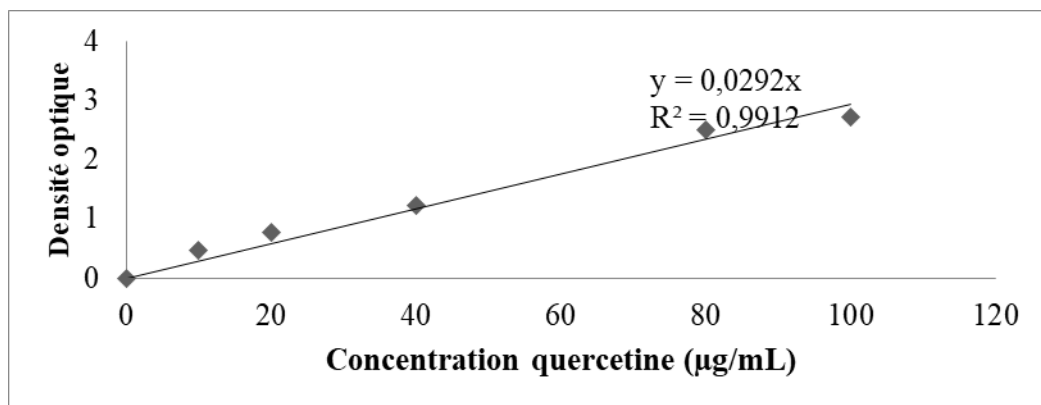
Préparation de la solution de TBA

Trois cents soixante-quinze milligrammes (375 mg) de TBA, 20 g de TCA, 0,01 g de BHT, 25 mL de HCl (1N) et 50 mL d'eau distillée sont introduits dans un bécher. La solution obtenue est chauffée à 40°C dans un bain-marie jusqu'à solubilisation complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 mL. Le volume est complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques

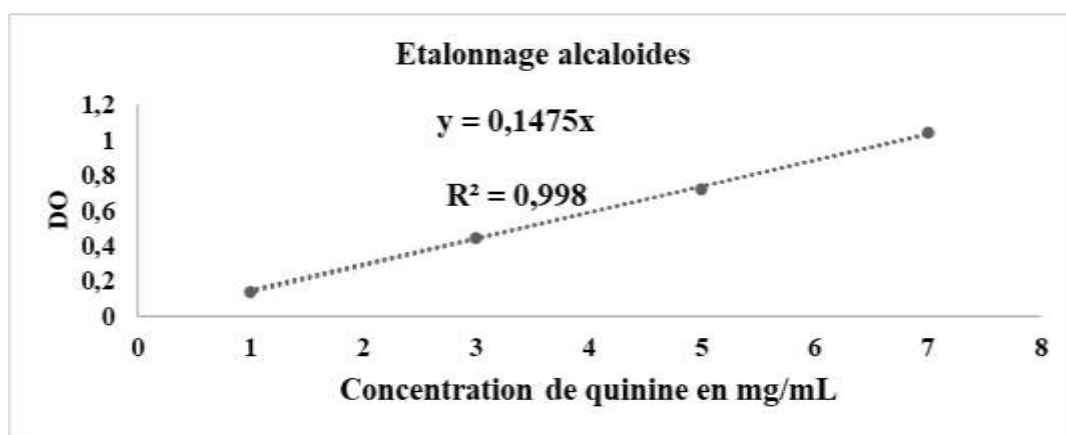


Annexe 4 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

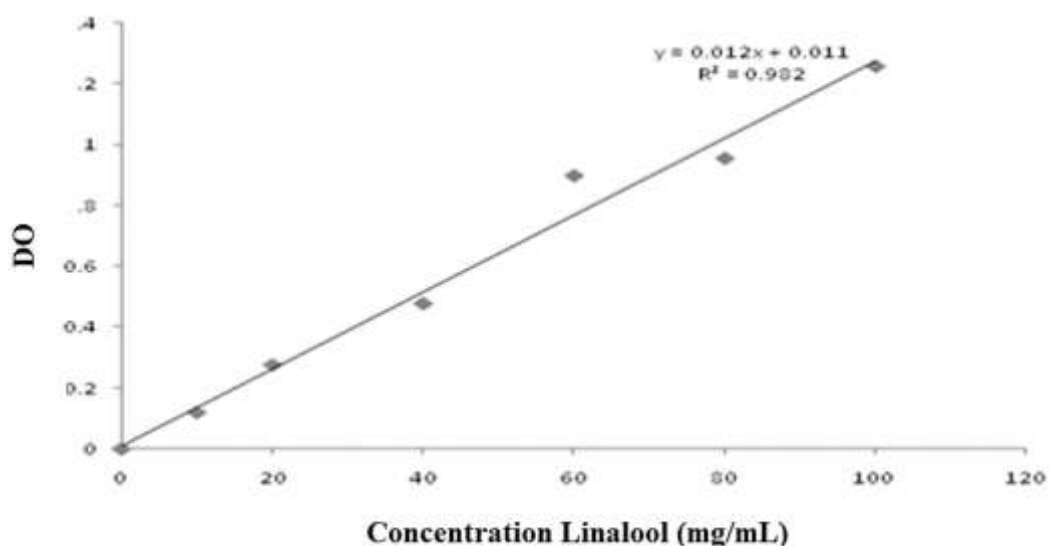


Annexe 5 : courbe d'étalonnage des tanins

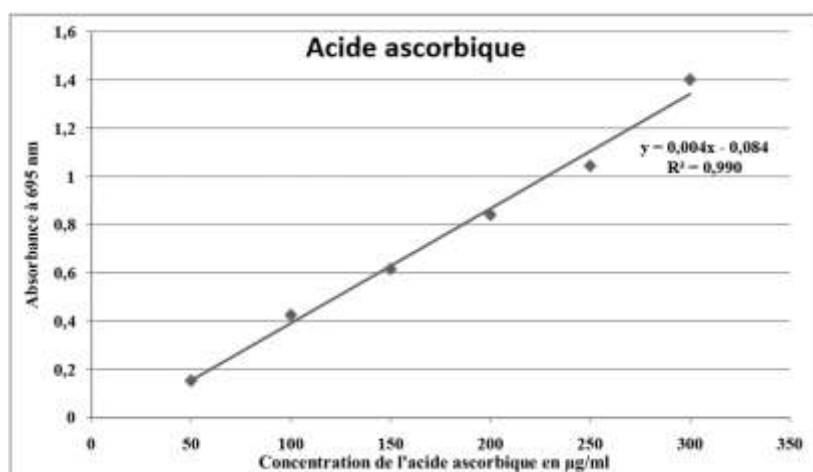
Annexe 6 : Courbe d'étalonnage des alcaloïdes



Annexe 7 : Courbe d'étalonnage des terpénoïdes



Annexe 8 : courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante totale



Annexe 9 : clairance éthique

Centre de Recherche et Formation Doctorale, Science de la Vie, Santé et Environnement (CRFD-SVSE)
Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences
University of Yaoundé I (UYI)



Joint Institutional Review Board for Animal & Human Bioethics (JIRB)
Email: jirbsecretariat@gmail.com

26 May 2023

MAKAMWE Inelle
University of Yaoundé 1, Faculty of Science
Department of Biochemistry

Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2023-084 (please use this reference number for all correspondences)

Protocol Title : « Evaluation des propriétés anticancéreuses des graines d'*Aframomum angustifolium* dans la prise en charge du cancer du sein »

Investigator(s) Name(s): Makamwe Inelle, Ph.D. Student; Prof. Kengne Nouemsi Anne Pascale & Professor Oben Julius Enyong, Supervisors.

The proposed research protocol and related documents have been reviewed and deliberated by the JIRB of the Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences (CRFD-SVSE) at the Biotechnology Centre, University of Yaoundé 1, on the 17th of February 2023.

The JIRB is satisfied with the current version of the research protocol and supporting documents, and agreed that there is no objection on ethical grounds to the proposed study. The JIRB is therefore pleased to grant approval on the consideration that the research team will strictly abide by the conditions of the approval below:

- Investigators must strictly follow the plan of the approved protocol. Any changes to the approved protocol will require prior JIRB approval.
- Must be promptly reported to the JIRB: (1) Any deviations from or changes to the protocol that are made to eliminate immediate hazards to the fauna or study participant; (2) All risks that may be rare or remote and especially those that may entail serious consequences or compromise potential benefits or that would affect the conduct of the research.
- Must prepare and submit a standard progress report of the research to the JIRB at completion or one year from the date of issuance of the approval letter and thereafter, on an annual basis.
- Must notify the JIRB when the research is completed. Failure to submit an annual progress report on the study may affect the conditions of approval.

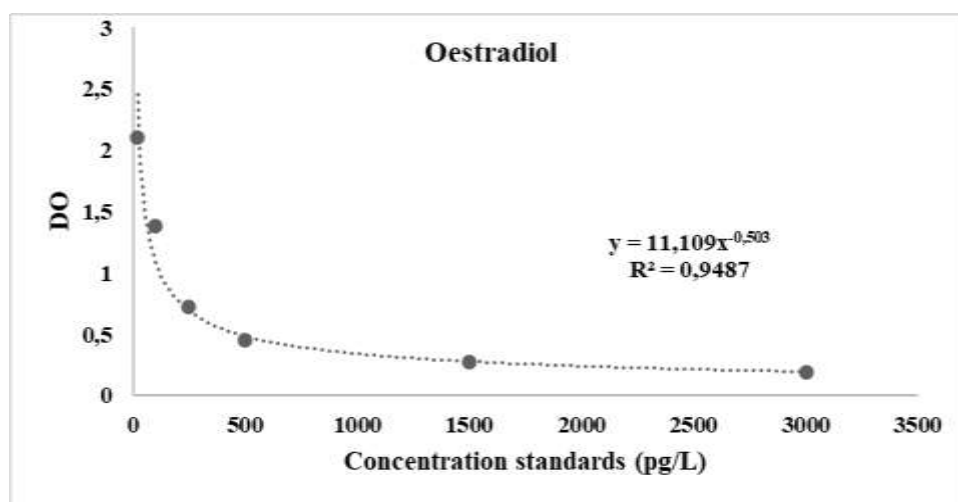
The current ethical clearance is for one-year renewable, on the condition that a progress report is submitted to the JIRB.

Sincerely,

Professor Frederic Nico Niayou
Coordinator for Animal Research Bioethics,
Faculty of Science, UYI



Annexe 10 : courbe d'étalonnage de l'oestradiol

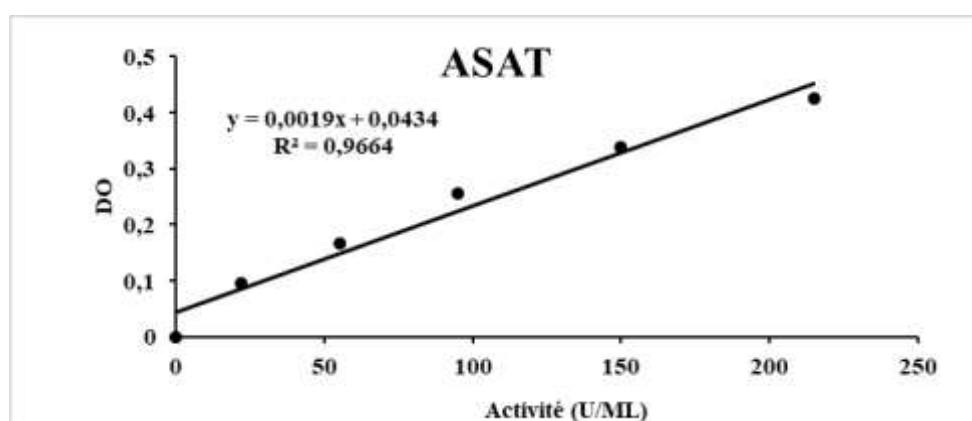
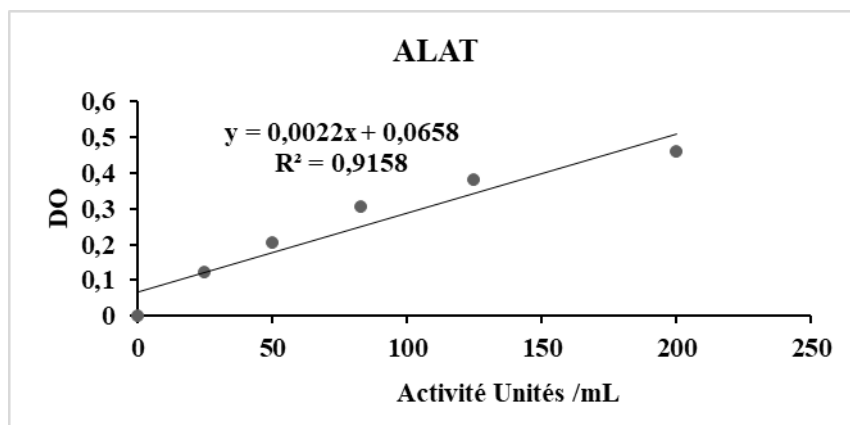


Annexe 11 : Etalonnage des transaminases

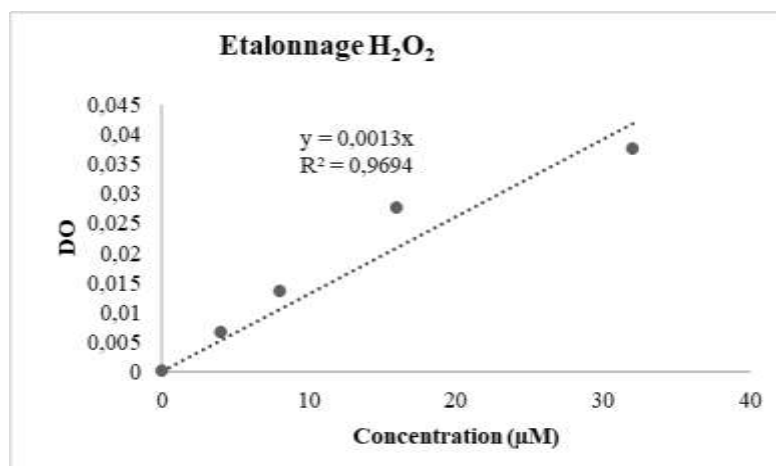
Tubes	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Substrat ALAT/ASAT (mL)	0,1	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05
Pyruvate de sodium /Oxaloacétate 2mM (mL)	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
DNPH (0,0198%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incubation 20 minutes à température ambiante						
NaOH 0,4N (mL)	1	1	1	1	1	1
Laisser à température ambiante pendant 5 minutes et lire la DO à 505 nm contre le blanc						
Activité correspondante						
ALAT (unités /mL)	00	25	50	83	126	200
ASAT(unités /mL)	00	22	55	95	150	215

Substrat ASAT : α -cétooglutarate + aspartate (2 mM/200 Mm) ;

Substrat ALAT α -cétooglutarate + alanine (2 mM/200 Mm)



Annexe 12 : courbe
d'étalonnage catalase



Annexe 13: protocole de dosage des protéines totales

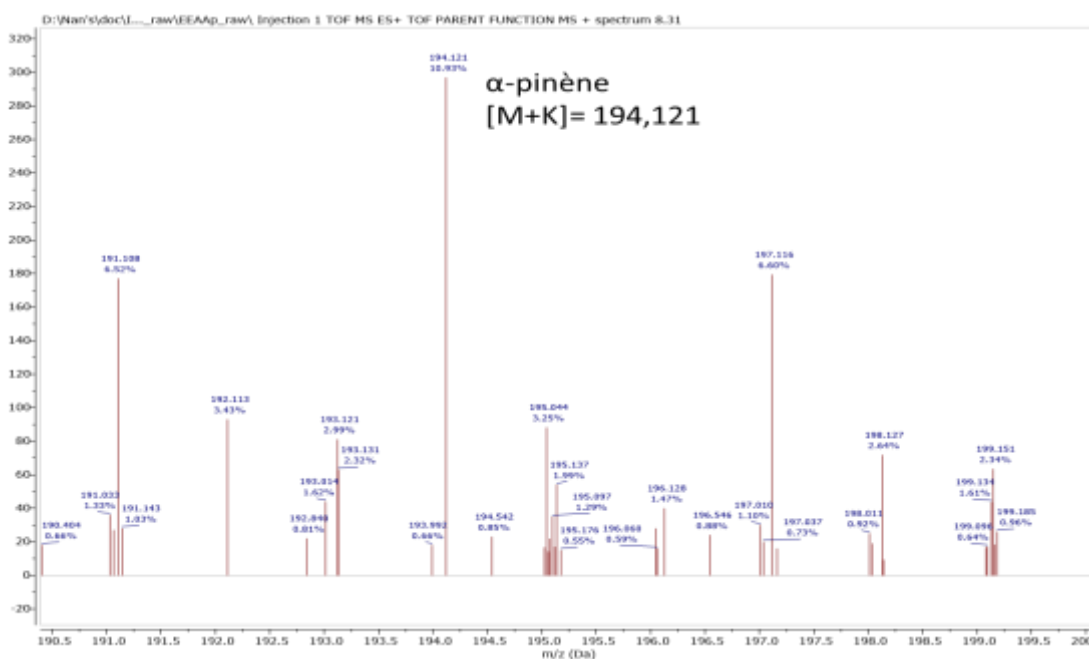
Les tubes expérimentaux ont été constitués de 100 µL d'homogénat ou de plasma ou de BSA (1mg/mL) et de 3 mL de réactif de Biuret. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité puis à température ambiante, les densités optiques ont été lues à 540 nm

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

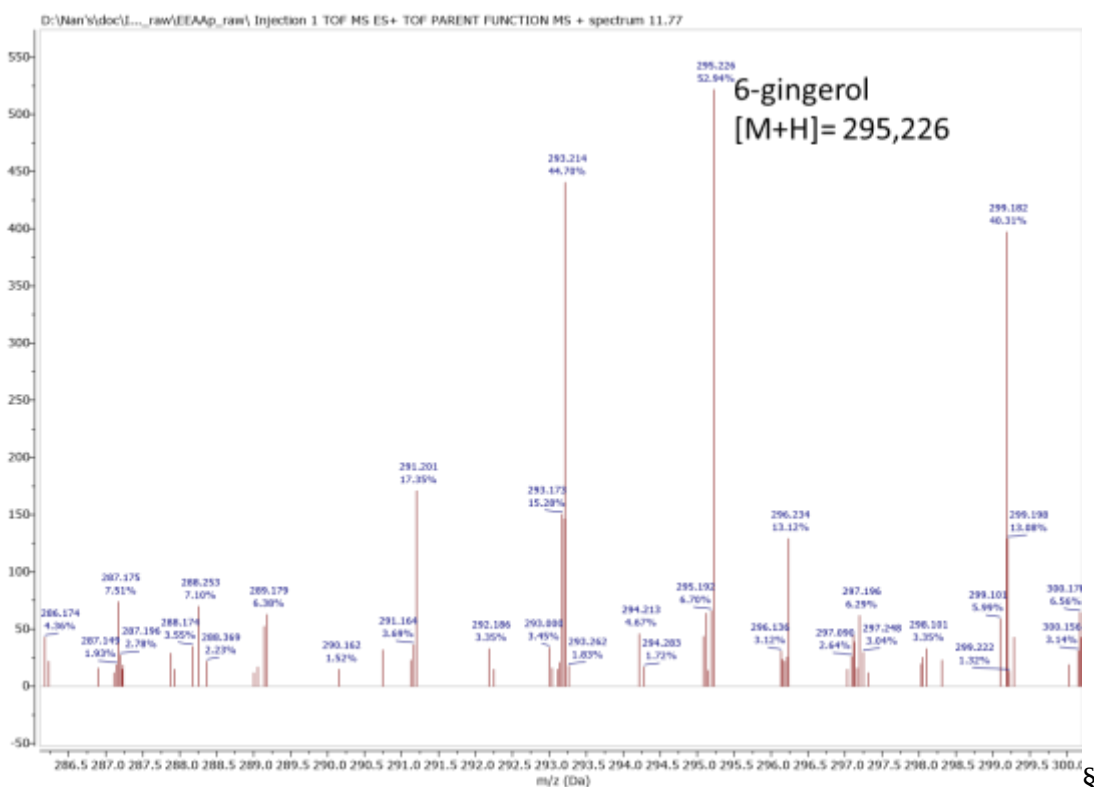
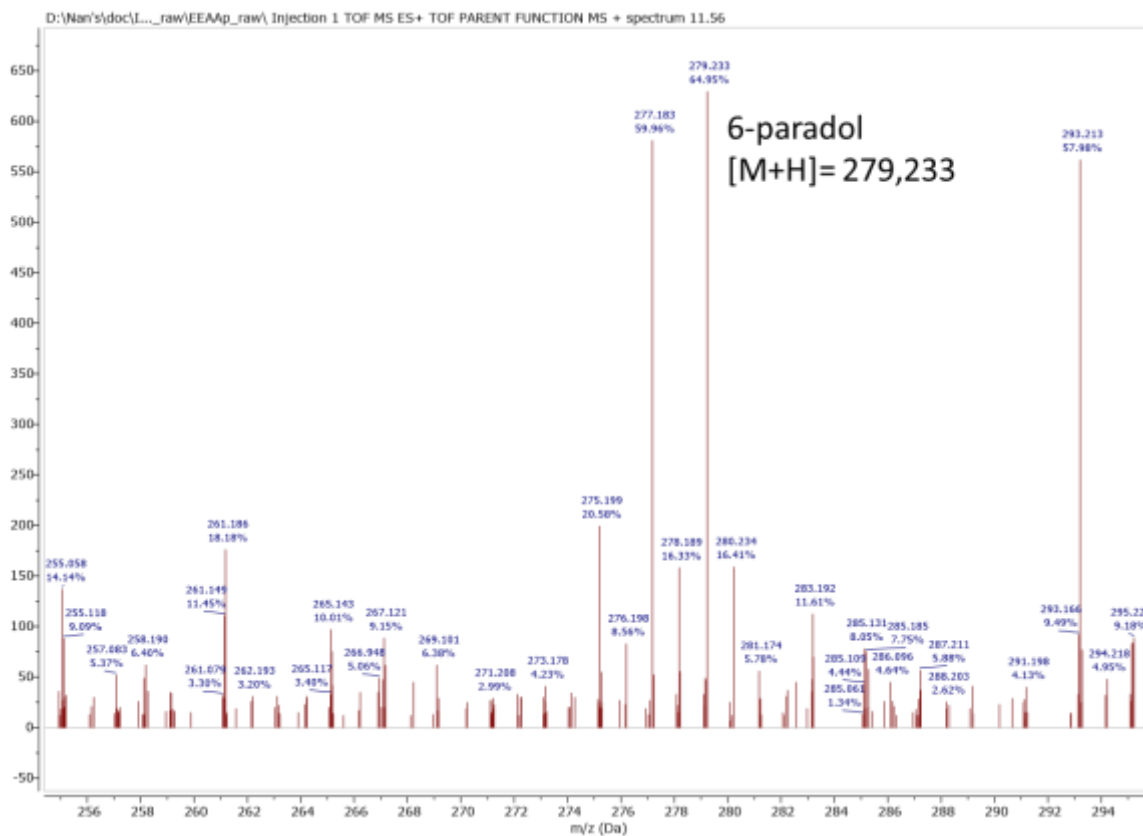
contre le blanc qui contenait 3 mL de la solution de réactif et 100 µL de NaCl 0,9 % incubé dans les mêmes conditions.

Les concentrations en protéines totales ont été déterminées à partir de l'équation suivante : Protéines (mg/mL) = (DO (essai) / DO (étalon)) x Concentration de l'étalon

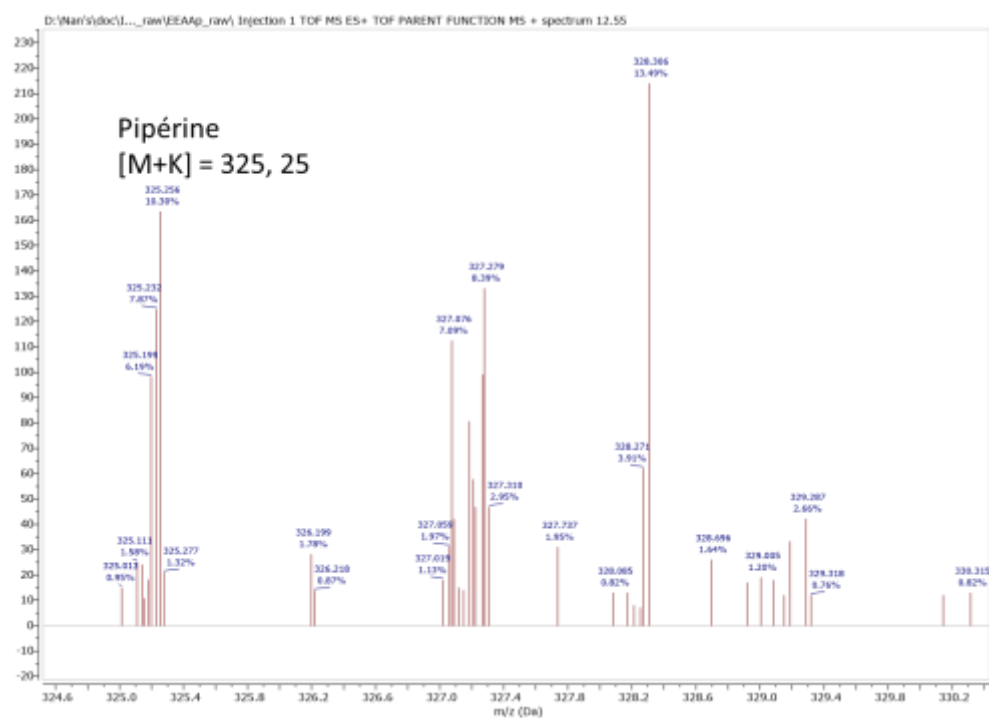
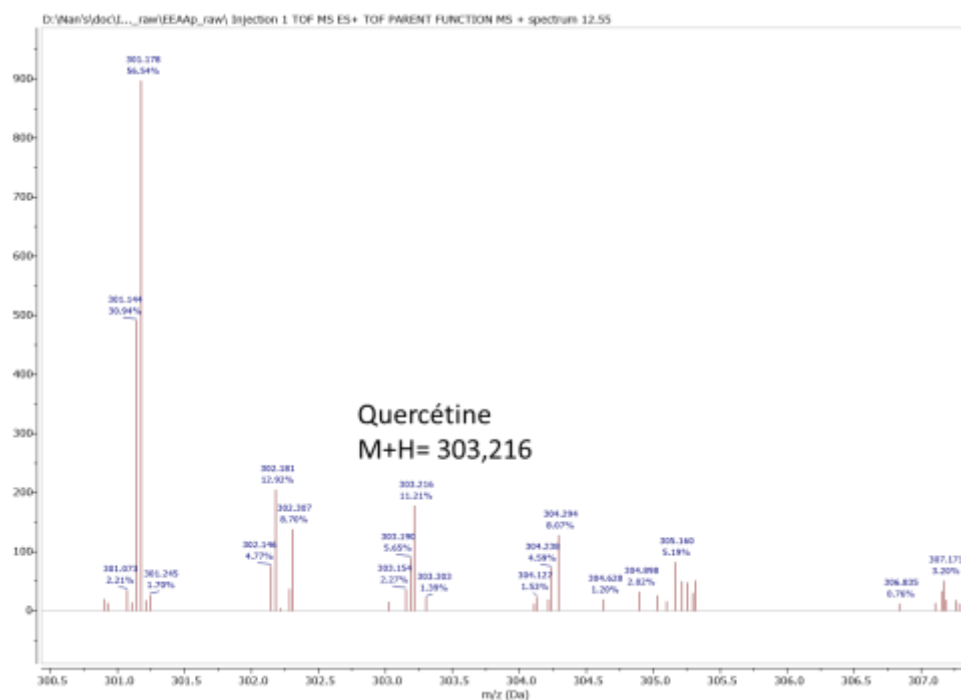
Annexe 14 : Spectres de masse des composés identifiés dans l'EEAa

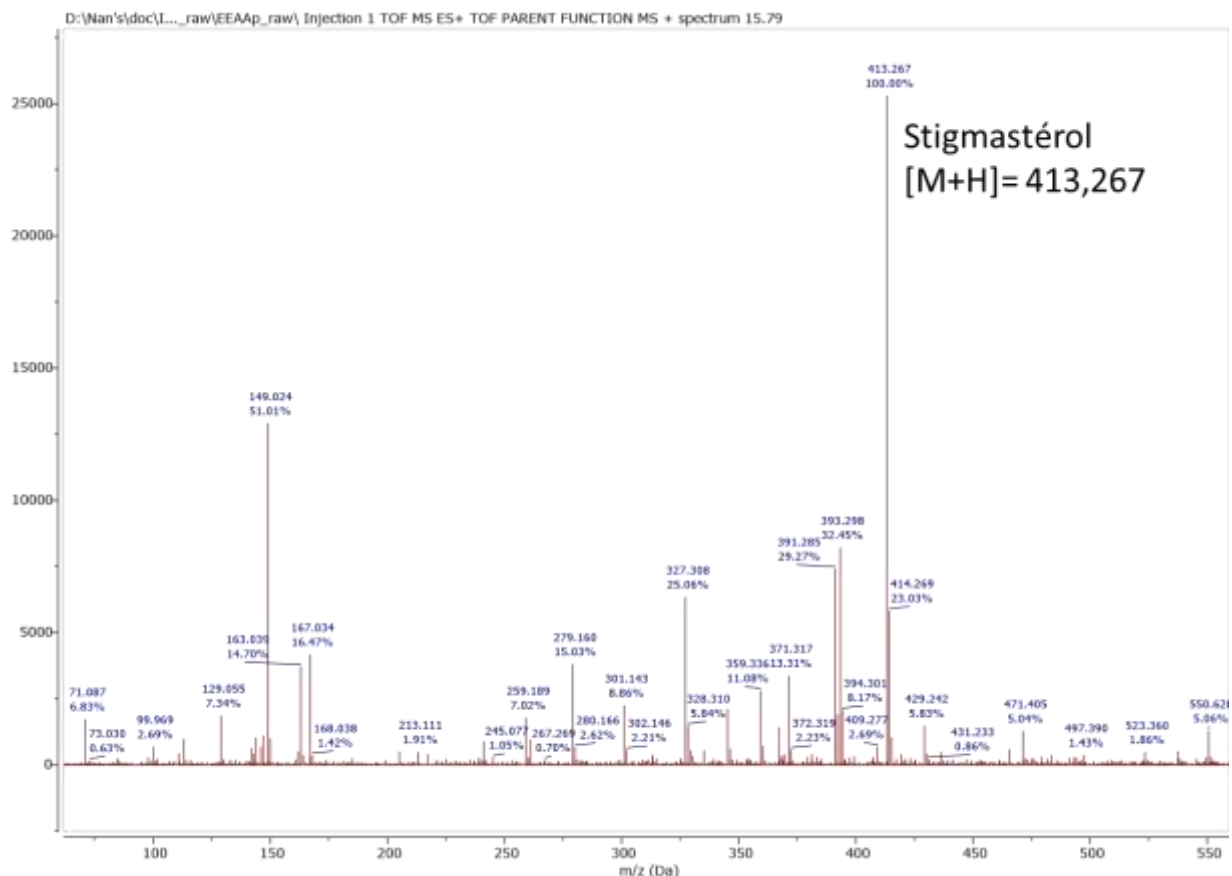


Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

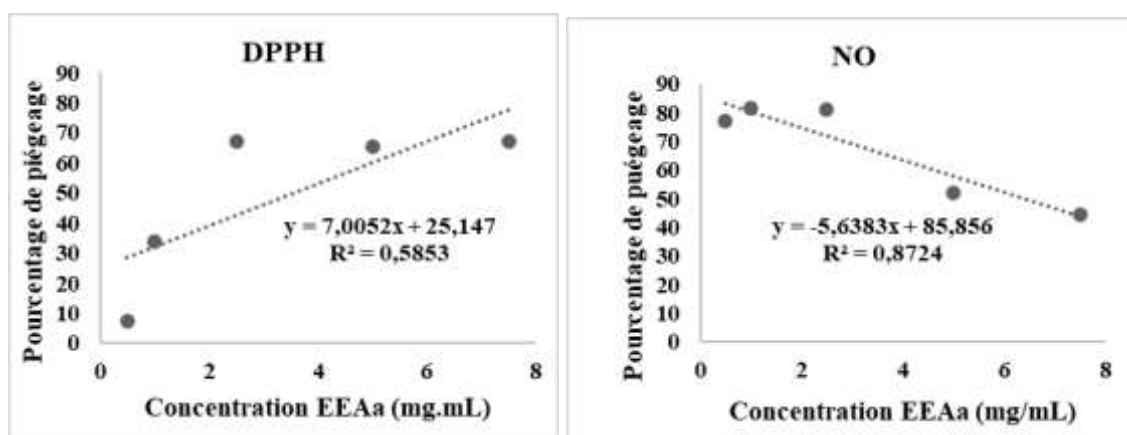


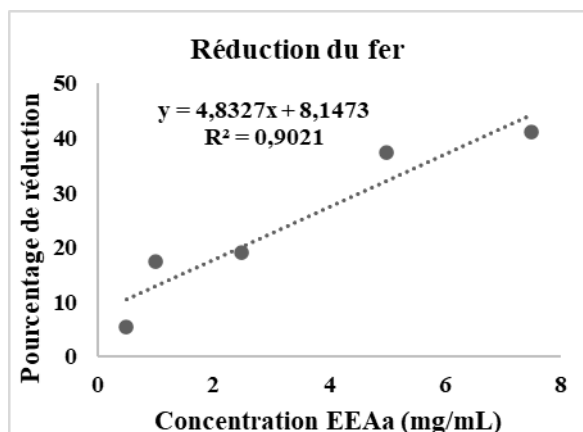
Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer



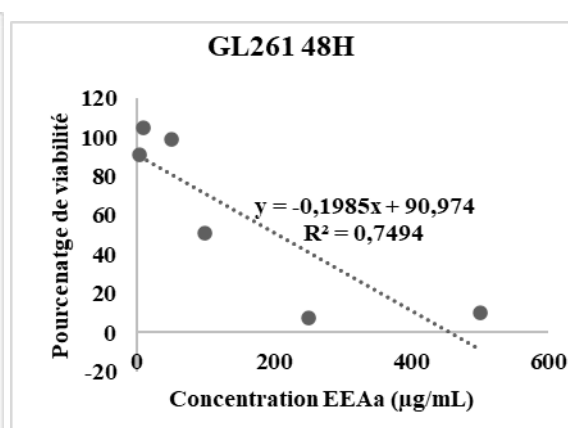
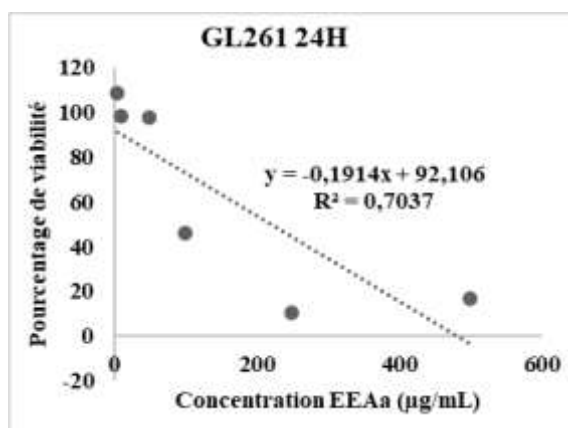
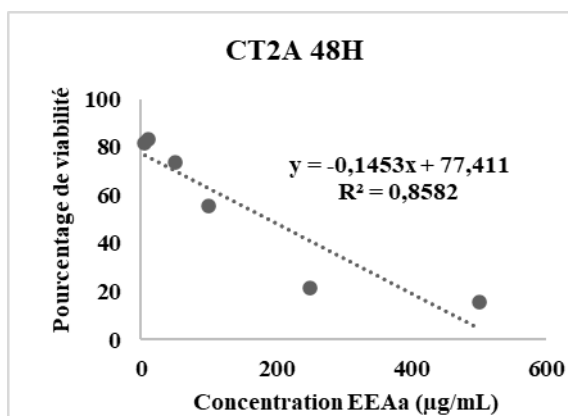
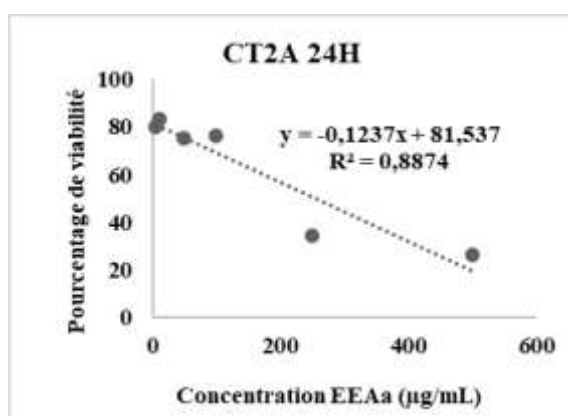


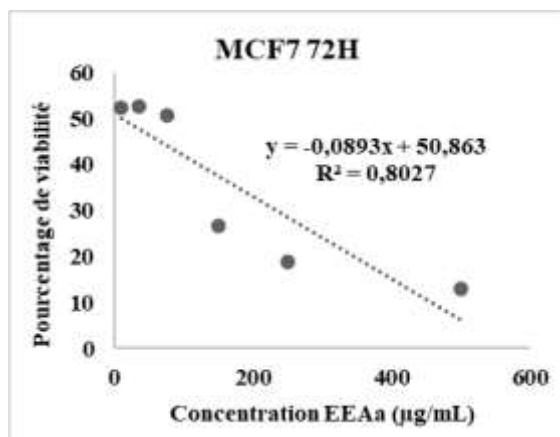
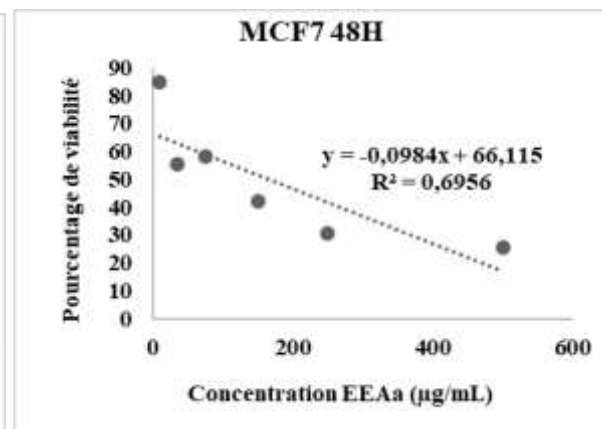
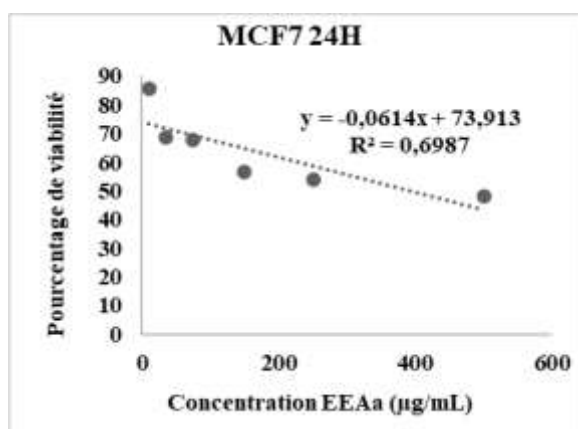
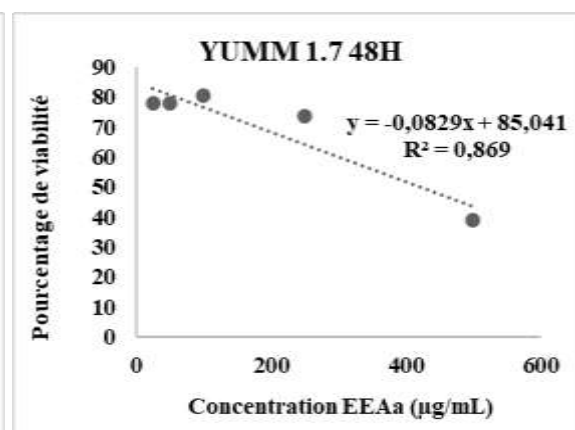
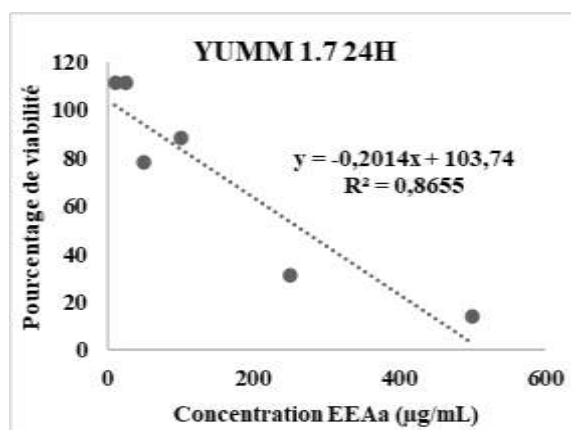
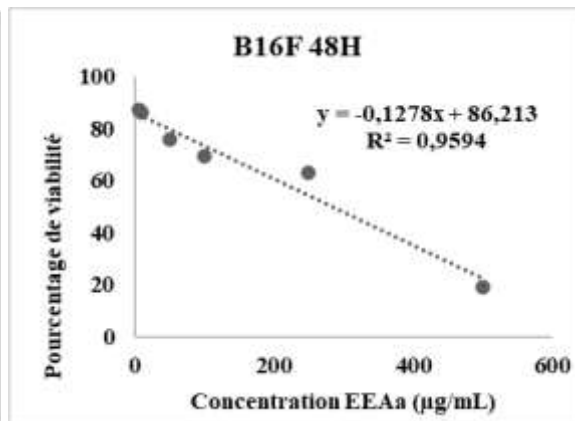
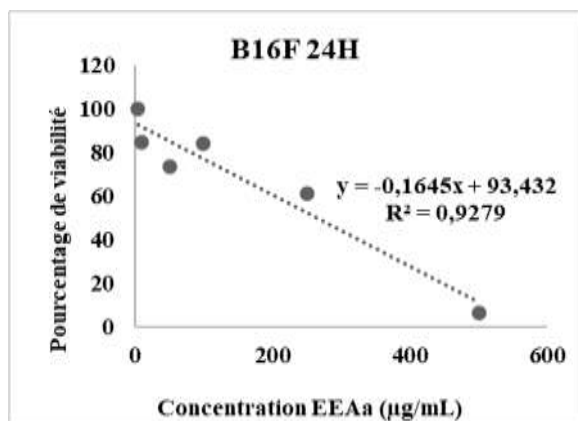
Annexe 15: Régression linéaire des tests antioxydants *in vitro*





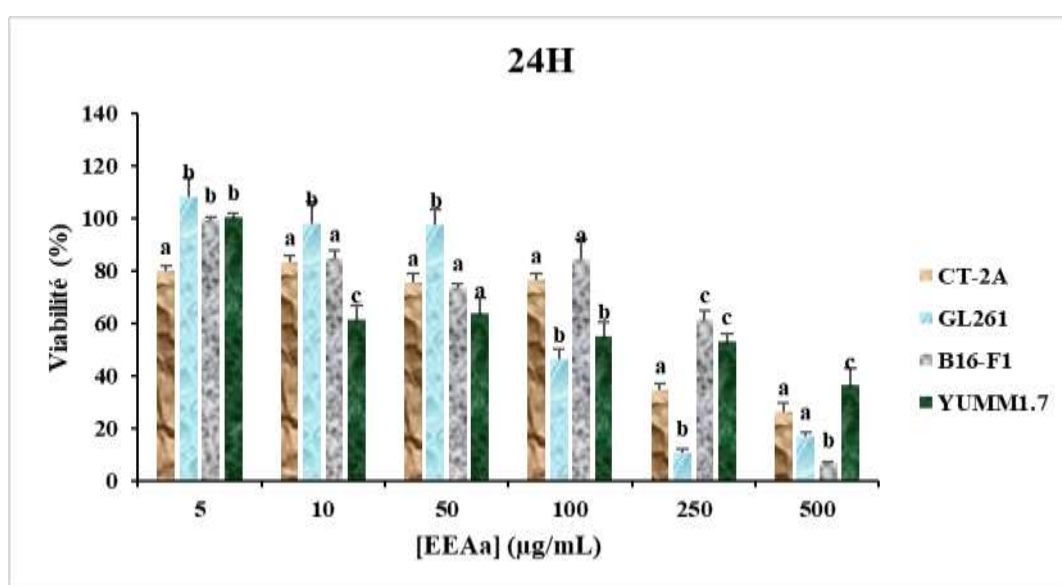
Annexe 16 : Régression linéaire des tests de viabilité cellulaire





I.3.1.1 Effet antiprolifératif de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium* sur les cellules cancéreuses après 24H d'exposition

L'activité cytotoxique sur les lignées cellulaires après 24H d'exposition est représentée par la Figure 34 ci-dessous. Il en ressort qu'après 24H d'exposition, L'EEAa à toutes les concentrations testées a inhibé la prolifération des cellules CT2A et GL261, B16-F1 et YUMM 1.7, excepté la plus petite concentration (5µg/mL) sur la lignée GL-261. Aux concentrations de 10 à 100 µg/m, l'EEAa a été plus antiprolifératif pour la lignée YUMM1.7. Cependant, aux concentrations en EEAa les plus élevées, les cellules GL261 ont été les plus sensibles.

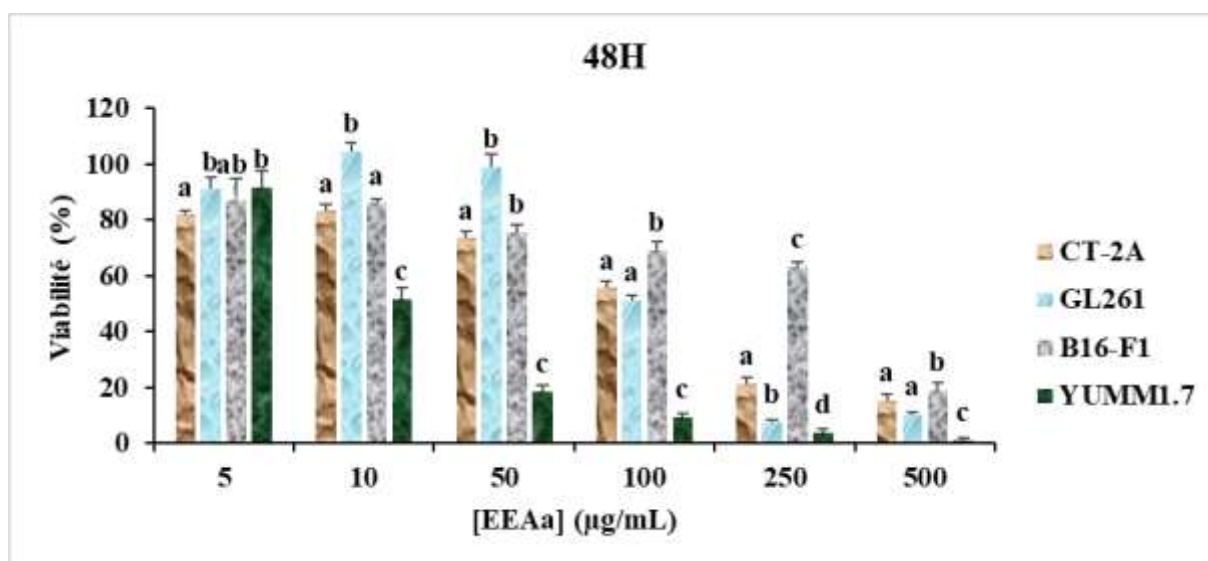


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type pour la viabilité. ; CT 2A, GL 261, B16-F1, YUMM1.7 : lignées cellulaires ; EEAa : extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* ; Pour chaque concentration en EEAa, les barres affectées de lettres différentes (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 34: Effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires CT-2A, B16-F1, GL261 et YUMM 1.7 après 24H d'exposition

I.3.1.2 Effet antiprolifératif de l'extrait éthanolique des graines d'*A. angustifolium* sur les cellules cancéreuses après 48H d'exposition

Le Figure 35 ci-après présente l'effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires après 48H. Il a été constaté que l'extrait aux concentrations testées a inhibé la prolifération de ces cellules. Une différence significative n'a été observée entre la viabilité des différentes cellules qu'à partir de la concentration en EEAa de 10µg/mL, avec une meilleure sensibilité des cellules YUMM1.7.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type pour la viabilité. ; YUMM, B16F : lignées cellulaires ; EEAa : extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* ; Pour Concentration en EEAa, les bandes affectées de lettres différentes (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 35: Effet antiprolifératif de l'EEAa sur les lignées cellulaires CT-2A, B16-F1, GL261 et YUMM 1.7 après 48H d'exposition

Concernant la CI_{50} (Tableau VIII) de l'EEAa vis-à-vis des différentes lignées cellulaires, la lignée GL261 a été la plus sensible après 24h d'exposition (215,04 µg/mL) tandis qu'à 48h, la lignée YUMM1.7 fut la plus sensible (31,5 µg/mL)

Tableau VIII: CI_{50} de l'EEAa vis à vis des différentes lignées cellulaires après 24H et 48H d'exposition

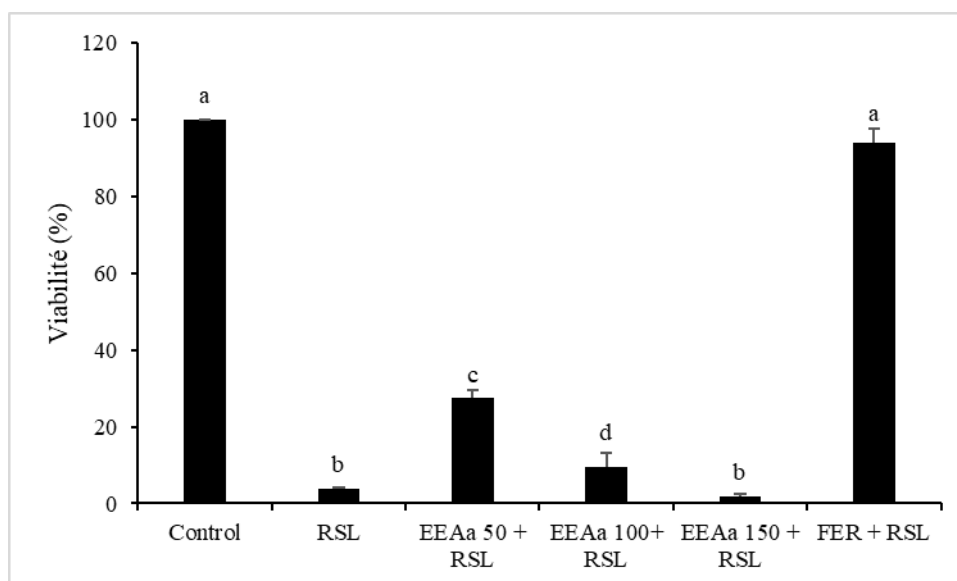
	Lignées	CT-2A	GL261	B16-F1	YUMM1.7
C50 (µg/mL)	24H	244,94	215,04	263,78	263,21
	48H	188,64	206,42	283,36	31,5

CI 50 : concentration inhibitrice 50

Le cancer étant une maladie dont le traitement se fait sur du long terme, la plus petite CI_{50} après 48H d'exposition à l'EEAa a été utilisée comme critère de sélection de la lignée cellulaire la plus sensible à l'extrait. De ce fait, la lignée YUMM 1.7 a été sélectionnée et utilisée pour l'exploration des mécanismes d'action.

I.3.2 Effet de l'extrait éthanolique d'*A. angustifolium* sur la mort cellulaire induite par le RSL-3 chez les cellules YUMM 1.7

L'effet de l'extrait sur la mort cellulaire induite l'agent pro-ferroptotique RSL-3 est représenté par la Figure 36 ci-dessous. Il en ressort que, comparativement au contrôle non traité, le traitement des cellules YUMM 1.7 avec 0,004 mM de RSL 3 a entraîné une baisse significative de la viabilité cellulaire. Cependant, le prétraitement des cellules avec de l'EEAa aux doses de 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ a limité la mort des cellules, conduisant à une augmentation de la viabilité cellulaire comparé au RSL-3 seul. Cette protection contre la mort induite par le RSL-3 était inversement proportionnelle à concentration en extrait, et moins efficace que la protection assurée par la ferrostatine.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; RSL : Ras small letal molecule ; EEAA : extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* : 50, 100 et 150 : concentration d'extrait en $\mu\text{g/mL}$; FER : Ferrostatine 1 ; les traitements affectées des lettres différentes (a, b, c, d) ont des nombres de cellules viables différents ($p < 0,05$).

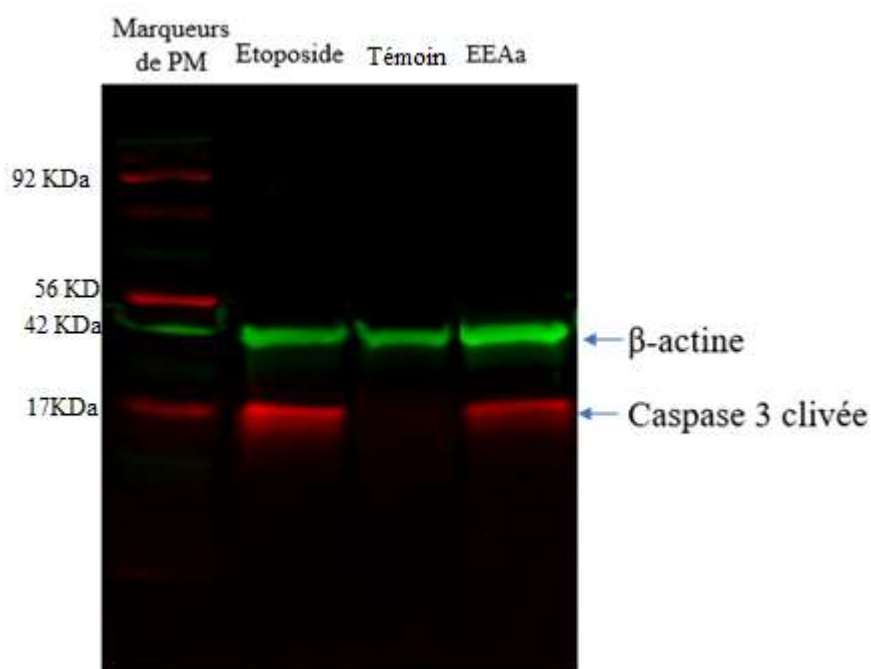
Figure 36: Effet de l'EEAa sur la peroxydation lipidique induite par el RSL-3 chez les cellules YUMM 1.7

I.3.3 Exploration des mécanismes de mort cellulaire induite par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* chez les cellules YUMM 1.7

Deux mécanismes de morts cellulaires ont été explorés, notamment l'apoptose et la nécroptose, à travers la détection des protéines impliquées par western blot

I.3.3.1 Mise en évidence de l'apoptose par détection de l'expression protéique de la Caspase-3 clivée

Les bandes électro-phorétiques pour la mise en évidence de l'apoptose chez les cellules YUMM 1.7 sont représentés sur la Figure 37 ci-dessous. On y déduit une expression de la β -actine (protéine de contrôle) tant chez les cellules non traitées (Contrôle) que chez celles traitées à l'étoposide (molécule pro-apoptotique de référence) ou l'EEAa. Cependant, seules les cellules traitées avec l'EEAa ou l'étoposide présentaient une expression protéique de la Caspase-3 clivée ou active. La Caspase-3 clivée étant l'un des effecteurs ultimes de la mort cellulaire par apoptose, l'EEAa induirait donc la mort des cellules YUMM 1.7 par apoptose.

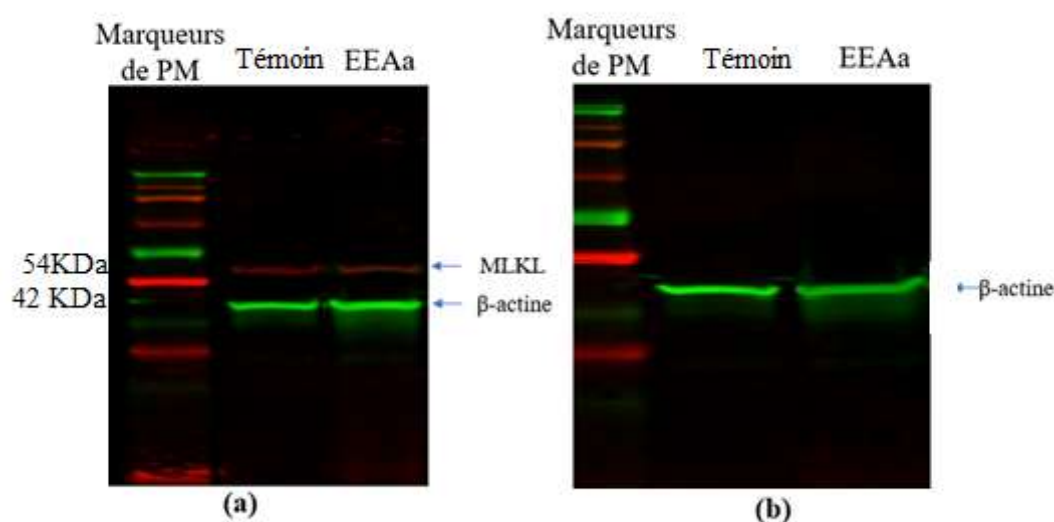


PM : poids moléculaire

Figure 37: Effet stimulateur de la caspase-3 active par l'EEAa chez les cellules YUMM1.7

I.3.3.2 Mise en évidence de la nécroptose par détection de l'expression protéique des formes inactives et actives de la protéine MLKL

Les bandes électrophorétiques de mise en évidence de la nécroptose, par détection de la protéine MLKL active (pMLKL) et inactive (MLKL) sont présentées sur la figure 38 ci-dessous. La β -actine a également été utilisée comme protéine de contrôle et a été exprimée par les cellules non traitées et les cellules traitées avec l'extrait. Concernant la protéine d'intérêt (MLKL), on note une expression de sa forme inactive (Figure 38a) tant par les cellules traitées que celles non traitées. Par contre, la forme active (pMLKL) n'a été exprimée autant par les cellules YUMM 1.7 non traitées que celles traitées avec l'EEAa (Figure 38b). Ce résultat traduit que, l'EEAa n'induit pas la mort cellulaire par nécroptose chez les cellules YUMM 1.7.



MLKL : Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase MLKL, pMLKL : phosphorylated Mixed Lineage Kinase domain Like, PM : poids moléculaire.

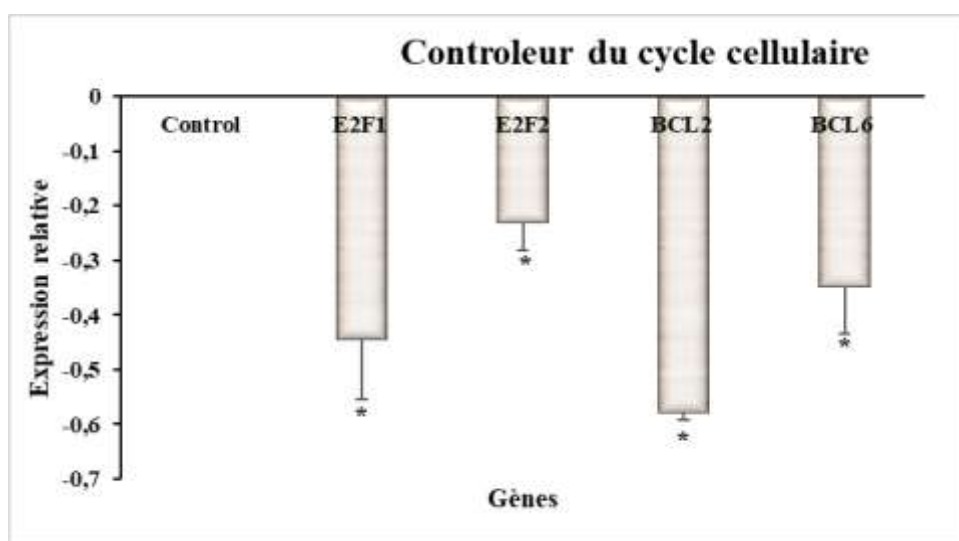
Figure 38: Effet inhibiteur de pMLKL (b) par l'EEAa chez les cellules YUMM1.7

I.3.4 Effet modulateur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur l'expression de quelques gènes chez les cellules YUMM 1.7

La mesure de l'expression des gènes codant pour les facteurs de croissance angiogéniques (VEGF, PDGF, et IGF), les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α), anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) et des facteurs de transcription et contrôleurs du cycle cellulaire (E2F1, E2F2, BCL-6 et BCL-2) a été effectuée par PCR en temps réel. Les résultats ont été exprimés en expression relative, par rapport aux cellules non traitées.

I.3.4.1 Effet de l'extrait sur l'expression des gènes E2F1, E2F2 BCL-2 et BCL-6 de contrôle du cycle

L'effet de l'extrait sur l'expression génique des contrôleurs du cycle cellulaire a montré que, la concentration en EEAA de 250 µg/mL a entraîné après 24 H une répression des facteurs de transcription E2F1 et E2F2, impliqués dans la progression du cycle cellulaire, ainsi qu'une répression des gènes anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-6. l'EEAA pourrait donc induire un arrêt de la progression du cycle cellulaire et conduire la cellule YUMM 1.7 vers une mort par voie intrinsèque de l'apoptose (Figure 39).

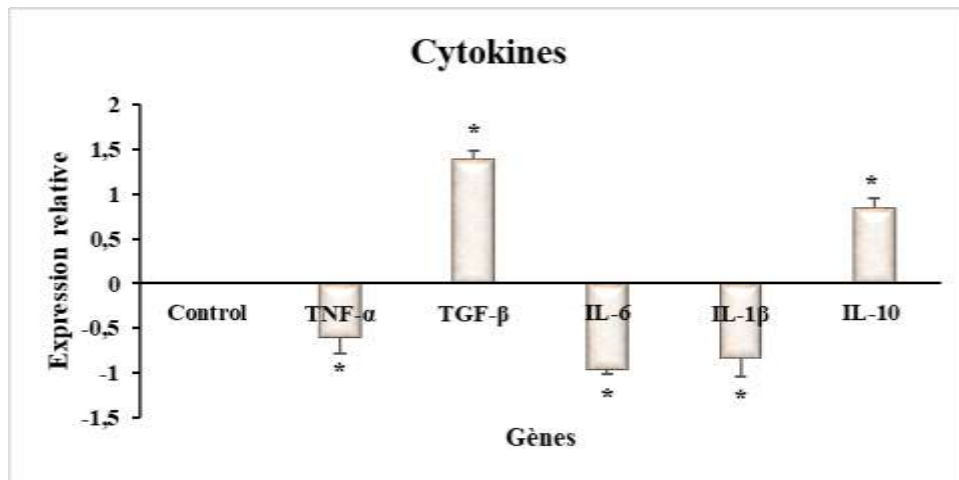


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; BCL-2 (6) : B-cell lymphoma -2 (6) ; E2F1 (2) : Eucaryotes transcription factor 1(2). les gènes affectées de l'Astérisk (*) ont des différences par rapport au à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 39: Effet inhibiteur de l'EEAA sur les contrôleurs du cycle cellulaire chez les cellules YUMM 1.7

I.3.4.2 Effet modulateur de l'extrait sur l'expression des gènes codant pour IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α et TGF- β

Le résultat de l'expression génique des cytokines pro et anti-inflammatoires est représenté sur la Figure 40 ci-dessous. Il en ressort que le traitement des cellules YUMM 1.7 a entraîné une régulation à la hausse et significative de la cytokine anti-inflammatoire (interleukine 10), tandis que, les cytokines pro-inflammatoires *Tumour Necrosis Factor alpha* (TNF- α), interleukine-1 beta (IL-1 β) et IL-6 était réprimés. Ceci traduisant un potentiel antiinflammatoire de l'EEAA. Le facteur de croissance transformant(TGF- β) a également été régulé à la hausse.

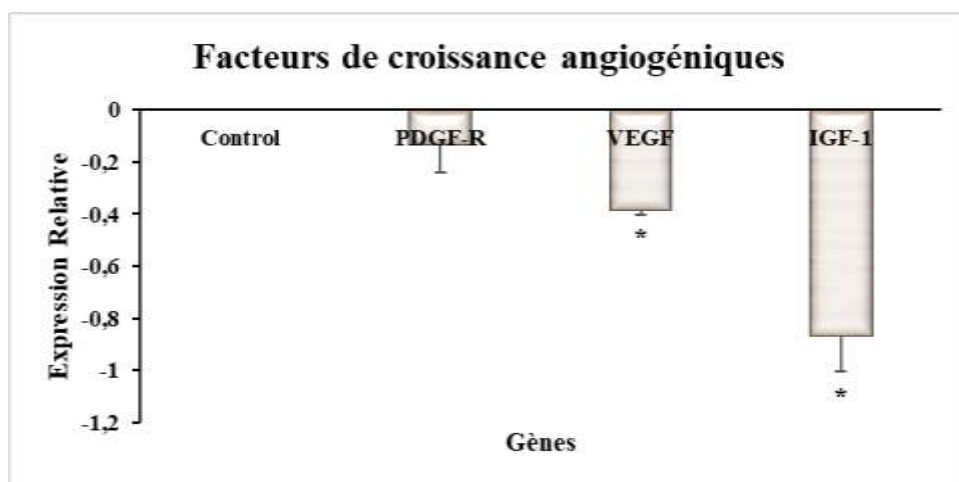


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; TNF- α : tumour necrosis facctor-alpha ; TGF- β : transforming growth factor-beta ; IL-1 β (6, 10) : interleukine-1beta (6, 10) ; les gènes affectées de l'Astérisk (*) ont des différentes par rapport au à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 40: Effet modulateur de l'EEAa sur l'expression des cytokines chez les cellules YUMM 1.7

I.3.4.3 Effet modulateur de l'extrait sur l'expression des gènes de facteurs de croissance angiogéniques *VEGF*, *IGF-1* et *PDGF-R*

L'effet de l'EEAa sur l'expression relative des gènes codants pour les facteurs de croissances angiogéniques *VEGF*, *IGF-1* et le de *PDGF* (*PDGFR*) est représenté sur la Figure 41 ci-dessous. Il en ressort que, le traitement des cellules YUMM 1.7 avec de l'EEAa sur une durée de 24h à réprimé de façon significative ($P < 0,05$). De ce fait, l'EEAa serait capable d'inhiber l'angiogenèse tumorale.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type ; PDGF-R : platelets-derived growth factor receptor ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; IGF-1 : insulin like growth factor-1 ; les gènes affectés de l'Astérix (*) ont des différences par rapport à leur expression dans le control ($p < 0,05$).

Figure 41: Répression des facteurs de croissance relatifs à l'angiogenèse PDGFR, VEGF et IGF-1 par l'EEAa chez les cellules YUMM 1.7

I.4 Discussion partie I

Plusieurs études ont révélé le potentiel antiprolifératif des extraits de plantes et de leurs constituants dans la prise en charge du cancer. L'une des familles botaniques les plus explorées dans ce domaine est celle des *Zingiberaceae* (Kuété *et al.* 2014) à laquelle appartient *Aframomum angustifolium*, la plante étudiée dans le présent travail. Le stress oxydatif étant fortement impliqué dans les mécanismes cancérigènes (Jelic *et al.*, 2021), explorer un extrait de plante possédant un fort potentiel antioxydant pour ses propriétés anticancéreuses serait une approche intéressante. D'entrée de jeu, le criblage des composés bioactifs de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* a révélé la présence des composés phénoliques (6-gibgéról, 6-paradol, Quercétine), des alcaloïdes (Piperine et isoprinosine) et des terpenoïdes (α -pinène, β -caryophyllène, β -bisabolène). Ces résultats concordent avec les données de la littérature rapportant la présence de ces classes de composés bioactifs dans les graines et les peaux de ce fruit (Inkoto *et al.*, 2021 ; Baser et Kürkcüglü, 2001). La mise en évidence du potentiel antioxydant de ces différentes classes de composés a déjà fait l'objet de nombreuses études (Kandylis, 2022 ; Vidinamo *et al.*, 2021). Ceci justifierait du potentiel antioxydant de l'EEAa relevé dans ce travail (Figures 29 à 33). Les potentiels observés (antiradicalaire et réducteur) seraient dus aux capacités de ces composés (Quercétine, α -Pinène) à céder un proton ou un électron aux agents oxydant, favorisant ainsi le passage d'une forme instable à une plus stable (Bougandoura et

Bendimerad, 2012). Ce potentiel pourrait ainsi conférer à l'EEAa la capacité d'inhiber l'initiation et la promotion des cancers (**Prasad et al., 2017**).

Pour apprécier ce potentiel anticancéreux, des tests sur lignées cellulaires ont été effectués. De prime à bord, le potentiel antiprolifératif de l'EEAa sur des lignées cellulaires de cancer du cerveau (CT2A, GL261) et de la peau (YUMM 1.7, B16F) a été évalué dans le but d'identifier la plus sensible. Il a été constaté que l'extrait provoquait la mort des cellules cancéreuses de manière dépendante de la concentration (Figures 34 et 35). Après 24 heures d'exposition, l'extrait était plus efficace sur les lignées cellulaires de cancer du cerveau. Cependant, lorsque le temps d'exposition était prolongé (soit 48 h), l'extrait était plus efficace sur la lignée cellulaire de la peau YUMM 1.7 (31,5 µg/mL). L'effet antiprolifératif de l'EEAa observé sur les différentes lignées cellulaires serait dû à la présence de composés bioactifs dans l'extrait, capables d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses. En effet, plusieurs études ont déjà montré que, les métabolites secondaires extraits des plantes, avaient la capacité d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses via différents mécanismes (**Rampogu et al., 2022 ; Siraj et al., 2021; Prasad et al., 2017 ; Mocanu et al., 2015**). En occurrence, l' α -pinène identifié dans l'extrait (Tableau VI) serait à lui seul capable d'induire la mort par apoptose des cellules cancéreuses (**Hou et al., 2019**) et un arrêt G2/M du cycle cellulaire (**Chen et al., 2015**). Les traitements anticancéreux étant fait sur du long terme, la lignée cellulaire YUMM 1,7 a été considérée comme étant plus sensible à l'EEAa et utilisée pour explorer les voies d'action antiproliférative de cet extrait.

Les cellules cancéreuses sont reconnues par un ensemble de caractéristiques qui leurs sont communes, dont l'une des principales est la résistance à la mort (**Fouad et Anei, 2017**). Le principal type de mort cellulaire est l'apoptose qui peut être induit par des stimuli extracellulaires impliquant les récepteurs de mort ou par voie intrinsèque (mitochondriale). Ces deux voies aboutissent à l'activation des caspases effectrices, dont la caspase-3 (**Mishra et al., 2018**). Les bandes électrophorétiques issues de la séparation des protéines extraites chez les cellules traitées avec l'EEAa ayant révélé la caspase-3 active (Figure 37). l'EEAa serait capable d'entraîner la mort des cellules YUMM1.7 par apoptose. Par ailleurs la qPCR a révélé une modulation négative de l'expression des gènes antiapoptotiques BCL-2 et BCL-6 par l'EEAa (Figure 38) suggérant une activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. En effet, l' α -pinène présent dans l'extrait serait capable d'entraîner un dysfonctionnement mitochondrial, ou de moduler les gènes de la famille des BCL-2. Ces actions seraient favorables à la libération du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol (**Ye et al.,**

2020). Ce cytochrome C avec apaaf-1 (*apoptotic protease activator factor 1*) va former l'apoptosome, avec activation de la caspase-9, qui va à son tour activer la caspase-3 par clivage. Il en résultera une translocation de la caspase-3 clivée dans le noyau où elle dégradera un large éventail de protéines, entraînant la mort cellulaire (**Mishra et al., 2018**).

Par ailleurs, il est connu que la voie extrinsèque de l'apoptose et la nécroptose sont toutes 2 activées par les voies sous-jacentes des récepteurs de la mort à l'instar des récepteurs à *TNF- α* (**Mishra et al., 2018 ; Maelfait et al., 2017**). Cependant la répression du *TNF- α* (Figure 40) par l'EEAa ainsi que et l'absence de la protéine pMLKL (Figure 38) dans les lysats de cellules traitées avec l'EEAa ont été observés dans cette étude. Cela pourrait suggérer une inactivation de la voie extrinsèque de l'apoptose et de la nécroptose. Néanmoins, il a été montré que, des métabolites secondaires des plantes tels que les tanins, étaient capables stimuler la mort par voie extrinsèque de l'apoptose malgré une répression de la pro-Caspase-8 enclenchant ainsi la mort par voie extrinsèque de l'apoptose (**Kandir et al., 2024**). La présence de cette classe de composés dans l'EEAa, présage que, l'EEAa pourrait également promouvoir la voie extrinsèque de l'apoptose, d'autant plus que le *TNF- α* n'est pas le seul ligand initiateur de cette voie (**Mishra et al., 2018**).

Hormis l'apoptose et la nécroptose comme mécanisme de mort cellulaire, il existe également la ferroptose. Elle est initiée par des petites molécules telles que le RSL-3, qui inhibe la glutathion peroxydase 4, entraînant une accumulation des radicaux peroxydes dans la cellule (**Zhang et al., 2022 ; Dixon et al., 2012**). La présente étude a montré que, l'EEAa à des concentrations de 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$, protège les cellules YUMM 1.7 de la peroxydation lipidique induite par le RSL-3 tandis qu'à 150 $\mu\text{g/mL}$, elle promeut d'avantage la mort de ces cellules (Figure 36). Le potentiel antioxydant de l'extrait démontré plus haut, serait à l'origine de la protection des cellules contre les effets des ERO, initiés par le RSL-3. Par contre à la plus grande concentration en EEAa testée, les métabolites secondaires présents dans l'extrait tels que les composés phénoliques, seraient à l'origine de l'effet observé. En effet, ils seraient capables d'induire la mort cellulaire par accumulation des ERO grâce à leur propriétés pro-oxydantes à forte dose (**NavaneethaKrishnan et al., 2019 ; Bishayee et al., 2013**).

La perte des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, conduisant à une prolifération illimitée est à l'origine de la progression cancéreuse. En effet, le cycle cellulaire est contrôlé par une panoplie de protéines dont les facteurs de transcription de la famille E2F, qui contrôlent la transition G1/S du cycle cellulaire. Ces derniers, comprenant des activateurs (*E2F1* à *E2F3*) et des répresseurs (*E2F4* à *E2F8*), sont de nouveaux biomarqueurs et des

cibles thérapeutiques dans la prise en charge du cancer (**Yao et al., 2020**). Dans la présente étude, l'EEAa a réprimé des gènes *E2F1* et *E2F2* (Figure 39), suggérant la capacité des constituants de l'extrait à prévenir la transition G1/S des cellules cancéreuses. La répression de ces facteurs de transcription serait associée à la surexpression de $\text{II TGF-}\beta$ par l'EEAa (Figure 40). En effet, dans ses voies de signalisation, le $\text{TGF-}\beta$ activé réunit ses 2 paires de récepteurs de type II (TbRII) et I (TbRI) dont le type I va lier et activer les Smads régulés par les récepteurs (R-Smads) au niveau des sérines carboxy-terminales. Une fois activés, l'isoforme 3 (R-smad 3), va s'associer à *E2F4/5*, *DP1* et au corépresseur p107 pour former un complexe répresseur qui sera transloqué dans le noyau et se liera à l'élément inhibiteur du $\text{TGF-}\beta$ situé au niveau du promoteur *Myc* (**Frederick et al., 2004 ; Chen et al., 2002 ; Yagi et al., 2002**). Cette répression de *Myc* va s'accompagner d'une induction transcriptionnelle de l'expression des inhibiteurs de CDK (p21CIP1 et p15INK4B) normalement inhibés par *c-Myc* dans les cellules en prolifération. Ceci conduirait donc à un arrêt du cycle cellulaire entre les phases G1 et S. l'effet observé serait dû à la présence des composés bioactifs tels que les alcaloïdes dans l'EEAa. En effets, il a été révélé que, les alcaloïdes extraits de *Pseuduvaria rugosa* avaient la capacité d'arrêter la progression des cellules de leucémie HL-60 and U937 à la phase G1 à travers l'inhibition des CDK médiée par la voie p21(WAF/Cip1) (**Uadkla et al., 2013**).

L'une des caractéristiques émergentes des cellules cancéreuses est leur capacité à induire une inflammation ; ce qui a conduit à l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires sélectifs dans la prise en charge des cancers. l'EEAa a provoqué une diminution significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires ($\text{TNF-}\alpha$, IL6- et IL-1 β) et une augmentation significative de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire (IL-10) (Figure 40). Ces résultats peuvent être dus à la présence de β -caryophyllène dans l'extrait comme l'a révélé le profil chromatographique. En effet, il a été montré que, l'administration d'un gel contenant 1% de caryophyllène à des rats *Wistar* souffrant d'une plaie d'excision entraînait une amélioration du statut anti-inflammatoire avec augmentation des niveaux d'IL-10, et diminution des niveaux de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 et IL-1 β (**Gushiken et al., 2022**). Par ailleurs, il a été démontré que les récepteurs activés de l'IL-10 sont capables d'activer le facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) par l'intermédiaire de kinases sous-jacentes JAK 1 (*Janus Activating Kinase 1*) (**Murray, 2005**). L'activation de STAT3 conduit à l'expression de facteurs impliqués dans la réponse anti-inflammatoire dont Bcl-3 (*B*

lymphoma cell-3). Ce dernier empêcherait NF- κ b, de se lier à l'ADN pour induire la transcription de cytokines pro-inflammatoires (Kim *et al.*, 2014 ; Hutchins *et al.*, 2013).

Le potentiel angiogénique et invasif des cellules cancéreuses est responsable du caractère agressif des cancers et est associé à un mauvais pronostic (Trapp *et al.*, 2010). Ces différents processus sont influencés par certaines cytokines et facteurs de croissance produits par les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires environnantes. L'exposition des cellules YUMM 1.7 à l'EEAa a entraîné une répression des gènes codant pour les promoteurs angiogéniques *VEGF* et *IGF-1* (Figure 41). Cela refléterait la présence de composés bioactifs dans l'EEAa, tels que les polyphénols, qui sont capables d'inhiber l'angiogenèse et l'invasion des tumeurs. En effet, une étude précédente avait révélé que, le Resvaratrol inhibait l'angiogenèse des cellules endothéliales en coculture avec des cellules de mélanome par la répression de l'expression du *VEGF* (Naginei *et al.*, 2014). Ceci se ferait par liaison direct aux transducteurs de signaux intracellulaires tels que *HIF-1 α* (*hypoxia inducible factor*) (Zhang *et al.*, 2014). L'inhibition de *HIF-1 α* par le resvératrol empêchera donc sa translocation dans le noyau où, il était supposé s'associer à *HIF-1 β* pour activer la transcription de *VEGF*, par liaison à l'élément de réponse à l'hypoxie, situé son site promoteur (Fu *et al.*, 2015). Par ailleurs il a été rapporté que la Quercetine était capable d'inhiber les récepteurs de l'IGF-1 et réprimer son gène (Chen *et al.*, 2021 ; Gaban *et al.*, 2019). Ceci entraînerait un défaut d'activation de *HIF- α* , par inactivation des voies de signalisation MAPK et PI3K et donc un défaut d'expression de *VEGF* (Fukuda *et al.*, 2002). La répression des promoteurs angiogéniques serait ainsi favorable à la réduction des moyens d'approvisionnement en nutriments et en oxygène au sein des tumeurs cancéreuses, et donc la mort des cellules cancéreuses.

Conclusion partielle I

Au terme de cette partie où il était question de faire une caractérisation phytochimique de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* et d'explorer son potentiel antiprolifératif, il en ressort que,

- Cet extrait contient des composés phénoliques, terpenoïdes et alcaloïdes et a présenté un meilleur effet antiprolifératif sur la lignée cellulaire cancéreuse YUMM1.7 (CI50: 31,5 μ g/mL)
- Chez ces cellules (YUMM1.7) l'EEAa (250 μ g/mL) a inhibé l'angiogenèse, par répression des promoteurs angiogéniques (*VEGF* et *IGF-1*) induit un arrêt G1/S du

Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

cycle cellulaire par répression des facteurs E2F1 & 2 et promu la mort par voie intrinsèque de l'apoptose en réprimant les gènes antiapoptotiques BCL-2 & 6.

Du fait de la similitude de comportement des cellules cancéreuses indépendamment de leurs origines, et de la forte recrudescence des cancers du sein, l'utilisation de l'EEAa dans la prise en charge du cancer du sein chez un modèle animal a été envisagé pour la suite de l'étude

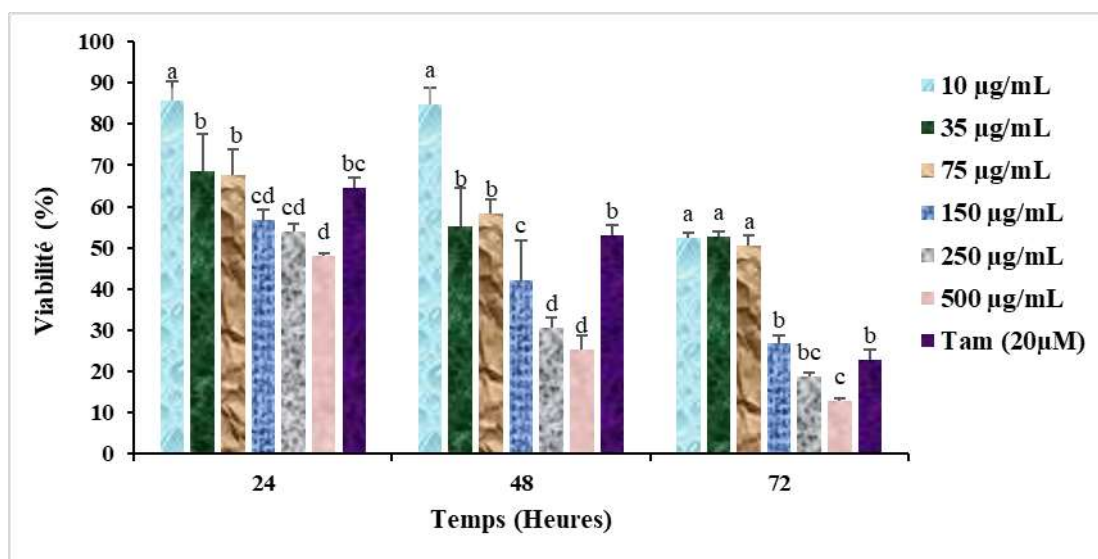
Partie II : Activités antiproliférative, antitumorale et immuno-modulatrice de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium*

La cytotoxicité de l'extrait sur les cellules du carcinome mammaire humain a d'abord été vérifiée avant d'envisager les études *in vivo* chez un modèle animal de cancer du sein induit au DMBA

II.1 Activité antiproliférative de l'extrait éthanolique des graines d'*A angustifolium* sur la lignée MCF-7 du cancer du sein

Le test de viabilité cellulaire au MTT sur les cellules MCF-7 du carcinome mammaire a révélé que, toutes les concentrations en extrait testées (10, 35, 75, 150, 250 et 500 µg/mL) ont eu un effet cytotoxique sur cette lignée cellulaire (Figure 42). L'activité antiproliférative de l'EEAa était concentration dépendante et temps dépendant. En effet, le pourcentage de viabilité était inversement proportionnel à la concentration en extrait dans le milieu et au temps d'exposition (24, 48 et 72 H). En 24H d'exposition, l'EEAa aux concentrations allant de 35 à 250 µg/mL, a présenté un potentiel antiprolifératif similaire au tamoxifène (20 µM). Après 48H L'extrait aux concentrations de 150 à 500 µg/mL s'est montré plus efficace que le tamoxifène tandis que seule la plus grande dose d'extrait testée était significativement plus efficace que le tamoxifène après 72H d'exposition.

L'efficacité antiprolifératif temps dépendant de l'EEAa sur les cellules MCF-7 a été marquée par une diminution des CI50 avec la durée d'exposition à l'extrait, allant de 389,46 µg/mL après 24 heures à 9.66 µg/mL après 72 heures (Tableau VIII).



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type pour la viabilité. ; EEAA : extrait éthanolique des graines d'*Aframomum angustifolium* ; Tam : tamoxifène ; Pour chaque temps, les barres affectées de lettres différentes (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 42: Effet de l'EEAa sur la prolifération des cellules MCF-7 à différents temps et à différentes concentrations

Tableau IX: CI₅₀ de l'EEAa vis-à-vis des cellules MCF-7 aux différents temps

Temps d'exposition	24 H	48H	72H
CI ₅₀ (µg/mL)	389,46	94,16	9,66

CI₅₀ : concentration inhibitrice 50

II.2 Activité antitumorale de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

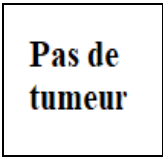
L'activité antitumorale de l'EEAa a été évaluée à travers des analyses macroscopiques, biochimiques et microscopiques.

II.2.1 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les paramètres tumoraux

L'administration de 50 mg/Kg, Pc de DMBA a au bout de 3 mois chez les animaux a entraîné des modifications physiques des mamelles. Quarante pourcent (40%) de ces animaux avaient une tumeur de diamètre moyen à $0,5 \pm 0,2$ Cm, les 60% restant avaient une modification de la peau autour du mamelon (peau d'orange). Après un mois de traitement, une incidence tumorale de 100% a été observée dans le groupe DMBA. Cependant, l'administration de l'EEAa aux doses respectives de 150 mg/Kg, Pc et 300 mg/Kg, Pc a réduit cette incidence de 40%. Le tamoxifène a quant à lui été plus efficace que l'EEAa en

maintenant cette incidence à 40%. De même, le volume tumoral moyen et la masse tumorale moyenne ont été réduits avec l'administration de l'EEAa. La meilleure performance a été enregistrée avec l'extrait à la dose de 150 mg/Kg, Pc qui a entraîné une baisse significative ($p < 0,05$) de la masse tumorale de 30,38% comparé au groupe DMBA. Le tamoxifène était également plus efficace que l'EEAa aux doses testée (Tableau X).

Tableau X: Effet régressif de l'EEAa sur les paramètres tumoraux

Paramètres tumoraux	TN	DMBA	EEAa 150	EEAa 300	TAM
					
Incidence tumorale (%)	/	100	60	60	40
Inhibition relative à l'IT	/	/	40	40	60
Volume Tumoral moyen (Cm ³)	/	12,51 ± 3,75 ^a	8,55 ± 4,95 ^b	9,16 ± 2,96 ^{ab}	6,37 ± 1,60 ^b
Inhibition relative au VT (%)	/	/	31.65	26.77	49.08
masse tumorale moyenne (g)		14,40 ± 4,76 ^a	10,01 ± 4,93 ^b	10,24 ± 2,08 ^b	7,15 ± 1,43 ^b
Inhibition relative à la MT (%)	/	/	30,48	28,89	50,34

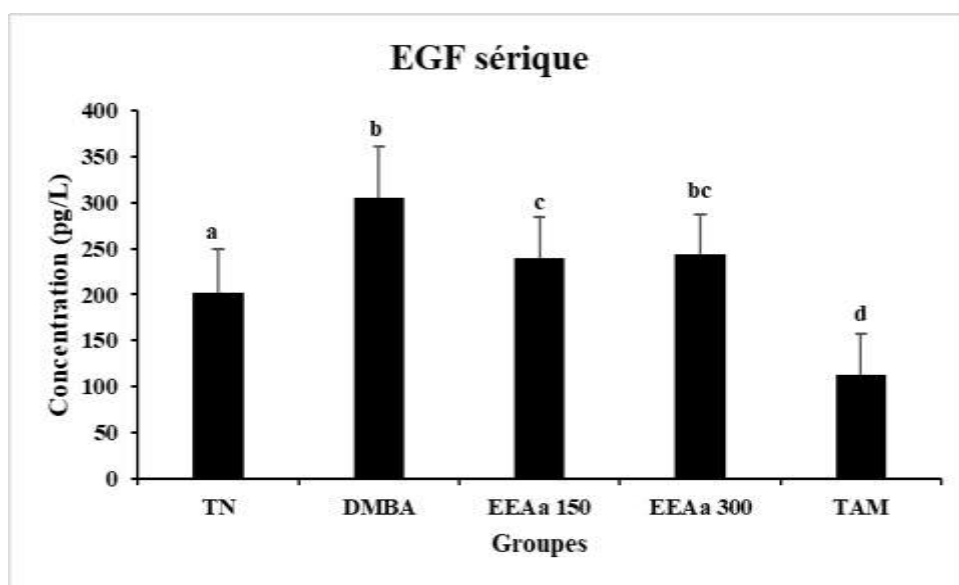
Expression des résultats : moyenne ± écart type ; TN : témoin normal, DMBA : 7,12-diméthylbenz(a)anthracène ; EEAa : extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* ; 150 & 300 : doses d'administration ; IT : incidence tumorale ; VT : volume tumoral ; MT : masse tumorale ; pour un même paramètre, les groupes affectés des lettres différentes (a & b) sont significativement différents ($p < 0,05$).

II.2.2 Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les facteurs de croissance et de survie

Il s'agissait des taux circulant d'EGF, d'estradiol et du taux de glucose dans la glande mammaire

a) Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur le taux sérique d'EGF

Pour mieux apprécier l'effet de l'EEAa sur la croissance tumorale, le taux sérique du facteur de croissance épidermique a été dosé. Il en ressort que, le DMBA a entraîné une augmentation significative ($P < 0,05$) du taux d'EGF ($305,4 \pm 56,44$ pg/L) comparé au groupe normal ($201,67 \pm 47,52$ pg/L). L'administration de l'extrait aux deux doses, a entraîné des baisses de ce taux, avec une différence significative avec la dose de 150 mg/Kg, PC ($239,6 \pm 44,24$ pg/L) par rapport au DMBA. Le tamoxifène a quant à lui entraîné une amélioration significative comparé aux doses testées de l'EEAa (Figure 43).

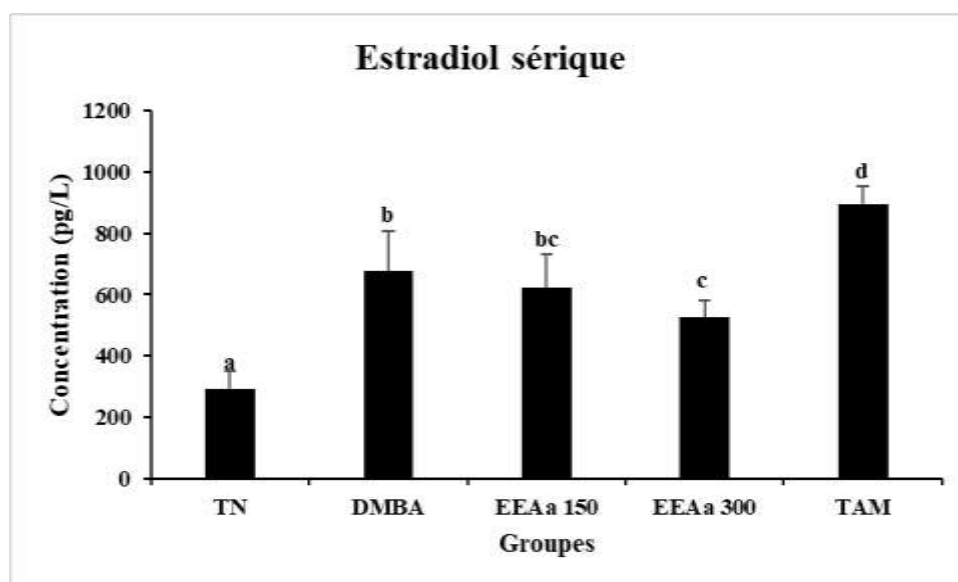


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 43: Effet inhibiteur de l'EEAa sur le taux sérique d'EGF

b) Effet l'extrait éthanolique de graines de d'A *angustifolium* sur le taux d'estradiol sérique

Le taux d'estradiol circulant a également été mesuré comme promoteur de la croissance tumorale. Il en ressort que (Figure 44), l'administration du DMBA a au bout de 4 mois entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux d'estradiol sérique ($667,34 \pm 40,92$ pg/L) comparativement aux animaux normaux ($293,30 \pm 57,21$ pg/L). L'administration de l'EEAa aux doses testées a au bout de 28 jours entraîné une baisse de ce taux, avec une différence significative à la dose de 300 mg/Kg, Pc ($525,26 \pm 56,87$ pg/L) comparé au DMBA. L'administration du tamoxifène a quant à elle entraîné une augmentation significative du taux d'estradiol ($896,85 \pm 54,57$ pg/L) en comparaison aux groupe DMBA et aux groupes traités avec l'EEAa.



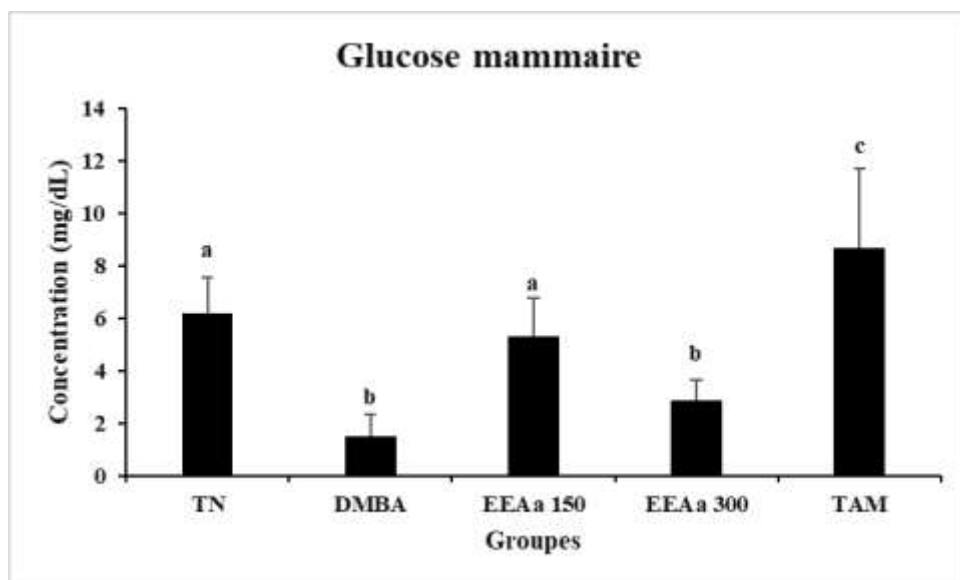
Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'A *angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 44 : Effet inhibiteur de l'EEAa sur le taux d'estradiol sérique

c) Effet de l'extrait éthanolique de graines d'A *angustifolium* sur le taux de glucose mammaire

Le glucose étant le métabolite énergétique le plus utilisé par les cellules cancéreuses, l'activité des cellulaires dans la glande mammaire a été appréciée par le dosage du glucose de cette glande. Il en ressort que (Figure 45), le taux de glucose était significativement ($p < 0,05$) plus faible dans le groupe DMBA non traité ($1,49 \pm 0,82$ mg/dL) comparé au groupe normal ($6,19 \pm 1,38$ mg/dL). L'administration de l'EEAa aux doses testées était associée à des taux

plus élevés de glucose comparé au groupe DMBA, avec une différence significative ($p < 0,05$) à la dose de 150 mg/Kg, PC ($5,32 \pm 1,43$ mg/dL). Le tamoxifène à quant à lui entraînée une augmentation significative du taux de glucose mammaire par rapport aux groupes traités, allant même au-delà de la normale (TN).



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAA 150 & EEAA 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 45 : Effet de l'EEAA sur le taux de glucose mammaire

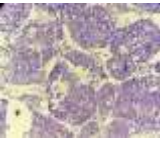
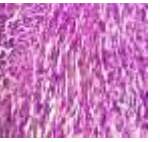
II.2.3 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur la microarchitecture de la glande mammaire et quelques organes de métastase

a) Effet de l'EEAA sur l'histologie de la glande mammaire

Le Tableau XI ci-dessous présente les effets de l'EEAA sur la microarchitecture de la glande mammaire. Il en ressort que, les glandes mammaires des animaux normaux avaient un parenchyme mammaire normal avec des lobules mammaires contenant des cellules acinaires mononuclées entourées par d'abondants adipocytes. Les animaux du groupe DMBA présentaient cependant tous un carcinome canalaire invasif majoritairement de haut grade (SBR 2 ou SBR3) avec une faible infiltration lymphocytaire ($< 10\%$) et environ 30% de comédonécrose. Ceux traités à la dose de 150 mg/Kg, PC présentaient des tumeurs mammaires de type carcinome canalaire cribriforme de grade SBR II sans infiltration lymphocytaire mais avec 30% de comédonécrose, tandis que les tumeurs mammaires retrouvées chez les animaux traités avec la dose de 300 mg/Kg, PC, sont de type fibrosarcome de grade SBR II sans infiltration lymphocytaire avec 30% de comédonécrose. Les animaux

traités avec le tamoxifène présentent quant à ceux en majorité un fibrosarcome de faible grade (SBR1) sans infiltration lymphocytaire et de comédonécrose.

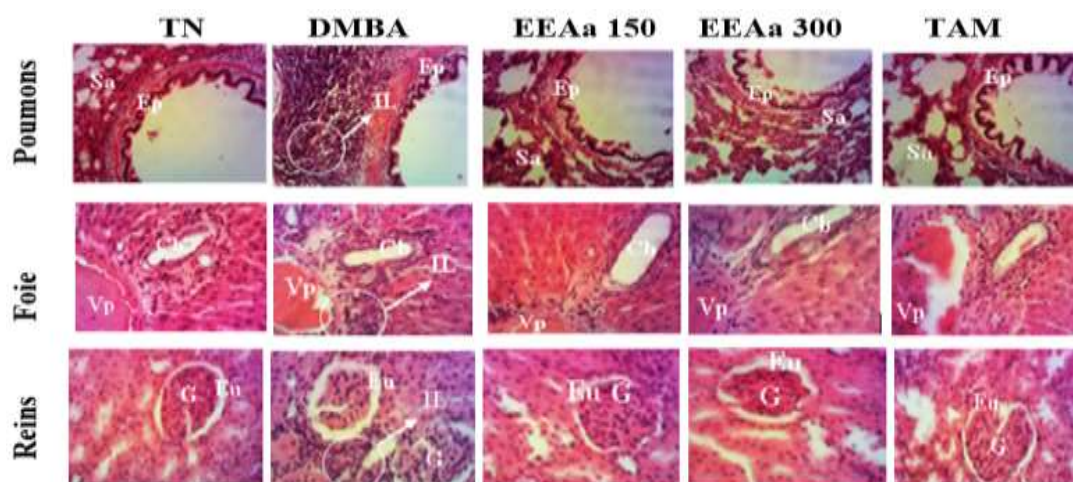
Tableau XI: Effet de l'EEAa sur l'histologie de la glande mammaire (H&E ×400)

Items	TN	DMBA	EEAa 150	EEAa 300	TAM
					
Type histologique	Sein normal	Carcinome canalaire invasif SBR III	Carcinome canalaire cribriforme SBR II	Fibrosarcome	Fibrosarcome
Grade	/			SBR II	SBR I
Infiltration lymphocytaire	/	~10%	0%	0%	0%
Nécrose	/	30%	30%	30%	0%

TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène

b) Effet de l'EEAa sur la microarchitecture de quelques organes de métastase

L'administration du DMBA a entraîné une infiltration leucocytaire rénale, pulmonaire et hépatique, comparativement au groupe normal qui présente une structure normale du rein avec un espace urinaire et un glomérule bien différencié, du foie et du poumon. Le tamoxifène et l'EEAa aux doses testées ont réduit infiltrations leucocytaires rénales, hépatiques et pulmonaires (Figure 46).



TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; Ep : Epithélium pulmonaire ; Sa : Sac alvéolaire ; IL : infiltration leucocytaire ; Vp : Veine porte ; Cb : Canalicule biliaire ; Eu : Espace urinaire ; G = Glomérule.

Figure 46: Effet de l'EEAa, du poumon (H&E × 100), du foie (H&E ×200) et des reins (H&E × 200)

II.3 Activité immunomodulatrice de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

Elle a été appréciée à partir de la numération sanguine, la mesure du taux de cytokines pro et antiinflammatoires, le taux de NO mammaire et l'analyse histologique des organes lymphoïdes primaires et secondaires.

II.3.1 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur la composition cellulaire sanguine

Pour apprécier le potentiel immuno-modulateur de l'EEAa, la numération sanguine a été effectuée et les résultats sont répertoriés dans le tableau XII ci-dessous. Il en ressort que, l'administration du DMBA a au bout de 4 mois entraîné une baisse significative du taux de globules blancs, globules rouges, hémoglobine, d'hématocrites et une augmentation significative des taux de plaquettes et neutrophiles comparativement à ceux animaux normaux. L'administration de l'EEAa aux 2 doses a après 28 jours entraîné une augmentation ($p < 0,05$) des taux de GB, et une baisse ($p < 0,05$) du taux de neutrophiles. Seule l'EEAa à la dose de 150 mg/Kg, Pc a conduit à une augmentation significative des hématocrites, plaquettes et monocytes, tandis que l'EEAa 300 a entraîné une augmentation significative du taux de lymphocytes. L'administration du TAM a quant à elle occasionné une baisse significative du taux de GB et de monocytes comparé aux différentes doses d'extraits, et une augmentation ($p < 0,05$) du taux de plaquettes.

Tableau XII: Effet de l'EEAa sur les paramètres hématologiques

Paramètres	TN	DMBA	EEAa 150	EEAa 300	TAM
GR (10⁶/uL)	8,00 ± 1,46 ^a	5,36 ± 1,69 ^b	7,05 ± 0,96 ^{ab}	6,39 ± 1,14 ^{ab}	7,85 ± 1,36 ^a
Hgb (g/dL)	13,80 ± 2,65 ^a	9,27 ± 2,43 ^b	12,40 ± 1,61 ^{ab}	11,23 ± 1,62 ^{ab}	13,10 ± 1,45 ^a
Hct (%)	50,1 ± 10,59 ^a	35,67 ± 10,56 ^b	46,53 ± 6,39 ^a	41,4 ± 7,56 ^{ab}	49,67 ± 5,23 ^a
Plt (10³/uL)	64,00 ± 1,00 ^a	291,5 ± 18,50 ^b	473,33 ± 104,15 ^c	359,33 ± 2,89 ^b	895,50 ± 78,50 ^d
GB (10³/uL)	13,61 ± 3,53 ^a	0,43 ± 0,06 ^b	12,63 ± 5,07 ^a	15,44 ± 0,65 ^a	0,56 ± 0,08 ^b
Neu (%)	16,20 ± 3,95 ^a	25,55 ± 6,29 ^b	19,90 ± 3,90 ^a	13,73 ± 3,27 ^a	14,13 ± 2,48 ^a
Mono (%)	5,20 ± 1,50 ^a	6,35 ± 2,85 ^a	11,45 ± 2,35 ^b	5,55 ± 1,15 ^a	1,35 ± 0,25 ^c
Lymp (%)	69,87 ± 8,97 ^a	66,00 ± 1,40 ^a	69,36 ± 8,65 ^a	78,63 ± 5,01 ^a	79,73 ± 4,54 ^a

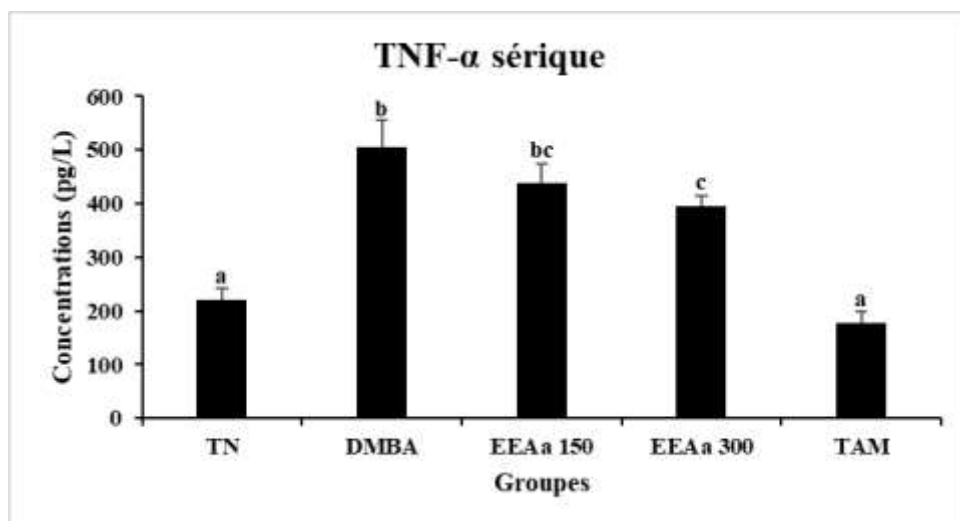
Expression des résultats : moyenne ± écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* TAM : animaux malades traités le tamoxifène ; GB : globules blancs ; GR : globules rouges ; Hgb : hémoglobine ; Hct : hématocrites ; Plt : plaquettes ; Neu : neutrophiles ; Mono : monocytes ; Lymp : lymphocytes ; pour un même paramètre, les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

II.3.2 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les taux sériques de cytokines TNF- α et INF- γ

La cytokine pro-inflammatoire TNF- α et celle anti-inflammatoire INF- γ ont été dosées au niveau sérique.

II.3.2.1 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les taux sériques de TNF- α

L'administration du DMBA chez les animaux a au bout de 4 mois entraîné une augmentation significative du taux sérique de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α ($504,87 \pm 50,95$ pg/L) comparativement au taux chez les animaux normaux ($221,39 \pm 22,00$ pg/L). L'administration de l'EEAa à la dose de 300 mg/Kg, Pc a significativement réduit le taux de TNF- α ($395,71 \pm 18,10$ pg/L) comparativement au taux obtenu chez les animaux du groupe DMBA. Le tamoxifène a présenté une meilleure efficacité que l'EEAa avec un taux de $178,4 \pm 20,34$ pg/L chez les animaux qui en recevaient (Figure 47).



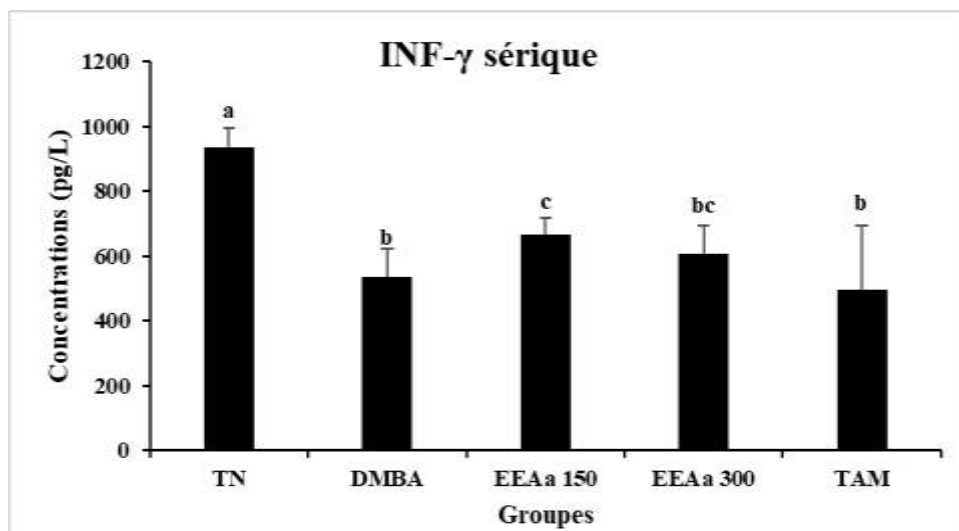
Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; TNF- α : tumour necrosis factor alpha pour un même paramètre, les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 47: Effet de l'EEAa sur les taux sériques de TNF- α

II.3.2.2 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les taux sérique d'INF- γ

Quatre mois après l'administration SC du DMBA, on a noté une baisse significative du taux de la cytokine antiinflammatoire INF- γ ($534,00 \pm 87,12$ pg/L) comparé aux valeurs obtenues chez les animaux du groupe TN ($935,98 \pm 58,24$ pg/L). Cependant, l'administration

de 150 mg/Kg, Pc d'EEAa durant le 4^{ème} mois après l'administration du DMBA a entraîné une augmentation significative du taux sérique d'INF- γ (664,00 $\pm$ 54,45 pg/L) comparativement aux taux obtenus chez les animaux non traités (DMBA). Le tamoxifène a été moins efficace que l'EEAa car, il n'a pas entraîné une amélioration du taux de cette cytokine anti-inflammatoire (Figure 48).

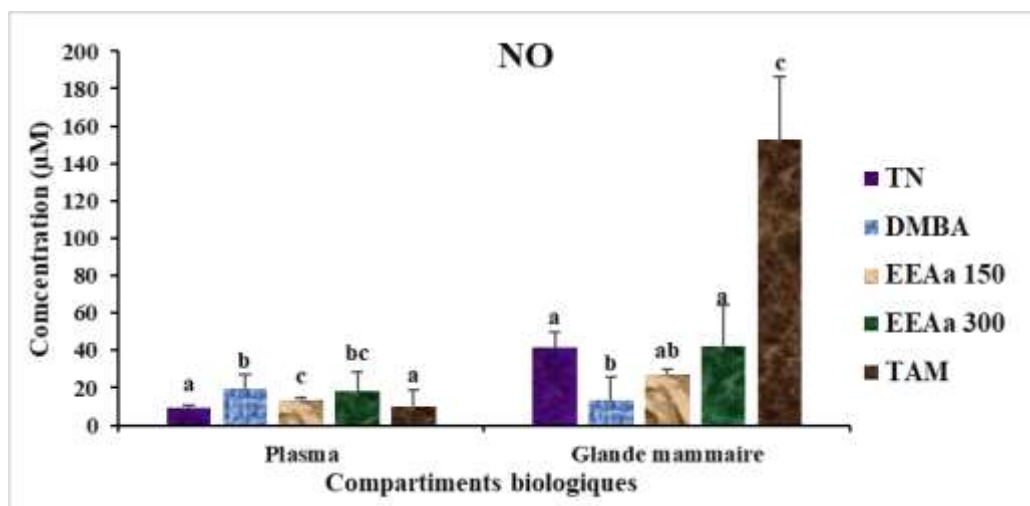


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEAa 150 & EEAa 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; INF- γ : interféron gamma ; pour un même paramètre, les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 48: Effet de l'EEAa sur les taux sériques d'INF- γ

II.3.3 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* sur le taux d'oxyde

L'oxyde nitrique (NO) a été dosé dans le plasma et les homogénats de glande mammaire. Il en résulte une augmentation significative du taux de NO dans le plasma et une baisse non significative dans la glande mammaire des animaux du groupe DMBA comparé au groupe normal (TN). Le traitement des animaux avec l'EEAa à la dose de 150 mg/Kg, PC a entraîné une baisse significative ($P < 0,05$) de son taux dans le plasma comparativement au groupe DMBA. Cependant la dose de 300 mg/Kg, Pc D'EEAa a entraîné une augmentation significative du taux de NO dans la glande mammaire comparativement au groupe DMBA. Par ailleurs, le TAM a été plus efficace de l'EEAa dans les deux cas (Figure 49).

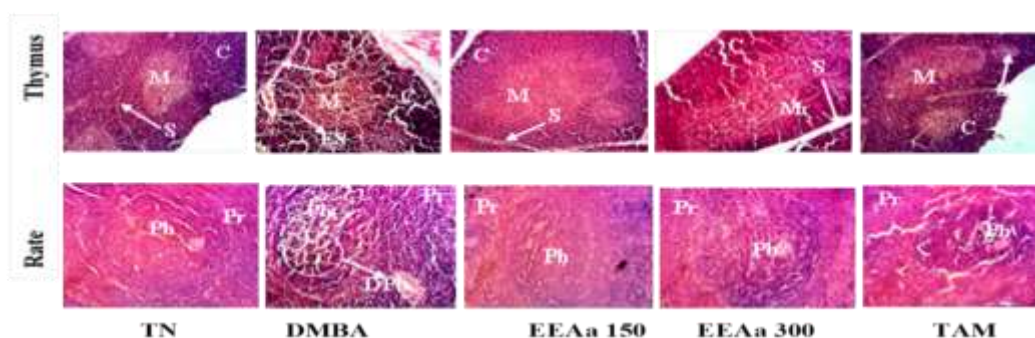


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEaA 150 & EEaA 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; pour un même compartiment, les groupes affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 49: Effet de l'EEaA sur les taux plasmatiques et mammaires de NO

II.3.4 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur l'histologie des organes lymphoïdes

Il ressort de la Figure 50 que le DMBA a entraîné une désorganisation de la pulpe blanche au niveau de la rate et au niveau du thymus, une diminution de la densité des lymphocytes corticales et un épaississement du septum interlobulaire comparativement au groupe normal qui présente une structure normale de la rate avec une pulpe blanche et rouge bien différenciées. L'administration de l'EEaA ou du tamoxifène, a rehaussé la densité des lymphocytes corticales et amélioré l'organisation de la pulpe blanche de la rate comparativement au groupe DMBA.



TN : témoin normal ; DMBA : animaux malades non traités ; EEaA 150 & EEaA 300 : animaux malades, traités avec l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; Pb : pulpe blanche ; Dpb = Désorganisation de la pulpe blanche ; Pr : pulpe rouge ; S : septum interlobulaire ; M : Couche médullaire ; C = Cortex, ES = Epaississement du septum interlobulaire.

Figure 50: Effet de l'EEaA sur la microarchitecture de la rate (H&E $\times$ 100) et du thymus (H&E $\times$ 40)

II.3 Discussion partielle II

Selon l'*American Cancer Institute*, un extrait végétal est déclaré antiprolifératif pour une lignée cancéreuse et capable de présenter une efficacité *in vivo* lorsque sa CI_{50} après 72 d'exposition est inférieure à 30 $\mu\text{g/mL}$ (Ogbole *et al.*, 2017). L'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* (EEAa) pourrait donc être considéré comme tel car, il a inhibé la prolifération des cellules MCF-7 du cancer de sein avec une CI_{50} de 9,66 $\mu\text{g/mL}$ après 72h d'exposition (Tableau VIII). Avec une telle CI_{50} ($5\mu\text{g/mL} < CI_{50} < 10\mu\text{g/mL}$), on classerait l'EEAa comme modérément antiprolifératif pour la lignée cellulaire MCF-7 selon le même organisme. Pour mieux apprécier la potentielle efficacité *in vivo*, l'activité anticancéreuse de l'extrait a été évaluée chez un modèle animal de cancer du sein induit au 7, 12-diméthylbenz-(a)-anthracène (DMBA). Etant donné que dans les pays en voie de développement et au Cameroun en particulier, le cancer du sein est généralement diagnostiqué à un stade avancé (MINSANTE, 2020 ; Nguefack *et al.*, 2012), une approche curative a été envisagée dans cette étude afin de satisfaire aux besoins de notre société.

Le DMBA est un hydrocarbure aromatique polycyclique, hautement cancérigène utilisé en laboratoire pour induire des tumeurs dont celui du sein (Karimi *et al.*, 2018). Dans la présente étude, après administration d'une dose unique de 50 mg/Kg, PC de DMBA des tumeurs se sont développées chez les rates au bout de 4 mois (Tableau IX). Ces résultats sont conformes aux données de la littérature, faisant mention d'une nécessité de 16 à 20 semaines pour le développement des tumeurs mammaires après une administration du DMBA à dose unique (Balzm *et al.*, 2018 ; Zingue *et al.*, 2018 ; Bishayee *et al.*, 2016). La progression tumorale chez ces animaux était accompagnée d'une augmentation des taux circulants de facteurs de croissance (EGF et estradiol) et d'une baisse du taux de glucose dans la glande mammaire (Figures 42, 43 et 44). Il a été montré que, le DMBA entraînait chez les rats de souche *Sprague Dawley* une diminution de l'expression de la GnRH, et de son récepteur hypophysaire, bloquant ainsi les poussées de FSH et LH et maintenant le taux sanguin d'estradiol élevé (Kerdelhué *et al.*, 2016). Par ailleurs des évidences scientifiques soutiennent que, le DMBA induit les tumeurs mammaires par stimulation de l'expression des gènes des voies des RE et récepteurs à EGF (Ma *et al.*, 2018). Le glucose étant le métabolite de préférence des cellules cancéreuses, une croissance tumorale serait naturellement accompagnée d'une consommation excessive de glucose par ces cellules. Par ailleurs, similairement aux résultats obtenus dans la présente étude (Figure 47), Akhouri *et al.* (2020) et Kong et Xu (2018) avaient montré que l'administration du DMBA chez les rats était

associée à une augmentation des médiateurs de l'inflammation tels que, TNF- α , Interleukin-1 β (IL-1 β) et Interleukin-6 (IL-6), à travers l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B. De même, une baisse du taux d'INF- γ noté dans ce travail (Figure 48) serait favorable à la progression tumorale (**Jorgovanovic et al., 2020**).

Le traitement des animaux avec l'EEAa aux doses testées a entraîné une baisse de l'incidence tumorale de 40% comparativement au groupe DMBA. Cela était accompagné d'une réduction significative du poids moyen des tumeurs (EEAa 150) et une diminution de la taille des tumeurs (EEAa 300). Ceci s'expliquerait par la capacité des composés bioactifs de l'extrait à empêcher la transition G1/S du cycle des cellules tumorales ou à entraîner leur mort par apoptose tel qu'obtenue dans la première partie de ce travail. En effet, il avait été constaté que le traitement des cellules YUMM 1.7 avec l'EEAa entraînait une surexpression du TGF- β , conduisant à la répression des facteurs de transcriptions E2F1 et E2F2 selon le mécanisme décrit par **Zhang et al. (2017)**. Ces 2 facteurs de transcription étant nécessaires à la transcription des gènes impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire (**Vantura et Giodano, 2019**). Par ailleurs, il avait été obtenu une répression du gène anti-apoptotique BCL-2 et une expression protéique de la caspase-3 active, témoignant une stimulation de la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose. Ces activités pourraient être attribuées aux terpenoïdes présents dans l'extrait tel que l' α -pinène dont les propriétés anticancéreuses ont déjà été démontrées (**Araújo-Filho et al., 2021 ; Hou et al., 2019**). De plus, la présence de composés phénoliques (Quercetine) dans l'extrait ne serait pas en reste car ils ont la capacité d'empêcher l'angiogenèse, en réduisant l'expression du facteur de croissance de l'épithélium vasculaire (VEGF), facilitateur de la vascularisation et du développement tumoral (**Chojnacka et Lewandowska, 2020**).

L'inhibition de la progression tumorale par l'EEAa était également accompagnée d'une baisse du taux sérique des facteurs de croissance et de survie notamment l'estradiol à la dose de 300 mg/Kg, Pc, l'EGF aux 2 doses et le taux mammaire de glucose à la dose 150 mg/Kg, Pc. De plus, comme prédit par l'étude *in vitro* (Partie I), une baisse du taux de TNF- α a été noté, et ceci accompagné d'une augmentation du taux de cytokine antiinflammatoire INF- γ . L'amélioration des taux de ces cytokines serait due à la protection assurée par l'EEAa au niveau des organes lymphoïdes. En effet, les alcaloïdes Isoprinosines et piperine présents dans l'extrait seraient capables de stimuler respectivement la synthèse des GB au niveau des organes lymphoïdes (**Patil et al., 2012**) et la différenciation lymphocytaire (**Sinula et Kuttan, 2004**). Ces activités auraient donc entraîné l'augmentation du taux de globule blanc, avec un taux

élevé de monocytes et lymphocytes telle qu'observée à la numération sanguine (Tableau XI). Les monocytes auraient ainsi produit de l'IL-10 dont les voies de signalisation en aval de son récepteur auraient entraîné la baisse du taux de TNF- α selon le mécanisme décrit par **Gushiken et al. (2022)** et **Hutchings et al. (2013)** et rappelé dans la partie I. De même, les lymphocytes en se différenciant en Lymphocytes T (LT) CD4⁺ et CD8⁺, produiraient d'avantage l'INF- γ (**Burke et Young, 2019**) dont les taux élevés stimuleraient l'activité cytotoxique des LT effecteurs (**Hu et Ivashkiv, 2009**). L'INF- γ pourrait également agir directement en forçant l'expression des caspases 3 et 7 au sein des cellules cancéreuses par l'intermédiaire de la signalisation JAK-STAT1, conduisant à la mort par apoptose (**Song et al., 2019**). Cette voie de signalisation pourrait également conduire à une répression des protéines *SLC7A11* et *SLC3A2*, constituant du système anti-porteur glutamate-cystine. Ceci aurait pour conséquence une inhibition de l'activité de la glutathion peroxydase, une accumulation des radicaux peroxydes et donc la mort des cellules cancéreuses par ferroptose (**Wang et al., 2019**).

Cette activité immunomodulatrice avec baisse du taux de TNF- α et la capacité de l'EEAa à réprimer l'IL-6 (Figure 40) seraient à l'origine de la baisse du taux d'estradiol dans les groupes traités avec l'EEAa. En effet il est connu que, les cellules tumorales et les cellules immunitaires associées à la tumeur peuvent produire des facteurs tels que la prostaglandine E2, le TNF- α et l'IL-6 qui vont stimuler l'expression de l'aromatase par les fibroblastes associés à la tumeur (**Johnston et Dowsett, 2003**). De plus, le Stigmasterol, un phytosterol identifié dans l'EEAa serait un précurseur de la synthèse la testolactone, un inhibiteur de l'aromatase (**Lone et Bhat, 2015**). Ces actions auraient pour conséquence une baisse de la synthèse de l'estradiol à partir des androgènes. La baisse du taux d'estradiol limiterait ainsi l'activité transcriptionnelle de ses récepteurs, avec pour conséquence une baisse de l'expression RE-dépendante des gènes tels que l'EGF.

Concernant le taux de glucose dans la glande mammaire, la capacité de l'EEAa à réprimer l'IGF-1 et inhiber la signalisation par son récepteur tel que présenté dans la partie I serait à l'origine de la baisse d'utilisation du glucose par ces cellules mammaires. En effet le facteur de transcription HIF-1 α dont l'activation est dépendante des voies en aval du récepteur à IGF-1 (**Fukuda et al., 2002**), induirait la transcription des gènes codant pour des enzymes glycolytiques (**Kierans et Taylor, 2021**). Par ailleurs, les composés phénoliques seraient également capables d'agir comme inhibiteurs spécifiques des transporteurs de glucose dans les lignées cellulaires du cancer du sein (**Xintaropoulou et al., 2015 ; Moreira et al., 2013**).

La modulation du taux de NO ne serait non plus à négliger car, son taux bas observé dans la glande mammaire des rates du groupe DMBA aiderait à la résistance à la mort, l'angiogenèse et l'invasion tumorale par augmentation de l'hyperperméabilité de l'endothélium vasculaire. Cette dernière favoriserait la libération du VEGF, l'augmentation de la perméabilité du système vasculaire tumoral et la régulation de l'expression des métalloprotéases de la matrice (MMP2 et MMP9) (**Huang et al., 2016**). L'administration de l'extrait a entraîné une baisse du taux de NO plasmatique (150mg/kg, Pc) et une augmentation du taux de NO mammaire (300mg/kg de Pc). Au niveau tumoral, il est connu que la plupart des médicaments cytotoxiques agissent par induction d'un stress oxydant au sein de la cellule tumorale (**Holotiuk et al., 2019**). Tel est le cas du tamoxifène utilisé comme traitement de référence dans ce travail. Il a été montré que, le tamoxifène augmente la concentration intra mitochondriale de Ca^{2+} et stimule l'activité de la NO synthase mitochondriale (mtNOS) de cellules MCF-7 du cancer du sein humain. Il s'en suit tour à tour une nitration de certaines protéines mitochondriales, une diminution de l'activité catalytique de la succinyl-CoA:3-oxoacide CoA-transférase, une entrave à la respiration mitochondriale, une augmentation de la peroxydation lipidique mitochondriale, une libération du cytochrome c conduisant à la mort par apoptose des cellules (**Nazarewicz et al., 2007 ; Masarone et al., 2018**). Ce mécanisme serait utilisé par l'EEAa pour induire la mort des cellules tumorale. Par ailleurs, cette activité serait due à la capacité des composés bioactifs de l'EEAa à stimuler la production de NO par les cellules immunitaires infiltrant la tumeur, favorisant ainsi la lutte anti-tumorale (**Vanini et al., 2015**). Au niveau plasmatique, la baisse du taux de NO jouerait un rôle modulateur de la réponse immunitaire antitumorale par sa capacité à supprimer la prolifération et l'infiltration leucocytaire, (**Babykutty et al., 2012**) telle qu'observé à l'histologie.

Conclusion partielle II

En somme pour cette partie, l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* ralentit laprogression tumorale *in-vivo* en réduisant les taux circulant d'estradiol et d'EGF. Cet extrait réduit le taux de cytokine pro-inflammatoire TNF- α et augmente le taux de cytokine anti-inflammatoire INF- γ , en modulant la production des cellules immunitaires. Il pourrait inhiber l'angiogenèse et l'invasion tumorale par la baisse le taux plasmatique de NO. Par ailleurs, il induirait un stress oxydant au niveau des cellules tumorales par induction de la production de NO, pouvant conduire à la mort cellulaire.

Au regard des effets anti-estrogénique de l'EEAa au niveau plasmatique contrairement au tamoxifène, il a été envisagé d'évaluer l'effet protecteur de l'EEAa contre les effets toxiques associés à la prise du tamoxifène (modulateur sélectif des RE) chez un modèle animal de cancer du sein.

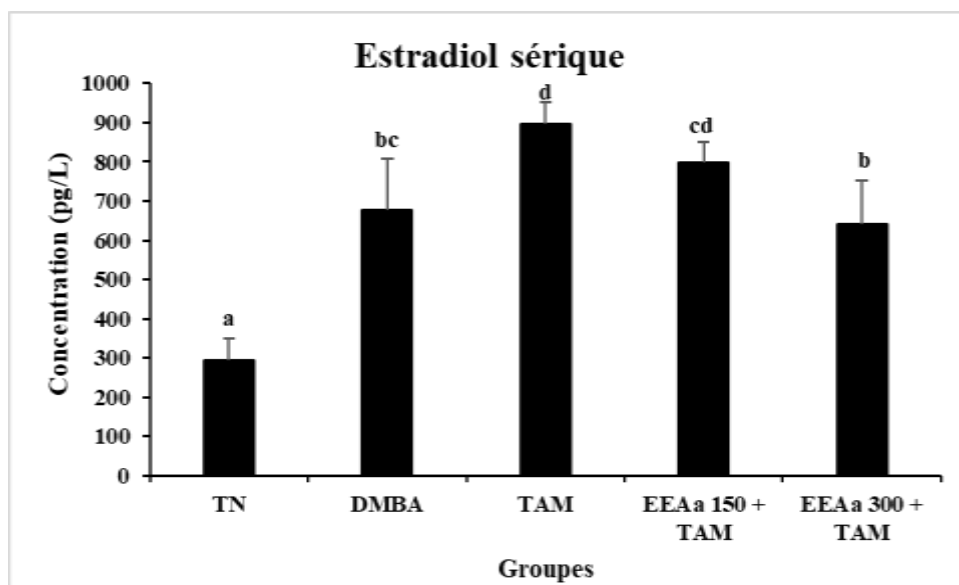
Partie III : Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* contre quelques effets indésirables associés à la prise du tamoxifène chez un modèle animal de cancer du sein

III.1 Effet protecteur de l'EEAa contre le développement d'une hyperplasie de l'endomètre utérin induite par le tamoxifène

Deux paramètres ont été exploités pour évaluer l'effet protecteur de l'EEAa contre une hyperplasie induite par le tamoxifène chez les rats femelles souffrant de cancer. D'une part le taux d'estradiol sérique et d'autre part l'épaisseur de l'endomètre utérin à l'histologie.

III.1.1 Réduction du taux d'estradiol sérique par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'effet de l'EEAA sur le niveau sérique d'estradiol est enregistré sur la Figure 51. L'administration d'une dose unique de DMBA ($667,34 \pm 40,92$ pg/L) a entraîné une augmentation significative du taux d'estradiol comparé aux TN ($293,30 \pm 57,21$ pg/L). Le tamoxifène (TAM) administré seul a exacerbé cette augmentation ($p < 0.05$) ($896,85 \pm 54,57$ pg/L) par rapport au groupe DMBA non traité. Cependant, la co-administration avec 300 mg/Kg, PC d'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* (EEAA 300 + TAM) a significativement réduit ce taux ($639,82 \pm 43,41$ pg/L) par rapport à celui du groupe TAM. ($p < 0.05$) en le ramenant à des valeurs proches du groupe DMBA.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 51: Effet de l'EEAa sur le taux d'estradiol sérique chez les rats traités au TAM

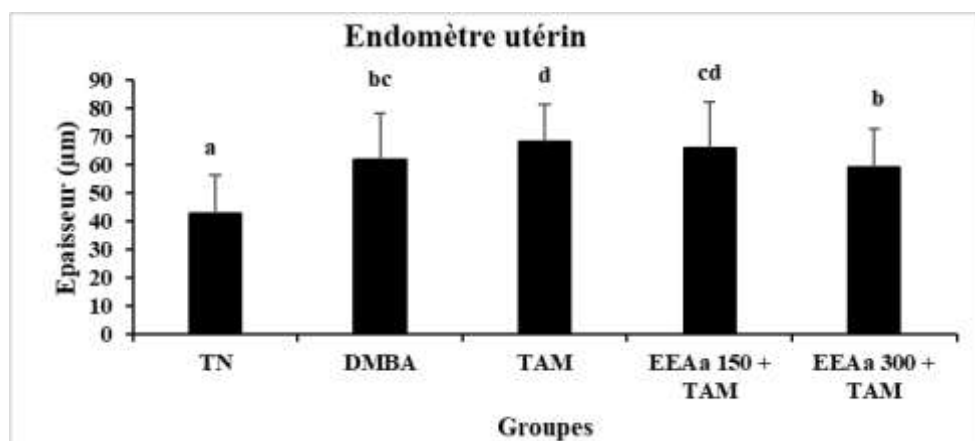
III.1.2 Protection de l'épithélium utérin par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'histologie H&E de l'endomètre utérin a montré une désorganisation structurale de ce tissu chez les animaux recevant le tamoxifène (TAM) tandis que, l'endomètre des animaux co-traités présentait une amélioration de cette architecture de façon dose dépendante (Figure 52). Par ailleurs, la mesure de l'épaisseur de l'épithélium utérin (Figure 53) a révélé un épaissement de l'endomètre utérin dans le groupe DMBA comparé au groupe TN. L'administration du TAM seul a d'avantage favorisé une augmentation de cette épaisseur comparée au groupe DMBA ($p < 0.05$). En revanche, l'association de l'EEAa aux 2 doses a concouru à la réduction de cette épaisseur, avec une nette différence à la dose de 300 mg/Kg, Pc, comparé au groupe TAM ($p < 0.05$).



DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 + TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène.

Figure 52: Effet de l'EEAa sur la microarchitecture de l'endomètre utérin chez les rats traités au TAM



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 + TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

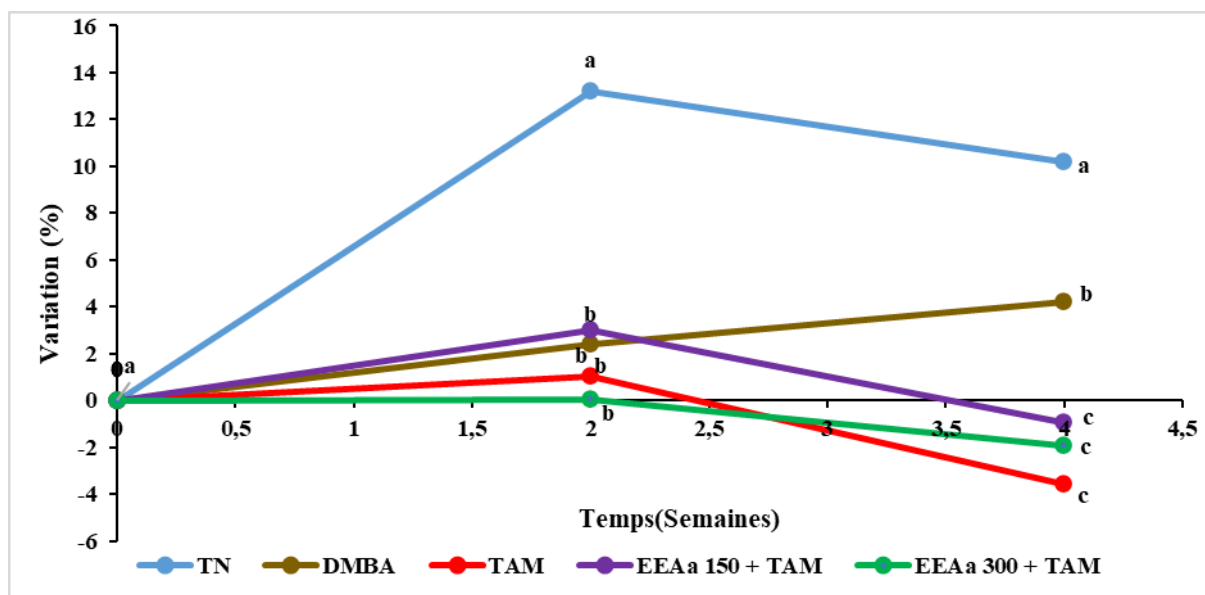
Figure 53: Effet de l'EEAa sur l'épaisseur de l'épithélium de l'endomètre utérin chez les rats traités au TAM

III.2 Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* contre quelques troubles métaboliques induits par le tamoxifène

Il s'agissait de la variation du poids corporel et des taux plasmatiques de CT et TG

III.2.1.1 Effet protecteur de l'EEAa contre la perte de poids corporel induite par le tamoxifène

Au cours des deux premières semaines de traitement, tous les animaux, à l'exception de ceux du groupe EEAA 300+TAM, ont montré un gain de poids. En revanche, au cours des 2 dernières semaines, tous les animaux, à l'exception de ceux du groupe DMBA, ont présenté une perte de poids. A la fin du traitement, le gain de poids était significativement plus faible chez le groupe DMBA comparativement au TN. L'administration du TAM seul a entraîné une perte de poids plus prononcée que celle observée dans le groupe DMBA ($p < 0.05$). Cependant l'administration préalable de l'EEAa aux doses testées avant le TAM a limité la perte de poids bien que la différence n'ait pas été significative comparée au groupe TAM (Figure 54).

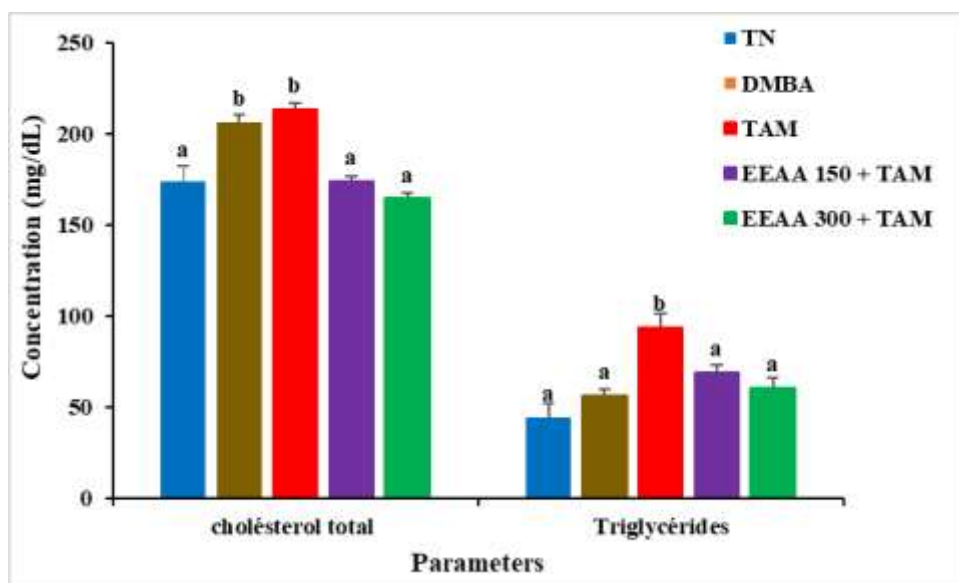


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 54: Effet de l'EEAa sur la variation du poids des rats traités au TAM

III.2.1.2 Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* contre les dyslipidémies induites par le tamoxifène

L'effet de l'EEAa sur le profil lipidique est représenté par la Figure 55 ci-dessous. Il en ressort que, le DMBA a entraîné une augmentation significative du taux de CT ($206,44 \pm 4,13$ mg/dL) comparé au groupe TN ($173,65 \pm 8,40$ mg/dL) tandis que le taux de TG n'a pas été impacté. L'administration du tamoxifène a entraîné chez les rats cancéreux une augmentation significative du taux de triglycéride ($93,89 \pm 7.23$ mg/dL) comparativement aux animaux malades non traités ($56,343.52$ mg/dL) tandis qu'aucune modification significative du taux de cholestérol total n'a été observée entre ces deux groupes. L'administration concomitante du tamoxifène et de l'extrait aux doses testées (150 et 300 mg/Kg, PC) a entraîné une amélioration significative ($P < 0,05$) des taux de triglycérides (69,01 et 60,56 mg/dL respectivement) et de cholestérol total (173,99 et 164,43 mg/dL respectivement) comparativement à l'administration seule du tamoxifène., ramenant les valeurs proches de celles du TN.



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$)

Figure 55 : Effet de l'EEAa sur la cholestérolémie et la triglycéridémie des rats traité au TAM

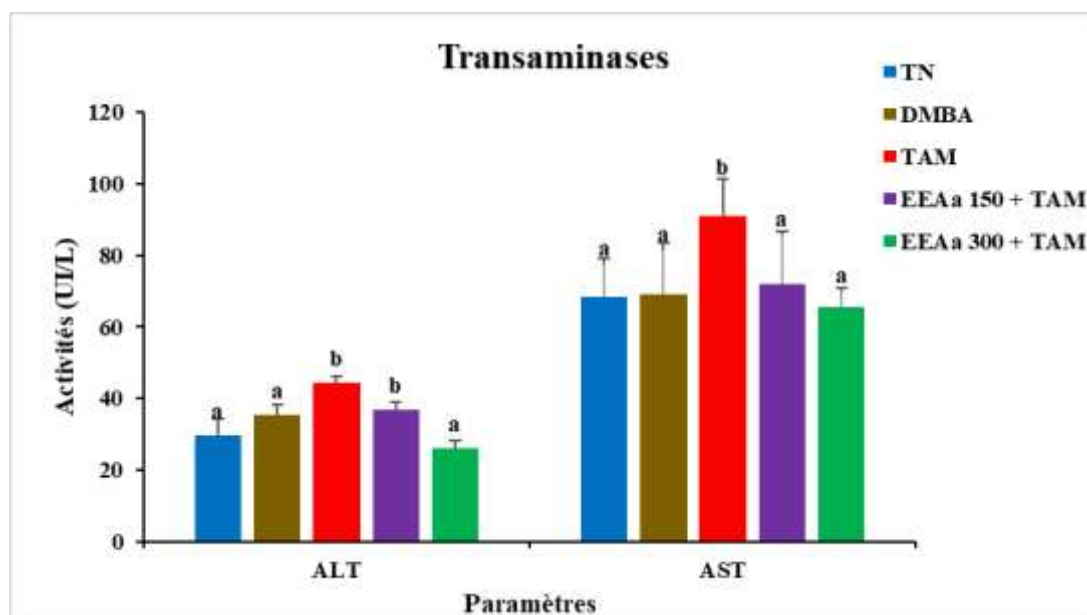
III.3 Effet protecteur de l'extrait éthanolique de graine d'*A angustifolium* contre une toxicité hépatique et rénale induite par le tamoxifène

Le foie et les reins étant également les organes cibles des effets indésirables associés à la prise du tamoxifène, leur intégrité a également été évaluée

III.3.1 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* sur les marqueurs d'atteinte hépatique

a) Réduction de l'activité plasmatiques des transaminases par l'EEAa

L'administration d'une dose unique de 50 mg/Kg, Pc de DMBA n'a au bout de 4 mois pas entrainé une modification significative de l'activité plasmatique des transaminases comparé au groupe TN (Figure 56). Le traitement des animaux avec le TAM durant le 4^{ème} mois a entrainé une augmentation significative des activités de l'ALT ($44,5 \pm 1,57$ UI/L) et de l'AST ($91,8 \pm 10,16$ UI/L) par rapport au groupe non traité (DMBA). Le co-traitement avec la dose de 300 mg/Kg, Pc de l'EEAA a cependant réduit significativement l'activité ALT ($26,25 \pm 2,13$ UI/L) alors que, les activités de l'AST ont diminué ($p < 0,05$) avec les deux doses ($71,93 \pm 14,61$ UI/L et $65,42 \pm 5,61$ UI/L respectivement).

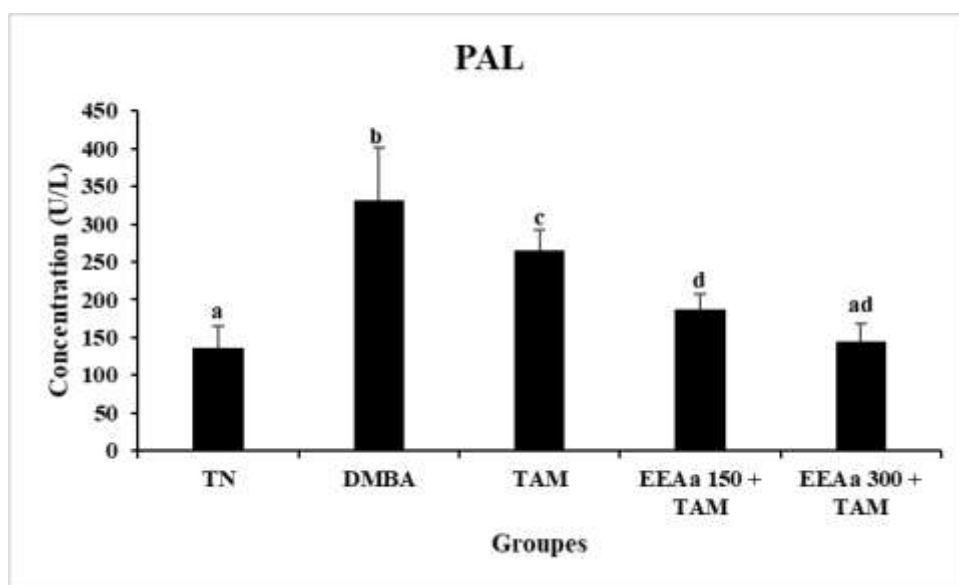


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; pour chaque paramètre, les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 56: Effet de l'EEAa sur l'activité plasmatique des transaminases chez les rats traités au TAM

b) Réduction de l'activité plasmatique de la phosphatase alcaline par l'EEAa

L'administration du DMBA a entraîné une augmentation significative de l'activité plasmatique de la PAL (331.65 ± 69.51 U/L) comparativement au groupe TN ($135,3 \pm 29,14$ U/L). Le traitement avec le tamoxifène a entraîné une diminution significative ($p < 0.05$) de son activité ($265,98 \pm 26,77$ U/L) par rapport au groupe DMBA. Le co-traitement avec le TAM et l'EEAA aux doses testées a significativement ($p < 0.05$) réduit l'activité ($186, 45 \pm 21,81$ U/L et $144,54 \pm 24,63$ U/L respectivement) par rapport à l'administration du tamoxifène seul (Figure 57).



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

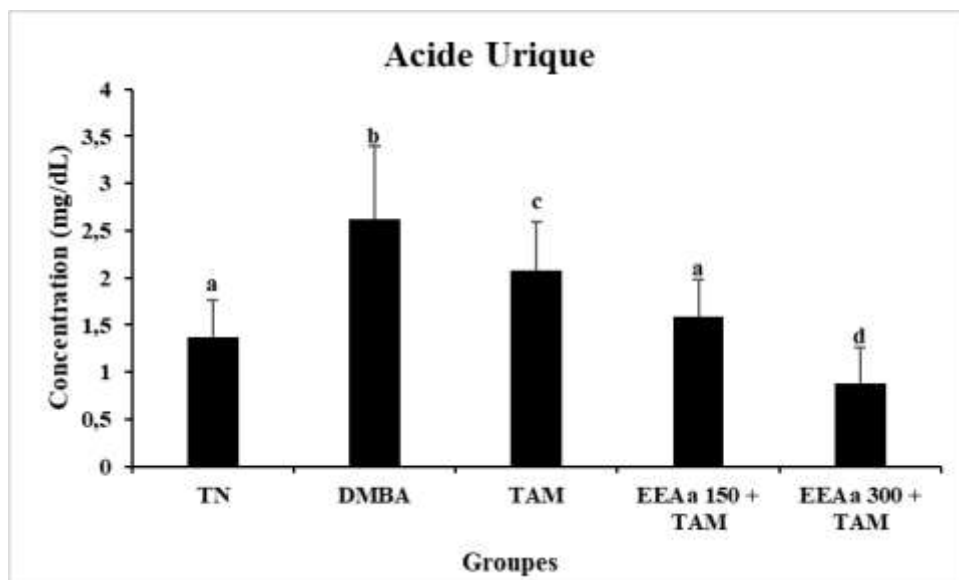
Figure 57: Effet de l'EEAa sur l'activité plasmatique de la phosphatase alcaline chez les rats traités au TAM

III.3.2 Effet de l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* sur les atteintes d'atteinte rénale

a) Réduction du taux plasmatique d'acide urique par l'EEAa

Il ressort de la Figure 58 que, L'administration du DMBA a entraîné une augmentation ($p < 0,05$) du taux d'acide urique plasmatique ($2,62 \pm 1,16$ mg/dL) comparé au groupe TN ($1,37 \pm 0,39$ mg/dL). Le traitement des animaux malades avec le TAM seul entraîne une diminution non significative du taux plasmatique d'acide urique par rapport au groupe DMBA. Cependant, le co-traitement avec l'EEAA aux deux doses a réduit son

niveau, avec une différence significative à la dose 300 mg/Kg, Pc ($0,87 \pm 0,37$ mg/dL) par rapport au groupe TAM ($2,08 \pm 0,52$ mg/dL).

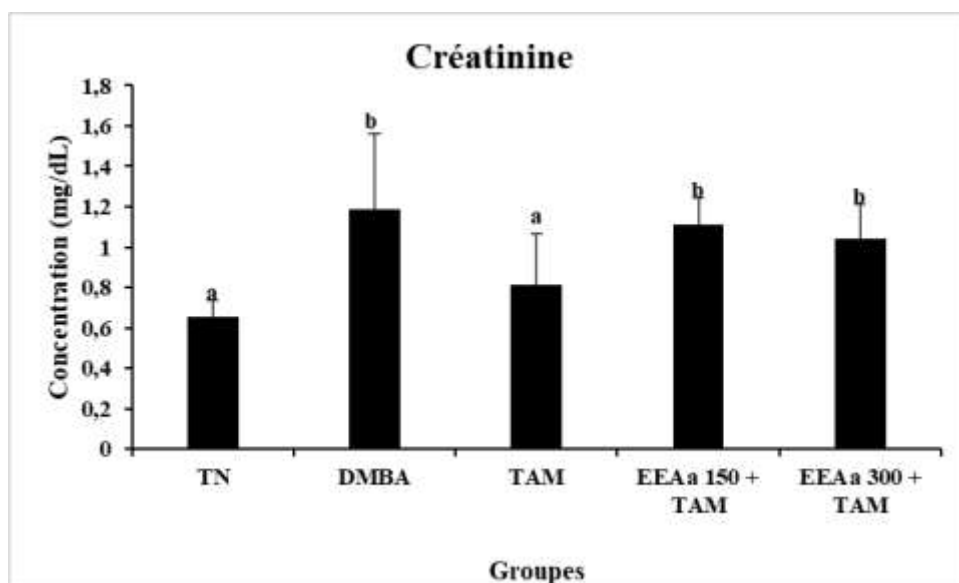


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 + TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 58: Effet de l'EEAa sur le taux plasmatique d'acide urique chez les rats traités au TAM

b) Réduction du taux plasmatique de créatinine par l'EEAa

La Figure 59 ci-dessous montre que, le DMBA a entraîné une augmentation significative de la concentration plasmatique en créatinine comparé au groupe TN. Le traitement des animaux avec le TAM a entraîné une baisse significative de son taux comparativement au groupe TAM. L'administration conjointe des extraits aux doses testées a entraîné une augmentation significative de taux plasmatique de créatinine comparativement au groupe TAM.

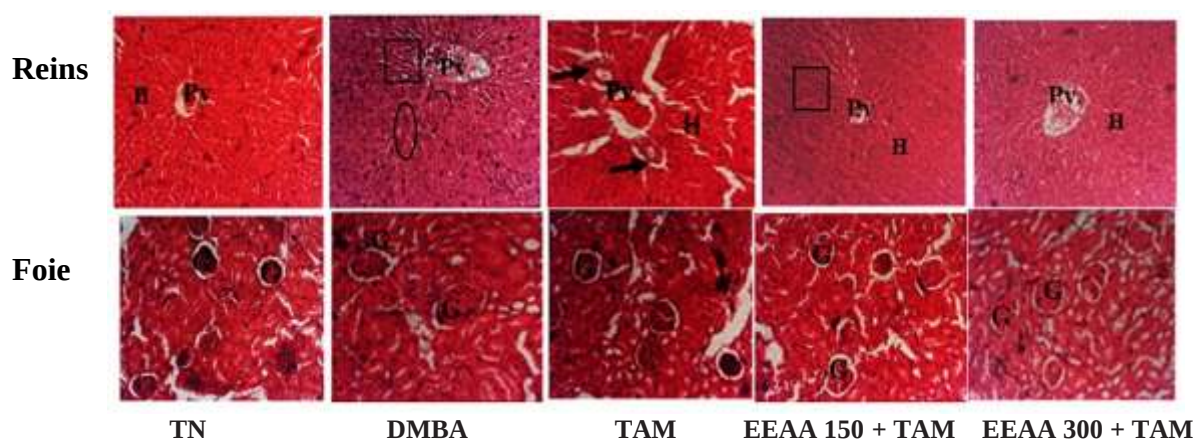


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 + TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; les groupes portant les lettres différentes (a, b) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 59: Effet de l'EEAa sur le taux plasmatique de créatinine chez les rats traités au TAM

III. 3. 4 Effet protecteur de la microarchitecture du foie et des reins par l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium*

L'administration de DMBA conduit à une détérioration de la structure des glomérules. Tous les groupes traités ont présenté une amélioration du nombre et de la structure des glomérules, et la meilleure observation a été obtenue à 300 mg/Kg, pc d'EEAA. L'histologie du foie dans le groupe DMBA a montré une infiltration lymphocytaire dans la zone périphérique alors qu'une détérioration de la veine centrale est observée dans le groupe TAM. Dans les groupes traités par l'extrait, l'architecture de la veine centrale est améliorée au fur et à mesure que la concentration de l'extrait végétal augmente (Figure 60).



DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEAa 150 +TAM & EEAa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène. H : hépatocytes ; PV : veine porte; → : gouttelette lipidique, G : glomérule

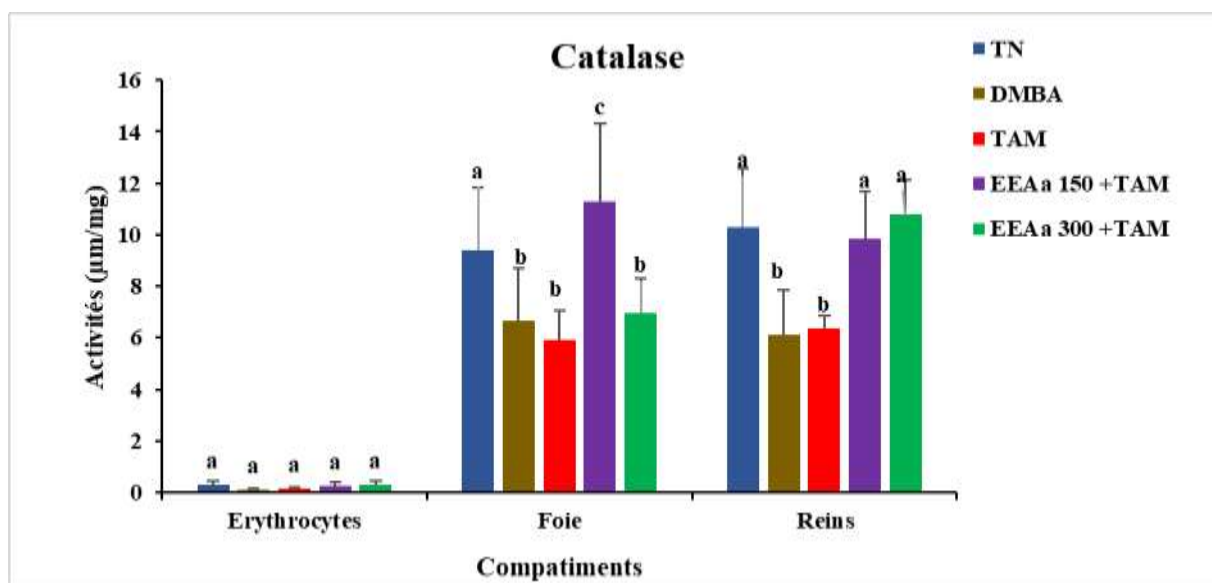
Figure 60: Effet de l'EEAa sur les microarchitectures du foie et des reins à l'histologie H&E (x200)

III.3.4 Mécanisme de protection du foie et des reins : activité antioxydante de l'EEAa

L'induction du stress oxydant par le tamoxifène étant l'un des mécanismes plausibles par lequel il favorise les atteintes hépatiques et rénales, l'activité de la catalase et le taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique ont été mesurées pour évaluer l'effet de l'EEAa sur le stress induit par le TAM.

III.3.1 Effet stimulateur de l'EEAa sur l'activité de la catalase

L'activité de la catalase a été mesurée dans les homogénats de foie et de rein, ainsi que dans l'hémolysât érythrocytaire. Aucun changement significatif n'a été noté dans les activités de la catalase au niveau érythrocytaire. Le DMBA a cependant entraîné une baisse significative de l'activité de la catalase hépatique ($6.64 \pm 2.05 \mu\text{mol/min/mg}$) et rénale ($6.12 \pm 1.71 \mu\text{mol/min/mg}$) comparativement au groupe TN (9.38 ± 2.47 et $10.32 \pm 2.27 \mu\text{mol/min/mg}$ respectivement). Aucune variation significative de l'activité n'a été observée au niveau hépatique et rénal entre les groupes TAM et DMBA. L'administration conjointe de TAM et d'EEAa a amélioré de façon significative l'activité de cette enzyme dans les reins aux deux doses (9.83 ± 1.86 et $10.79 \pm 1.35 \mu\text{mol/mg}$ respectivement), et dans le foie à 150 mg/Kg, P.c. ($11.31 \pm 3.01 \mu\text{mol/min/mg}$) comparativement au TAM administré seul (Figure 61).

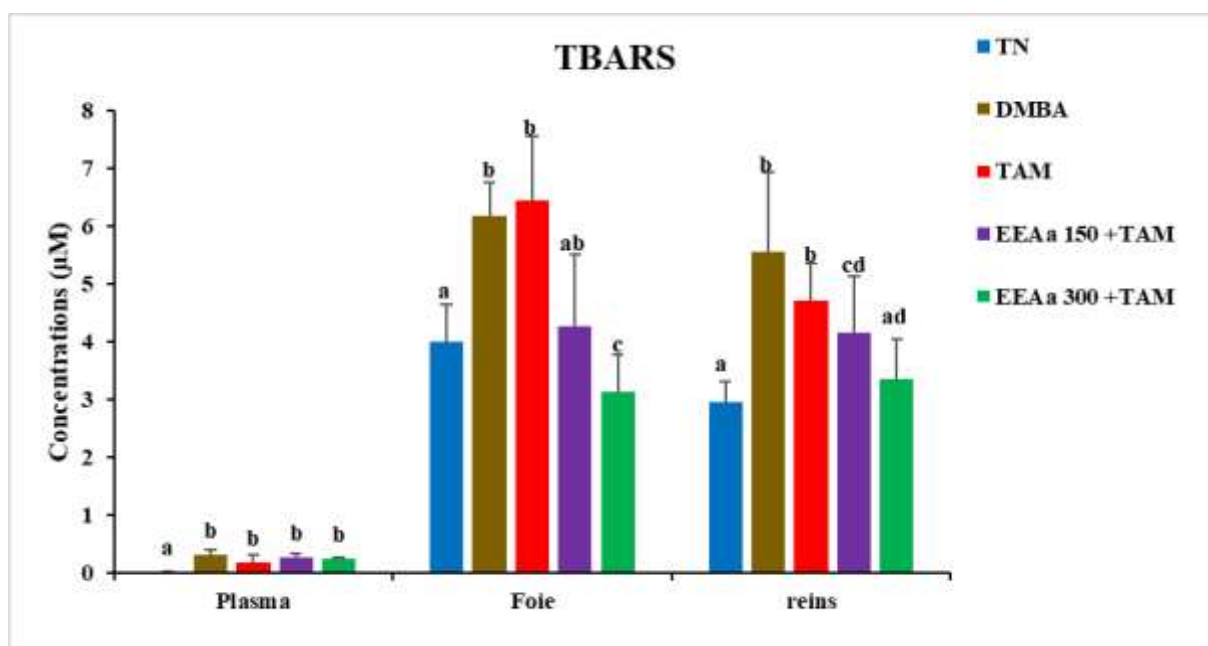


Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEa 150 + TAM & EEa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; pour chaque compartiment biologique, les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 61: Effet de l'EEAa sur l'activité érythrocytaire, hépatique et rénale de la catalase chez les rats traités au TAM

III.3.2 Réduction de taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique par l'EEAa

La peroxydation lipidique étant l'une des conséquences du stress oxydant, le taux de TBARS a été mesuré et les résultats sont représentés par la Figure 62 ci-dessous. Au niveau hépatique et rénal, le DMBA a entraîné une augmentation significative du taux de TBARS (6.17 ± 1.36 et 5.55 ± 1.36 μM respectivement) comparativement au groupe TN (3.99 ± 0.66 et 2.95 ± 0.35 μM respectivement). Le TAM a de façon non significative exacerbé l'observation faite avec le groupe DMBA dans le foie tandis qu'il a entraîné une baisse non significative du taux de TBARS dans les reins comparativement au groupe DMBA. Le co-traitement avec l'EEAa à 300 mg/Kg, PC a réduit significativement le niveau des TBARS dans le foie (3.12 ± 0.66 μM) et les reins (3.35 ± 0.71 μM) comparé au TAM administré seul (6.44 ± 1.01 et 4.70 ± 0.65 μM respectivement).



Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart type ; DMBA : animaux malades non traités ; TAM : animaux malades traités avec 3,3 mg/Kg, PC de tamoxifène ; EEa 150 + TAM & EEa 300 + TAM : animaux malades traités à l'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* aux doses respectives de 150 et 300 mg/Kg, PC puis du tamoxifène ; pour chaque compartiment biologique, les groupes portant les lettres différentes 'a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$).

Figure 62: Effet de l'EEa sur le taux plasmatique, hépatique et rénal des TBARS chez les rats traités au TAM

III.5 Discussion partie III

La plupart des tumeurs du sein diagnostiquées sont positives aux récepteurs ostrogéniques, et leur prise en charge passe donc par des thérapies endocriniennes adjuvants comme le tamoxifène (**Burstein et al., 2018**). Cependant, la récurrence des effets indésirables liés à ce médicament est responsable de la détérioration de la qualité de vie de la patiente (**Cella et Fallowfield, 2008**). Depuis quelques années, tel que suggéré par **Thompson et al. (2011)**, les recherches dans le cancer s'orientent également vers celle des substances naturelles à la fois antitumorales et capables de limiter les effets indésirables des médicaments. Au regard de cela, l'extrait éthanolique de graine d'*Aframomum angustifolium* s'inscrit comme un candidat prometteur dans ces recherches ; d'où l'évaluation de son effet protecteur contre les effets indésirables associés à la prise du tamoxifène envisagée dans cette partie du travail.

Le risque de développement d'un cancer de l'endomètre est l'effet secondaire le plus redouté de la prise de TAM qui agirait comme agoniste des RE utérin. Cet effet indésirable passe par une augmentation de l'épaisseur de l'endomètre (Hyperplasie) et l'augmentation du taux circulant d'estradiol (**Mvondo et al., 2020, Gu, 2017**) comme obtenu dans cette étude (Figures 51 à 53). En plus de son effet antagoniste des RE mammaires, il a été rapporté que le

tamoxifène a la capacité de stimuler la synthèse de l'estradiol dans les tissus non-gonadotropes à partir des androgènes par l'activité de l'aromatase (**Mvondo et al., 2020**). L'extrait éthanolique de graines d'*A. angustifolium* co-administré à la dose de 300 mg/Kg, PC avec le TAM a conduit à une diminution du taux d'estradiol sérique et de l'épaisseur de l'endomètre par rapport au TAM seul. Cette observation pourrait s'expliquer par la présence de composés bioactifs (stigmsterol) capables d'inhiber l'activité de l'aromatase, responsable de la synthèse de l'estradiol à partir du tissu adipeux (**Blakemore et Naftolin, 2016 ; Lone et Bhat, 2015**). Cela peut également être dû à la présence de métabolites secondaires dans l'EEAa à l'instar des flavonoïdes, qui peuvent agir comme des inhibiteurs compétitifs du RE, limitant la fixation de l'estradiol ou du tamoxifène, et donc empêchant la mitose des cellules épithéliales de l'endomètre (**Feng et al., 2017 ; O'Brien et al., 2006**).

Il a été révélé par **Klötting et al., (2020)** que, L'administration de tamoxifène entraînait une perte d'appétit et par conséquent une perte de poids comme obtenu dans cette étude (Figure 54). Cependant, il a été rapporté qu'une utilisation à long terme du tamoxifène pouvait entraîner la nécrose des cellules adipeuses, et conduire à une stéatose hépatique (**Owoade et al., 2022**). Dans la présente étude, il a été noté une augmentation des taux de triglycérides et de cholestérol total plasmatiques (Figure 55) et une accumulation des lipides dans le foie des animaux (Figure 61), suggérant une altération du métabolisme lipidique (**Hesselbarth et al., 2015**) chez les animaux traités uniquement au TAM. Bien que l'EEAa ait entraîné une légère augmentation du poids corporel, on a noté une baisse des taux de TG et de CT. Ces observations seraient dues à la présence des terpenoïdes dans l'EEAa. En effet, ces composés ont montré des aptitudes à inhiber la tyrosine phosphatase 1b hypothalamique, inductrice de l'activité antiobésogène de la leptine (**Kumar et al., 2022**). En effet, la leptine produite par les cellules adipeuses, pourrait induire la production neuronale du neurotransmetteur l'AgRP (*agouti-related protein*), qui va stimuler l'hyperphagie et donc entraîner la prise de poids (**Palmiter, 2018 ; Ahima et Antwi, 2006**). Cependant la baisse de la cholestérolémie et de la triglycémie observée serait due à la présence des flavonoïdes dans l'EEAa. Ces composés sont doués d'activité antiobésogène par inhibition de la lipase pancréatique, empêchant ainsi la digestion et l'absorption des lipides alimentaires (**Rufino et al., 2021 ; Nakai et al., 2005**). Par ailleurs, les flavonoïdes seraient capables d'améliorer le profil lipidique en inhibant l'adipogénèse par réduction de l'activité transcriptionnelle de la PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) (**Garcia-Barrado et al., 2020 ; Valli et al., 2018**).

La stéatose hépatique causée par le TAM est généralement accompagnée d'une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, PAL) au niveau plasmatique (**Yoo et al., 2020 ; Panchal et al., 2019**) tel que noté dans ce travail (Figure 56 et 57). L'amélioration de l'activité de la phosphatase alcaline avec l'administration du tamoxifène (Figure 58) reflèterait le potentiel de ce médicament à limiter les métastases osseuses. En effet, il est connu qu'une activité élevée de la phosphatase alcaline au niveau plasmatique chez les personnes souffrant de cancer pourrait être le reflet d'une invasion osseuse (**Lim et al., 2016**). Par ailleurs, l'administration du TAM a également entraîné une amélioration du taux plasmatique d'acide urique (Figure 59) suggérant une protection de la fonction rénale. L'administration conjointe de l'EEAa et du tamoxifène a entraîné une amélioration des activités plasmatique de enzymes hépatiques, du taux d'acide urique et une amélioration de la micro architecture du foie et des reins. Ces résultats suggèrent que l'EEAa pourrait protéger contre l'hépto-toxicité et une nephro-toxicité induites par le TAM lors d'une utilisation à long terme. **Ebhohimen et Okilie (2021) et Ebhohimen et al., (2020)** avaient déjà montré que, l'EEAa protégeait le foie et les reins des rats *Wistar* contre des dommages hépatiques et rénaux induits par le bromure de potassium. Ces résultats s'expliqueraient par le potentiel antioxydant de l'EEAa.

En effet, le tamoxifène stimulerait l'activité de la NO synthase mitochondriale, associé à la formation des peroxy-nitrites et par conséquent la peroxydation lipidique mitochondriale (**Nazarewicz et al., 2007**). Ceci concourt à la libération du cytochrome C, qui va induire une production accrue de peroxydes d'hydrogènes, responsable d'un stress oxydant (**Masarone et al., 2018**). L'extrait de plante (EEAa) aux doses testées a également réduit ($p < 0.05$) la concentration de TBARS dans le foie, et augmenté l'activité de la catalase, avec une significativité à 150 mg/Kg, PC dans le foie et aux deux doses dans les reins (Figures 61 et 62), suggérant une protection des membranes biologiques. Conformément aux résultats présentés dans la partie I de ce travail, le potentiel antioxydant des métabolites secondaires présents dans l'EEAa serait mis à profit pour protéger le foie et booster la protection rénale chez les animaux traités au TAM.

Les activités antioestrogéniques, antihyperlipidémiantes et antioxydantes de l'EEAa auraient ainsi contribué à empêcher l'accumulation des lipides dans le tissu hépatique tel qu'observé à l'histologie.

Conclusion partielle III

Au terme de cette partie ou il était question de d'explorer l'effet protecteur de l'EEAa contre les effets toxiques associé à la prise du tamoxifène chez un modèle animal de cancer du sein, il en ressort que :

- L'EEAa (300 mg/Kg,Pc) a prévenu d'une hyperplasie de l'endomètre utérin en réduisant le taux sérique d'estradiol
- L'EEAa aux doses testées a prévenu de la perte de poids et de l'hypertriglycémie induites par le TAM
- L'EEAa a prévenu d'une toxicité hépatique en boostant l'activité de la catalase (150 mg.Kg; Pc) et réduisant le taux de TBARS hépatiques (150 et 300 mg/Kg,Pc).

Discussion générale

Les cancers continuent de faire les ravages dans le monde malgré les avancées dans les moyens de prise en charge. En Afrique et particulièrement au Cameroun ; les cancers gynécologiques sont les plus prépondérants. Le cancer du sein à lui seul y représente plus du tiers des cancers féminin depuis 2020, avec une augmentation du taux de décès de 1,7% entre 2020 et 2022 (**Ferley et al., 2024, 2021**). En effet, au Cameroun, le niveau de pauvreté non favorable au diagnostic précoce de la pathologie serait en majeure partie responsable des taux de décès associés à cette pathologie (**MINSANTE, 2020**). Associé à cela, la faible disponibilité des médicaments anticancéreux, les couts élevés des traitements et leurs effets indésirables peu tolérés, poussent les patients à l'usage des thérapies complémentaires et alternatives (**His et al., 2021**). L'une d'elle est la phytothérapie, qui de façon générale est utilisée par plus de 80% de la population africaine pour la prise en charge de nombreuses pathologies (**Dibong et al., 2011**). Ainsi, la recherche de substances bioactives capables de limiter la prolifération des cellules cancéreuses et les effets indésirables associés aux traitements existants serait une approche prometteuse pour répondre aux besoins de notre société. La présente étude permet de classer l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* parmi ces substances, exploitables dans la prise en charge alternative et complémentaire d'un cancer du sein hormonodépendant.

En effet, les premières activités réalisées dans ce travail ont révélé la capacité de cet extrait (EEAa) à limiter la prolifération des cellules YUMM1.7 par arrêt G1/S du cycle cellulaire, réduction de l'inflammation tumorale, inhibition de l'angiogenèse et induction de la mort cellulaire par voie intrinsèque de l'apoptose. Ces différentes actions antiprolifératives de l'EEAa ont été attribuées à ses métabolites secondaires (α -pinène, β -caryophyllène, et Quercétine) identifiés par LC/MS. Les activités anticancéreuses et antiinflammatoires de ces composés ayant déjà fait l'objet de nombreuses études (**Gushiken et al., 2022 ; Ye et al., 2020 ; Gaban et al., 2019 ; Uadkla et al., 2013**). Les cellules cancéreuses partageant en commun ces caractéristiques, ces observations ont permis d'envisager l'exploration de cet extrait dans la prise en charge alternative et complémentaire d'un cancer du sein hormonodépendant induit chez le rat *Wistar*.

D'entrée de jeu, un test de cytotoxicité au MTT sur les cellules cancéreuses du sein de la lignée MCF-7 (RE+) a permis de classer l'EEAa comme modérément antiprolifératif, selon l'*American Cancer Institute*. *In vivo* chez les rats ayant subi l'induction d'un cancer du sein avec du DMBA, le potentiel antiinflammatoire de l'EEAa a été confirmé. Ceci était associé à

une immunomodulation antitumorale, attribuée aux composés tels que la pipérine, l'isoprinosine et le 6-gingérol identifiés dans l'EEAa. Ces composés seraient capables de stimuler la production des globules blanc par les organes lymphoïdes, stimuler la différenciation lymphocytaire et améliorer l'index phagocytaire (**Patil et al., 2012 ; Sinula et Kuttan, 2004**). Grace à cette activité antiinflammatoire et immunomodulatrice de l'extrait, associée à l'action antiaromatase du stigmastérol présent dans l'extrait, la production de l'estradiol par action de l'aromatase sur les androgènes serait réduite. (**Lone et Bhat, 2015 ; Johnsto et Dowsett, 2003**). On assisterait ainsi à la baisse de l'activité transcriptionnelle des RE, avec pour conséquence une baisse de la survie, de la prolifération et de la croissance tumorale ; marqué par la diminution des paramètres tumoraux physiques observé dans ce travail.

Par ailleurs, simultanément à cet effet antitumoral, la baisse du taux circulant d'estradiol a été favorable à la protection de l'endomètre utérin contre une hyperplasie induite par le tamoxifène. En plus de lu potentiel antiinflammatoire de l'extrait évoqué, l'activité antihyperplasique observé serait également due à la présence d'autres flavonoïdes dans l'extrait. Ces derniers pourraient agir comme inhibiteur compétitif des RE utérin, limitant l'effet agoniste du TAM sur ces récepteurs (**Feng et al., 2017**). En plus de protéger de l'hyperplasie de l'endomètre, l'EEAa a également limité la perte de poids chez les animaux tout en empêchant l'hyperlipidémie. Cette activité a été associé à la présence conjointe de terpenoïdes et flavonoïdes dans l'EEAa. L'un stimulant l'hyperphagie via l'activation de la leptine (**Kumar et al., 2022**) et l'autre limitant la digestion des lipides par la lipase pancréatique et la synthèse des TG et CT via la réduction de l'activité transcriptionnelle de la PPAR- γ (**Rufino et al., 2021**). Par ailleurs, de par son potentiel antioxydant prouvé dans la première partie de ce travail, l'EEAa a protégé le foie des dommages oxydatifs causés par le métabolisme du TAM. En effet, la présence des composés tel que l' α -pinène dans l'EEAa aiderait à la stabilisation des EROs produit lors du métabolisme de tamoxifène, empêchant ainsi l'attaque des membranes cellulaires par peroxydation lipidique (**Karthikeyan et al., 2019**). Ce composé serait également à même d'activer l'expression des enzymes antioxydantes telle que la catalase, concourant à détoxifier du peroxyde d'hydrogène libéré suite à la peroxydation mitochondrial induite par le tamoxifène (**Masarone et al., 2018 ; Nazarewicz et al., 2007**). La protection des hépatocytes contre les effets du stress étant ainsi marqué par la baisse de l'activité plasmatique des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, PAL).

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au terme de ce travail dont l'objectif général était d'évaluer les activités anticancéreuses de l'extrait éthanolique de graines d'*Aframomum angustifolium* *in vitro* et *in vivo*, ainsi que son effet protecteur contre les effets indésirables associés à la prise du tamoxifène, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

L'EEAa contient les composés phénoliques les alcaloïdes et les terpenoïdes. L'extrait a exhibé des potentiels anti-radicalaires contre le DPPH, ABTS et du NO, et réducteur du fer et du molybdate. Il a inhibé la prolifération des cellules cancéreuses YUMM1.7 (IC₅₀ = 31,5 µg/mL) chez lesquelles à la concentration de 250 µg/mL, il a entraîné un arrêt G1/S du cycle cellulaire, limité l'inflammation induit la mort cellulaire par voie intrinsèque de l'apoptose ;

L'EEAa a modérément inhibé la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF-7 (CI₅₀ : 9,66µg/mL). Aux doses de 150 et 300 mg/Kg,Pc, il a présenté une activité antitumorale en réduisant le taux circulant promoteurs de croissance (EGF et estradiol) en limitant l'utilisation du glucose par les cellules mammaires. L'EEAa a exercé une activité anti-immunosuppresseur en entraînant une augmentation du taux de globules blancs, du taux d'INF et en réduisant le taux de TNF-α ;

✚ L'extrait aux doses testées a protégé d'une hyperplasie induite par le TAM en réduisant le taux circulant d'estradiol. Il a limité la perte de poids, prévenu et d'une hypertriglycémie induite par le TAM. Par son potentiel antioxydant, L'EEAa a par ailleurs prévenu les atteintes hépatiques conduisant à une baisse de l'activité plasmatique des transaminases. Il a boosté la protection rénale chez les animaux recevant du tamoxifène.

L'EEAa se veut donc comme une potentielle source de substances naturelles exploitables dans la prise en charge alternative et complémentaire du cancer du sein hormono-dépendant.

PERSPECTIVES

Pour affuter ce travail, il serait envisageable :

- D'évaluer la cytotoxicité de l'EEAa sur les cellules normales afin de déterminer son degré de sélectivité ;
- D'évaluer l'effet de l'EEAa sur l'expression de quelques gènes impliqués dans la cancérogenèse mammaire ;
- Faire en fractionnement bioguidé de l'EEAa en vu de mettre sur pied un alicament efficace pour la prise en charge du cancer du sein

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abondo A, Mbenkum F, Thomas D. (1991)** Ethnobotany and the medicinal plants of the Korup rainforest project area, Cameroon dans: Traditional Medicinal Plants. Dar Es Salaam University Press - Ministry of Health - Tanzania; 391
- Abotaleb, M., Kubatka, P., Caprnda, M., Varghese, E., Zolakova, B., Zubor, P., ... & Büsselberg, D. (2018).** Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomedicine & Pssharmacotherapy*, 101, 458-477.
- ACR practice guidelines for the performance of screening and diagnostic mammography.** Amended 2014 (Resolution 39);
- Adamowicz K & Baczkowska-Waliszewska Z. (2020).** Quality of life during chemotherapy, hormonotherapy or antiHER2 therapy of patiens with advanced, metastatic breast cancer in clinical practice. *Health Quality Life Outcomes*. 18, 134.
- Adikwu E., Ebinyo N. & Ozeke B. (2020).** Protective Effect of Lycopene against Tamoxifen-Induced Hepatotoxicity in Albino Rats. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*. 4, 69-75.
- Ahima R S, & Antwi A,(2008).** Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(4), 811–823.
- Ahmed M. & Lennard T. (2009).** Breast cancer: Role of neoadjuvant therapy. *International Journal of Surgical Pathology*, 7:416-420.
- Akhouri,,V., Kumari, M. & Kumar, A.(2020).** Therapeutic effect of Aegle marmelos fruit extract against DMBA induced breast cancer in rats. *Nature Research*, 10:18016.
- Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A. E., & Mallei, M. I. (2021).** DNA damage/repair management in cancers. *Advances in Medical Biochemistry, Genomics, Physiology, and Pathology*, 309-339.
- Alix-Panabières C. & Pantel K. (2016).** Clinical applications of circulating tumor cells and circulat ing tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery*; 6, 479-491.
- Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016).** From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 619-634.
- Amadi, S. Zhang, W.Y. & Wu, G., (2016).** Research progress in phytochemistry and biology of *Aframomum* species. *Pharmaceutical Biology*,54(11):2761-2770.
- American Cancer Society (2021).** Types of Breast Cancer.
- Andre, P. Isabelle R., Nancy S., & Hanitriniaina R.. (2008).** "Cosmetic composition in particular with anti-ageing activity comprising an extract of *Aframomum angustifolium* or longoza plant." U.S. Patent N° 7,381,436,
- Anywar, U.G. & Kirimuhuzya, C. (2015).** Phytochemical profile and antibacterial activity of crude extracts of the pod of *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum. *European Journal of Biological Research*. 5(2), 36-41.

Arnal JF., Lenfant F., Metivier R., Flouriot G., Adlanmerini M., Fontaine., ...& Katzenellenbogen J. (2017). Estrogen Receptor Alpha Action: From Tissue Specificity Implications. *Physiological Reviews*. 97(3). 1045-1087.

Ateba, S.B. Mvondo, M.A., Tchoukouegno Ngeu, S., Tchoumtchoua J., Awounfack C.H., Njamen, D. & Krenn L. (2018). Natural Terpenoids Against Female Breast Cancer: A 5-year Recent Research. *Current Medicinal Chemistry*;25, 3162-3213

Azuma T., Yao S., Zhu G., Flies A.S., Flies S.J. & Chen L. (2008). B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood*; 111:3635-43.

Babykutty, S., Suboj, P., Srinivas, P., Nair, A. S., Chandramohan, K., & Gopala, S. (2012). Insidious role of nitric oxide in migration/invasion of colon cancer cells by upregulating MMP-2/9 via activation of cGMP-PKG-ERK signaling pathways. *Clinical & experimental metastasis*, 29, 471-492.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., ... & Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46, 1086 – 1089

Barsoum, I. B., Smallwood, C. A., Siemens, D. R., & Graham, C. H. (2014). A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Research*, 74(3), 665-674.

Bartels H., Böhmer M. & Heierli. (1972). Serum creatinine determination without protein precipitation. *International Journal of Clinical Chemistry*. 37: 193-197.

Baser K.H.C. & Kürkçüglü M. (2001). The essential oils of *Aframomum corrorima* (Braun) Jansen and *A. angustifolium* K. Schum. from Africa. *Journal of Essential Oil Research*;13:208-209.

Basset C.(2014) Api5 : un nouveau co-facteur du récepteur aux œstrogènes ER α impliqué dans la progression tumorale des carcinomes mammaires. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse : France.

Basu A. (2018). DNA damage, mutagenesis and cancer. *International Journal Molecular Sciences*. 19(4), 970.

Bayraktar S. & Arun K.B.(2019). Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. Dans A. Aydiner, A. Igci & A. Soran, *Breast Disease: Diagnosis and Pathology*, Volume 1, Edition 2 (P.49-63). Suisse: Springer.

Bazira, P. J., Ellis, H., & Mahadevan, V. (2022). Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (Oxford)*, 40(2), 79-83.

Bazm, M. A., Naseri, L., & Khazaei, M. (2018). Methods of inducing breast cancer in animal models: A systematic review. *World Cancer Research Journal*, 5(4), e1182.

Becker J.C., Houben R., Schrama D., Voigt H., Ugurel S. & Reisfeld R.A.(2010). Mouse model for melanoma: a person's perspective. *Experimental Dermatology*, 19: 157-64

Benz, C. C., Scott, G. K., Sarup, J. C., Johnson, R. M., Tripathy, D., Coronado, E., ... & Osborne, C. K. (1992). Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Research and Treatment*, 24, 85-95.

Bergmeyer H.U., Bernt E. & Lachenicht R. (1974), Alkaline Phosphatase in Serum Determination with Automatic Analysers. *Method of Enzymatic Analysis*, 2, 864-868,

Bishayee, A., Mandal, A., Bhattacharyya, P., & Bhatia, D. (2016). Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. *Nutrition and Cancer*, 68(1), 120-130.

Bishayee, A., Thoppil, R. J., Darvesh, A. S., Ohanyan, V., Meszaros, J. G., & Bhatia, D. (2013). Pomegranate phytoconstituents blunt the inflammatory cascade in a chemically induced rodent model of hepatocellular carcinogenesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 178-187.

Bistoni, G., & Farhadi, J. (2015). Anatomy and physiology of the breast. Plastic and reconstructive surgery: *Approaches and Techniques*, 477-485.

Blakemore J and Naftolin F, (2016). Aromatase: contributions to physiology and disease in women and men. *Physiology*, 31(4):258–269.

Bonnet-Duquennoyn M., Dumas, M., Debacker, A., Lazou, K., Talbourdet, S., Franchi, J., Heusèle, C., André, P., Schnebert, S., Bonté, F. & Kurfürst, R. (2007). Transcriptional effect of an *Aframomum angustifolium* seed extract on human cutaneous cells using low-density DNA chips. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6, 128–134

Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. *Nature & Technologie*, (9), 14 – 19.

Brown, J. M. (2014). Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy. *The British Journal of Radiology*, 87(1035), 20130686.

Brunicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, et al. (2005). editors. Schwartz's principles of surgery. 8th ed. New York: McGraw-Hill, Health Publishing Division;

Burke J.D. & Young H.A. (2019). IFN- γ : a cytokine at the right time, is in the right place. *Seminar in Immunology*, 43:1–8.

Burstein H.J, Lacchetti C., Anderson H., Buchholz T.A., Davidson N.E., Gelmon K.A., et al. (2018). Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of Clinical Oncology*, 37, 423–38.

Campbell, K.J. & Tait, S.W.G. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biology*; 8, 180002.

Cao, J. (2016). Breast Cancer Methods and Protocols. Hatfield, Hertfordshire: *Springer*.

Capasso, I., Esposito E., Pentimalli F., Crispo A., Montella M., Grimaldi M., ... & Giodano A. (2010). Metabolic syndrome affects breast cancer risk in postmenopausal : National Institute of Naples experience. *Cancer Biology and Therapy*, 10 (12), 1240-43.

Cardoso, F., van't Veer, L. J., Bogaerts, J., Slaets, L., Viale, G., Delaloge, S., ... & Piccart, M. (2016). 70-gene signature as an aid to treatment decisions in early-stage breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(8), 717-729.

Cavalcanti FN, Lucas TF, Lazari MF, & Porto CS (2015). Estrogen receptor ESR1 mediates activation of ERK1/2, CREB, and ELK1 in the corpus of the epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 54(3), 339–349.

Cella, D., & Fallowfield, L. J. (2008). Recognition and management of treatment-related side effects for breast cancer patients receiving adjuvant endocrine therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 107, 167-180.

Chanika D., Nayanathara T., Gayathree N., Uthpala J. & Nayanakanthi N. (2020). Cancer chemoprevention through functional food of plant origin. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 6, 132-143

Chauvin, L. (2015). Voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation des tumeurs mammaires au docétaxel par les acides gras polyinsaturés n-3 ; *Thèse de doctorat. Université François – Rabelais de Tours*

Chen C. R., Kang Y., Siegel P.M. & Massague J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to cmyc repression. *Cell*, 110, 19–32

Chen, P. H., Wu, J., Ding, C. K. C., Lin, C. C., Pan, S., Bossa, N., ... & Chi, J. T. (2020). Kinome screen of ferroptosis reveals a novel role of ATM in regulating iron metabolism. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 1008-1022.

Chen, W. J., Tsai, J. H., Hsu, L. S., Lin, C. L., Hong, H. M., & Pan, M. H. (2021). Quercetin blocks the aggressive phenotype of triple-negative breast cancer by inhibiting IGF1/IGF1R-mediated EMT program. *Journal of Food and Drug Analysis*, 29(1), 98.

Chen, W.; Liu, Y.; Li, M.; Mao, J.; Zhang, L.; Huang, R.; Jin, X.; Ye, L.(2015). Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127, 332–338.

Chew, S. M., Liu, B., Shen, S., & Iyengar, N. M. (2024). The Role of Obesity and Inflammation in Breast Cancer Recurrence. *Current Breast Cancer Reports*, 1-14.

Chin, C. Y., Chen, Y. H., Wu, S. C., Liu, C. T., Lee, Y. F., & Tsai, M. Y. (2020). Complementary and alternative medicine use in breast cancer patients at a medical center in Taiwan: a cross-sectional study. *Integrative Cancer Therapies*, 19, 1534735420983910.

Chojnacka K. & Lewandowska U. (2020). The angiogenic activity of Polyphenol-Rich Extracts and its implication on Cancer Chemoprevention. *Food Reviews International*. 36, 77-103.

Chunjie W., Lanxiang W. & Zhang H. (2016). Berberine enhances the antitumor activity of Tamoxifen in drug-sensitive MCF-7 and drug resistant MCF-7/Tamoxifen cells. *Oncology Letters*; 5490, 2250-2256.

Cimpean, A. M., Tamma, R., Ruggieri, S., Nico, B., Toma, A., & Ribatti, D. (2017). Mast cells in breast cancer angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 115, 23-26.

Cioroboreanu, R., & Lazăr, E. (2012). HISTOLOGICAL GRADE OF THE BREAST CANCER. *Journal of Hygiene and Public Health.*, 62(1) : 35-41

Clinton, S. K., Giovannucci, E. L., & Hursting, S. D. (2020). The world cancer research fund/American institute for cancer research third expert report on diet, nutrition, physical activity, and cancer: impact and future directions. *The Journal of Nutrition*, 150(4), 663-671.

Cole, K., Jacobs, L. and Vance, F. (2010). Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty synthesis. *Hepatology Journal*, 52, 1258-1265.

Colleoni, M. and Munzone, E. (2015). Navigating the challenges of endocrine treatments in premenopausal women with ER-positive early breast cancer. *Drugs*, 75,1311–1321

Costa, E., Ferreira-Gonçalves, T., Chasqueira, G., Cabrita A.S., Figueiredo I.V. et Reis C.P. (2020). Experimental Models as Refined Translational Tools for Breast Cancer Research. *Scientia Pharmaceutica*, 88 (32), 29 pages.

Crespi E., Bottai G. and Santarpia L. (2016). Role of inflammation in obesity-related breast cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 31:114–122

Dalgård, C., Benetos, A., Verhulst, S., Labat, C., Kark, J. D., Christensen, K., ... & Aviv, A. (2015). Leukocyte telomere length dynamics in women and men: menopause vs age effects. *International Journal of Epidemiology*, 44(5), 1688-1695.

Davidson N. (2013). Cancer du sein et maladies mammaires bénignes. Dans Goldman's Cecil Medicine, 24th edition (P. 259-272).

De Araújo-Filho H.G., Dos Santos J.F., Carvalho M.T.B., Laurent Picot L., Fruitier-Arnaudin I., Groult H., Quintans-Júnior L.J., Quintans J.S.S. (2021).Anticancer activity of limonene: A systematic review of target signaling pathways. *Phytotherapy Research*: 1–14.

Deberardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200.

Demaria, S., Pilonis, K. A., & Adams, S. (2011). Cross-talk of breast cancer cells with the immune system. Breast Cancer-Carcinogenesis, *Cell Growth and Signalling Pathways*, 457, 482.

Derya Y., Ebru B., Gülsen B., Deniz K. & Merve T. (2018). The Investigation of the Effects of Tamoxifen and Vitamin D Combination on the Expression of P53, Bcl-2 and Bax and Cell Cycle in Mcf-7 Cell Line. *Proceedings*, 2, 1-4.

Desnoyers, A., Riesco, E., Fülöp, T., & Pavic, M. (2016). Activité physique et cancer: mise au point et revue de la littérature. *La Revue de médecine interne*, 37(6), 399-405.

Dhyani, P., Quispe, C., Sharma, E., Bahukhandi, A., Sati, P., Attri, D. C., ... & Cho, W. C. (2022). Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. *Cancer Cell International*, 22(1), 1-20.

Dibong S. D., Mpondo M. E., Ngoye A., Kwin M. F. & Betti, J. L. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37, 2496 -2507

Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 297-306.

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060-1072.

Du R., Wang X., Ma L., Larcher LM., Tang H., Zhou H., ... & Wang T. (2021). Adverse reactions of targeted therapy in cancer patients: a retrospective study of hospital medical data in China. *BMC Cancer*, 21, 206.

Dumitrescu R.G. & Shields P.G. (2005). The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol* 35 : 213–225

Ebhohimen I.E. & Okolie N.P. (2021). Effect of Ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seed on the induction of nephrotoxicity by Bromate in Wistar rats. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 9(1), 8-14

Ebhohimen IE., Edemhanria L., Ekozin A and Okolie NP. (2017). Effect of heat treatment on the antioxidant capacity of aqueous and ethanol extracts of *Aframomum angustifolium* seed. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 1(3), 1125-128.

Ebhohimen, I. E., Ebhomielen, J. O., Edemhanria, I., Osagie, A. O. And Omoruyi, L. I., (2020). Effect of ethanol extract of *afmomum angustifolium* seeds on potassium bromate induced liver and kidney damage in wistar rats. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 26 :1-8.

Edhemhanria L., Ebhomielen JO and Ebhohimen I. (2020). Antioxidant effect of *Aframomum angustifolium* seed essential oil in freeze storage of lean meat. *Journal of Science Education and Technology*, 5(1), 97-103

Ellis, I.O. & Elston, C.W., (2006). Histologic Grade, In: O'Malley FP, Pinder SE, *Breast Pathology*, Elsevier Inc, 225-233

Emens, L. A., Silverstein, S. C., Khleif, S., Marincola, F. M., & Galon, J. (2012). Toward integrative cancer immunotherapy: targeting the tumor microenvironment. *Journal of Translational Medicine*, 10, 1-5.

Engbang J.P.N., Essome H., Koh V. M., Simo G., Essam J.D.S., Mouelle A.S., Essame J.L.O.(2015). Cancer du sein au Cameroun, profil histo épidémiologique: à propos de 3044 cas. *Pan african Medical Journal*, 21, 242

Ewaschuk, J. B., Newell, M., & Field, C. J. (2012). Docosahexanoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER– breast cancer cells. *Lipids*, 47, 1019-1030.

Faguet G. (2014). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer*, 136, 1-15

Farhadihosseinabadi B., Hosseini F., Larki P., Bagheri N., Abbaszadeh-Goudarzi K., Sinehsepehr K., Johari B., Abdollahpour-Alitappeh M. (2018). Breast cancer: risk factors, diagnosis and management. *Medical Laboratory Journal*, 12(5): 1-9.

Faustino-Rocha P, Oliveira J, Pinho-Oliveira et al. (2013). Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Animal*, 42(6): 217–224.

Fedro A., Giovanni C., Gunnar M., Barbara B., Eleonora B., Ernst A., ... & Thomas H. (2020). First- in- human pharmacokinetics of tamoxifen and its metabolites in the milk of a lactating mother: a case study. *European Society for Medical Oncology*, 2020,1-6.

Feng L., Li J., Yang L., Zhu L., Huang X., Zhang S., ... & Jin H. (2017). Tamoxifen activates Nrf2-dependent SQSTM1 transcription to promote endometrial hyperplasia. *Theranostics*, 7(7), 1890–1900.

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., ... & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77-106.

Ferlay, J., Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263..

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789.

Fleten, K. G., Flørenes, V. A., Prasmickaite, L., Hill, O., Sykora, J., Mælandsmo, G. M., & Engesæter, B. (2016). hvTRA, a novel TRAIL receptor agonist, induces apoptosis and sustained growth retardation in melanoma. *Cell Death Discovery*, 2(1), 1-11.

Fossati, P. & Prencipe, L. (1982). Enzymatic colorimetric method of the determination of uric acid in serum. *Clinical Chemistry* 26, 227.

Fouad Y.A. & Aanei C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5), 1016-1036.

Frederick J.P., Liberati N.T., Waddell D.S., Shi Y. & Wang X.F. (2004). Transforming growth factor b-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Molecular Cell Biology*, 24, 2546–2559

Fu, Z., Chen, D., Cheng, H., & Wang, F. (2015). Hypoxia-inducible factor-1 α protects cervical carcinoma cells from apoptosis induced by radiation via modulation of vascular endothelial growth factor and p53 under hypoxia. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 21, 318.

Fuentes, N. & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry structural biology*. 116. 135-170.

Fukuda, R., Hirota, K. Fan, F., Do Jung, Y., Ellis, L. M. & Semenza G.L. (2002). Insulin-like Growth Factor 1 Induces Hypoxia-inducible Factor 1-mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Which is Dependent on MAP Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Colon Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (41), 8205-38211.

Furth, P. A. (2014). STAT signaling in different breast cancer sub-types. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 612-615.

Gaban, M., Owczarek, K., Chojnacka, K., & Lewandowska, U. (2019). Overview of polyphenols and polyphenol-rich extracts as modulators of IGF-1, IGF-1R and IGFBP expression in cancer disease. *Journal of Functional Foods*, 52, 389-407.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... & Turk, B. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.

Ganott, M., Griffith, B., & Rudzinski, S. M. (2019). Breast Imaging and Image-Guided Biopsy Techniques. *Breast Disease: Diagnosis and Pathology*, Volume 1, 63-94.

Garcia-Barrado M, Iglesias-Osma M, Perez-Garcia E, et al. (2020) Role of flavonoids in the interactions among obesity, inflammation, and autophagy. *Pharmaceuticals*, 13(11), 342

Garima M. (2018). Serious adverse effects of anticancer drugs- a review. *An International Multidisciplinary e-Journal*, 3, 1-14.

Garuti G., Cellani F., Centinaio G., Sita G., Nalli G. and Luerti M. (2006). Histopathologic behavior of endometrial hyperplasia during tamoxifen therapy for breast cancer. *Gynecology and Oncology Journal*, 101, 269-273.

Gharekhanloo F., Haseli M.M., Torabian (2018). Value of Ultrasound in the Detection of Benign and Malignant Breast Diseases: A Diagnostic Accuracy Study. *Oman Medical Journal*, 33(5), 380-386

Ghorai N., Chakraborty S., Gucchait S., Saha S.K. & S.Biswas, (2012). Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*, 2529: 6 pages.

Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal*, 278(1), 16-27.

Gill, M.J., Brenwald, N.P. & Wise, R. (1999). Identification of an Efflux Pump Gene, pmrA, Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 43: 187- 189.

Girad S. (2015). Organochlorés et Cancer du sein : modulation de la signalization cellulaire des épithéliales mammaires humaines. *Mémoire. Université du Quebec*. 116.

Githiori J. B (2004). Evaluation of Anthelmintic Properties of Ethnoveterinary Plant Preparations Used as Livestock Dewormers by Pastoralists and Small Holder Farmers in Kenya. Thèse de Doctorat, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala;72

Goel, S., Bergholz, J.S., & Zhao, J.J. (2022). Targeting CDK4 and CDK6 in cancer. *Nature Review in Cancer* 22, 356–372.

Goss, P. E., Ingle, J. N., Pritchard, K. I., Robert, N. J., Muss, H., Gralow, J., ... & Parulekar, W. R. (2016). Extending aromatase-inhibitor adjuvant therapy to 10 years. *New England Journal of Medicine*, 375(3), 209-219.

Green D.R. (2011). Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Gu W., Xu W., Sun X., Zeng B., Wang S., Dong N., ... & Yang J. (2017) Anordrin eliminates tamoxifen side effects without changing its antitumor activity. *Scientific Report*, 7:43940.

Günter E., Alexander M. & Clemens T (2020). Tamoxifen and Endometrial Cancer: A Janus-Headed Drug. *Cancers*, 12, 1-11.

Gurer-Orhan, H., Ince, E., Konyar, D., Saso, L., & Suzen, S. (2018). The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 25(33), 4084–4101.

Gushiken L.F.S., Beserra F.P., Hussni M.F., Gonzaga M.T., Ribeiro V.P., De Souza P.F., ... & Takahira R.K. (2022). Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, Article ID 9004014.

Habibeh, B., Fatemeh, B. S., Naser, J., & Shirin, N. N. T. (2020). The role of herbal medicine in the side effects of chemotherapy. *Revista Latinoamericana De Hipertensión*, 15(1), 64-70.

Hall, L. H., King, N. V., Graham, C. D., Green, S. M., Barber, A., Neal, R. D., ... & Smith, S. G. (2022). Strategies to self-manage side-effects of adjuvant endocrine therapy among breast cancer survivors: an umbrella review of empirical evidence and clinical guidelines. *Journal of Cancer Survivorship*, 1-43.

Hamid, B., Nasrin, Z., Roghayeh, A., Abolfazl, N. & Sara, S. (2015). Therapeutic Effect of *Silybum marianum* Plant Extract on Tamoxifen-Induced Fatty Liver in Rats. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 3,1-5.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144(5):646–674.

Hansten, P. (2018). The Underrated Risks of Tamoxifen Drug Interactions. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 43, 495–508.

Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J., Gnant M., Houssami N., Poortmans P., ... & Cardoso F.(2019). Breast cancer. *Disease Primers*, 5, 66.

Haupt, S., Raghu, D., & Haupt, Y. (2016). Mutant p53 drives cancer by subverting multiple tumor suppression pathways. *Frontiers in Oncology*, 6, 12.

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 635-649.

He, Z., Chen, Z., Tan, M., Elingarami, S., Liu, Y., Li, T., ... & Li, W. (2020). A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. *Cell proliferation*, 53(7), e12822.

Hecht, F., Pessoa, C. F., Gentile, L. B., Rosenthal, D., Carvalho, D. P., & Fortunato, R. S. (2016). The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biology*, 37, 4281-4291.

Heitzer, E., Haque, I. S., Roberts, C. E., & Speicher, M. R. (2019). Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature Reviews Genetics*, 20(2), 71-88.

Hesselbarth, N., Pettinelli, C., Gericke, M., Berger, C., Kunath, A., Stumvoll, M., ... & Klötting, N. (2015). Tamoxifen affects glucose and lipid metabolism parameters, causes browning of subcutaneous adipose tissue and transient body composition changes in C57BL/6NTac mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(3), 724-729.

His M. (2016). Surpoids, obésité et survie après cancer du sein dans la cohorte E3N. *Thèse de Doctorat. Université Paris Saclay (COMUE)*. 253.

Hiyama, E., & Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer*, 96(7), 1020-1024.

Holotiuk V.V., Kryzhanivska A.Y., Churpiy I.K., Tataryn B.B., Ivasiutyn D.Ya. (2019). Role of nitric oxide in pathogenesis of tumor growth and its possible application in cancer treatment. *Experimental Oncology*, 41(2), 210–215.

Hou J., Zhang Y., Zhu Y., Zhou B., Ren C., Liang S. & Guo Y.(2019). α -pinene induces apoptotic cell death via caspase activation in Human Ovarian Cancer Cells. *Medicine Science Monitor*, 25, 6631-6638.

Hu X. & Ivashkiv L.B. (2009). Cross-regulation of signaling and immune responses by IFN- γ and STAT1. *Immunity*, 31(4):539–50.

Hu Z.I. & McArthur H.L. (2018). Immunotherapy in Breast Cancer: the New Frontier. *Current Breast Cancer Reports*, 10:35–40.

Huang, M., Qiu, Q., Xiao, Y., Zeng, S., Zhan, M., Shi, M., ... & Xu, H. (2016). BET bromodomain suppression inhibits VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability by blocking VEGFR2-mediated activation of PAK1 and eNOS. *Scientific reports*, 6(1), 23770.

Hubert, S., & Abastado, J. P. (2014). Les étapes précoces du processus métastatique. *Médecine/Sciences*, 30(4), 378-384.

Huda A., Falah H., Raghdah M., Younus J., Mohanad K. and Atyaf A. (2020). Tamoxifen from Chemotherapy to Antiviral Drug: Possible Activity against COVID-19. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 4, 108-116.

Hugo H., Julie L. and Thierry P. (2019). Agranulocytosis Induced by Tamoxifen in a Breast Cancer Patient. *Breast Care*, 15:72–74

Hutchins A.P., Diez, D. Miranda-Saavedra, (2012). The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings In Functional Genomics*, 12 (6): 489-498.

Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 177-184.

Hynes, N. E., & Watson, C. J. (2010). Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a003186.

Ingvarsson S. (1999) Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol*; 9: 277-288.

Inkoto L.C., Koto-Te-Nyiwa Ngbolua T.K., Bokungu E.P., Masengo A.C., Itoku B.J., Tshilanda DD., ... & Mpiana T.P. (2021). Phytochemistry and Pharmacology of *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum (Zingiberaceae): A Mini Review. *South Asian Research Journal of Natural Products*, 5(1), 21-36.

Institut National du Cancer.(2016). *Cancers du sein /du diagnostic au suivi*, INCa, novembre 2016.201pages

Javed, A., & Lteif, A. (2013, February). Development of the human breast. In *Seminars in plastic surgery* (Vol. 27, No. 01, pp. 005-012). Thieme Medical Publishers.

Jayachandra, K., Maheswaran, A., & Murali, M. (2012). In-vitro evaluation of nitric oxide scavenging activity of methanolic and aqueous extract of *syzygium cumini* Linn. Bark (Myrtaceae). *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 3(2), 615.

Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., & Srdjenovic, B. U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, 17(1), 22-28.

Jesinger, R. A. (2014). Breast anatomy for the interventionalist. *Techniques in vascular and interventional radiology*, 17(1), 3-9.

Jianghong F. and Lannoy I. (2013). Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, 87, 93-120.

Johnston, S. R., & Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nature Reviews Cancer*, 3(11), 821-831.

Jordan, V. C., & Assikis, V. J. (1995). Endometrial carcinoma and tamoxifen: clearing up a controversy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 1(5), 467-472.

Jorgovanovic D., Song M., Wang L. & Zhang Y.(2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research?* (2020) 8:49

Kaana A. & Samuel S.O. (2018). Proximate and antinutritional analyses of seed, pulp and peel of *Aframomum Angustifolium* (Sonn) K.Schum. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*;7(3), 120-124.

Kabat, G. C., Cross, A. J., Park, Y., Schatzkin, A., Hollenbeck, A. R., Rohan, T. E., & Sinha, R. (2009). Meat intake and meat preparation in relation to risk of postmenopausal breast cancer in the NIH-AARP diet and health study. *International journal of cancer*, 124(10), 2430-2435.

Kahia, K. B. (2012). Etude des voies de signalisation associées à la stabilité des microtubules et au chimiotactisme induits par le récepteur à tyrosine kinase ErbB2, dans le cancer du sein (*Doctoral dissertation, Institut Curie*).

Kamatenesi M.M., Oryem-Origa H., Acipa A. (2011). Medicinal plants of Otwal and Ngai Sub Counties in Oyam District, Northern Uganda. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7, 7

Kamran, S.; Sinniah, A.; Abdulghani, M.A.M.; Alshawsh, M.A.(2022) Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review. *Cancers*, 14, 1100.

Kandir, S., Karakurt, S., Gökçek-Saraç, Ç., & Karakurt, S. (2024). Tannic acid elicits differential gene regulation in prostate cancer apoptosis. *Acta Pharmaceutica*, 74(3), 539-550.

Kandyli, P. (2022). Phytochemicals and antioxidant properties of edible flowers. *Applied Sciences*, 12(19), 9937.

Karimi, B., Ashrafia, M., Shomali, T. & Yektaseresht A., (2018). Therapeutic effect of simvastatin on DMBA-induced breast cancer in mice. *Original article*, 30 pages,

- Karn A., Jha A., Shrestha S., Poundel S., Bhandari R. and Acharya B. (2010).** Tamoxifen for Breast Cancer. *Journal of Nepal Medical Association (JNMA)*, 49 :662-67.
- Karwacz, K., Bricogne, C., MacDonald, D., Arce, F., Bennett, C. L., Collins, M., & Escors, D. (2011).** PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8⁺ T cells. *EMBO Molecular Medicine*, 3(10), 581-592.
- Kerdelhué B., Forest C., Coumoul X. (2016).** Dimethyl-Benz(a)anthracene: a mammary carcinogen and a neuendocrine disruptor. *Biochimistry Open*, 3: 49-55.
- Keyte IJ., Harrison RM and Lammel G. (2013).** Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-A Review. *Chemical Society Reviews*. 42. 9333-9391.
- Kierans S.J., Taylor C.T. (2021).** Regulation of glycolysis by the hypoxia inductible factor (HIF): implication for cellular physiology. *Journal of Physiology*, 599(1): 23-37.
- Kim C., Cho S.K., Kim K.D., Nam DW., Chung W.S., Jang H.J., ... & Ahn KS. (2014).** β -Caryophyllène oxide potentiates TNF α -induced apoptosis and inhibits invasion through down-regulation of NF- κ B-regulated gene products. *National Library of Medicine*. 19(4). 708-18.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2005).** Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biology & Therapy*, 4(9), 924-933.
- Kim, W., Lee, W. B., Lee, J. W., Min, B. I., Baek, S. K., Lee, H. S., & Cho, S. H. (2015).** Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, 23(4), 626-632.
- Koch, A. E., & Distler, O. (2007).** Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Research & Therapy*, 9, 1-9.
- Koff J.L. (2015).** Ramachandiran S and Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*; 16: 2942-2955
- Konda K.M., Kabakura M., Mbembe B., Itufa Y., Mahuku K., Mafuta ...&., Paul L. (2012).** Plantes médicinales de traditions. Province de l'Equateur – R.D. Congo, *Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Kinshasa*;419
- Kong Y., Xu S. (2018).** Salidroside prevents skin carcinogenesis induced by DMBA/TPA in a mouse model through suppression of inflammation and promotion of apoptosis. *Oncology Reports*. 39. 2513-2526
- Kousteni S, Han L, Chen JR, Almeida M, Plotkin LI, Bellido T, & Manolagas SC (2003).** Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *Journal of Clinical Investigations*, 111(11), 1651–1664.
- Kuete V., Ango P.Y., Yeboah S.O., Mbaveng A.T., Mapitse R., Kapche G.D., ... & Efferth T. (2014).** Cytotoxicity of four *Aframomum* species (*A. arundinaceum*, *A. albobolaleum*, *A. kayserianum* and *A. polyanthum*) towards multi-factorial drug resistant cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:340.

Kumar V., Singh D. D., Singh Lakhawat S., Yasmeen N., Pandey A. & Singla R.K. (2022). Biogenic Phytochemicals Modulating Obesity: From Molecular Mechanism to Preventive and Therapeutic Approaches. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, Article ID 6852276, 20 pages

Kuol, N., Stojanovska, L., Nurgali, K., & Apostolopoulos, V. (2017). The mechanisms tumor cells utilize to evade the host's immune system. *Maturitas*, 105, 8-15.

Lakhani, S.R., Ellis I.O., Schnitt, S.J, Tan, P.H, van de Vijier, M.J. (2012).WHO Classification of tumors, volume 4

Laliotis A, Vrekoussis T, Kafousi M, Sanidas E, Askoxilakis J, Melissas J, ...& Stathopoulos EN (2013). Immunohistochemical study of pElk-1 expression in human breast cancer: association with breast cancer biologic profile and clinicopathologic features. *Breast*, 22(1), 89–95.

Latunde-Dada, G. O. (2017). Ferroptosis: role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(8), 1893-1900.

Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G., Buc, E., Bachet, J. B., Lecomte, T., ... & Penault-Llorca, F. (2009). Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(35), 5924-5930.

Lautenschläger T., Monizi M., Pedro M., Mandombe J.L.M. Bránquima F.M., Heinze C. & Neinhuis C. (2018). First large-scale ethnobotanical survey in the province of Uíge, northern Angola. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2018 (14), 51

Lee A.V., Oesterreich S., Davidson N.E. (2015). MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv073.

Lee, J., Chung, H., Chang, P. S., & Lee, J. (2007). Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry*, 103(2), 662-669.

Lemaire J., Larrue R., Perrais M., Cauffiez C. & Pottier N. (2020). Aspects fondamentaux du développement tumoral. *Service de Toxicologie et Génopathies*, 107(11), 1148-1160.

Lemmon M.A. & Schlessinger J.(2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117-1134.

Levin, E. R., & Pietras, R. J. (2008). Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 108, 351-361.

Li Y, Zhou M., Hu Q., Bai X., Huang W., Scheres S.H.W. & Shi Y. (2017) Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 114, 1542–47

Liamin M. (2019). Exposition *in vitro* de lymphocytes T humains aux hydrocarbures aromatiques polycycliques : étude des effets immunotoxiques. *Médecine humaine et pathologie : Université Rennes 1*. 1-237.

Liao G-S., Apaya M.K., Shyur L-F.(2013). Herbal Medicine and Acupuncture for Breast Cancer Palliative Care and Adjuvant Therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 437948, 17 pages.

- Lien, E. A., Solheim, E., & Ueland, P. M. (1991).** Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Research*, 51(18), 4837-4844.
- Lien, E. C., Lyssiotis, C. A., & Cantley, L. C. (2016).** Metabolic reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR pathway in cancer. *Metabolism in Cancer*, 39-72.
- Lim S, Kaldis P (2013).** Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*; 140(15), 3079–3093
- Lim, S.M., Kim, Y.N., Park, K.H. Kang B., Chon H.J., Kim C., Kim J.H & Rha S.Y. (2016).** Bone alkaline phosphatase as a surrogate marker of bone metastasis in gastric cancer patients. *BMC Cancer*, 16, 385.
- Lin, E. Y., Jones, J. G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K. D., Muller, W. J., & Pollard, J. W. (2003).** Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 2113-2126.
- Liu, Z., Huang, P., Law, S., Tian, H., Leung, W., & Xu, C. (2018).** Preventive effect of curcumin against chemotherapy-induced side-effects. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1374.
- Lone, S.H. & Bhat, K.A. (2015).** Phytosterol as precursors for the synthesis of aromatase inhibitors: hemisynthesis of testololactone and testolacyone. *Steroids*, 95 (2015), 164-168
- Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015).** Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, 112(6), 957-962.
- Lorusso, G., & Rüegg, C. (2012, June).** New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 22, No. 3, pp. 226-233). Academic Press.
- Lösel, R., & Wehling, M. (2003).** Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), 46-55.
- Lu, W., Sun, J., Yoon, J. S., Zhang, Y., Zheng, L., Murphy, E., ... & Lenardo, M. J. (2016).** Mitochondrial protein PGAM5 regulates mitophagic protection against cell necroptosis. *PloS one*, 11(1), e0147792.
- Ma, Z., Kim, Y. M., Howard, E.W., Feng, X., Kosanke, S.D., Jiang,S.Y., ... & Yang, X., (2018).** DMBA promotes ErbB2 mediated carcinogenesis via ErbB2 and estrogen receptor pathway activation and genomic instability. *Oncology Reports*, 40, 1632-1640.
- Maciejowski J. & De Lange T. (2017).** Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Molecular Cell Biology*, 18, 175-187.
- Maelfait, J., Liverpool, L., Bridgeman, A., Ragan, K. B., Upton, J. W., & Rehwinkel, J. (2017).** Sensing of viral and endogenous RNA by ZBP 1/DAI induces necroptosis. *The EMBO Journal*, 36(17), 2529-2543.
- Malhotra G. K., Zhao X., Band H. & Band V. (2010).** Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955-960,
- Manish M., Kurt J., Phillip R (2006).** Inducible Nitric Oxide Synthase and apoptosis in Murine proximal Tubule Epithelial cells. *Toxicological sciences*, 91(2), 493-500.

Marsh J., Mukherjee P., Seyfried T.N.(2008). Akt-dependent proapoptotic effects of dietary restriction on late-stage management of a phosphate and tensin homologue/tuberous sclerosis complex 2-deficient mouse astrocytoma. *Clinical Cancer Research*, 14, 7751-62.

Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., ... & Persico, M. (2018). Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Massagué J. & Obenauf A.C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*; 529, 298-306

Mastrangelo, S., Attina, G., Triarico, S., Romano, A., Maurizi, P., & Ruggiero, A. (2022). The DNA-topoisomerase inhibitors in cancer therapy. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 15(2), 553-562.

Matthews H.K., Bertoli C. & De BruinR. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature*, 23, 74-88

Mbong M-A., Edoun F., Ngandi L., Youvop J., Orang R., Tienoue H., Nwang F., Ngondi J. and Oben J. (2020). Comparative Study of the Protective Effect of Cola anomala and Coffea arabica Against Induced Toxicity in Rats. *Journal of Food Research*, 9, 1-13.

McDonald E.S., Clark A.S., Tchou J., Zhang P., Freedman G.M. (2016). Clinical and Translational Molecular Imaging of Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 57, 9S–16S

Meeth K., Wang J.X., Micevic G., Damsky W., Bosenberg M.W.(2016). The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations Pigment. *Cell & Melanoma Research*, 29, 590-7.

Mense S.M., Remotti F., Bhan A., Singh B., El-Tamer M., Hei T.K., Bhat H.K.(2008). Estrogen-induced breast cancer: alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*; 232: 78-85.

Mense, S. M., Hei, T. K., Ganju, R. K., & Bhat, H. K. (2008). Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. *Environmental health perspectives*, 116(4), 426-433.

MINSANTE (2020).Plan Stratégique National de Prévention et de Lutte contre le Cancer (PSNPLCa) 2020-2024

Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I. I., Badoiu, S. C., Stefani, C., & Greabu, M. (2020). PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 173.

Mishra B.P., Salehi B., Sharifi-Rad M., Pezzani R., Kobarfard F., Sharifi-Rad J.& Nigam M. (2018). Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective:An Overview. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 22, 281–295.

Miyamura, M., Yokota, J., & Saibara, T. (2016). Drug-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 136(4), 579-582.

Mocanu M-M., Nagy P. & Szöll"osi J. (2015).Chemoprevention of Breast Cancer by Dietary Polyphenols. *Molecules*, 20, 22578–22620

Morana, O., Wood, W., & Gregory, C. D. (2022). The apoptosis paradox in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1328.

Moreira, L., Araújo, I., Costa, T., Correia-Branco, A., Faria, A., Martel, F., & Keating, E. (2013). Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental Cell Research*, 319(12), 1784-1795.

Moyret-Lalle C., Pommier R., Bouard C., Nouri E., Richard G. & Puisieux A. (2016). Plasticité des cellules cancéreuses et dissémination métastatique. *Médecine/Sciences*, 32 ; 725-31

Murphy, J. M., Czabotar, P. E., Hildebrand, J. M., Lucet, I. S., Zhang, J. G., Alvarez-Diaz, S., ... & Alexander, W. S. (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39(3), 443-453.

Murray P.J.(2005). The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *PNAS*, 102 (24), 8686–8691.

Musa M., Khan M. & Cooperwood J. (2007). Medicinal chemistry and emerging strategies applied to the development of selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1249–1261.

Mvondo M.A., Messongue Mbollo M-S., Njamen D. (2020). The ethanol extract of avocado [Persea Americana Mill. (Lauraceae)] seeds reduced the hyperplastic effect of tamoxifen on uterine endometrium without changing its effect on the mammary gland. *Advances in Traditional Medicine*, 21, 305–316.

Mvondo M.A., Wego Kamgaing M.T., Wansi Ngnokam S.L (2021). Aqueous Extract of *Dacryodes edulis* (Burseraceae) Leaves Inhibited Tumor Growth in Female Wistar Rats with 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Breast Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.

Nagineni, C.N., Raju, R., Nagineni, K.K, Kommineni, V .K, Cherukuri, A,...& Kutty, R.K. (2014). Resveratrol suppresses expression of VEGF by human retinal pigment epithelial cells: potential nutraceutical for age-related macular degeneration. *Aging Diseases*, 5, 88.

Nakai M., Fukui Y., Asami S., Toyoda-Ono Y., Iwashita T., Shibata H., Mitsunaga T., Hashimoto F., & Kiso Y.(2005). Inhibitory Effects of Oolong Tea Polyphenols on Pancreatic Lipase in Vitro. *Agriculture and Food Chemistry*, 53 (11), 4593–4598

Nakamura, K., Iwahashi, K., Furukawa, A., Ameno, K., Kinoshita, H., Ijiri, I., Sekine, Y., Suzuki, K., Iwata, Y., Minabe, Y., & Mori, N. (2003). Acetaldehyde adducts in the brain of alcoholics. *Archives in Toxicology* 77, 591–593

National Comprehensive Cancer Network,(2017). Breast Cancer Screening and Diagnosis. NCCN Guidelines Version 1.

NavaneethaKrishnan . S., Rosales J.L., Lee K-Y. (2019). ROS-Mediated Cancer Cell Killing through Dietary Phytochemicals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, Article ID 9051542, 16 pages.

Nazarali, S. & Narod, S. (2014). Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 6, 29–36.

Nazarewicz, R. R., Zenebe, W. J., Parihar, A., Larson, S. K., Alidema, E., Choi, J., & Ghafourifar, P. (2007). Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer research*, 67(3), 1282-1290.

Nengtai O. et Lin W. (2016). Basic Histopathological Methods and Breast Lesion Types for Research. Dans J. Cao & J.M. Walker (dir). *Breast Cancer Methods and Protocols* (P. 3-10). Hatfield, Hertfordshire: Springer.

Neville, M. C., Webb, P., Ramanathan, P., Mannino, M. P., Pecorini, C., Monks, J., ... & MacLean, P. (2013). The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(9), E1103-E1114.

Ng, S. W., Norwitz, S. G., & Norwitz, E. R. (2019). The impact of iron overload and ferroptosis on reproductive disorders in humans: implications for preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3283.

Ngezahayo J., Havyarimana F., Hari L., Stévigny C., Duez P. (2015). Medicinal plants used by Burundian traditional healers for the treatment of microbial diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 338–351.

Nguefack, C. T., Biwole, M. E., Massom, A., Kamgaing, J. T., Njamen, T. N., Ekane, G. H., ... & Priso, E. B. (2012). Epidemiology and surgical management of breast cancer in gynecological department of Douala General Hospital. *The Pan African medical journal*, 13, 35.

Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., ... & Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47-54.

Nolan, E. Lindeman, J.G.& Visvader, J.E. (2023). Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell* 186, 1708-1729

Nunes A.T., Berman T., Harris L (2019). Molecular Biology of Breast. Dans V.T. DeVita, T.S Lawrence & S.A. Rosenberg *Cancer Principles & Practice of Oncology 11ième Edition* (P. 2243-2260). Philadelphie : Wolters Kluwer

O'Brien J.E., Peterson T.J., Tong M.H., Lee E.J., Pfaff L.E., Hewitt S.C., ... & Jameson J.L. (2006). Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26683–26692.

O'Donovan N., Byrne A.T., O'Connor A.E., McGee S., Gallagher W.M. & Crown J. (2011). Synergistic interaction between trastuzumab and EGFR/HER-2 tyrosine kinase inhibitors in HER-2 positive breast cancer cells. *Investigational New Drugs* 29(5),752–759

O'Lone R., Frith M.C., Karlsson E.K., & Hansen U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular Endocrinology*, 18(8): 1859–1875.

Ogbole O.O, Segun P.A. & Adeniji A.J. (2017). In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 494.

Ohshima, K. & Morii, E. (2021). Metabolic Reprogramming of Cancer Cells during Tumor Progression and Metastasis. *Metabolites*, 11, 28p.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3122-3128.

Owoade O.A., Adetutu A., Ogundipe O.O., Owoade A. & Kehinde E. O. (2022). Effects of Tamoxifen Administration on Lipid Profile in Female Albino Rats. *Asian Journal of Research in Biochemistry*, 10(3): 10-22.

Pagani, O., Regan, M. M., Walley, B. A., Fleming, G. F., Colleoni, M., Láng, I., ... & Francis, P. A. (2014). Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 371(2), 107-118.

Palmiter R. D. (2018). The parabrachial nucleus: CGRP neurons function as a general alarm. *Trends in Neurosciences*, 41 (5): 280–293

Pan H., Chang H. & Lee C. (2015). Association between tamoxifen treatment and the development of different stages of nonalcoholic fatty liver disease among breast cancer patients. *Journal of Formosan Medical Association*; 115, 411-417.

Panchal V., Ghodasara D., Ghodasara P., Pandey S., Khorajiya J., Joshi B. & Dave C. (2014). Subacute toxicopathological studies of tamoxifen in wistar rats. *Indian Journal of Veterinary Pathology*; 38: 158-163.

Patel A. (2020). Benign and Malignant Tumors. *JAMA Oncology*, 6(9), 1488.

Patil, U.S., Jaydeokar, A. V. & Bandawane D.D. (2012). Immunomodulators: a pharmacological review. *International Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences*, 4(1), 30-36.

Pavlova N.N. & Thompson C.B. (2016). The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab*; 23: 27-47.

Peinado H., Alečković M., Lavotshkin S., Matei I., Costa-Silva B., Moreno-Bueno G., ... & Ghajar C.M. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a prometastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18, 883-891

Prasad, S.; Gupta, S.C. & Tyagi, A.K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105.

Prat, A. & Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 5, 5–23.

Prever, L, Li, H., Hirsch, E., & Gulluni, F. (2021). Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer. *Cancers*, 13(14), 3517.

Prieto P., Pineda M. & Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex : specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*; 269, 337–341.

Prossnitz, E.R. & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(12), 715–726.

Rakotonirina, A F N. (2019). Etudes chimique et toxicologique des extraits de fruits d'*Aframomum angustifolium* (ZINGIBERACEAE). *Mémoire Université d'Antananarivo*. 1-67.

Rampogu S., Balasubramaniyam T. & Lee J.H (2022). Phytotherapeutic applications of alkaloids in treating breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, 113760

Ratovondramamy, F.J.E.(2008) Projet de création d'une unité de production de confiture de « longoza » dans le district d'Andapa, Région de S.A.V.A. Mémoire de Master en Gestion, Université d'Antananarivo, Antananarivo ;109p.

Regua A.T., Arrigo A., Doheny D., Wonga G.L. Lo H-W. (2021). Transgenic Mouse Models of Breast Cancer. *Cancer Letters*, 516, 73–83.

Reitman S. & Frankel, S. A.(1957).Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathologies*, 28, 56–63.

Renard, P. Y. (2013). Délivrance des anticancéreux oraux: besoins et attentes du pharmacien d'officine. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(523), 44-47.

Rezakhani L., Rashidi Z., Mirzapour P. & Khazaei M.(2014). Antiproliferatory effects of crab shell extract on breast cancer cell line (MCF7). *Journal of Breast Cancer*; 17, 219-225.

Roeschlau P., Bernt E. & Gruber A. (1974). Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klinische Biochemie*, 12, 226.

Ronco, A. L., De Stefani, E., Aune, D., Boffetta, P., Deneo-Pellegrini, H., Acosta, G., & Mendilaharsu, M. (2010). Nutrient patterns and risk of breast cancer in Uruguay. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11(2), 519-24.

Rong H., Leena H. & Robert C. (2015). Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncology Letters*; 2015: 1495-1501.

Roy, P. G., Pratt, N., Purdie, C. A., Baker, L., Ashfield, A., Quinlan, P., & Thompson, A. M. (2010). High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *International Journal of Cancer*, 127(2), 355-360.

Rufino, A. T., Costa, V. M., Carvalho, F., & Fernandes, E. (2021). Flavonoids as antiobesity agents: A review. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 556-585.

Rugo, H. S., Delord, J. P., Im, S. A., Ott, P. A., Piha-Paul, S. A., Bedard, P. L., ... & Tan, A. (2016). Abstract S5-07: Preliminary efficacy and safety of pembrolizumab (MK-3475) in patients with PD-L1-positive, estrogen receptor-positive (ER+)/HER2-negative advanced breast cancer enrolled in KEYNOTE-028. *Cancer research*, 76(4_Supplement), S5-07.

Rumgay H., Murphy N., Ferrari P. & Soerjomataram I. (2021). Alcohol and cancer: Epidemiology and biological mechanisms. *Nutrients*, 13 (9), 3173.

Russo J. & Russo, I. H., (2000).Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis,” Lab Invest, vol. 5, pp. 187–200.

Sadiq, Z., Varghese, E., & Büsselberg, D. (2020). Cisplatin's dual-effect on the circadian clock triggers proliferation and apoptosis. *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms*, 9, 100054.

Saleh H., Basma M. & Mohamed-Assem S. (2016). Sodium Butyrate Attenuates Nephrotoxicity Induced by Tamoxifen in Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6, 66-72

Santos Araújo, M. D. C., Farias, I. L., Gutierrez, J., Dalmora, S. L., Flores, N., Farias, J., ... & Chitolina Schetinger, M. R. (2012). Uncaria tomentosa—adjuvant treatment for breast cancer: clinical trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

Schiliro, C. & Firestein, B.L (2021).Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells*; 10, 1056.

Schuurman T., Witteveen P., Wall E. & Passier. (2019). Tamoxifen and Pregnancy : an absolute contraindication ?. *Breast Cancer Research and Therapy*,175 :17-25.

Seitz H.K., Pelucchi C., Bagnardi V. and Vecchia C.L.(2012). Epidemiology and Pathophysiology of Alcohol and Breast Cancer: Update 2012. *Alcohol and Alcoholism*, 47 (3), 204–212

Seyfried T.N., El-Abbadi M. & Roy M.L. (1992). Ganglioside distribution in murine neural tumour. *Molecular and Chemical Neuropathologies*, 17,147-67.

Shahbaz K. (2017). Tamoxifen: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Research*, 1, 1-8.

Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1213-1226.

Shay, J.W. & Wright, W.E. (2019). Telomeres and telomerase: Three decades of progress. *Nature Reviews Genetics* 20, 299–309.

Shuel S. L. (2022). Thérapies ciblées contre le cancer Perles cliniques à l’intention des soins primaires. *Canadian Family Physician | Le Médecin de famille canadien* , 68 ; e199

Silbergeld, E. K., Waalkes, M., & Rice, J. M. (2000). Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *American Journal of Industrial Medicine*, 38(3), 316-323.

Singh S., Vats P., Suri S., Shyram R., Ranganathan S. & Sriatharan K., (2004). Effect of an antidiabetic extract of catharantus roseus on enzymatic activities in spectozotocin induced diabetes rats. *Journal of Ethnopharmacology*,76, 269-277

Sinha K. (1972). Colorimetric Assay of Catalase. *Analytical Biochemistry*. 47: 389-394.

Sinula, E. S. & Kuttan, G. (2004). Immunomodulatory and aniyumor activity of Piper longum Linn. And piperine. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2), 339-346

Siraj, M. A., Islam, M. A., Al Fahad, M. A., Kheya, H. R., Xiao, J., & Simal-Gandara, J. (2021). Cancer chemopreventive role of dietary terpenoids by modulating Keap1-Nrf2-ARE signaling system—a comprehensive update. *Applied Sciences*, 11(22), 10806.

Smith, A., & Bruton, J. (1977). Color atlas of histological staining techniques. In *Color atlas of histological staining techniques* (pp. 192-192).

Song E. & Hu H. (2017). Translational Research in Breast Cancer: Biomarker Diagnosis, Targeted Therapies and Approaches to Precision Medicine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1026; Springer

Song M, Ping Y, Zhang K, Yang L, Li F, Zhang C, et al. (2019), Low-dose IFN- γ induces tumor cell stemness in tumor microenvironment of non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 81771781:1–29

Stegner D, Dütting S and Nieswandt B. (2014). Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thrombosis Research*, 133, S149-S157

Sun J.S., Tsuang Y.W, Chen J.J., Hang Y.S. et Lu F.J. (1998). An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. *Burns*, 24, 225-231.

Sun Z., Dong J., & Wu J.(2016).Juglanin induces apoptosis and autophagy in human breast cancer progression via ROS/JNK promotion. *Biomed Pharmacotherapy*, 4539, 10 pages

Sun, Q.; Xie, W.; Wang, Y.; Chong, F.; Song, M.; Li, T.; Xu, L.; Song, C. (2020). Alcohol Consumption by Beverage Type and Risk of Breast Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Alcohol*, 55, 246–253

Swatmari T., Lumniczky K., Desalnai S., Trajcevski S. Hidvegi E.J., Hamada H., Safrany G.(2006). Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Science*, 97:546-53.

Szablewski, L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1835(2), 164-169.

Tait, S. W., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621-632.

Tavassoli, F.A., Devilee P., (2003). World Health Organization classification of tumours Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC Press*; 19-23

TCGA (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61–70.

Teillaud, J. L., & Kroemer, G. (2014). Microenvironnements tumoraux: conflictuels et complémentaires. *Médecine/Sciences*, 30(4), 343-344.

Tenconi, E., & Rigali, S. (2018). Self-resistance mechanisms to DNA-damaging antitumor antibiotics in actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 100-108.

Terashima, H. & Ichikawa, M. (2003).A comparative ethnobotany of the Mbuti and Efe hunter-gatherers in Itury forest, Democratic Republic of Congo African Study Monographs.24(1,2):1-168

Thakur M. & Rao V.G. (2016). Tumour Invasion and Metastasis: A review. *Saudi Journal of Pathology and Microbiology*; 1, Iss-2:65-72.

Thomson, C. A., Rock, C. L., Thompson, P. A., Caan, B. J., Cussler, E., Flatt, S. W., & Pierce, J. P. (2011). Vegetable intake is associated with reduced breast cancer recurrence in tamoxifen users: a secondary analysis from the Women's Healthy Eating and Living Study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 125, 519-527.

Tian, Y. F., Chu, C. H., Wu, M. H., Chang, C. L., Yang, T., Chou, Y. C., ... & Sun, C. A. (2007). Anthropometric measures, plasma adiponectin, and breast cancer risk. *Endocrine-Related Cancer*, 14(3), 669-677.

Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology*, 24(2), 207-212.

Trapp V., Parmakhtiar B., Papazian V., Willmott L. & Frue J.P. (2010). Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis*, 13, 305–315.

Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, 6(1), 24-27.

Tsubura A., Lai Y.C., Miki H., Sasaki T., Uehara N., Yuri T., Yoshizawa K.(2011). Animal models of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials. *In Vivo*, 25, 11-22.

Tugume P, Kakudidi EK, Buyinza M, Namaalwa J, Kamatenesi M, Mucunguzi P, Kalema J. (2016). Ethnobotanical survey of medicinal plant species used by communities around Mabira Central Forest Reserve, Uganda. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12, 5.

Uadkla O., Yodkeeree S., Buayairaksa M., Meepowpan P., Nuntasen N.& Limtrakul P. (2012). Antiproliferative effect of alkaloids via cell cycle arrest from *Pseuduvaria rugosa*. *Pharmaceutical Biology*, 51(3),400-404.

Valli, V., Heilmann, K., Danesi, F., Bordoni, A., & Gerhäuser, C. (2018). Modulation of adipocyte differentiation and proadipogenic gene expression by sulforaphane, genistein, and docosahexaenoic acid as a first step to counteract obesity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018(1), 1617202.

Van M., J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture: *Methods and Protocols*, 237-245.

Vannini, F., Kashfi, K., & Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox biology*, 6, 334-343.

Ventura, E., Giordano, A. (2019). Cell cycle. *Reference Module in Life Sciences*: 11 pages

Verret, B., & Loirat, D. (2016). Immunothérapie et cancer du sein. *Oncologie*, 18(9-10), 551-558.

Vidinamo, F., Fawzia, S., & Karim, M. A. (2021). Effect of drying methods and storage with agro-ecological conditions on phytochemicals and antioxidant activity of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 353-361.

Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A. & Kinzler K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339, 1546-1558.

Von Karstedt, S., Montinaro, A., & Walczak, H. (2017). Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(6), 352-366.

Von Minckwitz, G., Eidtmann, H., Rezai, M., Fasching, P. A., Tesch, H., Eggemann, H., ... & Untch, M. (2012). Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(4), 299-309.

Wang, W., Green, M., Choi, J. E., Gijón, M., Kennedy, P. D., Johnson, J. K., ... & Zou, W. (2019). CD8+ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature*, 569(7755), 270-274..

Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 6(1), I1-1.

Wei, T., Zhang, J., Qin, Y., Wu, Y., Zhu, L., Lu, L., ... & Shen, Q. (2015). Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients. *American Journal of Cancer Research*, 5(7), 2190.

Williams, C. & Lin, C.-Y. (2013). Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *Ecancermedicalscience* 7, 370

Witsch E, Sela M & Yarden Y (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*, 25(2), 85–101.

Wong M., Guo C. & Zhang J. (2014). Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: mechanism, function and regulation. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 2, 169-187.

Xintaropoulou, C., Ward, C., Wise, A., Marston, H., Turnbull, A. & Langdon, S.P (2015). A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarge*, 6, 25677–25695

Xu, C., Huang, M. T., Shen, G., Yuan, X., Lin, W., Khor, T. O., ... & Kong, A. N. T. (2006). Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Research*, 66(16), 8293-8296.

Yagi K., Furuhashi M., Aoki H., Goto D., Kuwano H., Sugamura K., ... & Kato M., (2002). c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 854–861.

Yagi, K. (1976). Simple Fluorometric Assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemistry Medicine*, 15, 212-216.

Yamamoto, N., Oyaizu, T., Enomoto, M., Horie, M., Yuasa, M., Okawa, A., & Yagishita, K. (2020). VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration. *Scientific reports*, 10(1), 2744.

Yang N. & Sheridan A.M. (2014). Cell cycle. *Encyclopedia of Toxicology*, 1, 753-758.

Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., ... & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 156(1), 317-331.

Yao, H., Lu, F., & Shao, Y. (2020). The E2F family as potential biomarkers and therapeutic targets in colon cancer. *PeerJ*, 8, e8562.

Ye, Z., Liang, Z., Mi, Q. & Guo, Y., (2020). Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *JBUON*, 25(1), 281-285

Yoo, J. J., Lim, Y. S., Kim, M. S., Lee, B., Kim, B. Y., Kim, Z., ... & Kim, Y. S. (2020). Risk of fatty liver after long-term use of tamoxifen in patients with breast cancer. *PloS One*, 15(7), e0236506.

Zhang J., Sheng S., Wang W., Dai J., Zhong Y., Ren J, ... & Liu L. (2022) Molecular Mechanisms of Iron Mediated Programmed Cell Death and Its Roles in Eye Diseases. *Frontier in Nutrition*. 9, 844757.

Zhang Y., Alexander P.B., & Wang X-F. (2017). Cold Spring Harbor. *Perspectives in Biology*, 9: 22 pages.

Zhang, M., Li, W., Yu, L., & Wu, S. (2014). The suppressive effect of resveratrol on HIF-1 α and VEGF expression after warm ischemia and reperfusion in rat liver. *PLoS One*, 9(10), e109589

Zhao, Z., Zhao, G., Chai, Y., Li, W., Song, K., Zhao, W., ... & Du, Y. L. (2023). Targeted genome mining for microbial antitumor agents acting through DNA intercalation. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(3), 520-526.

Zingue, S., Njuh, A. N., Tueche, A. B., Tamsa, J., Tchoupang, E. N., Kakene, S. D., ... & Njamen, D. (2018). In vitro cytotoxicity and in vivo antimammary tumor effects of the hydroethanolic extract of *Acacia seyal* (Mimosaceae) stem bark. *BioMed Research International*, 2018(1), 2024602.

Zuazo-Gaztelu, I., & Casanovas, O. (2018). Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Frontiers in Oncology*, 8, 248.

Zuhair, Z. (2011). The role of vitamin C in alteration of enzymes responsible of energy metabolism induced by administration of tamoxifen to mouse. *Advances in Biological Chemistry*, 1(02), 15.

ANNEXE

ANNEXE

Annexe 1 : Caractéristiques des lignées cellulaires

a) Lignée cellulaire CT-2A

CT-2A est une lignée cellulaire générée à partir d'un astrocytome malin, après implantation du 20-méthylcholanthrène dans le cerveau de souris C57BL/6J par **Seyfried *et al.* (1992)**. Cette lignée est peu différenciée, angiogénique, très proliférative, invasive, infiltrante et tumorigène. Les cellules CT-2A sont marquées par une faible distribution des gangliosides anti angiogéniques et une déficience des suppresseurs de tumeur PTEN/TSC2 (**Marsh *et al.*, 2008**).

b) Lignée cellulaire GL261

Il s'agit des cellules de gliome issues des souris 261, suite à une injection intracrânienne du 3-méthylcholanthrène. Elles sont généralement utilisées dans les thérapies expérimentales de glioblastome. Elles sont partiellement immunogénique, et possèdent des mutations activatrices de K-ras et inhibitrices de P53. Elle présente également une déficience en PTEN et une forte expression de C-myc (**Swatmari *et al.*, 2006**)

c) Lignée cellulaire B16-F1

Il s'agit d'un sous-clone de la ligné B16, qui est la première lignée cellulaire utilisée en recherche pour étudier les mélanomes. Elles ont été établies d'une tumeur spontanée formée derrière l'oreille des souris C57BL/6J. Ce sont les cellules épithéliales productrices de mélanine. Leurs caractéristiques génétiques sont peu connues ; cependant, elles sous-expriment les glycoprotéines du CMH1. Le sous clone B16F1 est faiblement métastatique contrairement au sous clone B16F10, et est utilisé pour étudier les tumeurs primaires (**Becker *et al.*, 2010**).

d) Lignée cellulaire YUMM 1.7

Il s'agit de l'acronyme de *Yale University Mouse Melanoma*. Les cellules de lignée YUMM proviennent des mélanomes de souris génétiquement modifiées C57BL/6J. Le sous clone YUMM 1.7 porte des mutations inhibitrice de PTEN , CDK2na et activatrice de Braf. Elles ont un niveau minimal d'immunogénicité (**Meeth *et al.*, 2016**)

e) Lignée cellulaire MCF-7

MCF-7 signifie *Michigan Cancer Foundation*, en référence à l'institut de Détroit où la lignée fut établie au 7^{ème} essai. Elle a été obtenue par culture *in vitro* à partir d'un épanchement pleural prélevé chez une patiente de 69 ans atteinte d'un cancer du sein métastatique. Cette lignée est positive aux récepteurs estrogéniques, et récepteurs de progestérone. Elle ne présente pas d'amplification du gène ERBB2 (Her2 /neu), pas de mutation du gène TP53 et est tumorigène chez les souris à la base (**Lee et al., 2015**). Cependant, un modèle de cellules MCF-7 sur-exprimant HER2 a été généré par **Benz et al. (1992)**.

Annexe 2 : Réactifs et consommables

a) Réactifs de dosage des composés bioactifs

i) Dosage des polyphenols totaux

- Carbonate de sodium (7,5%)
- Acide gallique
- Réactif de Folin-ciocalteu (0,2N)
- Ethanol (95%)

ii) Dosage des flavonoïdes

- Acétate de potassium (1M)
- AlCl₃ (10% p/v)
- Quercétine
- Ethanol (95%)

iii) Dosage des tanins

- Acide gallique
- Ethanol
- HCl (1 N)
- Vanilline (4%)

iv) Dosage des alcaloïdes

- Chlorure de fer III (0,025 M)
- Chlorure d'hydrogène (0,5 M)
- 1,10 Phénanthroline (0,05 M)
- Ethanol (95 %)

v) Dosage des terpenoïdes

- Méthanol (95%) ;
- Chloroforme ;
- Acide sulfurique concentré.

vi) LC-MS

- Méthanol
- Acide formique

b) Réactifs pour les tests antioxydants

i) Test de Piégeage du radical DPPH

- DPPH : 0,025 g/L
- Ethanol : 95 %

ii) Test de piégeage du radical ABTS

- ABTS (7,4 mM) ;
- Permanganate de potassium (4,9 mM) ;
- Tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,1 mM) ;

Préparation de la solution d'ABTS+

- **Solution 1** : Elle a été obtenue en dissolvant 19 mg d'ABTS dans 5 mL d'eau distillée ;
- **Solution 2** : Elle a été obtenue en dissolvant 3,871 mg de permanganate de potassium dans 5mL d'eau distillée ;
- **Solution de travail** : Elle a été obtenue en mélangeant les 2 solutions. Puis le mélange obtenu a été laissé à l'obscurité, 12 à 16 h avant utilisation. Cette solution a été diluée avec le tampon phosphate afin d'avoir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm

iii) Test de piégeage du NO

- **Nitroprussiate de sodium** (10 mM) : 250 ml cette solution ont été préparés en dissolvant 745 mg de nitroprussiate de sodium dans 240 ml de tampon phosphate (pH 7,4 ; 50 mM), puis le volume été complété à 250 mL avec la même solution tampon ;
- **Acide sufonique (0,33%)** : 250 ml de cette solution ont été obtenus en dissolvant 42,90 mg d'acide sulfanilique dans 240 ml d'acide acétique 20%et le volume complété à 250 mL avec la solution d'acide acétique 20%
- **Naphtyléthylène diamine (NED)** ou réactif de Greiss (0,1 mg/ml) préparé dans de l'eau distillée.

iv) test de reduction du Fer

- Ferrocyanure De potassium [$K_3Fe(CN)_6$ (1%),]

- Tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6),
 - Acide trichloracétique (10%),
 - Chlorure ferrique (0,1%).

v) Capacité antioxydante totale

- Acide ascorbique
- H₂SO₄ (0,6M)
- Molybdate d'ammonium (4mM)
- Phosphate de sodium (28mM)

c) Réactifs pour tests sur culture cellulaire

i) Préparation des milieux de culture

- Les cellules CT-2A étaient cultivées dans le milieu *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) sans L-glutamine. Supplémenté à 10% de sérum fœtal de bovin (SFB), 1% de pénicilline/streptomycine (P/S) et du Glutamax 1X.
- Les cellules GL-261 étaient cultivées dans le milieu DMEM, supplémenté avec 10% de SFB, 20mM HEPES (Acide 4(2-hydroxyléthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), 1mM de pyruvate de sodium (1%) , 1% P/S et 1% d'acides aminés non essentiels (AANE).
- Les cellules YUMM 1.7 et B16F1 étaient maintenues dans le milieu DMEM/F12 contenant 10% de SFB et supplémenté 1% de P/S et 1% d'AANE.
- Les cellules MCF-7 étaient cultivées dans le milieu *Eagle Minimal Essential Medium* (EMEM), supplémenté avec 2mM de Glutamine, 1% d'AANE et 10% SFB.

ii) Réactifs pour le test de cytotoxicité

- Milieux de culture adaptés aux différentes cellules,
- Réactif MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
- DMSO (Diméthylsulfoxyde)

ii) test de peroxydation lipidique

- RSL 3 (Selleckchem, USA)
- Ferrostatine,
- Cell Titer- Glo (Promega Corporation)

iii) Extraction de l'ARN (RNeasy mini kit)

- Tampon de lyse RLT (QIAGEN) : il a été préparé en ajoutant à chaque millilitre de RLT, 10μL de β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich)
- Ethanol 70%,

- Super mélange DNase 1 : préparé en mélangeant 10µL de DNase et 70µL de tanpon RDD
- Eau dépourvu d'ARN (RNase-free water),
- Tampon RW1 contenat du thyocyanure de guanidine
- Tampon RPE : préparé en ajoutant de l'éthanol (96 -100%) jusqu'au trait de jauge indiqué sur le flacon.

iv) Transcription inverse (iScript cDNA synthesis, BioRad)

- Mélange réactionnel 5X iScript contenant les amorces
- Transcriptase inverse iScript
- Eau dépourvue de nucléase

v) rt-PCR

- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) contenant l'ADN polymérase KAPA SYBR FAST, le tampon de réaction, SYBR Green I fluorescent, le MgCl₂ (2,5 mM), les dNTP et les stabilisateurs.
- Amorces sens (10 µM) et anti sens (10 µM) de séquences suivante

gènes	sens (5'- 3')	Anti sens (5'- 3')
<i>β-actin</i>	ACGACGTGGCAGCTCTCGTTGTGG	GGTGCTTCGGTCAGCAGCACGGA
<i>GAPDH</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	GAAGGTGGAAGAGTGGGTG
<i>HRPT</i>	TGGATACAGGCCAGACTTTGTT	CAGATTCAACTTGCCTCATC
<i>18s</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTACTAGCG
<i>VEGF</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	TTTACACGTCTGCGGATCTT
<i>IGF-1</i>	GTGTGGACCGAGGGGCTTTTACT	GCTTCAGTGGGGCACAGTACATC
<i>PDGF-R</i>	TAGCGCGGAACCTCAGAGAGA	TGGGAGGTCCCCATAGCTCC
<i>BCL-2</i>	ATGCCTTTGTGGAATATATGGC	GGTATGCACCCAGAGTGATGC
<i>BCL-6</i>	CCTGAGGGAAGGCAATATCA	GTTTAAGTGCAGGGGCCATT
<i>E2F1</i>	GAGGCTGGATCTGGAGACTG	GAAGCGTTTGGTGGTCAGAT
<i>E2F2</i>	AGTTGCTCCCTGAGCTTCAA	GCTCCTTGAAGTTGCCTACG
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IL-10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>IL-6</i>	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC
<i>IL-1β</i>	CTTGGGCCTCAAAGGAAAGAA	AAGACAAACCGTTTTTCCATCTTC
<i>TGF-β</i>	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA

vi) Extraction des protéines pour western Blot

- Tampon de lyse : RIPA, sodium déoxycholate 10%, Tris (pH 7,5 1 M), NaCl (5 M), EDTA (200mM), cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (*Calbiochem*)
- Azote liquide
- Trypsine-EDTA

- Kit BCA

vii) Electrophorèse

- Tampon Laemmli 5X : 90 µL [Tris/HCl (125 mM, pH 6,8), SDS (10%), saccharose (50%), bleu de bromophénol (0,05%), DTT (0,5 M)] + 10 µL β-mercaptoéthanol
- Tampon d'anode (10X, pH 8,9) : Tris base 1M (60,57g) + HCl 1M (9,38ml du 12M) + 500 mL l'eau ultra pure (Milli-Q)
- Tampon de cathode (10X, pH 8,25) : Tris base 1M (12,1 g) + SDS 1% (5ml de 20%) + 17,9 g de Tricine (1M), compléter à 100 mL avec de l'eau ultra pure
- Marqueurs de poids moléculaire (LI-COR)

viii) Transfert des protéines

- Tampon de transfert 1X, pH 8,6 : 36.34g de Tris base (300 mM) + 5,7 mL d'acide acétique glacial (100 mM) + 1L d'eau ultra pure
- Solution de lavage TBST
- Tampon de blocage TBS (Li-COR Odyssey)
- Membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF)

ix)

Révélation

immuno-

radiologique

- Anticorps primaire : d'origine murine pour la β-actine, et provenant du lapin pour la caspase-3 le pMLKL et MLKL. L'anticorps primaire était préparé dans 5 ml de tampon de blocage LI-COR Odyssey (TBS)
- Les anticorps secondaires (LI-COR) provenant du singe, spécifique à l'anticorps de souris anti β-actine couplé à l'IR 800 et spécifique à l'anticorps de lapin anti caspase-3 clivée, ou pMLKL ou MLKL couplé à l'IR 680. Ils ont été dilués à 1:15.000 dans le tampon de blocage TBS.

d) Induction du cancer du sein

- 7,12-diméthylbenz-a-anthracène (DMBA)
- Diazépam injectable 5mg /mL
- Kétamine 50 mg/mL

Préparation de la solution de DMBA

Propriétés anticancéreuses de graines d'*Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

Le DMBA a été préparé 12 heures avant administration pour s'assurer de sa dissolution complète. La poudre a été dissoute dans de l'huile de maïs à la concentration de 50mg/mL.

f) Dosage des promoteurs cancéreux

i) Dosage EGF (Kit BioRad)

- Microsphères cotées (Multiplex 10×), anticorps de détection (Multiplex 10×),
- Standards,
- Diluant de l'anticorps de détection (HB),
- Diluant pour échantillons(HB), diluant pour standard (HB),
- Tampon de test et tampon de lavage ;
- Streptavidine-PE (100×).

iii) Dosage de l'œstradiol (Kit Monobind)

- Réactif enzymatique de l'œstradiol ;
- Œstradiol biotine ;
- Plaque de 96 puits induits de streptavidine,
- Solution de lavage concentrée,
- Réactif de substrat,
- Solution d'arrêt,
- Tampon de lavage,

iv) Dosage du glucose mammaire (Kit Chronolab)

- Etalon glucose 100mg/dl : Tampon pipes (50 mmol/L) pH 7,2 et Phénol (2,0 mmol/l)
- Réactif enzymatique (4-amino antipyrine 0,7mmol/L ; Glucose oxydase 4000U/l ; Peroxydase 4000U/L)

g) Analyse histologique

- Ethanol ;
- Xylène ;
- Paraffine ;
- Gélatine ;
- Hématoxyline ;

- Eosine.

h) Dosage du NO plasmatique

- NED (0,1 % dans l'eau distillée) ;
- Sulfanilamide (1 % dans 5 % d'acide phosphorique) ;

i)

Dosage des paramètres du profil

lipidique



Dosage des Triglycérides

- **R1 (Tampon) :**

Tampon GOOD pH 7,5	50 mmol/L
P -chlorophénol	2 mmol/L
- **R2 (enzymes) :**

Lipoprotéine lipase (LPL)	150 000U/L
Glycérol kinase (GK)	500U/L
Glycérol-3-phosphate oxydase (GPO)	2500U/L
Peroxydase (POD)	440U/L
4-Aminophénazone	0,1 mmol/L
- ATP
- **R3 (Solution étalon) :** Triglycérides standard 200 mg/dL



Dosage du Cholestérol total (Kit

Chronolab)

- R1 (Tampon) :**

Tampon PIPES pH 6,9	90 mmol/L
Phénol	26 mmol/L
- R2 (Réactif enzyme) :**

Cholestérol estérase	300U/L
Cholestéroloxydase	300U/L
Peroxydase	1250U/L
4-Aminoantipyrine	0.4 mmol/L
- R3 (Solution étalon) :** Cholestérol standard 200 mg/dL

J) Dosage des transaminases

- **Substrat ALAT :** L-alanine 1,78 g et α -cétoglutarate 30 mg. Ces deux réactifs ont été dissouts dans 20 mL de tampon phosphate pH 7,4, le pH de la solution a été ajustée à 7,5 avec du NaOH (0,4N). Le volume a été complété à 100 mL avec du tampon phosphate. Le substrat obtenu avait une concentration en α -cétoglutarate de 2 mM et en α -L alanine de 200 mM.
- **Substrat ASAT :** acide L-aspartique (2,66g) et α -cétoglutarate (30mg). Ces deux réactifs ont été dissouts dans 20ml de tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,4M) et le pH a été

ajusté à 7,5 avec du NaOH (0,4N). Ensuite le volume a été complété à 100ml avec le tampon phosphate. Un substrat avec des concentrations en α -cétoglutarate de 2 mM et en acide aspartique de 200 mM a été obtenu.

- **Tampon phosphate (0, 1M) pH 7,4** : Une masse de 13,40 g de phosphate disodique a été dissoute dans 500 mL d'eau distillée, parallèlement, une masse de 1,36 g de phosphate monopotassique a été dissoute dans 100 mL d'eau distillée. La solution de phosphate disodique a été titré par la solution de phosphate monopotassique jusqu'au pH 7,5, et le volume a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

- **Réactif de coloration** : Il a été préparé en dissolvant 0,0198 g de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans 100 mL de HCl (1N).
- **Solution d'arrêt** : 16g NaOH (0,4 N) ont été dissouts dans 1000 mL d'eau distillée.
- **-Etalon pyruvate (2 mM)** : 22 mg de pyruvate de sodium ont été dissouts dans 100 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,5)

k) Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (LABKIT)

R1 (Tampon) : Diéthanolamine (DEA) Ph 10,4 (1 mmol/L) ; Chlorure de magnésium (0,5 mmol/L) ;

R2 (Substrat) : p-nitrophénylphosphate (pNPP) (10 mmol/L)

l) Dosage de l'acide urique (Kit Chronolab)

- **R1 (tampon)** : Phosphate pH 7,4 (50 mmol/L) ; 2-4 Dichlorophénol sulphonate (4 mmol/L) ; DCPS ; 4 - Aminophénazone (4-AF), (1 mmol/L)
- **R2 (enzymes)** ; Uricase (60 U/L) ; Peroxydase (660 U/L) ; Ascorbate oxydase (200 U/L)

m) Dosage de la créatinine

- Réactif 1 : acide picrique (8,8mM) ;
- Réactif 2 : NaOH (0,4M)

La solution de travail (picrate alcalin) est préparée en mélangeant à volumes égaux, l'acide picrique et la soude.

n) Mesure de l'activité de la catalase

- Peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (0.2M) ;

Propriétés anticancéreuses de graines d'*Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

- Tampon phosphate (0.01M ; PH 7.0) ;
- Dichromate - acide acétique (10Mm) : mélanger 100ml de Dichromate de potassium (5%) avec 300mL d'acide acétique concentré.

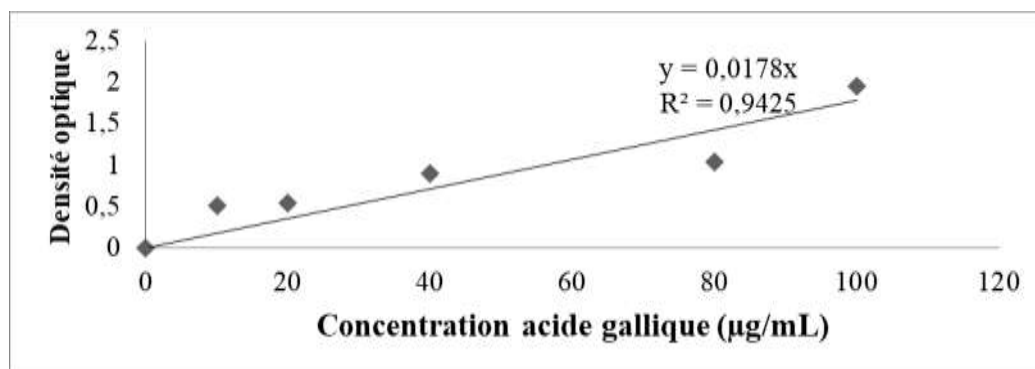
o) Dosage du MDA

- Acide trichloroacétique (TCA) 20% p/v ;
- Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% p/v ;
- HCl 1 N ;
- Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% p/v.

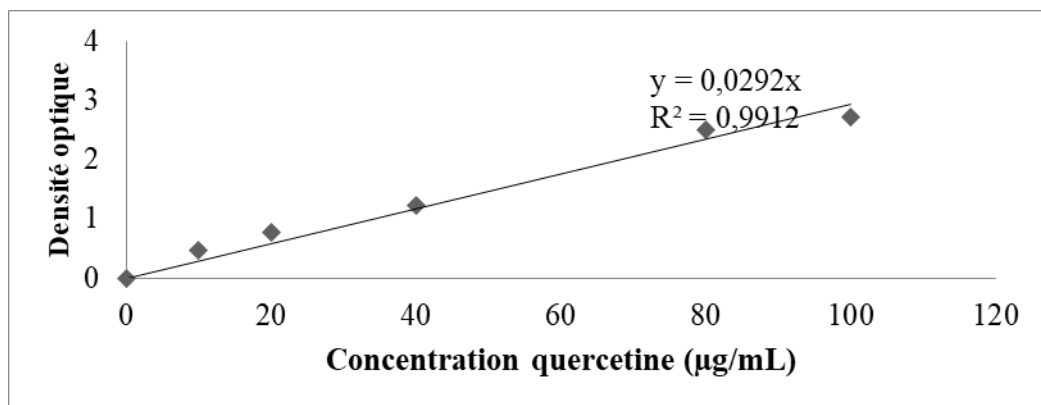
Préparation de la solution de TBA

Trois cents soixante-quinze milligrammes (375 mg) de TBA, 20 g de TCA, 0,01 g de BHT, 25 mL de HCl (1N) et 50 mL d'eau distillée sont introduits dans un bécher. La solution obtenue est chauffée à 40°C dans un bain-marie jusqu'à solubilisation complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 mL. Le volume est complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques

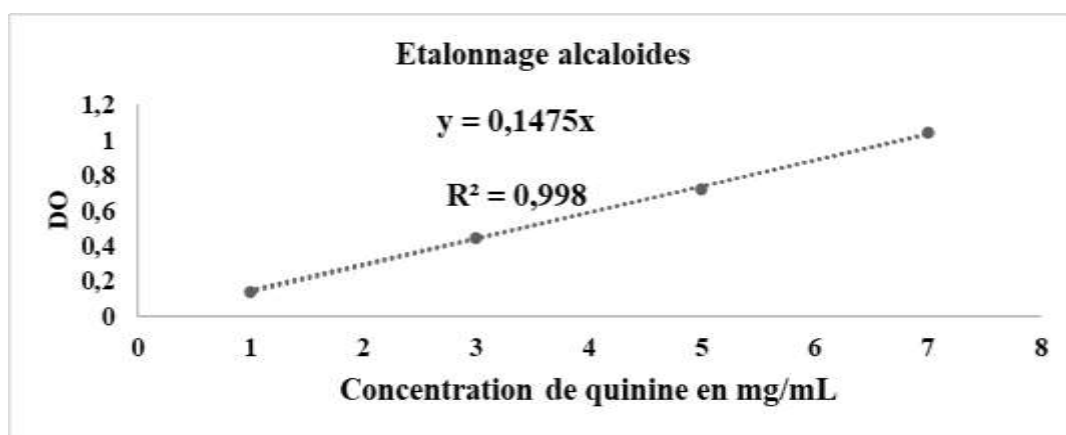


Annexe 4 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

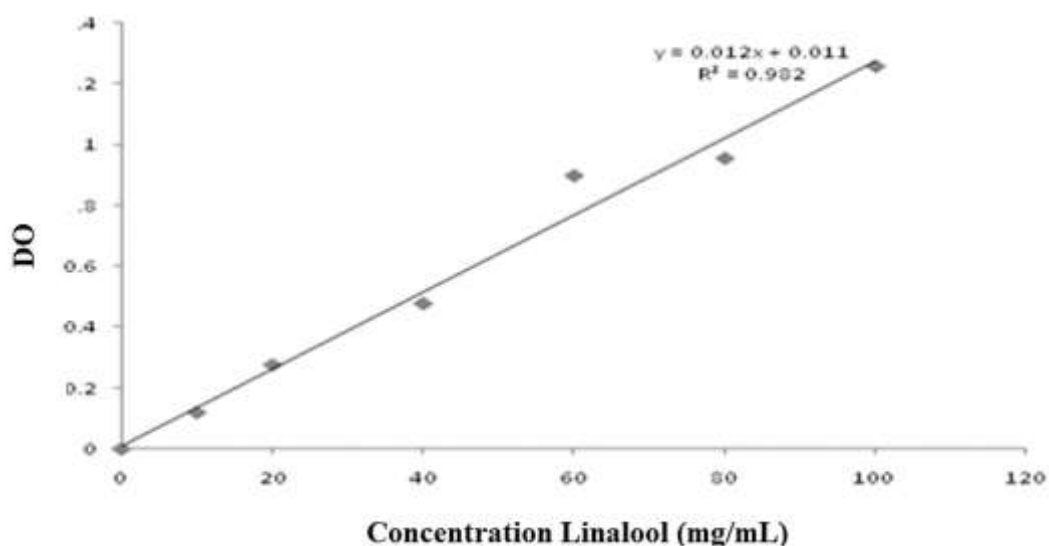


Annexe 5 : courbe d'étalonnage des tanins

Annexe 6 : Courbe d'étalonnage des alcaloïdes

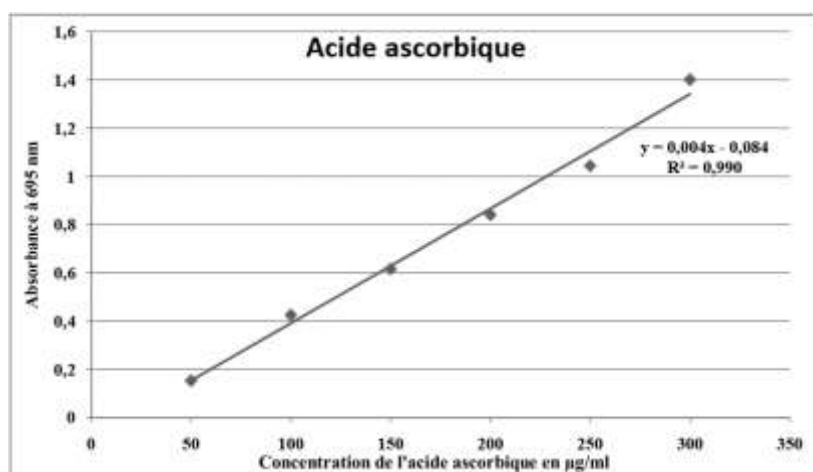


Annexe 7 : Courbe d'étalonnage des terpénoïdes



Propriétés anticancéreuses de graines d'*Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

Annexe 8 : courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante totale



Annexe 9 : clairance éthique

Centre de Recherche et Formation Doctorale, Science de la Vie, Santé et Environnement (CRFD-SVSE)
Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences
University of Yaoundé I (UYI)



Joint Institutional Review Board for Animal & Human Bioethics (JIRB)
Email: jirbsecretariat@gmail.com

26 May 2023

MAKAMWE Inelle
University of Yaoundé 1, Faculty of Science
Department of Biochemistry

Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2023-084 (please use this reference number for all correspondences)

Protocol Title : « Evaluation des propriétés anticancéreuses des graines d'*Aframomum angustifolium* dans la prise en charge du cancer du sein »

Investigator(s) Name(s): Makamwe Inelle, Ph.D. Student; Prof. Kengne Nouemsi Anne Pascale & Professor Oben Julius Enyong, Supervisors.

The proposed research protocol and related documents have been reviewed and deliberated by the JIRB of the Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences (CRFD-SVSE) at the Biotechnology Centre, University of Yaoundé 1, on the 17th of February 2023.

The JIRB is satisfied with the current version of the research protocol and supporting documents, and agreed that there is no objection on ethical grounds to the proposed study. The JIRB is therefore pleased to grant approval on the consideration that the research team will strictly abide by the conditions of the approval below:

- Investigators must strictly follow the plan of the approved protocol. Any changes to the approved protocol will require prior JIRB approval.
- Must be promptly reported to the JIRB: (1) Any deviations from or changes to the protocol that are made to eliminate immediate hazards to the fauna or study participant; (2) All risks that may be rare or remote and especially those that may entail serious consequences or compromise potential benefits or that would affect the conduct of the research.
- Must prepare and submit a standard progress report of the research to the JIRB at completion or one year from the date of issuance of the approval letter and thereafter, on an annual basis.
- Must notify the JIRB when the research is completed. Failure to submit an annual progress report on the study may affect the conditions of approval.

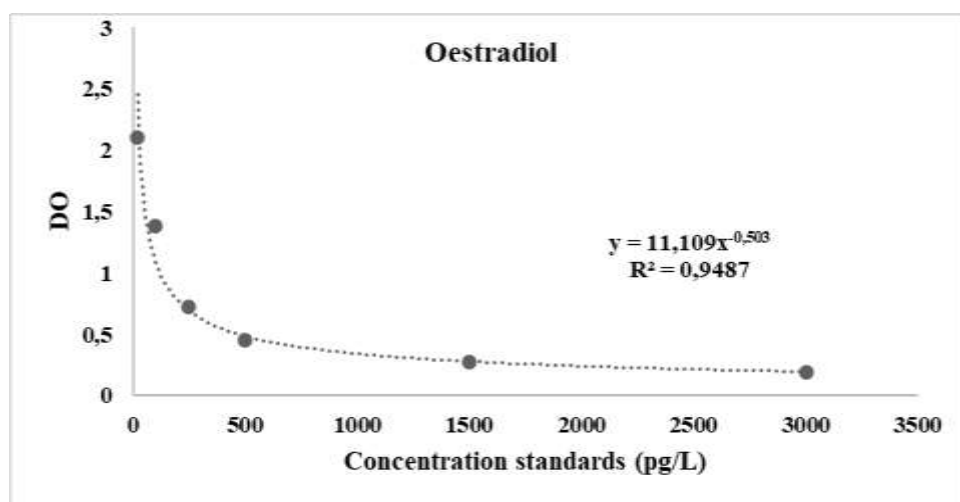
The current ethical clearance is for one-year renewable, on the condition that a progress report is submitted to the JIRB.

Sincerely,

Professor Frederic Nico Niayou
Coordinator for Animal Research Bioethics,
Faculty of Science, UYI



Annexe 10 : courbe d'étalonnage de l'oestradiol

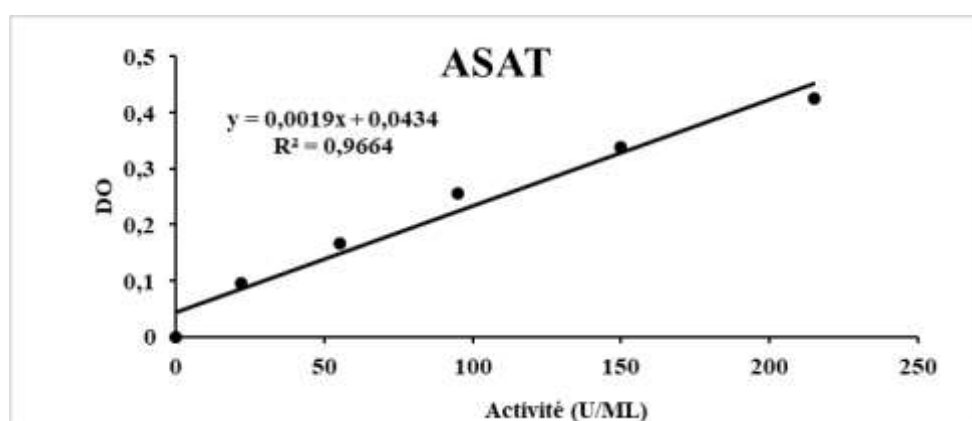
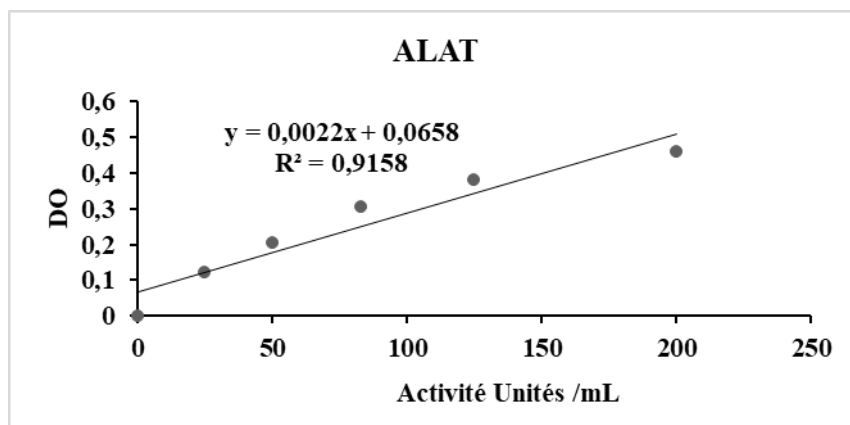


Annexe 11 : Etalonnage des transaminases

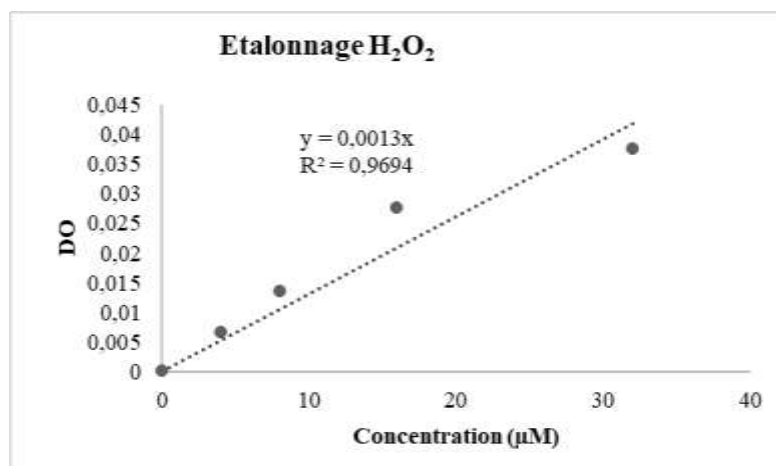
Tubes	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Substrat ALAT/ASAT (mL)	0,1	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05
Pyruvate de sodium /Oxaloacétate 2mM (mL)	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
DNPH (0,0198%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incubation 20 minutes à température ambiante						
NaOH 0,4N (mL)	1	1	1	1	1	1
Laisser à température ambiante pendant 5 minutes et lire la DO à 505 nm contre le blanc						
Activité correspondante						
ALAT (unités /mL)	00	25	50	83	126	200
ASAT(unités /mL)	00	22	55	95	150	215

Substrat ASAT : α -cétooglutarate + aspartate (2 mM/200 Mm) ;

Substrat ALAT α -cétooglutarate + alanine (2 mM/200 Mm)



Annexe 12 : courbe
d'étalonnage catalase



Annexe 13: protocole de dosage des protéines totales

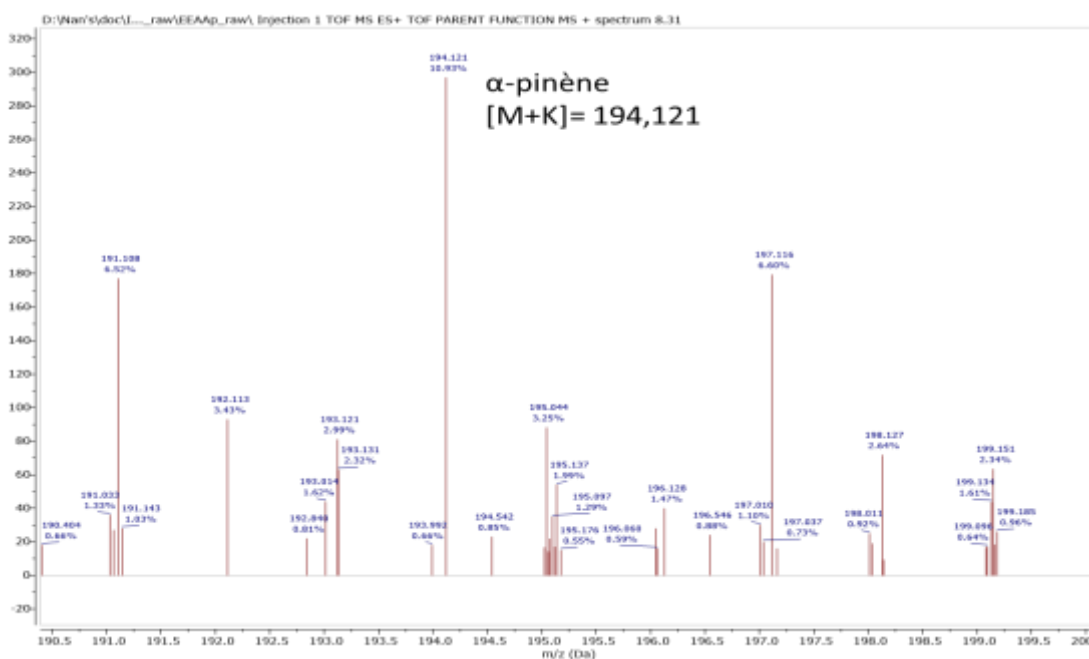
Les tubes expérimentaux ont été constitués de 100 µL d'homogénat ou de plasma ou de BSA (1mg/mL) et de 3 mL de réactif de Biuret. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité puis à température ambiante, les densités optiques ont été lues à 540 nm

Propriétés anticancéreuses de graines d'*Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

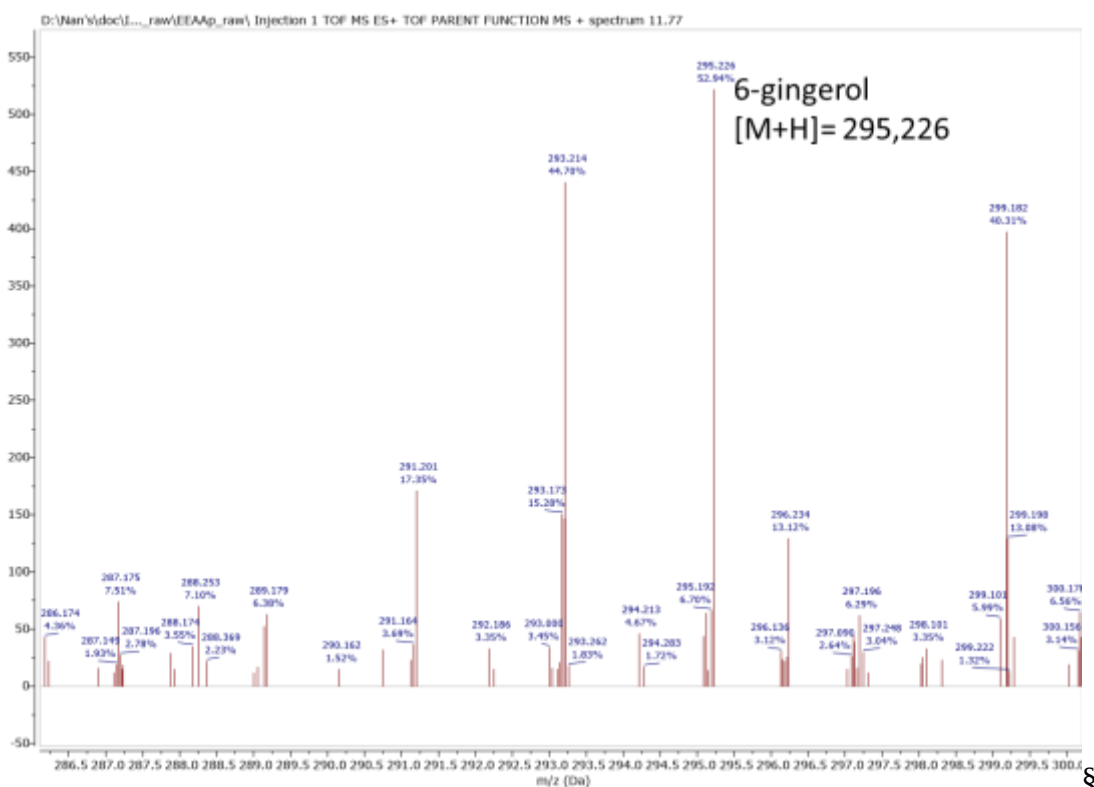
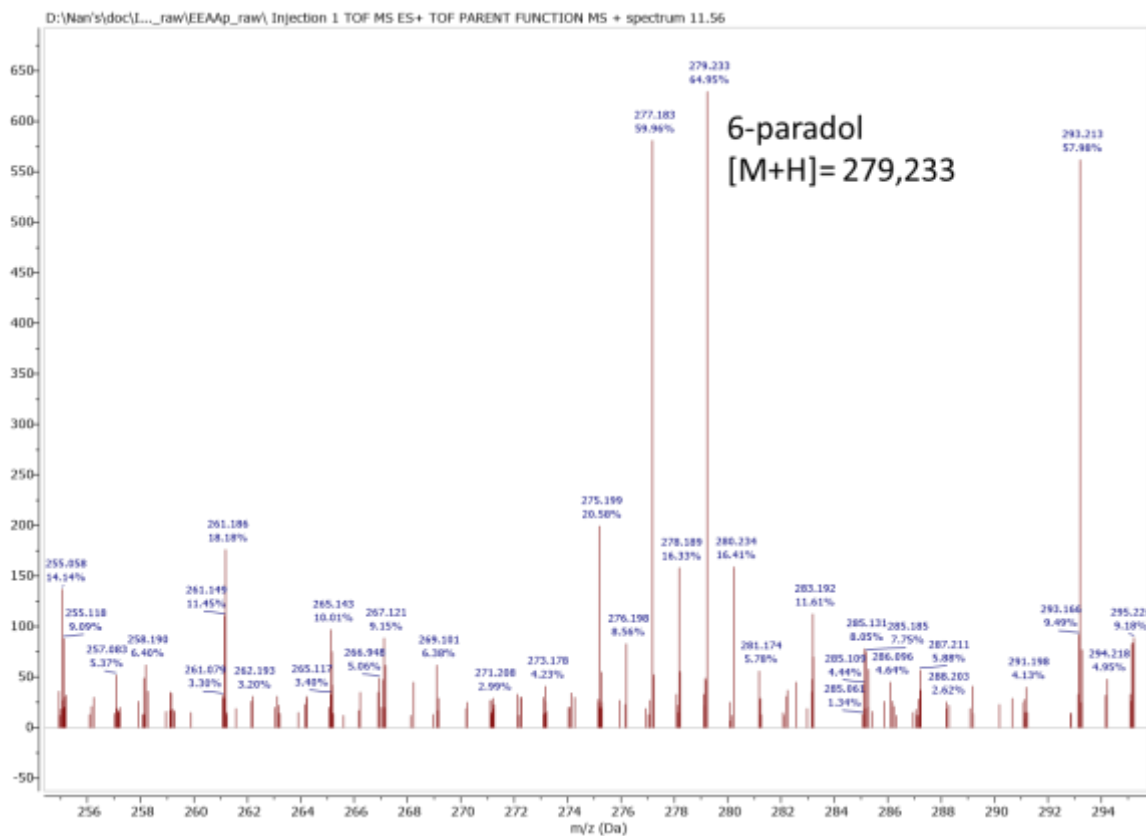
contre le blanc qui contenait 3 mL de la solution de réactif et 100 µL de NaCl 0,9 % incubé dans les mêmes conditions.

Les concentrations en protéines totales ont été déterminées à partir de l'équation suivante : Protéines (mg/mL) = (DO (essai) / DO (étalon)) x Concentration de l'étalon

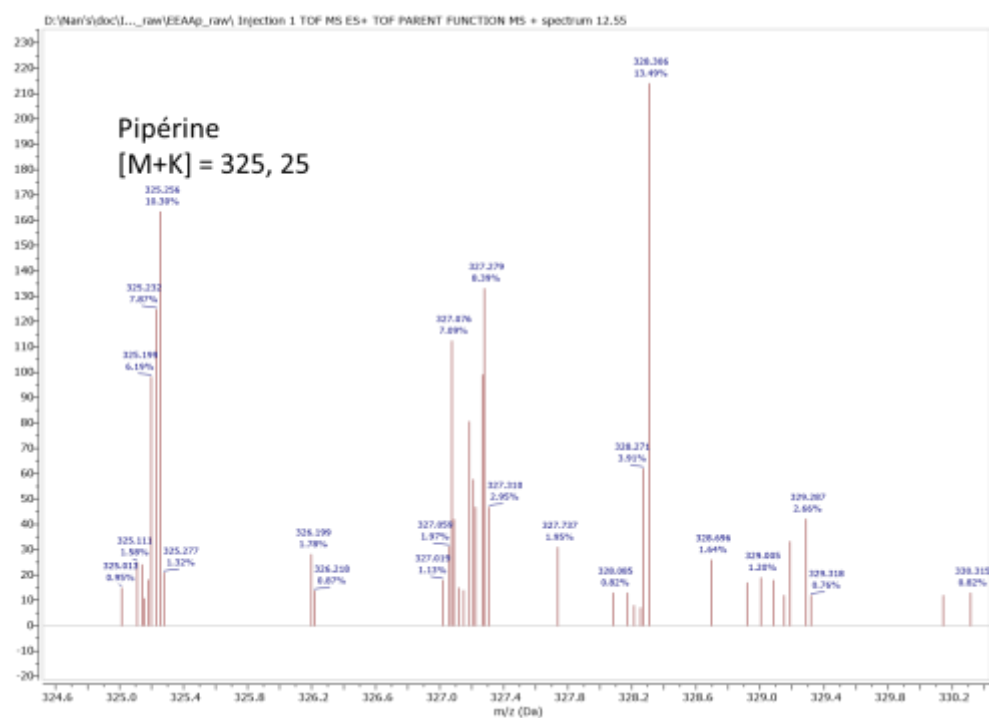
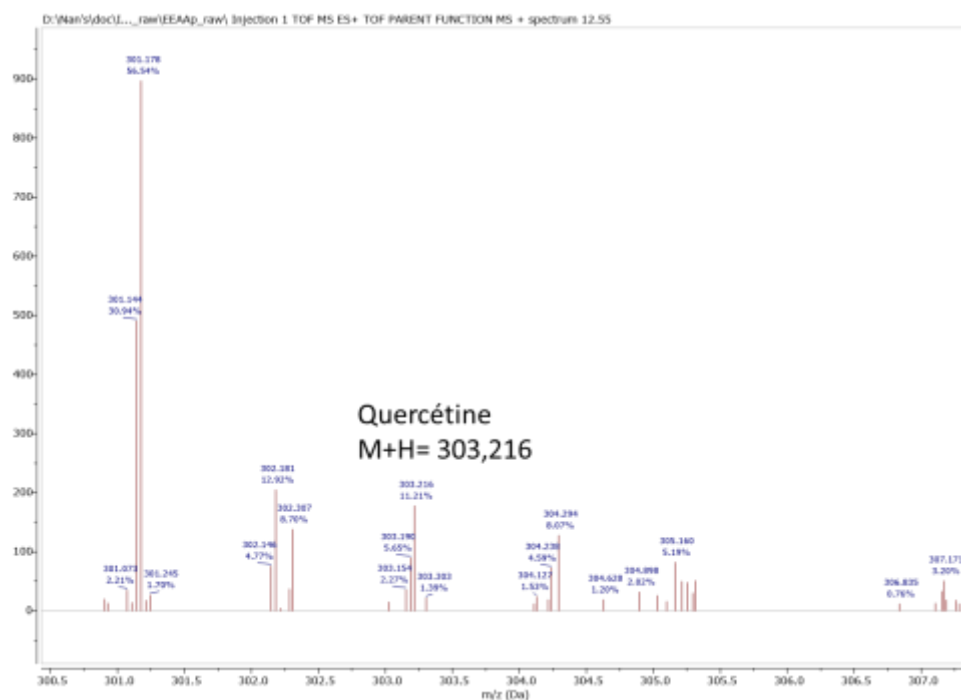
Annexe 14 : Spectres de masse des composés identifiés dans l'EEAa

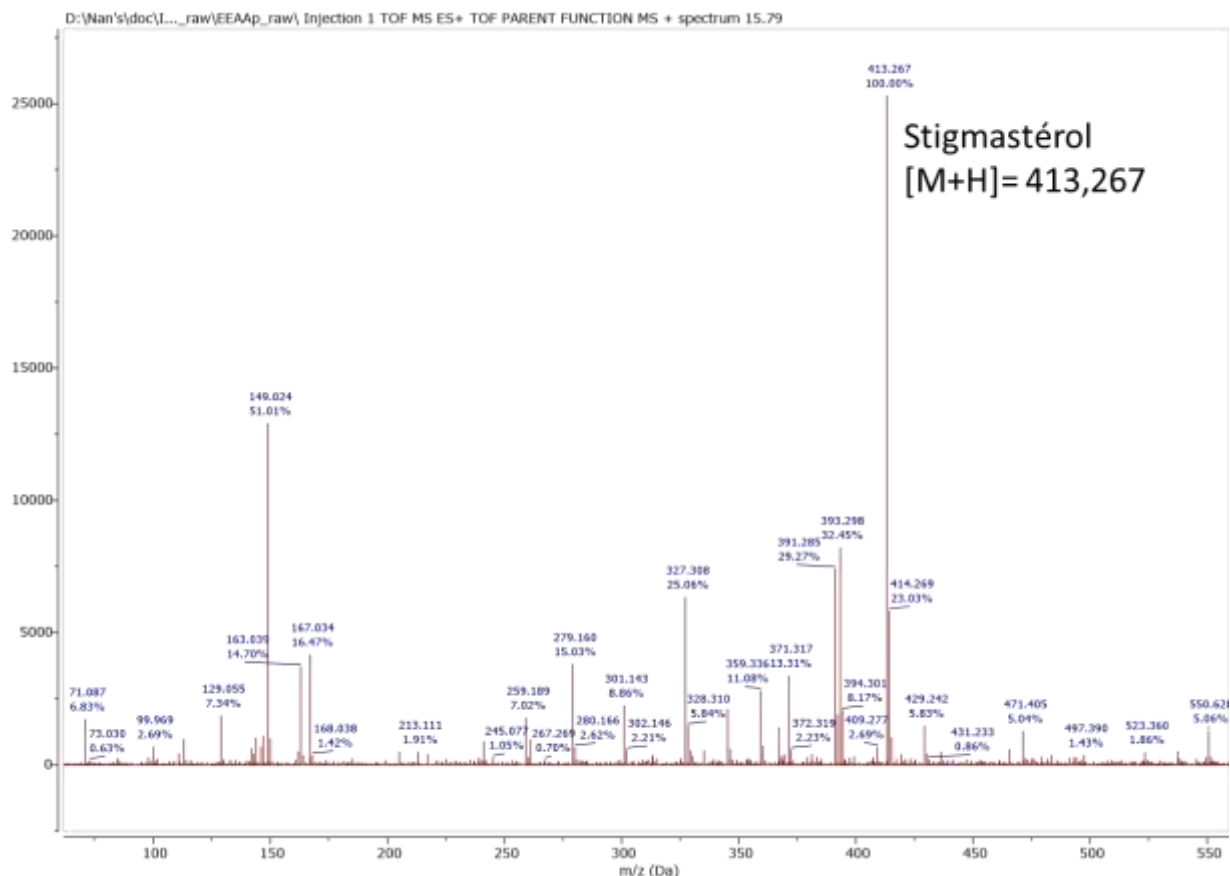


Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer

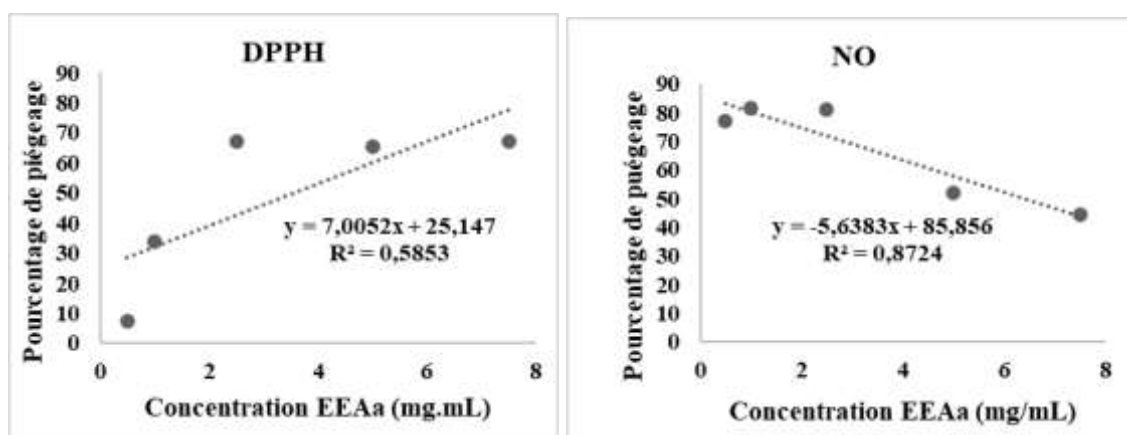


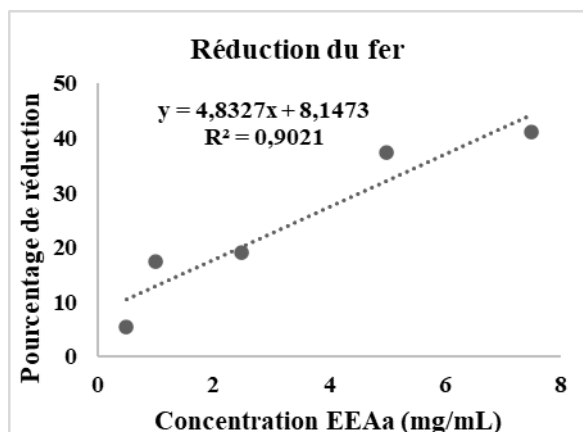
Propriétés anticancéreuses de graines *d'Aframomum angustifolium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer



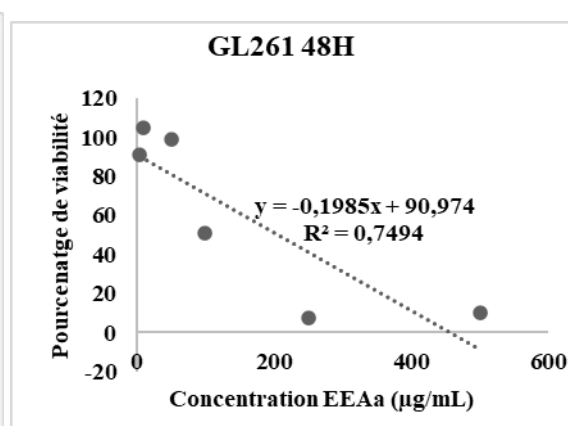
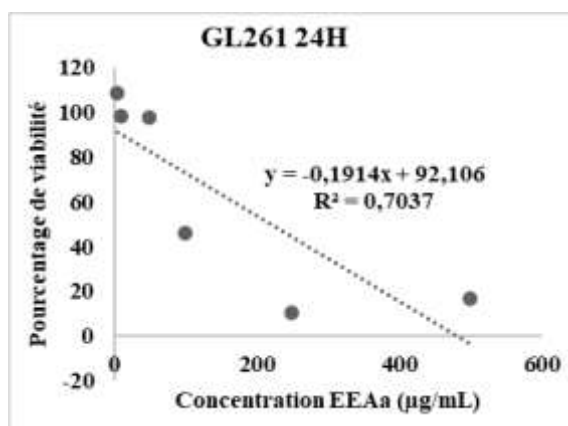
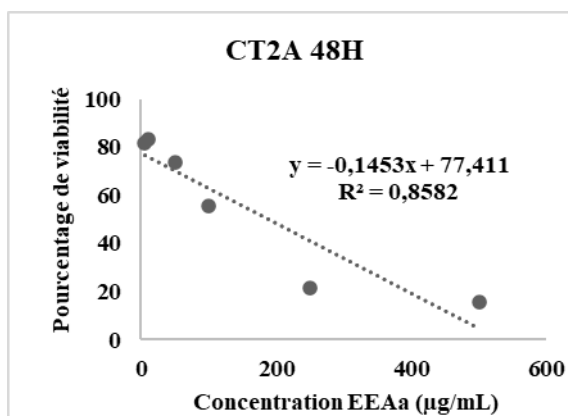
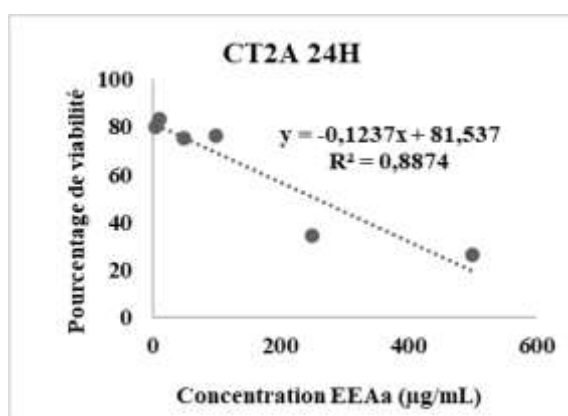


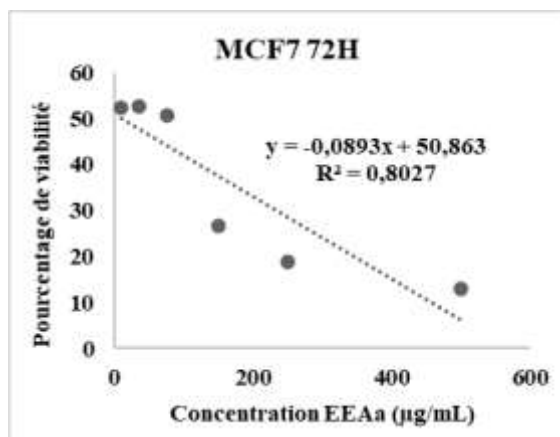
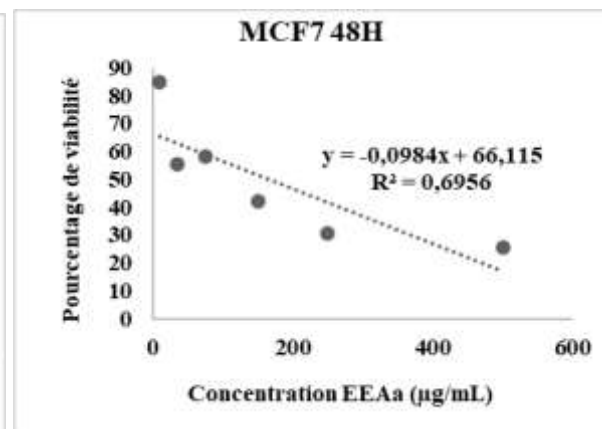
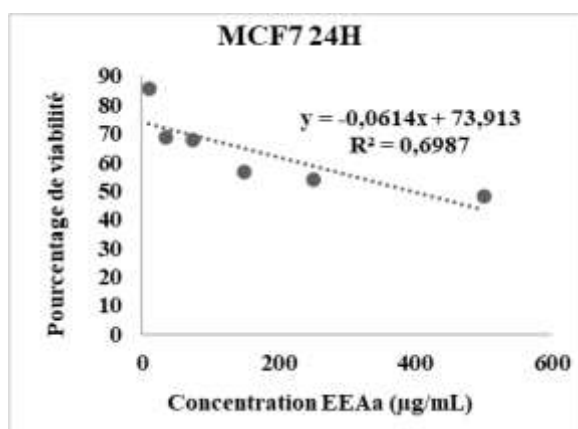
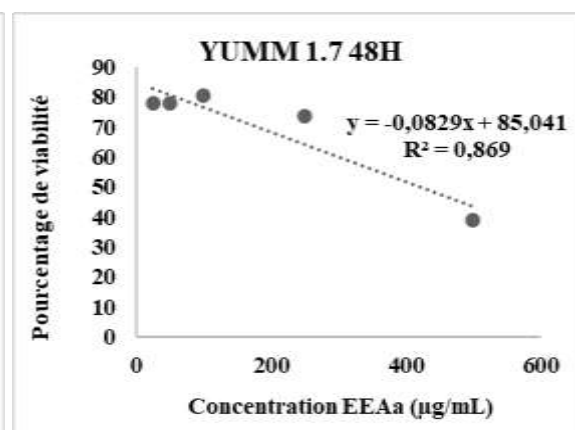
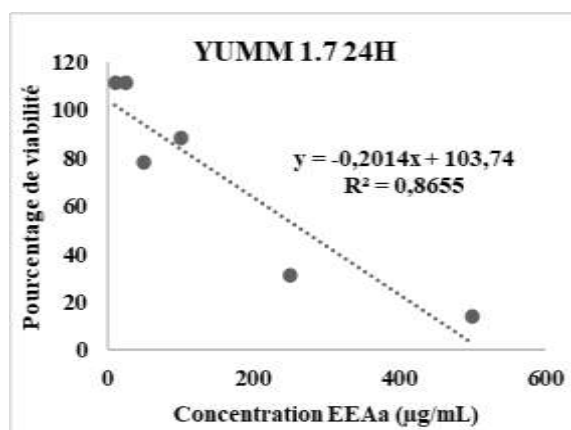
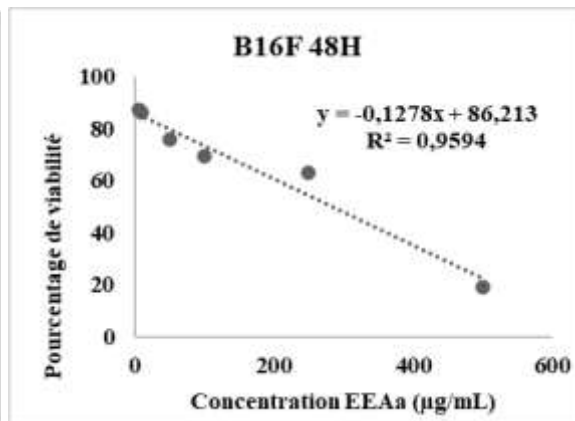
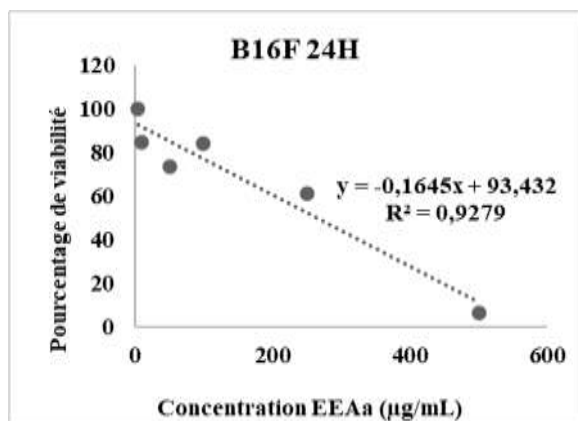
Annexe 15: Régression linéaire des tests antioxydants *in vitro*





Annexe 16 : Régression linéaire des tests de viabilité cellulaire







The ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds protects against tamoxifen-induced side effects in rats with breast cancer

Inelle Makamwe¹ · Françoise Raïssa Ntentie^{2,3} · Mary-Ann Angie Mbong^{1,3} · Anne Pascale Nouemsi Kengne⁴ · Huiny Miriane Fotso Tienoue¹ · Guy Roussel Nguemto Takuissu^{3,5} · Ulrich Aimée Ngankam Onsi¹ · Stéphane Zingue⁶ · Julius Enyong Oben^{1,3}

Received: 10 April 2023 / Accepted: 17 August 2023 / Published online: 14 September 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Institute of Korean Medicine, Kyung Hee University 2023

Abstract

Long-term use of tamoxifen (TAM) is associated with severe side effects. The present study aimed at evaluating the protective effect of the ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds (EEAA) against some adverse effects of TAM in female *Wistar* rats with 7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene (DMBA)-induced breast cancer. Breast cancer was induced through the subcutaneous administration of 50 mg/kg, bw of DMBA while normal rats constituted the control group. Twelve weeks later, breast cancer rats were randomised 5 per group and treated or not with 3.3 mg/kg, bw of tamoxifen alone, or tamoxifen plus either 150 or 300 mg/kg, bw of EEAA during 28 days, after which all animals were sacrificed under anaesthesia. The effects of the treatment on the uterus, body weight, lipid profile, liver and kidneys were evaluated. The EEAA at 300 mg/kg, bw significantly prevented tamoxifen-induced uterus's hyperplasia by reducing serum estradiol level from 896.85 ± 54.57 (tamox alone) to 639.81 ± 43.41 pg/L. The extract at both doses prevented metabolic disturbance by increasing body weight, lowering triglyceride and total cholesterol levels and also prevented lipids accumulation in the liver. Catalase activity and TBARS levels were ameliorated ($p < 0.05$) in the liver and kidneys leading to the improvement of the integrity of these organs. Also, an amelioration of plasmatic activities of transaminases alkaline phosphatase and uric acid levels was noted. The ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds can be considered a potential source of bioactive compounds for the management of the side effects of TAM among breast cancer patients.

Keywords Breast cancer · *Aframomum angustifolium* seeds · Tamoxifen · Sides effects

Introduction

Breast cancer is the most common cancer among women, and the most common estrogen-dependent cancer worldwide (Hall et al. 2021). Among the proposed therapy, tamoxifen (TAM) a selective estrogen receptor (ER) modulator has become one of the most frequently prescribed anticancer drugs worldwide (Yong et al. 2020). It is also used for the chemoprevention of breast cancer in women who are at high risk and also to lower the risks of breast cancer recurrence and contralateral breast cancer. For these purposes, TAM can be administered for long periods of up to 5–10 years (Hu et al. 2015; Gu et al. 2017). It has been reported that the long-term use of TAM is associated with an increased incidence of endometrial hyperplasia and even endometrial cancer (Gu et al. 2017; Emons et al. 2020).

Tamoxifen is known to be an agonist of the ER in the endometrium where it induces mitosis in epithelial cells

✉ Françoise Raïssa Ntentie
franc_ntentie@yahoo.fr

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

² Department of Biological Science, Higher Teachers' Training College, University of Yaoundé 1, P.O. Box 47, Yaoundé, Cameroon

³ Cameroon Nutrition and Dietetics Research Centre, J&A Oben Foundation, P.O. Box 8348, Yaoundé, Cameroon

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

⁵ Institute of Medical Research and Medicinal Plant, Ministry of Scientific Research, P.O. Box 13033, Yaoundé, Cameroon

⁶ Faculty of Medicine and Biomedical Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 1364, Yaoundé, Cameroon

(O'Brien et al. 2006; Emons et al. 2020). Moreover, the long-term use of TAM is associated with an increased serum estradiol level (Mvondo et al. 2020) which is known to play an important role in endometrial cancer (EC) development; through its ability to enhance the up-regulation of fat mass and obesity-associated gene expressions via the activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase C/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) and mitogen activating protein kinase (MAPK) signal pathways, thus increasing endometrial cell proliferation (Yang et al. 2019). It has also been reported that TAM has deleterious effects on the liver and kidneys and can induced metabolic disorders and oxidative stress (Faiza 2016; Klötting et al. 2020).

Since the socio-economic context of sub-Saharan African populations, marked by poverty, is not favourable to an early diagnosis of cancers resulting in poor treatment outcomes (Nguefack et al. 2012; Mvondo et al. 2021), the search of biomolecules for the management of the side-effects of an ongoing cancer treatment is of interest. Thompson et al. (2011), have suggested to focus research on compounds or substances that enhance antitumor activity or reduce side effects of existing treatments to increase their benefits. *Aframomum angustifolium* is a plant of the family *Zingiberaceae*, a great family of antiproliferative plants (Amadi et al. 2016). A phytochemical screening of *A. angustifolium* revealed the presence of saponins, tannins, alkaloids, steroids, cardio-glycosides, flavonoids, and terpenoids (Inkoto et al. 2021) which have already shown significant efficiency in the management of several disorders. A chromatographic profile of essential oil from its seeds showed the presence of limonene and α -pinene (Anywar and Kirimuhuzya 2015), which have been characterised as antitumoral molecules (Bahare et al. 2019; Hennia et al. 2019). Also, experimentations carried out on the ethanolic extract of its seeds revealed its protective effects against potassium bromide-induced liver and kidneys toxicity in rats (Ebbohimen et al. 2020; Ebboghimen and Okolie 2021). The current study was carried out to evaluate the protective effects of the ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds against some major side effects of TAM in a breast cancer rat model induced with 7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene.

Material and methods

Plant material and extraction

The plant material consisted of *Aframomum angustifolium* seeds. After taxonomical identification at the Cameroon National Herbarium of the plant harvested in Baham (West Region of Cameroon) in April 2019, the fruits were washed and shade dried until a constant mass was obtained. The dried fruits were peeled, and the seeds collected then

grinded. For the preparation of the ethanolic extract, 250 g of powder were macerated for 72 h in 1000 mL of 95% ethanol then filtered using Wattman's paper n°3. The obtained filtrate was evaporated and dried at 50 °C in a ventilated oven (Binder, USA) to obtain the ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds (EEAA) which was transferred in a clean glass container and stored at room temperature.

Experimental study

Animals

Thirty (30) female *Wistar* rats were provided by the animal breeding facility of the Laboratory of Animal Biology and Physiology of the University of Yaoundé 1 and transferred to the Laboratory of Nutrition and Nutritional Biochemistry for experimentation. The rats were housed at room temperature (25 ± 2 °C) under a 12 h light: 12 h dark cycle and acclimated one week before the beginning of the experimentation. A standard food and water were provided *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the principles and procedures of the European Union on Animal Care guidelines adopted by the Joint Institutional Ethics Committee of the University of Yaoundé I.

Breast cancer induction on female rats

The 7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene (DMBA) ($\geq 95\%$ purity) was purchased from Sigma-Aldrich (Stanford, Germany) and dissolved 12 h before use in corn oil (50 mg/mL). The protocol described by Mvondo et al. (2021) with some modifications was used. Rats were divided into 2 groups: the first group of 5 rats was used as normal control and the 25 other rats were first anesthetized by intraperitoneal administration of Diazepam (10 mg/kg, bw) and Ketamine (50 mg/kg, bw). Then, 50 mg/kg, bw of DMBA solution was administered to animals by subcutaneous injection under the nipples. Animals were observed and their breasts were palpated during 3 months. After this period, animals with orange peel-like skin around the nipples (48% of animals) and those with breast nodes (32%) were randomised for the treatment. Rats which did not developed cancer (20%) were excluded and euthanized by cervical dislocation after anaesthesia with Ketamine and Diazepam.

Animal's treatments

The 20 animals which had positively reacted to induction were randomly divided into four (4) groups of 5 rats each and treated as follows:

- DMBA group: untreated rats, received vehicle (water) at 5 mL/kg, bw

- TAM group: received vehicle and tamoxifen at 3.3 mg/kg, bw
- EEAA 150 + TAM group: received ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds at 150 mg/kg, bw and 3.3 mg/kg, bw of tamoxifen
- EEAA 300 + TAM group: received ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds at 300 mg/kg, bw and 3.3 mg/kg, bw of tamoxifen
- Also the NC group: constituted of the 5 normal animals with no breast cancer induction received 5 mL/kg, bw of water

Tamoxifen citrate (purchased from Mylan SAS, Saint Priest, France) and the plant extract were dissolved in distilled water and administered daily by gastric intubation. The volume of administration was 5 mL/kg, bw. In TAM plus extract treated groups, TAM was administered one hour after plant extract or vehicle administration. The treatment lasted 28 days during which animals were weighed once a week and the percentage weight variations was computed using the following formula:

Percentage of weight variation = $[(W_x - W_0)/W_0] \times 100$
 where W_0 is the initial weight and W_x the weight after a week X.

Animal sacrifice and preparation of biological samples

On the 29th day of experimentation, animals were sacrificed under anaesthesia (Ketamine and Diazepam) after a 12H overnight non-hydric fasting. Blood was collected from each rat by cardiac puncture into an anticoagulant-free tube (about 2 mL) and an ethylen-diamine tetra-acetic acid (EDTA) anticoagulant-containing tube for the preparation of serum and plasma respectively.

The uterus, liver, and kidney were also collected. Ten percent (10%) of liver and kidney homogenate were prepared with phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 M) and stored at -20°C for biochemical analysis. The uterus and the other parts of the kidneys as well as liver were fixed in 10% formaldehyde for histological analysis.

Evaluation of the effect of treatment on the uterine endometrium

Determination of serum estradiol level

The circulating estradiol level was assessed through ELISA method using a kit from Monobind Inc. (Lake Forest, CA 92630, USA) according to the manufacturer instructions. Calibrators provided with the kit were assayed in duplicate and the means of their absorbance at 450 nm were used to determine the concentration of estradiol in the samples.

Histological analysis of the endometrium

The portions of the uterus that were previously fixed in 10% formalin solution were dehydrated in ascending series of ethanol, cleared in methyl benzoate and embedded in paraffin wax. Section of 5 μm thick were cut using a microtome, then fixed to slides and stained with Harris's hematoxylin and eosin. Histomorphological changes were determined under 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). The software image J 1.3 was used to analyse and measure the thickness of the uterine epithelium.

Evaluation of the effect of treatment on lipid profile

Lipid profile was evaluated through the quantification of total cholesterol and triglycerides levels in the plasma, using reagent standard kits (CHRONOLAB).

Evaluation of the effect of the treatment on liver and kidney functions

The protective effect of the extract on liver function was evaluated through the determination of plasmatic transaminases (Reitman and Frankel 1957) and alkaline phosphatase (Bergmeyer et al. 1974) activities. Kidney function was evaluated through the assay of plasma uric acid level (Fossati and Prencipe, 1980). These biochemical parameters were assayed using standard reagent kits (CHRONOLAB). Oxidative stress status was assessed through the evaluation of the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Yagi 1976) and catalase activity (Sinha 1972) in liver and kidney. Catalase activity was expressed in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of proteins. Total protein concentration in each sample (liver and kidney) was assayed according to the method described by Gornall et al. (1949). Liver and kidney histology were performed using the same protocol as described in Sect. "Evaluation of the effect of treatment on the uterine endometrium".

Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Microsoft Excel software (2013) was used to treat data and plot graphs while Image J was used to compute the thickness of the endometrium and treat micrographs. Statistical analysis was done using the Statistical Package for Social Science (SPSS) 25.0 software for Windows. One way analysis of Variance followed by a post-hoc Least Significant Difference

tests were used for multiple comparisons between groups. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Protective effect of the ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds against tamoxifen-induced endometrium hyperplasia

Effect of EEAA on circulating estradiol level

The administration of DMBA significantly increased the serum level of estradiol (667.3 ± 40.92 pg/L) compared to the normal control group (293.30 ± 57.21 pg/L). The treatment of breast cancer rats with 3.3 mg/kg bw of tamoxifen exacerbated the increased of estradiol level (896.85 ± 54.57 pg/L) compared to the untreated DMBA rats group ($p = 0.01$). Better still, the co-administration of TAM and 300 mg/kg, bw of ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds (EEAA 300 + TAM group) led to a decrease of estradiol level (639.82 ± 43.41 pg/L,) as compared to the TAM group ($p = 0.003$) (Fig. 1).

Effect of EEAA on the endometrium

The increase in serum estradiol level was accompanied with an increase ($p < 0.05$) in the thickness of the epithelial lining of the uterus (Fig. 2a, b) in the DMBA group compared to the NC group. Also, this parameter was high

in the TAM group compared to the DMBA group. Once more, associating TAM with the EEAA at 300 mg/kg, bw significantly reduced this thickness of the epithelium compared to the group where tamoxifen was administered alone ($p = 0.017$).

Protective effect of the ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds against some tamoxifen-induced metabolic disorders

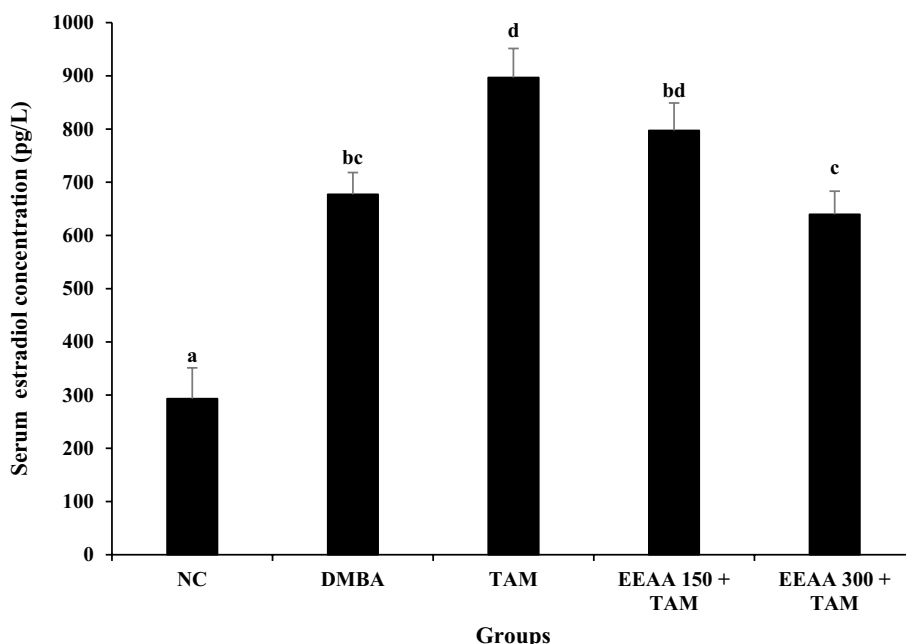
Effect the ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds on the body weight variation

During the first 2 weeks of treatment, all animals except those in the EEAA 300 + TAM group gained weight. But, during the last 2 weeks; all animals except those in the DMBA group lost weight. At the end of the experiment, TAM administered alone led to a loss ($p < 0.05$) of body weight compared to the DMBA group. However, the administration of 150 mg/kg, bw and 300 mg/kg, bw of EEAA prior to the TAM administration slightly limited weight loss (Fig. 3).

Effect of the ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds on lipid profile

The results of Fig. 4 showed a significant increase of total cholesterol (TC) in DMBA treated (206.44 ± 4.13 mg/dL) rats compared to the NC group (173.65 ± 8.4 mg/dL) while

Fig. 1 Effect of EEAA on serum estradiol level, Data expression: Mean $\pm$ standard deviation; NC: Normal rats; DMBA (7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene): untreated cancer rats; TAM: animals treated with 3.3 mg/kg, bw; EEAA 150 + TAM & EEAA 300 + TAM; animals treated with ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds and TAM. Bars with different letters (a, b, c, d) represent significant difference between groups at $p < 0.05$



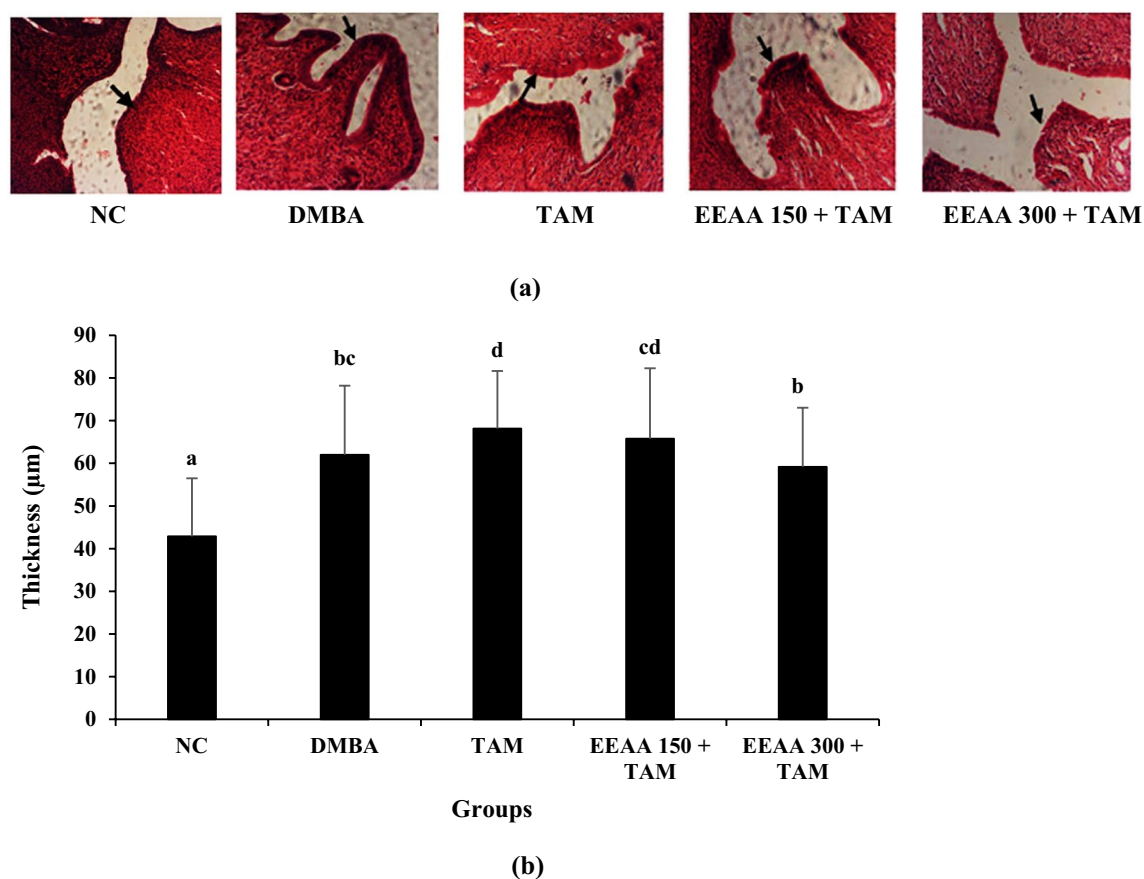
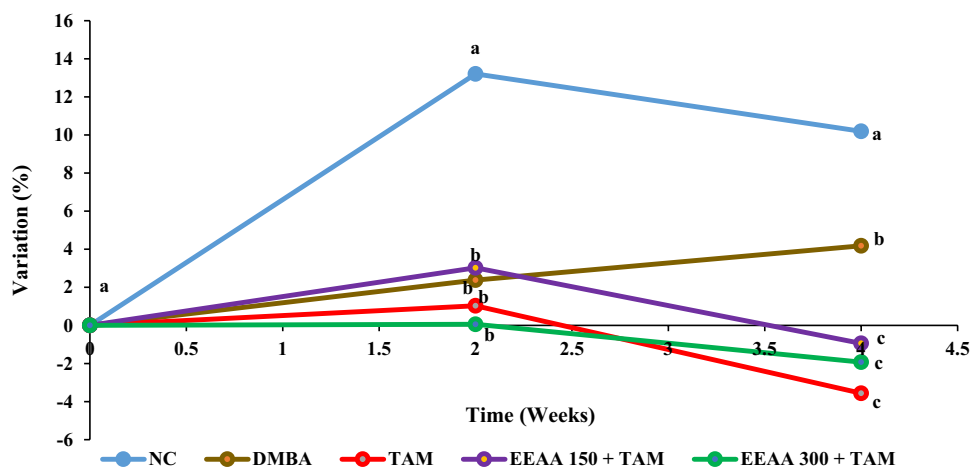


Fig. 2 Effect of EEAA endometrium histology (a) and thickness (b); Data expression: Mean $\pm$ standard deviation; NC: Normal rats; DMBA (7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene): untreated cancer rats; TAM: animals treated with 3.3 mg/kg, bw; EEAA 150 + TAM &

EEAA150 + TAM; animals treated with ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds and TAM. Arrow: epithelium; for each parameter, bars between groups with different letters (a, b, c, d) are significantly different at $p < 0.05$

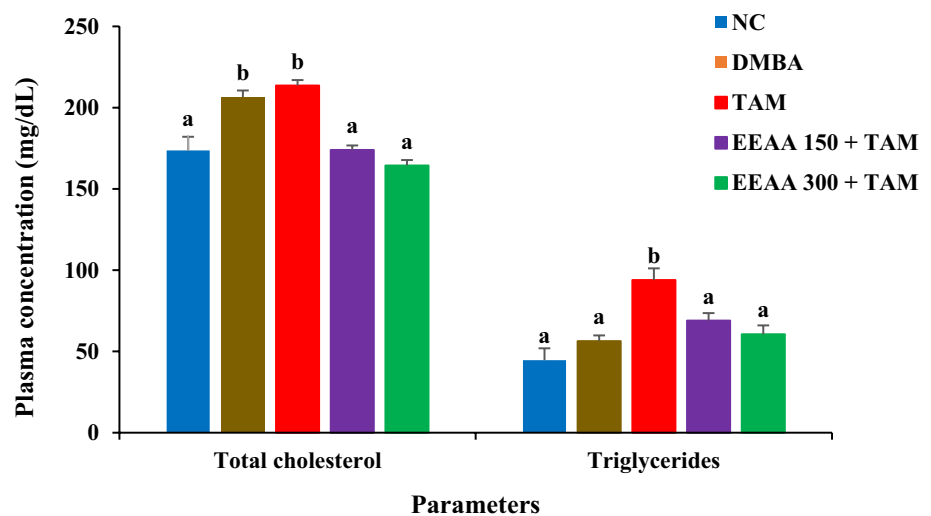
Fig. 3 Effect of treatments on body weight variation. Data expression: mean percentage of variation, NC: normal rats; DMBA (7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene): untreated cancer rats; TAM: animals treated with 3.3 mg/kg, bw; EEAA 150 + TAM & EEAA150 + TAM; animals treated with ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds and TAMs. At each time, the percentages of variation affected with different letter (a, b, c) are significantly different between groups ($p < 0.05$)



no change was observed with triglycerides (TG) level. The administration of tamoxifen did not significantly affect TC level, whereas the TG (93.89 ± 7.23 mg/dL) level was significantly increased ($p < 0.01$) when compared to DMBA

group (56.34 ± 3.52 mg/dL). The co-treatment of rats with TAM and extract at both doses lead to a significant reduction of TC and TG to levels closer to those of the NC group.

Fig. 4 Effect of EEAA on total cholesterol and triglyceride in the plasma; Mean $\pm$ SD; DMBA (7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene): untreated cancer rats; TAM: animals treated with 3.3 mg/kg, bw; EEAA 150 + TAM & EEAA 150 + TAM; animals treated with ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds and TAM. For each parameter, values with different letters(a, b) are significantly different between groups at $p < 0.05$



Protective effect of the ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds on renal and hepatic function

Effect on the biochemical markers of hepatic and kidney toxicities

Administration of DMBA did not significantly affect plasma activities of transaminases compared to the NC group, while the plasma level of ALP and Uric acid were increased. Rats treated only with tamoxifen presented a significant increase in the activities of ALT and AST, a significant decrease of ALP activity and a non significant decrease of the plasma level of uric acid compared to the untreated group (DMBA group). However, co-treatment with the 300 mg/kg, bw dose of EEAA significantly reduced ALT activity ($p = 0.001$) while AST, ALP activities and uric acid level decreased at both the 300 and 150 mg/kg, bw doses ($p < 0.05$) (Table 1).

Liver and kidney histologies

The histology of the liver in the normal control, EEAA 150 + TAM and EEAA 300 + TAM groups showed normal

structure of the liver, with hepatocytes organized in cord around portal vein and separated by sinus. In the DMBA group a deterioration of the central vein and necrotic hepatocytes were observed. TAM administration led to an accumulation of lipids in the liver and necrosis of hepatocytes (Fig. 5).

Concerning kidneys, the administration of DMBA led to a deterioration of the glomerulus structure. Both extract-treated groups presented an improvement in the number and structure of the glomerulus compared to TAM group, and the best effects were observed with the 300 mg/kg, bw extract co-treatment (Fig. 5).

Antioxidant activity of the ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds

DMBA administration led to a significant decrease in catalase activity and a significant increase in TBARS in the liver and kidneys compared to the normal control. No significant change was noted in catalase activity and TBARS between DMBA and TAM groups in all cellular compartments. The co-administration of TAM and EEAA significantly improved

Table 1 Effect of the extract on renal and hepatic biochemical parameters

Groups	Plasma ALT (UI/L)	Plasma AST (UI/L)	Plasma ALP (UI/L)	Plasma Uric acid (mg/dL)
NC	29.8 $\pm$ 4.58 ^a	68.53 $\pm$ 10.67 ^a	135.3 $\pm$ 29.14 ^a	1.37 $\pm$ 0.39 ^a
DMBA	31.51 $\pm$ 2.79 ^a	69.13 $\pm$ 14.34 ^a	331.65 $\pm$ 69.51 ^b	2.62 $\pm$ 1.16 ^b
TAM	44.5 $\pm$ 1.57 ^b	91.08 $\pm$ 10.16 ^b	265.58 $\pm$ 26.77 ^c	2.09 $\pm$ 0.52 ^{bc}
EEAA 150 + TAM	36.45 $\pm$ 2.19 ^{ab}	71.93 $\pm$ 14.61 ^a	186.45 $\pm$ 21.81 ^d	1.59 $\pm$ 0.39 ^c
EEAA 300 + TAM	26.25 $\pm$ 2.13 ^a	65.42 $\pm$ 5.61 ^a	144.54 $\pm$ 24.63 ^{ad}	0.87 $\pm$ 0.39 ^a

Data expression: Mean $\pm$ standard deviation; NC: Normal rats; DMBA (7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene): untreated cancer rats; TAM: animals treated with 3.3 mg/kg, bw; EEAA 150 + TAM & EEAA 150 + TAM; animals treated with ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds and TAM; ALT: alanine aminotransferase; AST aspartate aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; for each parameter, values with different letters (a,b,c) are significantly different between groups at $p < 0.05$

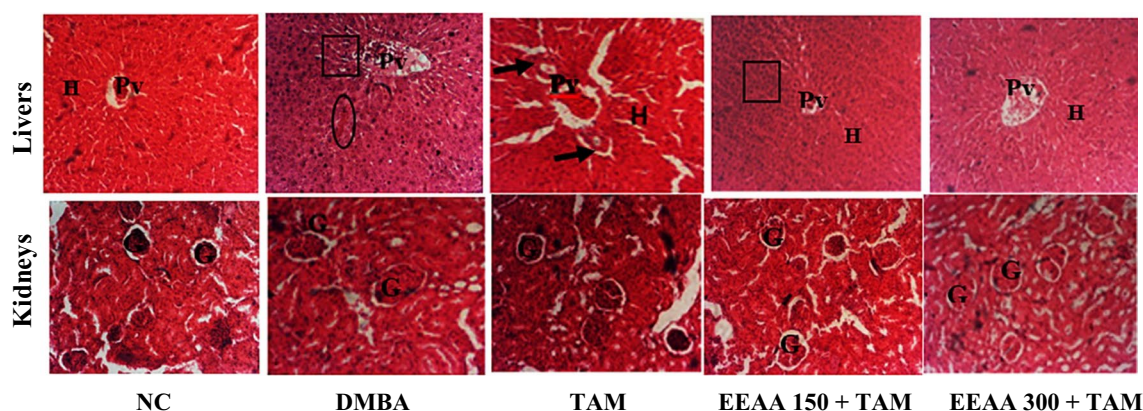


Fig. 5 Effect of treatments on liver and kidneys tissues ($\times 200$). NC: normal rats; DMBA (7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene): untreated cancer rats; TAM: animals treated with 3.3 mg/kg, bw; EEAA 150 + TAM & EEAA 150 + TAM; animals treated with ethanolic

extract of *A. angustifolium* seeds and TAM; PV: portal vein, H: hepatocytes; G: Glomerulus; Arrow: lipid accumulation, Circle: Necrotic cells; Square: Lymphocytes infiltration

Table 2 Effect of EEAA on catalase activity and TBARS levels in the liver and kidney

Groups	Catalase activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)		TBARS (μM)	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney
NC	9.38 ± 2.47^a	10.32 ± 2.27^a	3.99 ± 0.66^a	2.95 ± 0.35^a
DMBA	6.64 ± 2.05^b	6.12 ± 1.71^b	6.17 ± 1.36^b	5.55 ± 1.36^b
TAM	5.94 ± 1.12^b	6.36 ± 0.52^b	6.44 ± 1.01^b	4.70 ± 0.65^b
EEAA 150	11.31 ± 3.01^b	9.83 ± 1.86^a	4.27 ± 1.24^{ab}	4.16 ± 0.98^b
EEAA 300	6.95 ± 1.35^a	10.79 ± 1.35^a	3.12 ± 0.66^a	3.35 ± 0.71^a

Data expression: Mean $\pm$ standard deviation; NC: normal rats; DMBA (7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene): untreated cancer rats; TAM: animals treated with 3.3 mg/kg, bw; EEAA 150 + TAM & EEAA 150 + TAM; animals treated with ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds and TAM; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; for each parameter, values with different letters (a, b) are significantly different between groups at $p < 0.05$

the activity of catalase in the kidney at both doses, and only 150 mg/kg, bw of EEAA significantly improved its activity in the liver ($p < 0.05$). Additionally, TBARS level in both tissues was significantly reduced by treatment with EEAA at both doses (Table 2).

Discussion

Despite innovative advances in the management of breast cancer, related mortality remains high worldwide. Most of the tumours detected are ER positive and their management involves adjuvant endocrine therapies like tamoxifen (Burstein et al. 2018). However, the recurrence of adverse effects associated with this drug is responsible for the

deterioration of patient's life quality (Cella and Fallowfield, 2008). Hall et al. (2021) recently noticed that dietary supplementation was one of the strategies considered for patients undergoing adjuvant endocrine therapy to overcome certain disorders. Therefore, foods with bioactivity would be promising for the amelioration of cancer therapy, chemoprevention and the management of side effects associated with existing treatments. Results of the present study showed that, the ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds prevented endometrial hyperplasia, metabolic disorders and organ toxicity induced by tamoxifen in a breast cancer animal model. DMBA-induced breast cancer model was used in the present study because it has been reported that, DMBA induces breast tumour positive to oestrogen receptors (Kerdelhué et al. 2016; Ma et al. 2018), and hormone therapy (Tamoxifen) was therefore useful to manage it.

The risk for endometrial cancer development is the most feared side effect of TAM intake. It is histologically materialized by an increase in endometrium thickness and biochemically by the increase in the circulating level of estradiol (Gu et al. 2017; Mvondo et al. 2020) as observed in this study. It has been reported that tamoxifen has the ability to stimulate the synthesis of estradiol in non-gonadotropic tissues from androgens through aromatase activity (Blakemore and Naftolin, 2016; Mvondo et al. 2020). Moreover, it has been found that its active metabolites can bind to DNA leading to carcinogenesis (Srinivas et al. 2004). Ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds co-administered at 300 mg/kg, bw dose with TAM led to a decrease in serum estradiol level (Fig. 1) and endometrium thickness compared to TAM administered alone (Fig. 2a, b). This observation could be explained by the presence of flavonoids in the extract as previously shown by Anywar and Kirimuhuzya (2015). These compounds have been shown to be able to inhibit the

activity of aromatase (Seth et al. 2021). Additionally, flavonoids from *Aframomum melegueta* showed antiestrogenic activity in yeast-two hybrid assay (El-Halawany et al. 2011) due to their ability to competitively attach to ER, limiting the binding of estradiol or tamoxifen, and thus the induction of mitosis of endometrial epithelial cells (O'Brien et al. 2006; Feng et al. 2017) or their ability to inhibit nuclear factor kappa B (NF- κ B) and mTORC1 signaling pathways. All these pathways are known to be involved in the pathogenesis of several cancers (Ichimura et al. 2013; Feng et al. 2014).

It has been demonstrated that, tamoxifen causes a decrease in food intake thus lowering body weight in rodents (Klötting et al. 2020) as observed in this study (Fig. 3). In contrast, long term use of tamoxifen can triggered necrosis of adipose tissues, leading to fat accumulation in the liver (Owoade et al. 2022). In this study, the observed increase in triglycerides and total cholesterol level in the plasma (Fig. 4) and lipid accumulation in the liver of TAM group (Fig. 5), suggest a lipid metabolism disturbance (Hesselbarth et al. 2015). All the same, EEAA led to a slight increase in body weight, and a decrease in triglycerides and total cholesterol levels. Bioactive compounds such as terpenoids present in *A. angustifolium* (Inkoto et al. 2021), have been show to suppress hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B and enhance the antiobesity effect of leptin (Kumar et al. 2022). Leptin is a hormone produced by adipose tissue acting through two antagonist mechanisms. On the one hand, it causes the activation of agouti-related protein (AgRP) neurons, producing AgRP neurotransmitter leading to a hyperphagia (Ahima and Antwi 2008) responsible of body weight gain. On the second one, it acts through the activation of anorexigenic neurons which expresses α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH). Indeed, in the accurate nucleus, leptin-regulated proopiomelanocortin (POMC) is a precursor for the α -MSH hormone which binds to the melanocortin-4 receptor and induces anorexic properties thus improving lipid accumulation in the plasma (Ramos-Lobo and Donato, 2017; Palmiter 2018). Additionally flavonoids in plant extracts are able to improve lipid profile by inhibiting adipogenesis through the reduction of the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and the inhibition of adipogenesis (Garcia-Barrado et al. 2020). These mechanisms thus contribute to limit lipid accumulation in the liver.

Long-term use of TAM has also been reported to adversely affect liver and kidney function (Fadhil and Majeed 2016; Yong et al. 2020). Liver damages are mainly accompanied by an increase in plasma transaminases activities (Yoo et al. 2020) as recorded in Table 1. Furthermore, it has been reported that tamoxifen increased intramitochondrial Ca^{2+} concentration in rat liver, thus stimulating mitochondrial NO synthase activity, associated with peroxynitrite formation and consequently mitochondrial

lipid peroxidation (Jang et al. 2007). This may result in a loss of cytochrome C, leading to a high production of hydrogen peroxide (Masarone et al. 2018). The EEAA at 300 mg/kg, bw dose significantly improved plasma transaminase activity, plasma uric acid levels (Table 1), antioxidant status in the liver and kidney (Table 2) and the microscopic architecture of these organs (Fig. 5). Similar protective effects of this plant extract against potassium bromide-induced liver and kidney toxicity in rats and as well as its in vitro antioxidant potential as demonstrated by Ebhohimen et al. (2020, 2017). So, this extract could reduce oxidative stress by trapping free radicals produced during TAM metabolism and/or by boosting endogenous antioxidant enzymes, thus preventing lipid peroxidation which then protects cell membrane maintaining tissue (liver, kidney) integrity.

Conclusion

The aim of this study was to evaluate the protective effect of the ethanolic extract of *Aframomum angustifolium* seeds against tamoxifen-induced side effects in an animal model of DMBA-induced breast cancer. Results show that the EEAA at 300 mg/kg, bw protected the uterus, liver and kidneys from tamoxifen-related damage by reducing the serum level of estradiol, plasma triglycerides, plasma total cholesterol, transaminase activity and uric acid level respectively. The results of this study thus provided additional informations in the search of new natural substances that can be used in the management of hormone-dependent breast cancer (complementary therapy) as *A. angustifolium* seeds are widely consumed by many African population as a fruit or as a spice. The effect of the ethanolic extract of *A. angustifolium* seeds on the antitumor efficacy of tamoxifen against breast cancer needs to be investigated prior to its validation as a complementary therapy.

Author contributions All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were carried out by IM, UAON, HMFT and SZ; the draft of the manuscript was written by IM, GRNT and FRN; Revision and edition were done by FRN, M-AAM and APNK; the supervision was ensured by JEO. All authors read and approved the final manuscript.

Funding The authors declare that this study has no funding.

Declarations

Ethical approval The Joint Institutional Review Board (JIRB) for Animal and Human Bioethics, of the Biotechnology Centre of the University of Yaoundé I gave Ethical approval for the study (BTC-JIRB2022-042). All the ethical protocols laid by the committee in line

with the standard accepted principles for laboratory animal handling and care were followed.

Conflict of interest Inelle Makamwe has no conflict of interest. Françoise Raïssa Ntentie has no conflict of interest. Mary-Ann Angie Mbong has no conflict of interest. Anne Pascale Nouemsi Kengne has no conflict of interest. Huiny Miriane Fotso Tienoue has no conflict of interest. Guy Roussel Nguemto Takuissu has no conflict of interest. Ulrich Aimée Ngankam Onsi has no conflict of interest. Stéphane Zingue has no conflict of interest. Julius Enyong Oben has no conflict of interest.

References

- Ahima RS, Antwi A (2008) Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol Metab Clin N Am* 37(4):811–823. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.08.005>
- Amadi SW, Zhang Y, Wu G (2016) Research progress in phytochemistry and biology of *Aframomum* species. *Pharm Biol* 54(11):2761–2770. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1173068>
- Anywar GU, Kirimuhuzya C (2015) Phytochemical profile and antibacterial activity of crude extracts of the pod of *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum. *Eur J Biol Res* 5(2):36–41
- Bahare S, Shashi U, Ilkay EO, Arun KJ, Sumali LDJ, Daniel AD, Farukh S, Yasaman T, Natália M, Navid B, William CC, Javad S-R (2019) Therapeutic potential of and-pinene: a miracle gift of nature. *Biomolecules* 9:738. <https://doi.org/10.3390/biom9110738>
- Bergmeyer HU, Bernt E, Lachenicht R (1974) Alkaline phosphatase in serum determination with automatic analysers. *Method Enzym Anal* 2:864–868. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50069-4>
- Blakemore J, Naftolin F (2016) Aromatase: contributions to physiology and disease in women and men. *Physiology* 31(4):258–269. <https://doi.org/10.1152/physiol.00054.2015>
- Burstein HJ, Lacchetti C, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KA et al (2018) Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol* 37:423–438. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01160>
- Cella D, Fallowfield LJ (2008) Recognition and management of treatment-related side effects for breast cancer patients receiving adjuvant endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat* 107:167–180. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9548-1>
- Ebhohimen IE, Ebhomielen JO, Edemhanria L, Osagie AO, Omoruyi LI (2020) Effect of ethanol extract of *Aframomum angustifolium* seeds on potassium bromate induced liver and kidney damage in wistar rats. *Glob J Pure Appl Sci* 26:1–8. <https://doi.org/10.4314/gjpas.v26i1.1>
- Ebhohimen IE, Okolie NP (2021) Effect of ethanol extract of *Aframomum angustifolium* seed on the induction of nephrotoxicity by bromate in wistar rats. *Avicenna J Med Biochem* 9(1):8–14. <https://doi.org/10.34172/ajmb.2021.02>
- Ebhohimen IE, Edemhanria L, Ekozin A, Okolie PN (2017) Effect of heat treatment on the antioxidant capacity of aqueous and ethanol extracts of *Aframomum angustifolium* Seed. *Trop J Natl Prod Res* 1(3):125–128. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v1i3.8>
- El-Halawany AM, El Dine RS, Chung MH, Nishihara T, Hattori M (2011) Screening for estrogenic and antiestrogenic activities of plants growing in Egypt and Thailand. *Pharmacognosy Res* 2(3):107–113. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.81958>
- Emons G, Alexander M, Clemens T (2020) Tamoxifen and endometrial cancer: a janus-headed drug. *Cancers* 12:1–11. <https://doi.org/10.3390/cancers12092535>
- Fadhil SR, Majeed SK (2016) Histo-toxic and pathological study of tamoxifen citrate on the kidney of female rats. *J Agric Vet Sci* 9(9):70–74. <https://doi.org/10.9790/2380-0909017074>
- Faiza M (2016) The effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract against hepato-toxicity induced by tamoxifen in rats. *J Food Process Technol* 7:1–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000625>
- Feng L, Ma Y, Sun J, Shen Q, Liu L, Lu H et al (2014) YY1-MIR372-SQSTM1 regulatory axis in autophagy. *Autophagy* 10:1442–1453. <https://doi.org/10.4161/auto.29486>
- Feng L, Li J, Yang L, Zhu L, Huang X, Zhang S, Luo L, Jiang Z, Jiang T, Xu W, Wang X, Jin H (2017) Tamoxifen activates Nrf2-dependent SQSTM1 transcription to promote endometrial hyperplasia. *Theranostics* 7(7):1890–1900. <https://doi.org/10.7150/thno.19135>
- Fossati P, Prencipe L (1980) Enzymatic colorimetric method of the determination of uric acid in serum. *Clin Chem* 26:227
- Garcia-Barrado M, Iglesias-Osma M, Perez-Garcia E et al (2020) Role of flavonoids in the interactions among obesity, inflammation, and autophagy. *Pharmaceuticals* 13(11):342. <https://doi.org/10.3390/ph13110342>
- Gornall G, Bardawill J, David M (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177(2):751–766
- Gu W, Xu W, Sun X, Zeng B, Wang S, Dong N, Zhang X, Chen C, Yang L, Chen G, Xin A, Ni Z, Wang J, Yang J (2017) Anordrin eliminates tamoxifen side effects without changing its antitumor activity. *Scientific Report* 7:43940. <https://doi.org/10.1038/srep43940>
- Hall LH, King NV, Graham XD, Green SMC, Barber A, Neal RD, Foy R, Clark J, Lloyd K.E., Smith S.G. (2021) Strategies to self-manage side-effects of adjuvant endocrine therapy among breast cancer survivors: an umbrella review of empirical evidence and clinical guidelines. *J Cancer Surviv*. <https://doi.org/10.1007/s11764-021-01114-7>
- Hennia A, Nemmiche S, Susana D, Maria GM (2019) Myrtus communis essential oils: insecticidal, antioxidant and antimicrobial activities: a review. *J Essent Oil Res* 31(6):1–59. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1611672>
- Hesselbarth N, Pettinelli C, Gericke M et al (2015) Tamoxifen affects glucose and lipid metabolism parameters, causes browning of subcutaneous adipose tissue and transient body composition changes in C57BL/6NTac mice. *Biochem Biophys Res Commun* 464(3):724–729. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.015>
- Hu R, Halakivi-Clarke L, Clarke R (2015) Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncol Lett* 2015:1495–1501. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2962>
- Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R et al (2013) Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell* 51:618–631. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.003>
- Inkoto CL, Ngbolua KTN, Bokungu PE, Masengo CA, Iteku JB, Tshilanda DD et al (2021) Phytochemistry and pharmacology of *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum (Zingiberaceae): a mini review. *South Asian Res J Natl Prod* 5(1):21–36
- Jang E-S, Kim J-Y, Kim B-G (2007) Tamoxifen induces mitochondrial-dependent apoptosis via intracellular Ca²⁺ modulation. *J Life Sci* 17(8):1053–1062. <https://doi.org/10.5352/JLS.2007.17.8.1053>
- Kerdelhué B, Forest C, Coumoul X (2016) Dimethyl-Benz(a)anthracene: a mammary carcinogen and a neuropeptide disruptor. *Biochimie Open* 3:49–55
- Klötting N, Kern M, Moruzzi M et al (2020) Tamoxifen treatment causes early hepatic insulin resistance. *Acta Diabetol* 2020(57):495–498. <https://doi.org/10.1007/s00592-019-01468-6>
- Kumar V, Singh DD, Singh Lakhawat S, Yasmeen N, Pandey A, Singla RK (2022) Biogenic phytochemicals modulating obesity: from

- molecular mechanism to preventive and therapeutic approaches. *Evid Based Complem Altern Med*. <https://doi.org/10.1155/2022/6852276>
- Ma Z, Kim YM, Howard EW, Feng X, Kosanke SD, Jiang SY, Parris AB, Cao X, Li S, Yang X (2018) DMBA promotes ErbB2 mediated carcinogenesis via ErbB2 and estrogen receptor pathway activation and genomic instability. *Oncol Rep* 40:1632–1640. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6545>
- Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C et al (2018) Role of oxidative stress in pathophysiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev* 2018:9527613
- Mvondo MA, Messongue Mbollo M-S, Njamen D (2020) The ethanol extract of avocado [*Persea Americana* Mill. (Lauraceae)] seeds reduced the hyperplastic effect of tamoxifen on uterine endometrium without changing its effect on the mammary gland. *Adv Tradit Med* 21:305–316. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00443-9>
- Mvondo MA, Wego Kamgaing MT, Wansi Ngnokam SL (2021) Aqueous extract of *Dacryodes edulis* (Burseraceae) leaves inhibited tumor growth in female wistar rats with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced breast cancer. *Evid Based Complem Altern Med*. <https://doi.org/10.1155/2021/9960950>
- Nguefack CT, Biwole ME, Massom A, Kamgaing JT, Njamen TN, Ekane GH, Obinchemti TE, Priso EB (2012) Epidemiology and surgical management of breast cancer in gynecological department of Douala General Hospital. *Pan Afr Med J* 13:35
- O'Brien JE, Peterson TJ, Tong MH, Lee EJ, Pfaff LE, Hewitt SC, Korach KS, Weiss J, Jameson JL (2006) Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements. *J Biol Chem* 281(36):26683–26692. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601522200>
- Owoade OA, Adetutu A, Ogundipe OO, Wand OA, Kehinde EO (2022) Effects of tamoxifen administration on lipid profile in female albino rats. *Asian J Res Biochem* 10(3):10–22. <https://doi.org/10.9734/AJRB/2022/v10i330224>
- Palmiter RD (2018) The parabrachial nucleus: CGRP neurons function as a general alarm. *Trends Neurosci* 41(5):280–293. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.03.007>
- Ramos-Lobo AM, Donato J (2017) The role of leptin in health and disease. *Temperature* 4(3):258–291. <https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1327003>
- Reitman S, Frankel SA (1957) Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 28:56–63. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>
- Seth R, Kushwaha S, Luqman S, Meena A (2021) Flavonoids as prospective aromatase inhibitors in breast cancer patients/therapy. *Curr Mol Pharmacol* 14(6):1112–1124. <https://doi.org/10.2174/1874467214666210210123709>
- Sinha K (1972) Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem* 47:389–394. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90132](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90132)
- Srinivas G, Annab LA, Gopinath G (2004) Antisense blocking of BRCA1 enhances sensitivity to plumbagin but not tamoxifen in BG-1 ovarian cancer cells. *Mol Carcinog* 39:15–25. <https://doi.org/10.1002/mc.10164>
- Thomson CA, Rock CL, Thompson PA, Caan BJ, Cussler E, Flatt SW, Pierce JP (2011) Vegetable intake is associated with reduced breast cancer recurrence in tamoxifen users: a secondary analysis from the Women's Healthy Eating and Living Study. *Breast Cancer Res Treat* 125(2):519–527. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1014-9>
- Yagi K (1976) Simple Fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15:212–216. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(76\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0006-2944(76)90049-1)
- Yang B, Chen R, Liang X, Shi J, Wu X, Zhang Z, Chen X (2019) Estrogen enhances endometrial cancer cells proliferation by upregulation of prohibitin. *J Cancer* 10(7):1616–1621. <https://doi.org/10.7150/jca.28218>
- Yong S, Jeong-Ju Y, Min S, Bora L, Bo-Yeon K, Zisun K, Ji E, Min L, Sang G, Young S (2020) Risk of fatty liver after long-term use of tamoxifen in patients with breast cancer. *PLoS ONE* 15:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236506>
- Yoo JJ, Lim SYS, Kim SM, Lee B, Kim BY, Kim Z, Lee JE, Lee MH, Kim SG, Kim YS (2020) Risk of fatty liver after long-term use of tamoxifen in patients with breast cancer. *PLoS ONE* 15(7):e0236506

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

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.