

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY
LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE
LABORATORY OF ANIMAL PHYSIOLOGY

Effets préventifs de l'extrait du jus de la pulpe du fruit
de *Annona muricata* Linn (Annonaceae) sur un
modèle de cancer du sein induit chez la rate Wistar

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de **Master** en Biologie des Organismes
Animaux

Option : **Physiologie Animale**

Par

MBOU DEFO William

Matricule : 14L2295

Licencié ès-sciences



Sous

La direction de

ZINGUE Stéphane

*Maître de Conférences
Université de Yaoundé I*

et

la supervision de

NJAMEN Dieudonné

*Professeur
Université de Yaoundé I*

Année 2022

DÉDICACES

À

- Monsieur **Charles DIBOUE**

- À mes grand-mères **MOCHE Monique** et **JUEGO Marthe**

- Mon père et mon grand-père **SINDZE MBOU Bruno Bertrand**

REMERCIEMENTS

Je commencerai par rendre grâce à DIEU qui n'a cessé d'être avec moi dans toutes les situations de ma vie, de me tenir par la main et de me conduire vers des eaux paisibles. Bénis sois tu Seigneur.

Ce travail est parvenu à son terme sous la houlette de plusieurs personnes que je ne cesserai de remercier, notamment :

- **Professeur NJAMEN Dieudonné** (*Professeur*) qui a accepté de superviser ce travail, pour sa rigueur scientifique et ses conseils avisés ;
- **Professeur ZINGUÉ Stéphane** (*Maître de Conférences*) qui a accepté de me tenir par la main et de suivre mes premiers pas dans cette phase d'initiation à la recherche. Tel un père et en dépit de mes manquements, il m'a conduit à l'accomplissement de cette œuvre.
- **Professeurs DIMO Théophile** (*Professeur*) et **NGUEGUIM TSOFAK** (*Maître de Conférences*) pour avoir accepté respectivement de présider ce jury de soutenance de mémoire et d'examiner ce travail ;
- **À tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales** et plus précisément ceux du **Laboratoire de Physiologie Animale** pour l'encadrement reçu ;
- **Dr SILIHE KAMGA Kevine** qui a suivi de près ce travail. Malgré ses multiples occupations elle a toujours trouvé du temps à me consacrer durant toute la période de manipulation ;
- **Dr NGO PAMBE Judith Christiane** (*Chargée de Cours*) anatomopathologiste à la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Garoua pour son aide dans la réalisation de la partie histologique.
- **À tous mes aînés du laboratoire de Physiologie Animale : Dr AWOUNFACK Charline, Dr ZEMO Franklin, Mme BAKAM Berlise, Mme MOTOUM Florette, Mr NDJIKEM Rudig, Mme ATSAMA Perpétue, Mme MASSOP Christelle, Mme NDJENGUE Elisabeth** pour leurs conseils, leur assistance lors des manipulations ainsi que leurs critiques et leurs encouragements.
- **À mes promotionnaires de laboratoire : Mlle NKUIMI KAMI Bernie Ornella, Mlle FOTSING Inès Sorelle, Mr OSSOMBA Éric, Mlle KEMMO Christelle, Mlle FEUDJIO Merveille**, merci pour ce travail d'équipe, pour les critiques constructives et aides de toutes natures.
- **À tous mes camarades de la promotion "ADAPTATION"**, merci pour l'accompagnement.
- **À tous mes pasteurs** de la Mission Apostolique de la Restauration en particulier au pasteur **TCHEDJE FEUNOU Michel** pour ses conseils, prières, encouragements, soutien financier.
- **À tous les membres de ma famille MBOU Jean** d'avoir toujours été là près de moi pour me soutenir et m'encourager de toujours aller de l'avant.
- **À toute ma famille de la Mission Apostolique de la Restauration.**
- **À tous ceux qui de près ou de loin ont contribué ou souhaité voir la réalisation, l'aboutissement de cette œuvre.**

SOMMAIRE

DÉDICACES	i
REMERCIEMENTS.....	ii
SOMMAIRE	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ANNEXES	viii
RESUME	ix
ABSTRACT.....	x
Chapitre I : REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
I.1- Le cancer	3
I.1.1- Définition et épidémiologie.....	3
I.1.2- Cancérogénèse.....	3
I.1.3- Types histologiques des cancers	4
I.2- Le cancer du sein.....	5
I.2.1- Description du sein.....	5
I.2.2- Épidémiologie du cancer du sein	5
I.2.3- Développement du cancer du sein.....	6
I.2.4- Détection du cancer du sein	6
I.2.5- Les marqueurs biologiques de la cellule cancéreuse.....	7
I.2.7- Généralités sur les méthodes d'évaluation <i>in vivo</i> de l'activité antitumorale des extraits de plantes	7
I.2.8- Cancer du sein et inflammation.....	8
I.2.9- Traitement du cancer du sein	9
I.3- Sucre et cancer	12
I.4- La chimio-prévention du cancer.....	13
I.5- <i>Annona muricata</i>	13
I.5.1- Classification botanique	13
I.5.2- Description de <i>Annona muricata L.</i>	14
I.5.3- Données ethno-pharmacologiques	14
I.5.4- Travaux pharmacologiques antérieurs	15
Chapitre II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
II.1- Matériel	16
II.1.1- Matériel animal	16
II.1.2- Matériel végétal	16
II.1.3- Produits chimiques et réactifs	16

II.2- Méthodes.....	16
II.2.1- Préparation des solutions	16
II.2.2- Préparation des jus de pulpe de <i>A. muricata</i>	18
II.2.3- Préparation de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Annona muricata</i>	19
II.2.4- Caractérisation des jus de <i>A. muricata</i>	20
II.2.5- Induction du cancer du sein chez la rate par le DMBA	23
II.2.6- Analyse histopathologique.....	24
II.2.8- Détermination de taux de quelques cytokines	26
II.2.9- Détermination du taux de protéines totales et de quelques paramètres du stress oxydatif.....	27
II.2.10- Évaluation du biomarqueur du cancer du sein CA15-3	28
II.2.11- Analyse statistique	28
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	33
III.1- Résultats.....	29
III.1.1- Effets de <i>Annona muricata</i> sur le cancer du sein	29
III.1.1.1- Effets sur la survie et l'évolution pondérale des animaux.....	29
III.1.2.2- Effet de <i>A. muricata</i> sur la masse relative des organes et sur quelques paramètres hématologiques	29
III.1.2.3- Effets de <i>Annona muricata</i> sur l'incidence, la charge et la masse relative des tumeurs.....	32
III.1.2.4- Effets de <i>Annona muricata</i> sur la morphologie des tumeurs et sur le taux de CA15-3	33
III.1.2.5- Histopathologie des tumeurs mammaires.....	34
III.1.2.5- Effets de <i>A. muricata</i> sur quelques cytokines pros et antiinflammatoires.....	36
III.1.2.7- Effet de <i>A. muricata</i> sur certains paramètres du stress oxydatif, sur l'activité de l'ALT et sur le taux de créatinine	38
III.1.2.8- Effets de <i>A. muricata</i> sur l'histo-architecture de quelques organes d'intérêt en toxicité.....	40
III.2- Discussion.....	41
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	58
RÉFÉRENCES	59
ANNEXES.....	a
Annexes I : Courbe d'étalonnage des sucres totaux	xi
Annexes II : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes	xi
Annexes III : Courbe d'étalonnage des flavonols	xii
Annexes IV : Courbe d'étalonnage des tanins	xii
Annexes V : Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante par la méthode de FRAP	xiii
Annexes VI : Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante totale.....	xiii
Annexes VII : Courbe d'étalonnage du taux de CA 15-3.....	xiv
Annexes VIII : Réactifs	xv
Annexes IX : Clairance éthique	xvii

LISTE DES ABBREVIATIONS

APGIII	:	“Angiosperm Phylogeny Group”
BSA	:	“Bovine Serum Albumin”
CA15-3	:	“Cancer Antigen 15-3”
DMBA	:	7,12 Diméthylbenz(a)anthracène
EDTA	:	Ethylène Diamine-Tétra-Acétique
EGF	:	“Epidermal Growth Factor”
ELISA	:	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
RE	:	Recepteurs aux œstrogènes
ERO	:	Espèces Réactives de l'Oxygène
HAP	:	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HNC	:	Herbier National du Cameroun
IFN- γ	:	Interféron-gamma
IL-12	:	Interleukine-12
IL-6	:	Interleukine-6
LTZ	:	Letrozole
MDA	:	Malondialdehyde
MSRO	:	Modulateur Sélectif des Récepteurs des Œstrogènes
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé.
SBR	:	Scarff-Bloom-Richardson
SOD	:	Superoxyde Dismutase
TAMOX	:	Tamoxifène
TNF-α	:	“Tumor Necrosis Factor-alpha”

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : LES ÉTAPES DE LA CANCÉROGENÈSE (BURGIO ET MIGLIORE, 2015).	4
FIGURE 2 : LES CANCERS LES PLUS FRÉQUEMMENT DIAGNOSTIQUÉS DANS LE MONDE (ADAPTÉ DE SUNG ET AL., 2021).	4
FIGURE 3 : PRINCIPALES COMPOSANTES DU LOBULE GLANDULAIRE DU SEIN HUMAIN (A), DE LA COUPE DE L'ACINUS (B) ET DES CELLULES DES ALVÉOLES MAMMAIRES (C) (BEAUDRY ET AL., 2006).	5
FIGURE 4 : ETAPES DE DÉVELOPPEMENT DU CANCER DU SEIN (A ET B) (PLACE ET AL., 2011).	6
FIGURE 5 : LES SOURCES ALIMENTAIRES DE MATIÈRES GRASSES ET DE SUCRE CONTRIBUENT À L'OBÉSITÉ ET AUX MALADIES LIÉES À L'OBÉSITÉ (GONCALVES ET AL., 2019).	12
FIGURE 6 : PHOTOGRAPHIES DE <i>A. MURICATA</i> PRISES À NGOA-ÉKÉLÉ (YAOUNDÉ) PAR MBOU LE 16 SEPTEMBRE 2020.	14
FIGURE 7 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DU JUS NATUREL DE LA PULPE DU FRUIT DE <i>A. MURICATA</i>	19
FIGURE 8 : PROTOCOLE D'OBTENTION DU JUS MOINS SUCRÉ DE LA PULPE DU FRUIT DE <i>A. MURICATA</i>	19
FIGURE 9 : PROTOCOLE D'OBTENTION DE L'EXTRAIT ÉTHANOLIQUE DES FEUILLES DE <i>A. MURICATA</i>	20
FIGURE 10 : PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL D'ÉVALUATION DES EFFETS CHIMIO-PRÉVENTIFS DE <i>ANNONA MURICATA</i> SUR LE CANCER DU SEIN INDUIT CHEZ LA RATE WISTAR.	24
FIGURE 11 : COURBE DE KAPLAN MEIR PRÉSENTANT LE TAUX DE SURVIE (A) ET ÉVOLUTION DE LA MASSE CORPORELLE (B) APRÈS 20 SEMAINES DE TRAITEMENT.	29
FIGURE 12 : EFFETS DE L'EXTRAIT DES FEUILLES ET DE JUS DE <i>A. MURICATA</i> SUR LA MORPHOLOGIE (A), LE VOLUME TUMORAL (B) ET LE TAUX DE CA15-3 (C).	33
FIGURE 13 : HISTOPATHOLOGIE DES GLANDES MAMMAIRES ET DES TUMEURS MAMMAIRES.	35
FIGURE 14 : EFFETS DE L'EXTRAIT DES FEUILLES ET DES JUS DE <i>A. MURICATA</i> SUR CERTAINS NIVEAUX DE CYTOKINES.	37
FIGURE 15 : EFFETS DE L'EXTRAIT DE FEUILLES ET DES JUS DE <i>A. MURICATA</i> SUR LA MICROARCHITECTURE DES REINS (×200), DE LA RATE (×100), DES POUMONS (×100), DU FOIE (×200) ET DU THYMUS (×400) APRÈS UNE COLORATION H&E.	40

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : TAXONOMIE DE ANNONA MURICATA L. (ITIS STANDARD REPORT PAGE, 2017)	13
TABLEAU II : EFFET DE A. MURICATA SUR LA MASSE RELATIVE DE CERTAINS ORGANES ET SUR LES PARAMÈTRES HÉMATOLOGIQUES.	31
TABLEAU III : ACTIVITÉ CHIMIO-PRÉVENTIVE DE L'EXTRAIT DU JUS DE A. MURICATA APRÈS 20 SEMAINES DE TRAITEMENT.	32
TABLEAU IV : IMPLICATION DES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS SUR LA TYPOLOGIE HISTOLOGIQUE DES TUMEURS.	34
TABLEAU V : EFFETS DE A. MURICATA SUR CERTAINS PARAMÈTRES DU STRESS OXYDATIF, L'ACTIVITÉ DE L'ALANINE TRANSAMINASE (ALT) ET DES TAUX DE CRÉATININE.....	39

LISTE DES ANNEXES

Annexes I : Courbe d'étalonnage des sucres totaux.....	xi
Annexes II : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes	xi
Annexes III : Courbe d'étalonnage des flavonols.....	xii
Annexes IV : Courbe d'étalonnage des tanins	xii
Annexes V : Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante par la méthode de FRAP.....	xiii
Annexes VI : Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante totale.....	xiii
Annexes VII : Courbe d'étalonnage du taux de CA 15-3.....	xiv
Annexes VIII : Réactifs	xv
Annexes IX : Clairance éthique	xvii

RESUME

Au Cameroun comme dans les pays environnants, les populations prennent aussi bien la décoction des feuilles de *Annona muricata* que le jus de la pulpe de ses fruits pour prévenir et/ou traiter le cancer. De nombreux travaux scientifiques ont démontré leurs effets anticancéreux *in vitro* et *in vivo*. Cependant, la forte teneur de ces fruits en sucre a suscité notre interrogation quant à son potentiel chimio-préventif, étant donné que le sucre a un effet promoteur sur la cancérogenèse. L'effet des jus de *Annona muricata*, naturellement sucré ou moins sucré, a donc été évalué sur un modèle de cancer du sein induit par le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) chez la rate. Pour ce faire, des rates exposées à une dose unique (50 mg/kg, *s.c.*) de DMBA, ont été traitées soit avec du jus naturel de *Annona muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à la dose de 200 mg/kg PC à 2 différentes fréquences (3 jours/semaine et quotidiennement) ou avec les standards (tamoxifène à 3,3 mg/kg, létrozole à 1 mg/kg et l'extrait des feuilles de *Annona muricata* à 200 mg/kg). Les contrôles normaux et négatifs ont reçu uniquement de l'eau distillée servant de véhicule. Après 20 semaines d'expérimentation, l'incidence, la masse et le volume des tumeurs ont été évalués. L'analyse histopathologique des tumeurs mammaires obtenues a été faite. Les paramètres biochimiques tels que : le biomarqueur du cancer du sein CA 15-3, le statut anti-oxydatif [catalase (CAT), glutathion réduit (GSH), malondialdéhyde (MDA), superoxyde dismutase (SOD)], le taux des protéines totales et le taux de certaines cytokines inflammatoires [le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), l'interféron gamma (INF- γ), la fractalkine, l'interleukine-12 (IL-12) et l'interleukine-6 (IL-6)] ont été déterminés. À l'issue de l'expérimentation, 100% des rates exposées au DMBA ont développé des tumeurs de type carcinome canalaire cribriforme de grade SBR III. Les extraits des feuilles et des jus de fruits de *Annona muricata* ainsi que les médicaments de référence (tamoxifène et létrozole) ont réduit de manière significative l'incidence des décès, l'incidence des tumeurs, le volume et la masse relative des tumeurs, les taux de protéines totales dans les tumeurs et les taux sériques de CA 15-3, également protégé les organes d'intérêt en toxicité et favorisés une augmentation de quelques paramètres hématologiques comparés au groupe DMBA. Les jus de *Annona muricata* ont présenté une activité antioxydante, caractérisée par une augmentation des activités de la SOD et de la catalase ainsi que le taux de GSH, tandis qu'ils ont diminué le taux de MDA comparé au groupe DMBA. Les taux des médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α et l'IL-6 ainsi que les taux d'INF- γ ont été réduits suite au traitement aux jus de *Annona muricata*. Ces résultats confirment l'effet antitumoral de *Annona muricata*, sur le cancer du sein induit chez le rat. Cependant, le jus moins sucré de *A. muricata* a mieux protégé que le jus naturellement sucré, cette observation doit être prise en considération dans la chimio-prévention du cancer.

Mots clés : *Annona muricata* ; Cancer du sein ; DMBA ; CA15-3 ; Cytokines inflammatoires.

ABSTRACT

In Cameroon as in surrounding countries, population consumes both the decoction of *A. muricata* leaves and its pulp fruit juices to prevent cancer. Numerous works have demonstrated their *in vitro* and *in vivo* anti-cancer effects. The richness of its fruit in sugar raises questions about its chemo-preventive potential, since sugar promote carcinogenesis. The effect *A. muricata* juices, sweet or less was therefore evaluated on DMBA induced-breast cancer. Rats exposed to a single dose (50 mg/kg, *s.c.*) of DMBA, were either treated with *A. muricata* juice with (JAM+) or less sweet (JAM-) sugars at 200 mg/kg BW at 2 different frequencies (3-day/week and daily) or standards (tamoxifen at 3.3 mg/kg, letrozole and 1 mg/kg. The *A. muricata* leaves ethanolic extract was administrated at 200 mg/kg as phytotherapeutic control. Normal and negative controls received distilled water, only (vehicle). After 20 weeks of experimentation the tumor incidence, tumor burden, tumor weight and volume were assessed. The histopathology analyze of mammary tumors was performed. Biochemical parameters such as: breast cancer biomarker CA 15-3, antioxidant status [reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)], total protein levels and some inflammatory cytokines [Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), Epidermal Growth Factor (EGF), interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12), fractalkin, interferon gamma (INF- γ)] were determined. As results, 100% of rats exposed to DMBA developed breast cancer of cribriform ductal carcinoma of SBR grade III. *A. muricata* extracts (leaves and juices) and standards (tamoxifen and letrozole) significantly reduced the incidence of animal death, tumor incidence, tumor volume and weight, total protein levels in tumor as well as CA 15-3 levels compared to the DMBA group. *A. muricata* exhibited antioxidant activity, evidenced by an increase in SOD and catalase activities as well as the GSH level, while it diminished the MDA level compared to DMBA. The pro-inflammatory mediators such TNF- α and IL-6 as well as INF- γ levels were reduced following *A. muricata* treatment. These results confirm the anti-breast tumor effect of *A. muricata*, however, the less sweetened juice better protected rat against cancer than the natural juice, which must be taken into consideration when preventing cancer.

Keywords: *Annona muricata* ; Breast cancer ; DMBA ; CA15-3 ; cytokines inflammatory.



INTRODUCTION

Le cancer est une grande famille de maladies hétérogènes qui impliquent une croissance cellulaire anormale avec le potentiel de se propager à d'autres parties du corps (National Cancer Institute, 2018). Il est la deuxième cause de mortalité dans le monde après les maladies cardiovasculaires et constitue un problème majeur de santé dans le monde avec 19,3 millions de nouveaux cas et 10 millions de décès en 2020 (Sung *et al.*, 2021). Selon l'agence "Cancer Research UK", il y aura 27,5 millions de nouveaux cas de cancers chaque année dans le monde d'ici 2040 avec près de 70% de cas se produisant dans les pays en développement si la tendance actuelle persiste (Cancer Research UK, 2019). Chez les femmes, les quatre types de cancer les plus courants sont le cancer du sein, le cancer colorectal, le cancer du poumon et le cancer du col de l'utérus (Global cancer statistics, 2020). Le cancer du sein est la première cause de décès lié au cancer chez la femme avec 685000 décès en 2020 et 30% de tous les nouveaux cas de cancer diagnostiqués dans le monde (Sung *et al.*, 2021). En Afrique, c'est la première cause de décès par cancer chez la femme avec 28% de tous les cas de cancers et 20% de tous les décès enregistrés par cancer (Ferlay *et al.*, 2020). Au Cameroun, le cancer du sein reste un défi de Santé Publique important touchant la femme avec plus de 4170 (20,1%) nouveaux cas et 2108 (16%) décès par an (Global cancer statistics, 2020).

L'étiologie du cancer du sein reste inconnue, mais les facteurs tels que le tabagisme, l'obésité, une alimentation inadaptée, le manque d'activité physique et la pollution environnementale [exposition à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) tels que le DMBA], des facteurs génétiques (mutations des gènes suppresseurs de tumeurs BRCA1 et BRCA2), l'imprégnation œstrogénique (ménarche précoce et ménopause tardive) augmentent le risque de contracter un cancer du sein (Grundy *et al.*, 2017). De nombreux traitements dirigés contre le cancer du sein sont aujourd'hui disponibles. Ils comprennent notamment : la chimiothérapie qui peut être utilisée seule ou en association avec la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la thérapie ciblée (Tinoco *et al.*, 2013). Cependant, ces thérapies ne sont pas absolument efficaces contre le cancer du sein métastatique et présentent de nombreuses autres limites, notamment la toxicité des médicaments de chimiothérapie tant sur les cellules tumorales que sur les cellules saines (exemple : paclitaxel), le risque de développer un cancer de l'endomètre après un traitement au tamoxifène et la cardiotoxicité liée à une médication au doxorubicine (Kumar *et al.*, 2014). De plus, l'apparition des multirésistances, les rechutes tumorales et surtout le coût élevé limitent l'utilisation de ces approches thérapeutiques surtout pour les pays à faibles revenus (Geretto *et al.*, 2017). Face à cette situation, l'intérêt pour les thérapies alternatives ou complémentaires va sans cesse croissant (Mbaveng *et al.*, 2017). De nombreux composés naturels facilement disponibles à de faibles coûts et ayant peu ou pas de toxicité ont montré des effets anticancéreux probants, c'est par exemple *Annona muricata* (Chaudhry *et al.*, 2019).

Annona muricata Linn communément appelée "soursop" en anglais est une plante largement répandue dans les régions tropicales y compris au Cameroun. Elle est reconnue pour ses nombreuses vertus et activités biologiques parmi lesquelles : sédative, bactéricide, antiparasitaire, anti-inflammatoire, astringente, hémostatique, antispasmodique, antiulcéreuse, anti-diarrhée, antitussive, hypotensive, antipyrétique, galactogogue et anticancéreuse (Maignien, 2005). Dans différentes parties du monde, elle est conventionnellement utilisée pour traiter le cancer (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Ainsi, de nombreux travaux ont démontré ses effets cytotoxiques, cytostatiques et anticancéreux *in vitro* et *in vivo* sur différents tissus de même que les mécanismes par lesquels il agit (Torres *et al.*, 2012, Mishra *et al.*, 2013 ; Minari et Okeke, 2014 ; Ioannis *et al.*, 2016). La composition phytochimique de *A. muricata* a largement été étudiée et elle est riche en acétogénines et alcaloïdes qui sont impliqués dans ses effets anticancéreux. En Afrique, notamment au Cameroun, la population consomme à la fois la décoction des feuilles de *A. muricata* et le jus de la pulpe de son fruit pour prévenir le cancer (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Ce jus est naturellement sucré et la plupart du temps, du sucre synthétique y est ajouté pour relever son goût. Une grande consommation des aliments à indice glycémique élevé est significativement associée à des risques accrus de cancer du sein (Mullie *et al.*, 2016). Connaissant l'impact négatif d'une alimentation riche en sucre sur la cancérogenèse (Goncalves *et al.*, 2019), une étude comparative du jus de *A. muricata*, sucré ou moins sucré, a été entreprise pour comprendre son potentiel chimio-préventif.

Objectifs

L'objectif général de ce travail était d'évaluer les effets préventifs du jus de la pulpe de *Annona muricata* sur un modèle de cancer du sein induit par le 7,12 diméthylbenz(a)anthracène chez la rate Wistar.

Il s'agissait spécifiquement de :

- Évaluer les effets des jus (sucré ou moins sucré) de *A. muricata* sur l'histopathologie, l'incidence, la charge et la morphologie (masse relative et volume) des tumeurs mammaires ;
- Évaluer les effets des jus de *A. muricata* sur certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, TNF- α , INF- γ , EGF, fractalkine) d'intérêt dans le cancer du sein ;
- Évaluer les effets des jus de *A. muricata* sur le statut oxydatif (SOD, GSH, catalase et MDA) au niveau de la glande mammaire chez la rate.



**Chapitre I : REVUE DE
LITTÉRATURE**

I.1- Le cancer

I.1.1- Définition et épidémiologie

Le cancer est une grande famille de maladies hétérogènes caractérisées par une croissance cellulaire anormale avec le potentiel d'envahir ou de se propager à d'autres parties du corps (National Cancer Institute, 2018). En effet, les cellules cancéreuses échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication et par ricochet, résistent à la mort cellulaire programmée (Varela, 2013). Environ 19,3 millions de nouveaux cas de cancers et 10 millions de décès ont été enregistrés en 2020 (Sung *et al.*, 2021). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), d'ici 2030 les chiffres de mortalité dus aux cancers pourraient s'accroître de 50% pour atteindre les 15 millions si rien n'est fait. À cette date, près de 70% des nouveaux cas de cancer se produiront dans les pays en développement. En Afrique, environ 1 109 209 nouveaux cas de cancers et 711 429 décès ont été enregistrés en 2020 et d'ici 5 ans cette mortalité due au cancer en Afrique atteindra 2 166 740 si rien n'est fait (Global cancer statistics, 2020). Au Cameroun, plus de 20 745 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués avec environ de 13 199 personnes qui en décèdent chaque année (Global cancer statistics, 2020). La vitesse de croissance ces 5 dernières années montre que ces chiffres croîtront pour atteindre les 8 150 décès de cancer si cette tendance persiste (Global cancer statistics, 2020).

I.1.2- Cancérogénèse

C'est un processus multi-étapes ayant pour origine l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur pouvant aboutir à un clone de cellules initiées sous l'action des promoteurs (Lemaire *et al.*, 2020). La cellule ainsi initiée peut aboutir à un cancer qui peut progresser dans d'autres tissus (métastases). Elle comporte (Figure 1) :

- **L'initiation** : elle correspond à une atteinte génotoxique, plus précisément à une lésion de l'ADN (acide désoxyribonucléique) par des carcinogènes dits « initiateurs ». On peut citer entre autres les radiations ionisantes et ultraviolets, les virus (virus de l'herpès, *Papilloma virus*), les carcinogènes chimiques et/ou environnementaux (tabac, métaux, DMBA). Tous conduisent d'une manière ou d'une autre à une activation d'oncogène et une inactivation d'anti-oncogène dans des cellules souches ; ce qui aboutit à la formation d'une cellule initiée qui échappe au contrôle normal de la division cellulaire (Baillet *et al.*, 2015).
- **La promotion** : la cellule initiée réussit à échapper au système de défense de l'organisme et prolifère sous l'action des promoteurs tels que les facteurs de croissance, les cytokines et les hormones (œstrogènes, testostérone). Cette prolifération cellulaire conduit en une masse de cellules semblables au tissu d'origine et logé dans un tissu (tumeur bénigne) (Reece *et al.*, 2012).
- **La progression** : Suite aux modifications géniques et cellulaires, les cellules cancéreuses (cancer *in situ*) sécrètent entre autres des protéases qui vont rompre la membrane basale (cancer invasif) et digérer les fibres du tissu conjonctif (collagène, fibronectine, laminine) pour migrer. En outre ces

cellules sécrètent des facteurs angiogéniques pour détourner la circulation sanguine "Vascular Epidermal Growth Factor" (VEGF) et l'"Epidermal Growth Factor" (EGF) ; permettant leur nutrition et leur propagation dans d'autres organes (métastases). Ces métastases se forment parce qu'en s'entourant de substances qui les masquent et les protègent, les cellules cancéreuses deviennent en même temps plus résistantes à l'attaque des globules blancs (Baillet *et al.*, 2015).

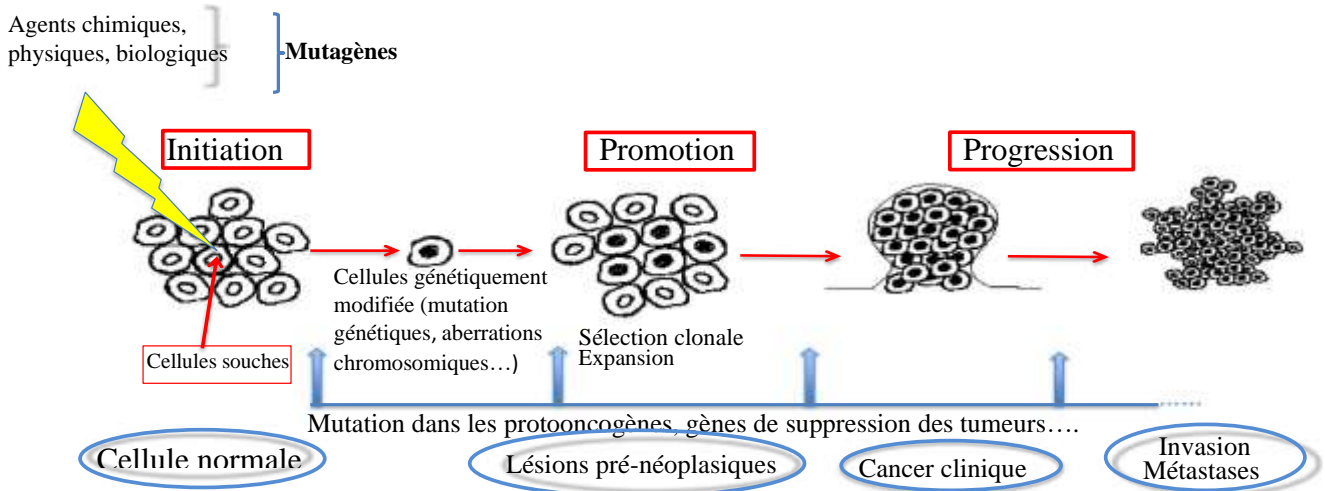


Figure 1: Les étapes de la cancérogenèse (Burgio et Migliore, 2015).

I.1.3- Types histologiques des cancers

Les formes de cancers diffèrent suivant l'organe affecté et le site de développement de la maladie (Alliance des Ligues francophones Africaines et Méditerranéens, 2017) ; on peut donc avoir entre autres :

- **Les carcinomes** qui représentent 85% des tumeurs et désignent toutes formes de tumeurs malignes qui prennent naissance dans un épithélium. Dans cet ensemble, on distingue les carcinomes malpighiens, nés d'un épithélium malpighien ou les adénocarcinomes nés d'un épithélium glandulaire.
- **Les sarcomes** qui se développent aux dépens des cellules du tissu conjonctif, cellules assurant le lien entre les éléments d'un même organe et occupant la fonction de remplissage et de soutien (os, muscle, graisses).
- **Les cancers hématopoïétiques** qui présentent trois sous-groupes : a) les leucémies qui affectent les cellules du sang ; b) les lymphomes touchant les tissus lymphatiques (ganglions et autres) ; c) les myélomes caractérisés par une prolifération de certains types de globules blancs dans la moelle osseuse



Figure 2 : Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde (adapté de Sung *et al.*, 2021).

I.2- Le cancer du sein

Le cancer du sein peut être défini comme un cancer touchant la glande mammaire principalement sous la forme d'un adénocarcinome et parfois sous la forme d'un sarcome (Institut National du Cancer, 2016). Il s'agit d'un cancer qui se développe généralement dans les canaux galactophores et dans les lobules mammaires.

I.2.1- Description du sein

Le sein est un organe pair et globuleux, dont la fonction biologique est de produire du lait afin de nourrir un nouveau-né (Marieb et Hoehn, 2010). Chaque sein contient une glande mammaire et du tissu de soutien constitué de vaisseaux, de fibres et de graisses. La glande mammaire, qui se développe sous l'influence des hormones sexuelles fabriquées par les ovaires (les œstrogènes et la progestérone), est constituée de lobes composés de lobules, eux-mêmes renfermant des alvéoles ou acini sécrétoires formés de cellules lactifères sécrétrices du lait (Figure 3). Le lait est conduit vers le mamelon par des canaux galactophores (Beaudry *et al.*, 2006). Le sein est parcouru de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques. Ces derniers et les ganglions lymphatiques composent le système lymphatique qui aide notamment à combattre les infections (Institut National du Cancer, 2016).

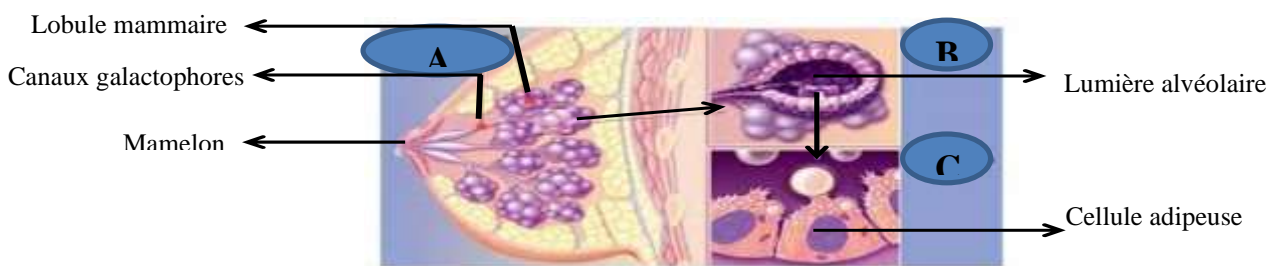


Figure 3 : Principales composantes du lobule glandulaire du sein humain (A), de la coupe de l'acinus (B) et des cellules des alvéoles mammaires (C) (Beaudry *et al.*, 2006).

I.2.2- Épidémiologie du cancer du sein

Dans le monde, le cancer du sein représente le cancer le plus fréquemment diagnostiqué avec 2,3 millions de nouveaux cas et 684 994 décès (Global cancer statistics, 2020 ; Sung *et al.*, 2021). En Afrique, c'est le cancer le plus fréquent dans la population générale après les cancers du foie, de la peau et du col de l'utérus avec 186 598 nouveaux cas et 85 787 décès et d'ici 5 ans la mortalité due au cancer du sein en Afrique atteindra 370 015 si rien n'est fait (Globocan, 2020). Au Cameroun l'incidence annuelle du cancer du sein se situe autour de 4 170 nouveaux cas avec environ 2 108 décès. Plus de 80% de cas sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie et la plupart décède dans les 12 mois qui suivent le diagnostic (Globocan, 2020). Il représente 20,1% des cancers chez la femme camerounaise ; et la survie globale à 5 ans est estimée à 43,3% (Zingué *et al.*, 2021).

I.2.3- Développement du cancer du sein

Au cours de la cancérogenèse au niveau d'un épithélium glandulaire du sein, les cellules épithéliales glandulaires sous l'action des carcinogènes environnementaux (DMBA, œstrogènes, etc.) acquièrent plusieurs modifications dues aux aberrations chromosomiques sporadiques ou à l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (Sagiv *et al.*, 2009 ; Durbat-Gault, 2013). Celles-ci leur permettent d'entrer dans une phase de prolifération sans modifications cytoplasmiques visibles, étape appelée hyperplasie sans atypie à l'origine d'une tumeur bénigne du sein. Les divisions cellulaires rapides font accumuler aux cellules des mutations et leur font développer des systèmes pour échapper aux contrôles cellulaires. Elles deviennent ainsi moins ressemblantes aux cellules glandulaires normales : c'est l'hyperplasie atypique ou dysplasie (Figure 4) (Durbat-Gault, 2013). Ces dernières peuvent proliférer sans dépasser la membrane basale en s'organisant en amas jusqu'à occlusion des lumières canalaire : cette étape est qualifiée de carcinome canalaire *in situ* par les anatomopathologistes. Lorsque la tumeur franchie la membrane basale et infiltre le tissu qui entoure les canaux et les lobules, il s'agit alors d'un carcinome infiltrant ou invasif (Institut National du Cancer, 2014). Comme la plupart des cancers, le cancer du sein évolue d'abord localement, avec extension aux organes de voisinage et aux ganglions lymphatiques axillaires, puis se propage par voie sanguine pour se métast

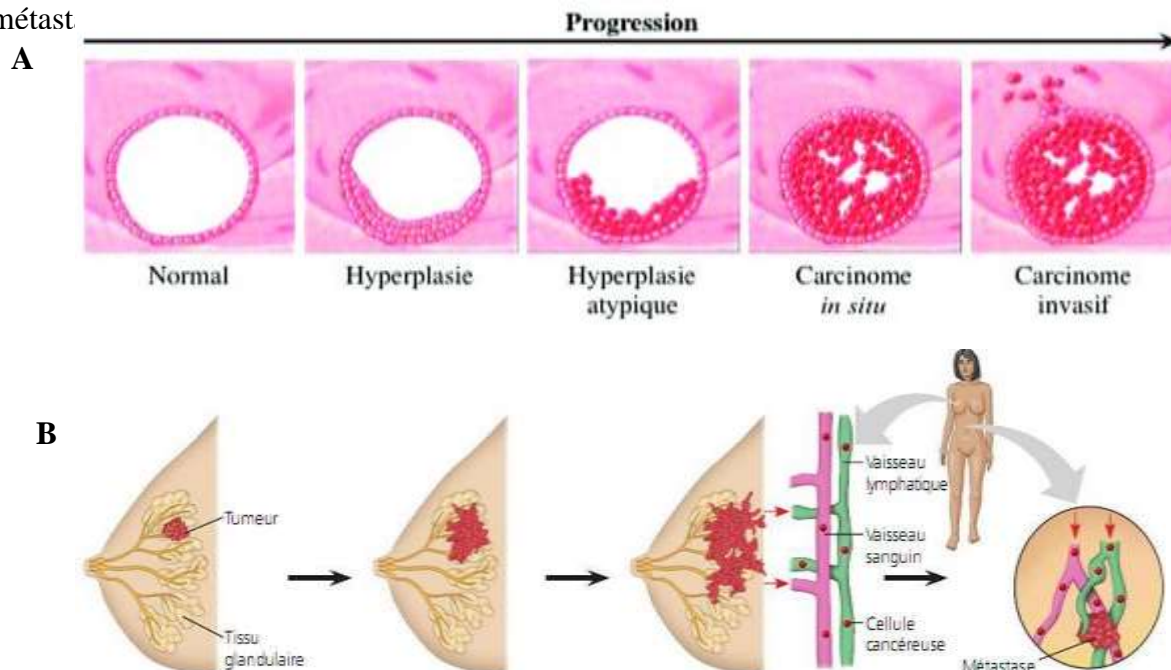


Figure 4 : Etapes de développement du cancer du sein (A et B) (Place *et al.*, 2011).

I.2.4- Détection du cancer du sein

Le symptôme le plus courant du cancer du sein est une grosseur non douloureuse. La maladie peut aussi se manifester par une fossette cutanée, une inversion du mamelon, un œdème ou un aspect peau d'orange et un écoulement mammaire coloré de sang (Moore *et al.*, 2008). Le diagnostic du cancer du sein se fait soit à l'occasion d'un examen systématique par le gynécologue, soit par une

mammographie (examen du sein au moyen des rayons x) et/ou une échographie mammaire (examen du sein utilisant la réflexion des faisceaux d'ultrasons) et par une cytoponction à l'aiguille fine ou par biopsie (prélèvement d'un fragment de tissu) (Guegang *et al.*, 2012).

I.2.5- Les marqueurs biologiques de la cellule cancéreuse

Les marqueurs tumoraux sont des substances protéiques qui sont produites principalement par les cellules cancéreuses et que l'on retrouve dans le sérum (marqueurs tumoraux sériques) ou dans les tissus (marqueurs tumoraux tissulaires). Le marqueur idéal doit être capable de détecter la maladie encore asymptomatique et ne devrait pas s'observer chez le sujet sain. Les marqueurs tumoraux sont considérés comme des facteurs pronostiques qui permettent de prévoir le devenir d'un patient, sa réponse à un traitement ou le risque de récurrence. Des marqueurs comme le Kiel (Ki67) ou "tumor protein" (P53), le "Cancer Antigen" CA15-3, détecté par immunohistochimie sont aussi utilisés pour prévoir l'évolution d'un cancer mammaire (Reis-Filho et Pusztai, 2011).

I.2.6- Facteurs de risques

Comme les autres cancers, le cancer du sein est une maladie multifactorielle, qui inclut les facteurs intrinsèques, c'est-à-dire, propres à l'individu (sexe, âge, hérédité génétique, etc.), qui ne sont généralement pas modifiables. Il existe également des facteurs de risques extrinsèques (environnement, mode de vie) sur lesquels on peut agir pour diminuer le risque de développer un cancer (Figure 5) (Sun *et al.*, 2017).

I.2.6.1- Facteurs de risques intrinsèques

Plusieurs facteurs sont associés à la survenue des cancers du sein. Nous avons entre autres : le sexe et l'âge ; les Facteurs hormonaux ; les facteurs liés à la reproduction ; les Antécédents de tumeurs bénignes du sein ; la Densité des seins à la mammographie ; Antécédents familiaux de cancer du sein.

I.2.6.2- Facteurs de risques extrinsèques

Les rayonnements ionisants notamment au niveau de la cage thoracique, présentent un risque relatif de cancer du sein entre 2 et 5 eV (Sancho-Garnier and Colonna, 2019). De même, l'obésité constitue un facteur de risque indépendant du cancer du sein (Charfi *et al.*, 2012). Une consommation modérée d'alcool est systématiquement associée à un risque accru de cancer du sein, en particulier les sous-types de cancer avec récepteurs hormonaux positifs (Liu *et al.*, 2015). Par ailleurs, il est observé que le risque relatif de cancer du sein associé au tabagisme est significativement plus élevé chez les femmes ayant des antécédents familiaux de la maladie (Jones *et al.*, 2017).

I.2.7- Généralités sur les méthodes d'évaluation *in vivo* de l'activité antitumorale des extraits de plantes

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

Ce composé appartient à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et est utilisé comme pro-mutagène, pro-carcinogène et tératogène (Digiovanni *et al.*, 1980). Son métabolisme

hépatique dépend de systèmes monooxygénases liés au cytochrome P450, au travers duquel ses métabolites sont transférés sur les tissus cibles. Les principaux métabolites produits par ce carcinogène sont le 7-hydroxy méthyl, 7-OHM-12-MBA et 7,12-diOMHBA. Ces composés perturbent la réparation de l'ADN au travers de dépurination, induisant ainsi la mort de la cellule et le développement tumoral des tissus du sein (Gao *et al.*, 2008). Selon plusieurs travaux, la dose oncogénique de ce composé est comprise entre 50 et 80 mg/kg généralement administrée par gavage, par voie intrapéritonéale, sous-cutanée et intraveineuse en dose unique (Akbakari *et al.*, 2018, Zingué *et al.*, 2020 ; Mefegue *et al.*, 2021).

❖ **Modèle d'induction par le NMU (N-méthyl-N-nitrosourea)**

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

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

Ce composé se trouve dans les aliments frits, en particulier les viandes et les poissons, et dans la fumée de cigarette en tant que substance cancérigène affectant les tissus mammaires, du colon et de la prostate (Suzui *et al.*, 1977 ; Nakatsugi *et al.*, 2000). C'est une amine hétérocyclique, également connue comme mutagène et composé cancérigène qui affecte directement l'ADN. La dose expérimentale est de 80 à 100 mg/kg, administrée généralement 4 fois par semaine pendant deux semaines.

I.2.8- Cancer du sein et inflammation

La libération et l'activation des facteurs de croissance et cytokines ancrés à la matrice extracellulaire (MEC) ou à la surface cellulaire fournissent des indices biochimiques qui exercent une influence majeure sur la survie des cellules tumorales. De plus, les fibroblastes associés et les cellules inflammatoires et immunitaires sont des entités cellulaires critiques qui affectent le potentiel tumorigène du stroma mammaire. Les métalloprotéinases sont la plus grande classe de protéases dans le génome humain et constituent un axe protéolytique important (Puente *et al.*, 2003). Les réponses inflammatoires élevées sont associées à des niveaux accrus de cytokines contribuant à la progression du cancer (Chen et Mellman 2013). Elles régulent la réponse inflammatoire ; cependant, au cours d'une inflammation chronique, certaines cytokines peuvent contribuer à la cancérogenèse (Amin *et al.*, 2020). On peut citer entre autres :

- **TNF- α** qui est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'inflammation chronique, l'apoptose, la croissance tumorale, l'invasion et l'angiogenèse (Balkwill, 2009) ;

- **IL-6** qui est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la cancérogenèse. C'est un puissant facteur anti-apoptotique qui favorise la croissance cellulaire (Rose-John *et al.*, 2007) ;
- **INF- γ** qui est une cytokine qui régule les processus moléculaire, cellulaire et physiologique qui régissent les réponses immunitaires (McNab *et al.*, 2015) ;
- **IL-12** qui est une cytokine qui possède les effets anticancéreux. Il est capable d'activer les cellules immunitaires cytotoxiques ce qui fait d'elle une cytokine utile pour induire une réponse anticancéreuse (Chiocca *et al.*, 2019) ;
- **EGF** qui est un mitogène connu pour provoquer la motilité, l'invasion et de la prolifération cellulaire par les voies de signalisation en aval des "Mitogen-Activated Protein Kinases" (MAPK) et de la phosphatidylinositol-3kinase (PI-3K) secrété par les macrophages dans les microenvironnements ;
- **Fractalkine ou CX3CL1** qui est une chimiokine particulière qui peut exister soit sous une forme soluble, soit sous forme de molécule de la membrane cellulaire. Elle possède des fonctions complexes, notamment le recrutement de leucocytes antitumoraux et la promotion de la survie au cancer, affectant ainsi la progression du cancer (Tsang *et al.*, 2013).

I.2.9- Traitement du cancer du sein

Le traitement du cancer du sein consiste dans la majorité des cas à faire appel à de multiples méthodes complémentaires, afin de garantir une guérison ou permettre le contrôle de la tumeur. Le choix des thérapeutiques dépend du type de cancer, en particulier du type moléculaire, de ses caractéristiques, de son degré d'invasion ou de métastases, et de l'état général du patient (Clere, 2016). La prise en charge des cancers du sein comporte deux volets :

- Le traitement locorégional associe le plus souvent la chirurgie et la radiothérapie ;
- Le traitement systémique qui vise à éradiquer la maladie micro-métastatique présente au moment du diagnostic. Il est maintenant bien démontré que la chimiothérapie seule ou associée aux thérapies ciblées et l'hormonothérapie adjuvante améliorent le taux de guérison pour la plupart des stades de la maladie (Hennequin *et al.*, 2016). Les principales techniques de traitement sont :

➤ **La chirurgie**

Deux types d'interventions chirurgicales peuvent être pratiquées :

- **Une chirurgie mammaire totale ou mastectomie** : qui est le traitement de référence pour toutes les tumeurs dont la taille est supérieure à 3 cm (Classe *et al.*, 2010).
- **Une chirurgie mammaire partielle ou segmentaire, appelée tumorectomie** : qui est conservatrice (Salhi, 2017).

➤ **La chimiothérapie**

La chimiothérapie est un traitement médicamenteux administré par voie orale ou injectable et qui utilise une ou plusieurs molécules antitumorales qui peut être administrée avant ou après la chirurgie (Le Corgne, 2016). Elle n'est pas spécifiquement antitumorale mais touche essentiellement les cellules

en division ce qui induit une toxicité importante. Elle permet d'éliminer le risque de dissémination, de réduire la masse tumorale et le nombre/taille de métastases afin de faciliter l'exérèse chirurgicale. (Ganier, 2017).

➤ **La radiothérapie**

Elle utilise des rayonnements ionisants (rayons X ou gamma) qui ciblent la zone à traiter tout en essayant de préserver les organes et tissus sains avoisinants. Elle cherche à détruire les cellules cancéreuses et à réduire le risque de récurrence. Dans le cancer du sein localisé, elle est le plus souvent faite en complément, après la chirurgie. On parle alors de radiothérapie adjuvante. La radiothérapie peut également être prescrite pour les cancers du sein métastatiques de manière à ralentir l'évolution de la tumeur ou afin de traiter des métastases osseuses ou cérébrales (Elhadri, 2018).

➤ **Thérapie ciblée**

En oncologie, les thérapies ciblées sont des médicaments qui ciblent spécifiquement une protéine ou un mécanisme impliqué dans le développement de la tumeur. Ces médicaments sont donc théoriquement sans effet sur les cellules saines, de ce fait, ils engendrent moins d'effets indésirables (fatigue, nausées, vomissements) que les chimiothérapies anti-tumorales classiques (Martin, 2017).

➤ **L'hormonothérapie**

L'hormonothérapie est un traitement qui empêche l'action des hormones susceptibles de stimuler la croissance des cellules cancéreuses. Deux exemples d'hormonothérapies les plus utilisées sont :

❖ **Le Letrozole** qui est un inhibiteur de l'aromatase. Il est utilisé en première intention contre le cancer du sein présentant des récepteurs d'œstrogènes positifs chez les femmes ménopausées (Patel *et al.*, 2021).

❖ **Le Tamoxifène** est un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes qui bloque l'action proliférative des œstrogènes dans la cellule cancéreuse œstrogéno-sensible prescrit chez la femme non ménopausée.

I.2.10.1- Phytothérapie et cancer du sein

Les métabolites secondaires ou produits naturels dérivés des plantes jouent un rôle important dans les activités pharmacologiques, y compris l'action antinéoplasique. Le taxol, les alcaloïdes de la pervenche, la camptothécine, des podophylotoxines, ainsi que leurs dérivés semi-synthétiques sont les exemples les plus importants de cette coopération (Malik *et al.*, 2014).

❖ **Alcaloïdes de Vinca**

Cantharanthus roseus (L.) G. Don, communément appelé pervenche (famille des Apocynaceae), a suscité un intérêt pharmaceutique en raison de la présence de ses métabolites secondaires,

principalement des alcaloïdes. Les alcaloïdes les plus importants isolés de cette espèce végétale sont la vinblastine et la vincristine, deux alcaloïdes bisindole qui ont été isolés et identifiés par Robert Noble et Charles Beer dans les années 1950 et sont connus pour posséder de fortes activités anticancéreuses (Yang *et al.*, 2016). Ils inhibent la polymérisation de la tubuline des cellules tumorales et provoquent également la destruction du fuseau mitotique.

❖ Taxol et ses dérivés

Le taxol (nom générique paclitaxel) est un alcaloïde diterpénique isolé de l'écorce de *Taxus brevifolia* (if du pacifique) en 1962, puis ses propriétés anticancéreuses ont été découvertes en 1971 (Wani *et al.*, 1971). Il agit en stabilisant les microtubules et en inhibant leur dépolymérisation en tubuline, ce qui arrête le cycle cellulaire en phase G2/M conduisant à la mort cellulaire (Horwitz, 1994).

❖ Podophyllotoxine et ses dérivés

Les podophyllotoxines sont des lignanes aryltétralines naturelles que l'on trouve dans les plantes, en particulier dans le genre Podophyllum. Ils comprennent plusieurs structures chimiques étroitement liées, plus précisément la podophyllotoxine, la désoxypodophyllotoxine, les analogues 4-diméthyl, les peltatines et leurs glycosides correspondants (Botta *et al.*, 2001).

I.2.10.2- Alicaments et cancer

Un alicament est un aliment ayant un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions cibles dans l'organisme, au-delà des effets nutritionnels habituels, pouvant soit améliorer l'état de santé et le bien être d'un individu (Contor, 2001). Les études épidémiologiques ont montré qu'il y a des corrélations étroites entre l'alimentation et l'apparition ou la prévention des cancers. En effet, certains nutriments sont riches en composés ayant un rôle pour la santé autre que leur rôle alimentaire de base (Bouyahya, 2016). Plusieurs recherches décrivant la mécanistique de la transformation tumorale ont montré l'implication des diètes dans la prévention des cancers (Song *et al.*, 2015). En effet, certaines composantes alimentaires sont capables d'activer les facteurs de transcription spécifiques des oncogènes soit directement soit via d'autres intermédiaires.

Le concept de "nutrithérapie" est né suite à l'observation suivant laquelle des molécules présentent naturellement dans les nutriments ont un effet thérapeutique (Bouyahya, 2016). Dans la thérapie cancéreuse, certaines molécules isolées d'aliments ont induit la mort des cellules cancéreuses d'une manière sélectives, d'où l'idée d'utiliser ces molécules de façon naturelles via l'alimentation afin d'éviter le développement ou la progression tumorale. L'avantage de l'utilisation de ces molécules réside dans le fait qu'elles sont contenues dans les aliments, ce qui rend leur utilisation quotidiennement possible. Parmi les produits qui sont considérés comme des nutraceutiques antitumoraux, on cite les fruits, les légumes, le thé et certaines épices. L'efficacité anticancéreuse de ces aliments a été prouvée par de nombreuses études expérimentales *in vitro* et *in vivo*, de même que les études épidémiologiques. L'action antitumorale de ces nutriments a été attribuée à leurs composés qui sont pour la majorité les

polyphénol (curcuminoïdes, flavonoïdes et catéchines), les composés sulfurés (isothiocyanates et diallylsulphides), les terpènes (caroténoïdes et monoterpènes) et les saponines (triterpénoïdes et stéroïdes) (Bouyahya et Berezgoun, 2016).

I.3- Sucre et cancer

Le sucre alimentaire stimule la libération de l'insuline et peut prédisposer à la résistance à l'insuline (Goncalves *et al.*, 2019). L'hyperinsulinisme chronique qui en résulte peut stimuler la tumorigénèse car l'insuline est un mitogène connu dans la croissance des cellules tumorales mammaires *in vitro* (Van der Burg *et al.*, 2005). Plusieurs études ont examiné la relation entre sucre alimentaire et les glucides avec le développement du cancer du sein, et il ne semble pas y avoir d'association (Giles *et al.*, 2006). Les glucides sont digérés et absorbés à des vitesses différentes, ce qui modifie leurs effets systémiques (par exemple, le degré de sécrétion d'insuline). Par conséquent, un système appelé index glycémique (IG) a été créé pour classer les aliments sur une échelle de 1 à 100 en fonction de leur effet sur la glycémie. Les glucides à faible index glycémique sont digérés, absorbés et métabolisés plus lentement, ce qui entraîne une augmentation plus faible et plus lente de la glycémie et, généralement, des taux d'insuline.

Bien qu'il n'y ait pas de preuves cliniques cohérentes soutenant un rôle des graisses alimentaires dans le développement de tout cancer, des cohortes prospectives de populations avec des individus à haut risque suggèrent un rôle des graisses alimentaires dans la progression du cancer de la prostate et du sein qui est étayée par des études chez la souris. Parce que de grandes quantités de graisses alimentaires prédisposent à l'obésité (facteur de risque connu du cancer), nous convenons de suivre un régime à base de plantes est un moyen facile de limiter les graisses alimentaires. Une alimentation pauvre en glucides et à base de plantes améliore la survie des hommes atteints de cancer de la prostate non métastatique et est associé à une cause de mortalité plus faible (Richman *et al.*, 2013). (Figure 6).

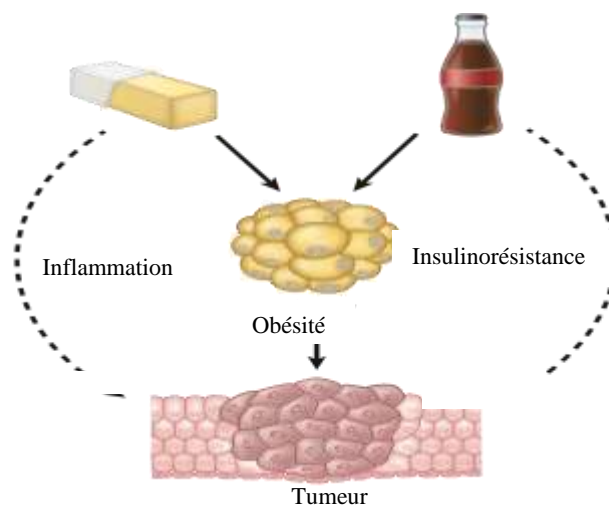


Figure 5 : Les sources alimentaires de matières grasses et de sucre contribuent à l'obésité et aux maladies liées à l'obésité (Goncalves *et al.*, 2019).

I.4- La chimio-prévention du cancer

C'est l'utilisation des substances d'origine naturelle (plantes ou agent biologique) pour prévenir ou stopper la progression des cancers dans l'organisme (Shu *et al.*, 2010). Ces substances d'origine naturelle incluent les polyphénols (métabolites secondaires des plantes), communément regroupés en acides phénoliques (phénols simples), flavonoïdes et tanins, qui présentent plusieurs propriétés biologiques parmi lesquelles des propriétés antioxydantes, antiinflammatoires et anticancéreuses (Vacek *et al.*, 2009).

Par ailleurs il existe également des substances d'origine animale dotées de propriétés anticancéreuses prouvées. C'est le cas de la propolis (substance résineuse naturelle fortement adhésive, recueillies par les abeilles) qui est riche en flavonoïdes aux propriétés antioxydantes et anticancéreuses (Zingué *et al.*, 2021a).

Le diagnostic précoce du cancer du sein (autoexamen et la mammographie) et la chimio-prévention sont considérés comme le meilleur moyen pour lutter contre le cancer du sein (Klug *et al.*, 2010). Pour contribuer à la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer du sein, notre intérêt s'est porté sur *Annona muricata*.

I.5- *Annona muricata*

I.5.1- Classification botanique

Annona muricata L. est une plante appartenant à la famille des Annonaceae qui regroupe 2106 espèces reconnues et 128 genres dont celui des *Annona*. C'est la plus grande famille de l'ordre des Magnoliales. Elle est composée d'arbres, d'arbustes ou de lianes des zones tropicales ou subtropicales. Sa classification selon le système APGIII est consignée dans le Tableau I.

Tableau I : Taxonomie de *Annona muricata* L. (ITIS Standard Report Page, 2017)

Règne	Plantae
Division	Angiospermes (Magnoliophytes)
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Magnoliideae
Ordre	Magnoliales
Famille	Annonaceae
Genre	<i>Annona</i>
Espèce	<i>Annona muricata</i>

Annona muricata Linn porte le nom de corossolier et est souvent appelé par le nom de son fruit, le corossol. Il est également désigné par de nombreux noms vernaculaires français comme cachimantier, corossol épineux, cachiman épineux, grand corossol. Dans la littérature, ses noms anglais (soursop), espagnol (guanabana) ou encore portugais (graviola), sont régulièrement cités.

I.5.2- Description de *Annona muricata* L.

A. muricata L. est un arbre mince, mesurant 3 à 10 mètres de hauteur avec un tronc d'un diamètre moyen de 15 centimètres (Orwa *et al.*, 2009). Les rameaux bruns rougeâtres et glabres sont ramifiés près de la base. Les rameaux poussent de façon ascendante, mais forment par la suite une sorte de cône inversé, en raison de leur faible diamètre comparé à la taille du fruit qu'ils portent. Les feuilles sont entières, simples, penninerves, alternes, non stipulées. Les fruits de *A. muricata* sont des syncarpes, charnus, ovoïdes, souvent asymétriques et irréguliers (Figure 7). Ils peuvent mesurer de 10 à 20 cm de large et de 15 à 35 cm de long. Ils pèsent en moyenne entre 4 et 7 kg (Maignien, 2005).



Figure 6 : Photographies de *A. muricata* prises à Ngoa-ékélé (Yaoundé) par MBOU le 16 septembre 2020.

Légende : A = Plante entière ; B = Feuilles ; C = Fruit ; D = Pulpe.

I.5.3- Données ethno-pharmacologiques

En médecine traditionnelle, toutes les parties de la plante sont utilisées. Les feuilles ont la plus large utilisation, suivies de l'écorce et du fruit. Ses principaux usages traditionnels sont les suivants : sédatif, bactéricide, antiparasitaire, anti-inflammatoire, astringent, hémostatique, antispasmodique, antiulcéreux et anti-diarrhéique, antitussif, hypotensif, anti-vertiges, antipyrétique et galactogogue (Maignien, 2005).

I.5.4- Travaux pharmacologiques antérieurs

Annona muricata L. est doté de plusieurs propriétés thérapeutiques parmi lesquels les plus courants sont :

- **Activité antitumorale**

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré un effet antiprolifératif significatif de différents extraits de *A. muricata* ainsi que de acétogénines des Annonaceae (AAG) isolées de cette plante, et ce, envers diverses lignées de cellules tumorales (poumon, sein, colon, prostate, rein et pancréas) (Mishra *et al.*, 2013 ; Minari et Okeke, 2014 ; Ioannis *et al.*, 2016).

- **Activité cytotoxique**

L'activité cytotoxique des AAG est principalement liée au blocage du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (NADH-ubiquinone oxydoréductase). Ainsi, une diminution des fonctions cellulaires et un effet cytopathique sont induits par la déplétion des stocks d'adénosine triphosphate (ATP) et un stress oxydant (Torres *et al.*, 2012).

- **Activité cytostatique**

Certains travaux ont montré que les extraits du fruit de *A. muricata* pourraient inhiber sélectivement la croissance des cellules du cancer du sein sur-exprimant "l'epidermal growth factor receptor" (EGFR) (cellules MDA-MB-468), mais pas les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses (MCF-10A) (Dai *et al.*, 2011). Ces auteurs ont conclu que *A. muricata* aurait des effets cytostatiques sélectifs entre les cellules cancéreuses et non cancéreuses. Concernant le cancer de la prostate, des études portant sur l'extrait éthanolique des feuilles de *A. muricata* ont rapporté une inhibition de la croissance tumorale. De plus, une corrélation entre les constituants des extraits de ces feuilles, les fractions enrichies en flavonoïdes et en acétogénines a été établie (Yang *et al.*, 2015).

- **Activité antalgique et anti-inflammatoire**

Plusieurs études ont démontré les effets anti-nociceptifs et anti-inflammatoires de *A. muricata* justifiant ainsi son utilisation comme analgésique (Roslida *et al.*, 2012 ; Ishola *et al.*, 2014).

- **Autres activités biologiques**

Plusieurs autres études ont démontré que *A. muricata* serait doté d'autres activités tels que : activité antioxydante (Olakunle *et al.*, 2014, Kalyani *et al.*, 2017) ; activité antipaludique (Ménan *et al.*, 2006 ; Bidla *et al.*, 2004), activité hypotensive (Nwokocha *et al.*, 2012), activité antiparasitaire (Osorio *et al.*, 2007), activité anti-leishmaniale (Jaramillo *et al.*, 2000 ; Vila-Nova *et al.*, 2013), activité chimio-préventive (Moghadamtousi *et al.*, 2015 ; Minari et Okeke, 2014), activité antihelminthique (Ferreira *et al.*, 2013), activité hépato-protectrice (Fareed *et al.*, 2012), activité gastro-protectrice (Hamid *et al.*, 2012), activité molluscicide (Dos Santos *et al.*, 2001), activité insecticide (Ribeiro *et al.*, 2014) ; activité antidiabétique et hypolipémiante (Adeyemi *et al.*, 2008 ; Ngueguim *et al.*, 2014) ; activité anticonvulsivante (Moghadamtousi *et al.*, 2015 ; N'Gouemo *et al.*, 1997) et activité antiarthritique (Minari et Okeke, 2014).



**Chapitre II : MATÉRIEL ET
MÉTHODES**

II.1- Matériel

II.1.1- Matériel animal

Des rates Wistar prépubères âgées de 35 à 40 jours et pesant environ 55 g au début de l'expérience ont été obtenues à l'animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences (Université de Yaoundé I). Elles ont été introduites dans des cages en plastique à température ambiante (~ 25°C) avec une ventilation suffisante sous un cycle de lumière naturelle. Elles avaient un accès libre à l'eau de robinet et à une alimentation standard composée comme suit : maïs (42%), farine d'os (3%), farine de blé (22%), farine de poisson (19%), farine de palmiste broyée (4%), sel (0,75%), arachides (9%) et complexe multivitaminé (Olivitazol® 0,5%).

L'hébergement et les traitements des animaux ont été approuvés par le Comité de Bioéthique Institutionnel des Expériences Animales et Humanitaires de la Faculté des Sciences (Université de Yaoundé I) sous le numéro de référence N° : BTC-JIRB2021-10, qui a adopté les directives établies par l'Union européenne sur le soin des animaux (Conseil de la CEE 86/609).

II.1.2- Matériel végétal

Les feuilles et les fruits de *A. muricata* ont été collectés à Ngoa-Ekellé à Yaoundé (Région du Centre, Cameroun). La plante a été authentifiée à l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé par Dr ESSONO Damien, Botaniste à l'Université de Yaoundé I, en comparaison avec un spécimen de référence N° 32879 HNC.

II.1.3- Produits chimiques et réactifs

Le carcinogène mammaire 7,12 diméthylbenz(a)anthracène (DMBA, pureté $\geq 98\%$), a été obtenu auprès de Sigma-Aldrich (Stanford, Allemagne), tandis que le citrate de tamoxifène (Norvatis Access®) et le Letrozole (Norvatis Access®) ont été obtenus auprès de Salutas Pharma GmbH (Barbelen, Allemagne). Les anesthésiques, diazépam (Valium® 10 mg/2 ml) et kétamine (Ketamine hypochloride® 50 mg/ml) ont été obtenus respectivement auprès de Roche (Fontenay-sous-bois, France) et de Rotex Medica (Tritau, Allemagne). Le kit de dosage des cytokines MILIPLEX® pour la technologie lumiex® Xmap® a été fourni par Milipore (R&D systems, inc, Minneapolis, USA). Le kit de dosage immunoenzymatique ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay") de l'antigène du cancer 15-3 (CA 15-3) provenait de Monobind Inc® (Californie, États-Unis). Les kits de réactifs de l'alanine transaminase (ALT) et de la créatinine provenaient de Fortress Diagnostics Limited® (Muckamore, Royaume-Uni).

II.2- Méthodes

II.2.1- Préparation des solutions

Les solutions utilisées dans cette étude ont été préparées comme suit :

❖ **Formol à 4%**

Elle servait à fixer les organes et les tumeurs et sa préparation s'est faite à partir du formol commercial (solution concentrée à 40%). Pour un volume final (Vf) de 1000 mL, un volume initial (Vi) de 100 mL de formol a été introduit dans une éprouvette graduée et le Vf a été atteint par ajout de 900 ml d'eau distillée.

❖ **Hématoxyline de Harris**

Elle est une composante de la coloration hématoxyline-éosine (H&E) qui colore les noyaux cellulaires en bleu violacé. Pour une préparation de 200 mL, 1 mg d'hématoxyline, 10 mL d'alcool absolu, 20 g d'alun potassique, et 0,5 g d'oxyde de mercure rouge ont été mélangés, ensuite le tout a été complété avec de l'eau distillée pour atteindre un volume final de 200 mL. Le mélange obtenu a été filtré.

❖ **Eosine alcoolique à 0,5%**

Seconde composante de l'H&E, elle colore le cytoplasme des cellules en rose. Pour obtenir une solution de 500 mL, 3 g d'éosine ont été dissous dans 100 mL d'eau distillée. A cette solution initiale, 125 mL d'éthanol 95° ont été ajoutés et le volume final complété à 500 mL avec de l'eau distillée. Après homogénéisation et filtration, deux gouttes d'acide acétique ont été ajoutées. La solution finale obtenue a été laissée à l'abri de la lumière et filtrée avant usage.

❖ **Solution d'eau gélatinée**

Cette solution a permis de faire adhérer les coupes de tissus sur les lames porte objet. Pour la préparation de 100 mL de cette solution, 5 mg de poudre de gélatine ont été dissous dans 80 mL d'eau distillée et le volume du mélange a été complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

❖ **Solution d'éosine alcoolique 65 (EA-65)**

Cette solution a été obtenue par le mélange de 450 mL de vert lumière à 0,02%, de 100 mL de brun Bismarck à 0,5% et de 450 mL de solution d'éosine à 0,5%. Six grammes d'acide phospho-tungstique ont ensuite été dissous dans le mélange.

❖ **Solution d'orange G à 10%**

Cette solution entre dans la composition de la solution de EA-65 ; elle a été obtenue par dilution de 10 g d'orange G dans 100 mL d'eau distillée.

❖ **Solution de Biuret**

C'est la solution réactive du dosage des protéines totales. Elle résulte du mélange de deux solutions. Solution A : 0,75 g de sulfate de cuivre hydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et 3 g de tartrate de sodium et de potassium ont été dissout dans 100 mL d'eau distillée. Solution B : 15 g de soude ont été dissouts dans 100 mL d'eau distillée. Les deux solutions ont été mélangées et le volume final a été ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée.

❖ **Solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 7, 5)**

C'est dans ce tampon qu'ont été préparés les homogénats de glandes mammaires et des tumeurs. Pour préparer le tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5), 4,08 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 11,75 g de phosphate disodique hydraté ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ont été successivement pesés et dissous dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour faire 1 L.

❖ **Solution de DMBA**

La solution de DMBA a été utilisée pour induire les tumeurs mammaires chez les rates prépubères (50 jours d'âge) à la dose de 50 mg/kg PC (Wafa *et al.*, 2008). L'ensemble a été porté à l'ultrason Elmasonic jusqu'à obtention d'une solution homogène.

❖ **Solution de tamoxifène**

Le tamoxifène, l'une des substances de référence utilisé dans cette étude a été administré à la dose de 3,3 mg/kg PC (Maltoni *et al.*, 1997). Pour un animal de masse corporelle moyenne de 100 g, 0,33 mg de poudre de tamoxifène a été dissout dans 1 mL de véhicule (eau distillée) et homogénéisé à l'ultrason Elmasonic 20 hertz pendant 15 minutes à 30°C.

❖ **Solution de letrozole**

Le letrozole, utilisé comme seconde substance de référence dans cette étude, a été administré à la dose de 1 mg/kg PC (Mvondo *et al.*, 2020). Pour un animal de masse corporelle moyenne de 100 g, 0,1 g de poudre de letrozole a été dissout dans 0,1 mL d'eau distillée et homogénéisé à l'ultrason Elmasonic 20 hertz pendant 15 minutes à 30°C.

❖ **Solution d'adrénaline**

La solution d'adrénaline 0,06 mg/mL nous a servi à doser le superoxyde dismutase (SOD) et a été préparée à l'abri de la lumière, en dissolvant 6 mg d'adrénaline dans de l'eau distillée pour un volume final de 100 mL.

❖ **Solution de BSA "Bovine Serum Albumin"**

Cette solution nous a servi de standard dans le dosage des protéines totales. Elle a été obtenue par dissolution de 2 mg de poudre de BSA dans de l'eau distillée dans une fiole jaugée de 2 mL et le volume a été complété jusqu'au trait de jauge, et titrée à 1 mg/mL.

II.2.2- Préparation des jus de pulpe de *A. muricata*

Après la récolte des fruits matures de *A. muricata*, ceux-ci ont été conservés pendant 8 jours au cours desquels ils ont mûri. 3 kg de fruits murs ont été nettoyés, débarrassés de leurs graines puis broyés à l'aide d'un moulin électrique. La pâte obtenue a été tamisée et filtrée sur du papier Wattman N° 4. Ensuite, le 3L filtrat obtenu a été séché dans une étuve à ventilation pendant 48 heures à une température de 50°C,

ce qui nous a permis d'obtenir 87 g d'une patte marrone représentant l'extrait du jus de *A. muricata* (JAM+) soit un rendement de 2,8% (Figure 8).

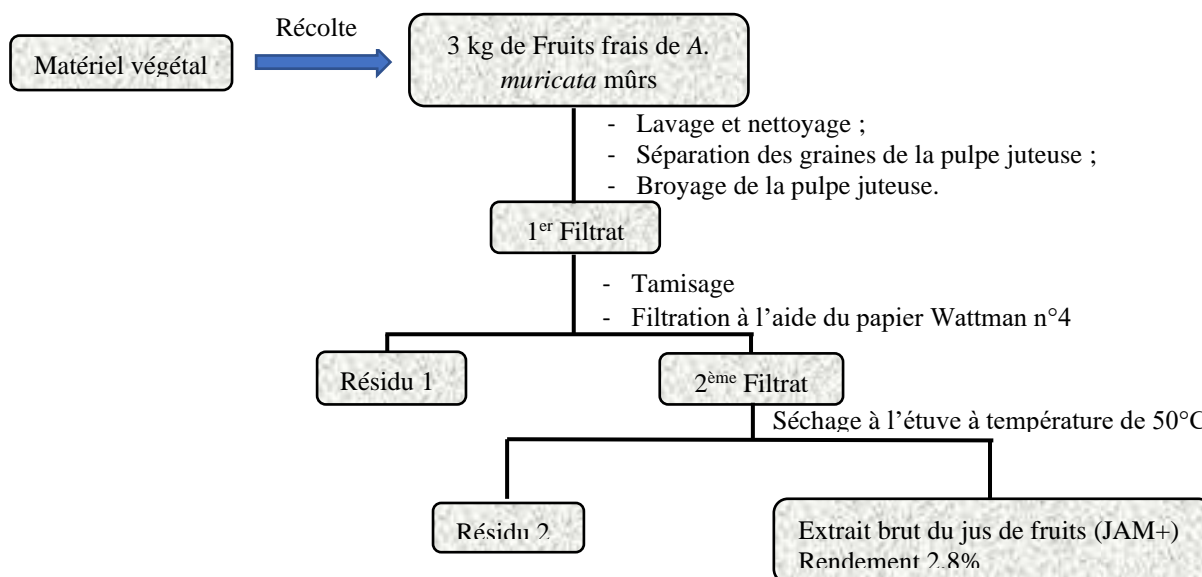


Figure 7: Protocole d'extraction du jus naturel de la pulpe du fruit de *A. muricata*.

Pour précipiter les sucres (monosaccharides) dans le jus de *A. muricata*, 53 g de l'extrait du jus de *A. muricata* ont été dissous dans de l'eau distillée dans des proportions de 1/5. Le mélange a été précipité avec de l'éthanol à 95% dans des proportions de 1/4 et le mélange obtenu a été stocké à 4°C pendant 24 h puis centrifugé à 3500 trs/min pendant 15 minutes. Le surnageant a été recueilli et séché dans un four à 50°C pendant 48 heures ce qui a donné 32 g de jus moins sucré de *A. muricata* (JAM-) soit un rendement de (60,37%) (Figure 9).

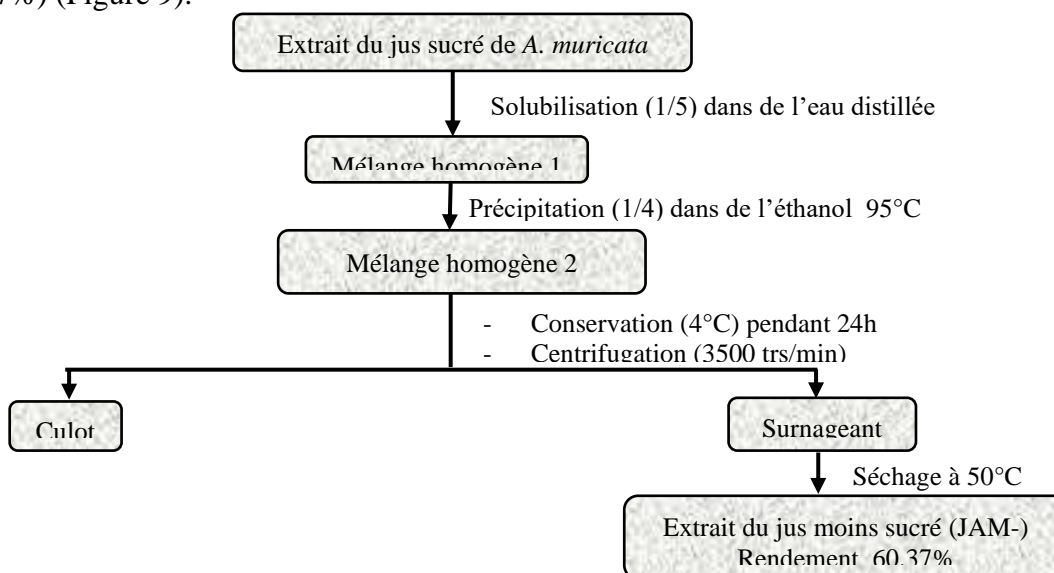


Figure 8 : Protocole d'obtention du jus moins sucré de la pulpe du fruit de *A. muricata*.

II.2.3- Préparation de l'extrait éthanolique des feuilles de *Annona muricata*

Les feuilles de *A. muricata* après avoir été nettoyées et séchées à l'ombre, ont été broyées à l'aide d'un moulin à hélice et 1500 g de la poudre obtenue ont été macérés dans 6 litres d'éthanol à 95°C pendant 48 h à température ambiante. Le processus a été répété deux fois et 32 g (2,13%) d'extrait éthanolique brut

de feuilles (FAM) a été obtenu après filtration sur papier Wattman N°4 et évaporation sur un évaporateur rotatif sous pression réduite de 175 mbar à 40°C (Figure 10).

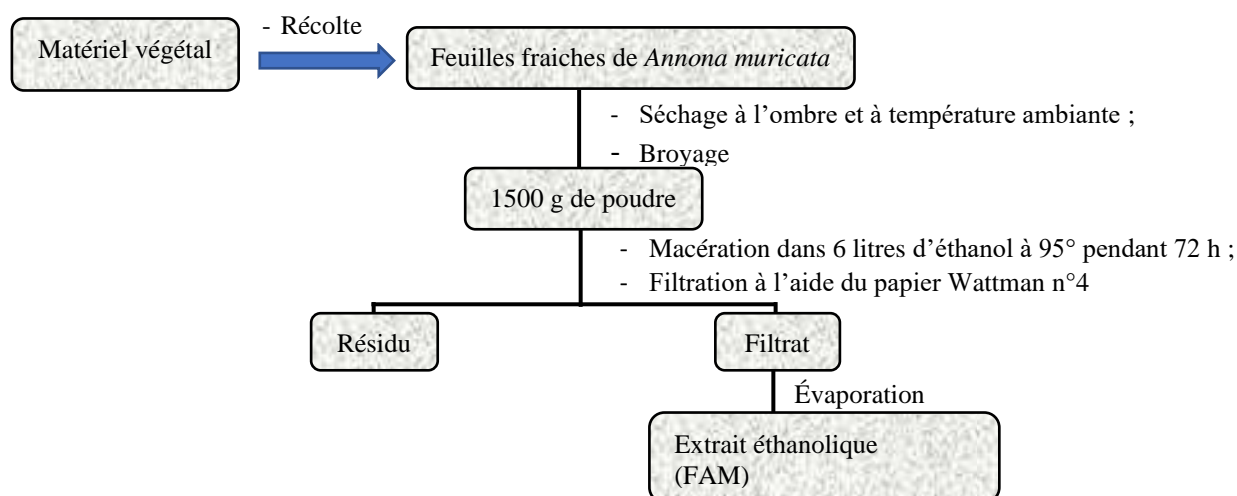


Figure 9 : Protocole d'obtention de l'extrait éthanolique des feuilles de *A. muricata*.

II.2.4- Caractérisation des jus de *A. muricata*

II.2.4.1- Détermination de la teneur en eau des extraits du jus de *A. muricata*

❖ Principe

Le protocole de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (1982) nous a permis de déterminer la teneur en eau des jus de *A. muricata* à l'aide d'une étuve. Il est basé sur l'insinération des produits à haute température (105°C) afin d'évaporer toute trace d'eau.

❖ Méthode

Environ 0,5 g d'extrait de chaque jus de *A. muricata* a été pesé à l'aide d'une balance sensible et introduit dans les creusets. L'ensemble a été pesé (M2) et mis dans l'étuve pendant 24 heures à une température de 105°C. chaque échantillon séché a été refroidit dans l'atmosphère d'un dessiccateur et ensuite pesé (M3).

❖ Expression des résultats

La teneur en eau et en matières volatiles notée (TE) exprimée en pourcentage (%) de chaque échantillon a été déterminée selon la relation suivante :

$$TE (\%) = [(M2 - M) - (M3 - M) / M1] \times 100$$

II.2.4.2- Détermination de la teneur en lipides totaux des extraits du jus de *A. muricata*

❖ Principe

Les lipides totaux ont été extraits au soxhlet selon la méthode Russe décrite par Bourelly 1982. L'extraction repose sur la solubilité différentielle des lipides dans les solvants organiques (hexane ou éther de pétrole). Elle se fait à chaud pendant une durée de 12 heures.

❖ Méthode

Une masse d'environ 1 g de chaque échantillon a été emballée dans du papier filtre Wattman N°1 puis introduit dans l'extracteur du Soxhlet. L'extraction de l'huile des lipides s'est effectuée avec l'hexane pendant une durée de 12 heures, la cartouche est récupérée et séchée à l'étuve à 105°C pendant 20 minutes puis pesé à nouveau.

❖ Expression des résultats

La teneur en lipides a été calculée par la différence de poids du sachet avant et après l'extraction complète des lipides soient :

M1 : la masse du sachet plein renfermant la prise d'essai avant son traitement (papier + prise d'essai) ; M : la masse du sachet plein refermant la prise d'essai après extraction des lipides (papier + prise d'essai + lipide) ; M2 : la masse du sachet de papier vide. La teneur en lipides totaux H pour 100 g d'échantillon a été donnée par la relation :

$$H (\%) = [(M1 - M) / (M1 - M2)] \times 100$$

II.2.4.3- Détermination de la teneur en sucres totaux des jus de *A. muricata*

❖ Principe

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5- dinitrosalicylique (DNS) réagit avec les sucres solubles et passe de sa forme oxydée jaune à sa forme réduite orangée présentant un maximum d'absorption à 530 nm.

❖ Mode opératoire

A l'aide des solutions étalon S₁, S₂, S₃, S₄, S₅ du maltose, la gamme d'étalonnage a été préparée et le dosage des échantillons a été effectué comme indiquée dans le Tableau 2.

❖ Expression des résultats

La teneur en sucre totaux en g /100 g MS de l'échantillon a été déterminée en se reportant sur la courbe d'étalonnage (Annexe I) d'équation de régression : DO = a Q + b. Avec, DO : Densité Optique et Q : quantité de sucres réducteurs ; a, b : Constantes à déterminer.

II.2.4.4- Dosage des flavonoïdes et flavonols

❖ Principe

Le chlorure d'aluminium forme avec les groupements C-4 céto et C-3 ou C-5 hydroxy des flavones et des flavonols, des complexes acides stables. Il forme également des complexes acides labiles, avec les groupes ortho-dihydroxy dans l'anneau A- ou B- des flavonoïdes (Harbone, 1998).

❖ Mode opératoire du dosage des flavonoïdes

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

❖ **Mode opératoire du dosage des flavonols**

Dans les tubes à essai contenant 2 mL d'extrait de concentration 0,1 mg/mL, 2 mL d' AlCl_3 (2%) et 3 mL de solution d'acétate de sodium (50 g/L) ont été ajoutés et le mélange incubé pendant 2 h 30 min à 20 °C. L'absorbance a été lu à 430 nm.

❖ **Expression des résultats**

La teneur en flavonoïdes et en flavonols a été déterminée par extrapolation sur une courbe d'étalonnage (Annexes II et III), et exprimée en mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait sec (mg eq/g d'extrait sèche).

II.2.4.5- Dosage des tanins condensés totaux

❖ **Principe**

La vanilline réagit avec le groupement flavonoïdes terminal des tanins condensés et la forme un complexe rouge, cela due à la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidol de couleur rouge.

❖ **Mode opératoire**

Un volume de 50 μL d'extrait a été ajouté à 1500 μL de la solution vanilline/méthanol à 4%, puis vigoureusement mélangé. Ensuite, un volume 750 μL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) a été additionné, le mélange obtenu a été incubé à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance a été mesuré à 550 nm contre le blanc.

❖ **Expression des résultats**

Les différentes concentrations comprises entre 0 et 1000 $\mu\text{g/mL}$ préparées à partir d'une solution mère de la vanilline, ont permis de tracer la courbe d'étalonnage (Annexe IV) la concentration en tanins condensés des extraits a été exprimée à partir de cette courbe.

II.2.4.7- Détermination de la capacité antioxydante totale

❖ **Principe**

En milieu acide et en présence d'agents réducteurs, le molybdate d'ammonium réagit pour former un complexe vert de phosphomolybdates qui absorbe la lumière à 695 nm. L'absorbance à cette longueur d'onde est directement proportionnelle à la quantité de composés réducteurs présents dans l'échantillon (Prieto et *al.*, 1999).

❖ **Mode opératoire**

Dans les tubes à essai 0,3 mL d'extrait a été mélangé avec 3 mL de solution réactif. Les tubes contenant la solution de réaction ont été incubés à 95°C pendant 90 min. Ensuite l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre le blanc.

❖ **Expression des résultats**

La capacité antioxydante totale de l'extrait a été exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique/g d'extrait (mg EAA/g matière sèche) en utilisant l'équation de régression de la courbe d'étalonnage.

II.2.5- Induction du cancer du sein chez la rate par le DMBA

II.2.5.1- Détermination des doses

Le cancérogène DMBA a été utilisé pour induire les tumeurs mammaires chez des rates prépubères (~55 jours) à une dose de 50 mg/kg PC dissoute dans 1 mL d'huile d'olive, alors que les rates normales ont uniquement reçu de l'huile d'olive (Ramachandran *et al.*, 2017). Le tamoxifène (Tamox), un modulateur sélectif des récepteurs d'œstrogènes (MSRO) a été utilisé comme témoin positif-1 dans cette étude et administré à la dose de 3,3 mg/kg PC (Maltoni *et al.*, 1997). Le létrozole, un inhibiteur de l'aromatase, a été utilisé comme témoin positif-2 et a été administré à la dose de 1 mg/kg PC (Mvondo *et al.*, 2020). L'extrait éthanolique des feuilles de *A. muricata* a été utilisé dans cette étude comme témoin pharmacologique à la dose optimale de 200 mg/kg PC (Subin *et al.*, 2019). Le jus naturellement sucré de *A. muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) a été administré à la dose de 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 jours/semaine et quotidiennement).

II.2.5.2- Traitement des rats

Pour atteindre notre objectif, soixante-douze (72) rates Wistar femelles âgés de 35-40 jours ont été acclimatées pendant 10 jours et randomisées à l'âge de 45-50 jours dans des cages en plastique préalablement étiquetées, en 9 groupes de 8 animaux chacun (n = 8) comme suit : les groupes 1 (NOR) et 2 (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) et servaient respectivement de groupe témoin normal et négatif. Les groupes 3 (Tamox) et 4 (LTZ) ont été traités avec du tamoxifène à 3,3 mg/kg et du létrozole à 1 mg/kg respectivement et servaient de groupes témoins positifs. Le groupe 5 représentait le contrôle pharmacologique et a reçu l'extrait éthanolique des feuilles de *A. muricata* à une dose de 200 mg/kg. Les groupes 6-9 ont reçu le jus de *A. muricata* naturel (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et tous les jours).

II.2.5.3- Collecte des organes

Les animaux devenus moribonds ou décédés ont été directement sacrifiés ou autopsiés. Après 20 semaines, les survivants ont été sacrifiés par décapitation sous anesthésie après un jeûne de 12 h. Des échantillons de sang ont été prélevés dans des tubes secs anticoagulants (éthylène diamine tétra-acétique-EDTA) puis centrifugés à $600 \times g$ pendant 15 minutes pour les analyses hématologiques et biochimiques. En outre, les tumeurs mammaires ont été retirées, comptées, pesées et mesurées avec un pied à coulisse de précision de 1 mm (IGAGING®). Les tumeurs mammaires, les glandes mammaires, le foie, la rate, les poumons et les reins ont également été prélevés, pesés et immédiatement fixés dans du formol à 4% pour une analyse histologique (Figure 11).

Le volume de la tumeur a été calculé par la formule : longueur × masse × hauteur × $\pi / 6$ de Faustino Rocha *et al.* (2013). La masse relative des organes a été calculée comme suit : masse relative des organes (mg/kg) = [masse de l'organe (mg)/masse corporelle du rat (kg)] × 10⁶. L'incidence des tumeurs a été calculée comme suit : incidence des tumeurs (%) = (rat avec tumeurs/nombre total de rats) × 100. La charge tumorale a été estimée comme suit : charge tumorale (g) = somme de la masse tumorale relative totale dans un groupe. L'inhibition de la charge tumorale a été calculée comme suit : % d'inhibition de la charge tumorale = (charge tumorale dans le DMBA - charge tumorale dans le groupe test) / charge tumorale dans le DMBA) × 100.

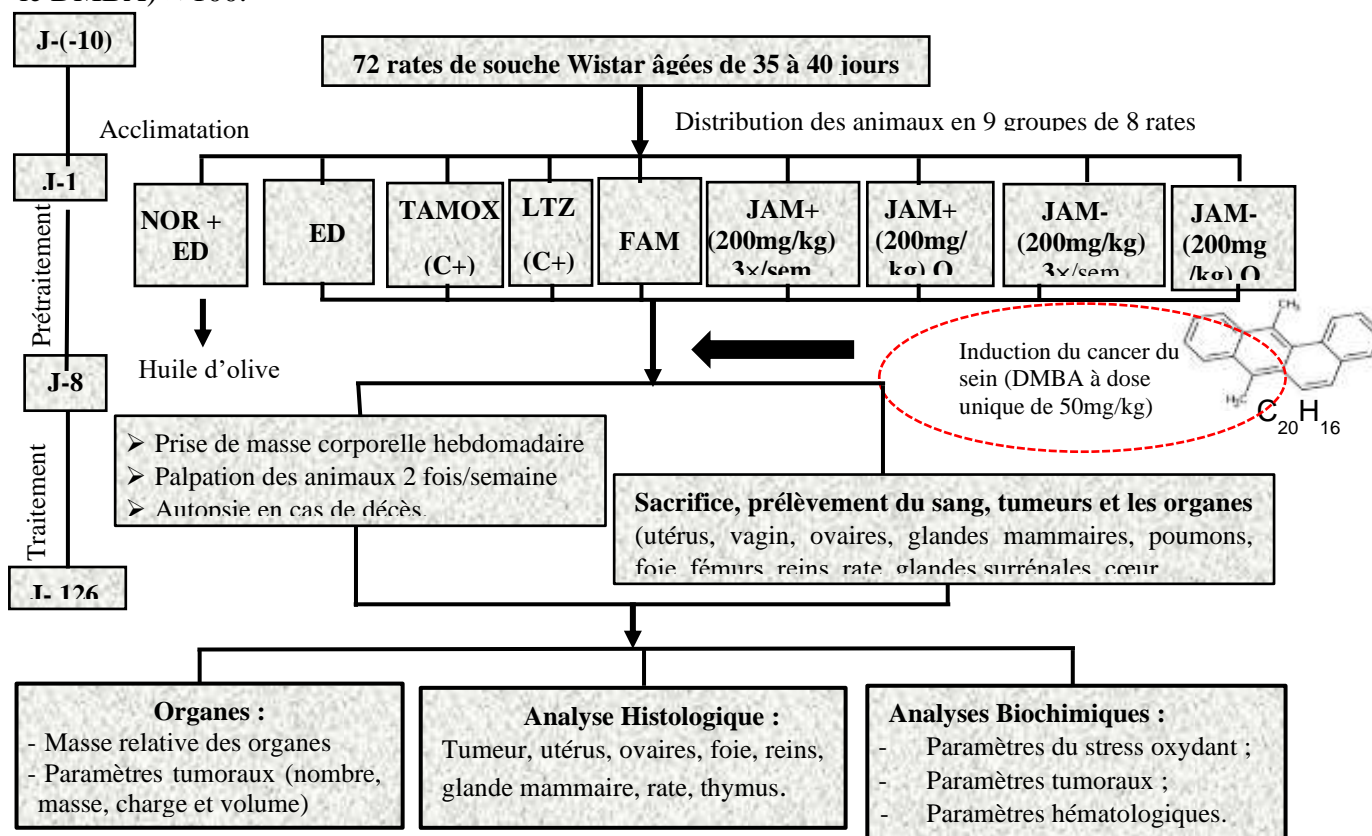


Figure 10 : Protocole expérimental d'évaluation des effets chimio-préventifs de *Annona muricata* sur le cancer du sein induit chez la rate Wistar.

Légende : AMF : *Annona muricata* Feuilles ; JAM- : jus de *Annona muricata* avec sucre réduit ; JAM+ : jus de *Annona muricata* avec sucre naturel ; NOR : Contrôle Normal ; ED : Eau distillée ; C+ : Contrôle positif.

II.2.6- Analyse histopathologique

Dans le cadre de ce travail nous nous sommes référés aux techniques d'études histologiques décrites par Cannet (2004). Elles consistent après prélèvement des organes en sept étapes suivantes : la fixation, la macroscopie ou trimming, la déshydratation, l'inclusion, la coupe, la coloration et le montage.

❖ La fixation

Elle a consisté en la mise des tissus prélevés aussitôt dans du formol à 4% pour éviter toute éventuelle dénaturation et aussi de passer par toutes les étapes de la technique histologique sans changement, ni déformation en insolubilisant les composants cellulaires. Elle augmente le potentiel tinctorial des différents constituants cellulaires.

❖ **La macroscopie ou "trimming"**

Elle intervient à la suite de la fixation et consiste au sectionnement des différents organes suivant un plan transversal et leur disposition dans des cassettes en matière plastique au préalable.

- Déshydratation

À cause de la propriété non miscible de l'eau avec la paraffine, les tissus fixés ont d'abord été débarrassés de toute trace d'eau avant de pouvoir être inclus dans ce milieu. Pour débarrasser les tissus de leur eau nous avons utilisé six bacs d'alcool, à raison de deux heures dans chaque bac : un bac d'éthanol à 70%, un bac d'éthanol à 80%, deux bacs d'éthanol à 95%, et deux bacs d'alcool absolu (éthanol à 100 %).

- L'éclaircissement

Elle consiste à remplacer la solution de déshydratation par un solvant miscible dans le milieu d'inclusion. C'est une étape dans laquelle on utilise les hydrocarbures benzéniques. Dans notre cas c'est le xylène qui a été utilisé ; pour ce faire les cassettes histologiques ont séjourné dans deux bains de xylène (2 × 2 heures) après la déshydratation.

- L'imprégnation

Pour la réalisation des coupes fines, il est nécessaire d'incorporer une substance neutre qui durcit les fragments de tissus. La substance utilisée dans ce travail était la paraffine. L'imprégnation en elle-même a consisté à remplacer l'eau des cellules et des tissus par la paraffine. Les cassettes contenant les fragments d'organes ont séjourné pendant 4 heures (2 heures × 2 bains) dans de la paraffine chaude en fusion (60°C).

- L'inclusion

Elle fournit un support externe aux tissus, ce qui permet la réalisation des coupes au microtome. Les tissus ont été placés dans des moules remplis de paraffine en fusion, qui a été solidifié sur une surface froide (-9 °C) après orientation appropriée du tissu dans le bloc.

❖ **La coupe**

Un microtome à volant de marque LEICA RM 2125 RT a été utilisé pour couper les blocs obtenus. Des rubans de coupes de 5 µm d'épaisseur obtenus ont été étalés dans un bain-marie contenant de l'eau gélatinée. Au moyen de lames porte-objets propres et étiquetées, les coupes ont été recueillies et séchées à l'étuve à 45°C pendant 24 heures.

❖ **La coloration**

Pour visualiser des constituants cellulaires et tissulaires, on utilise généralement des colorants qui peuvent se fixer de façon plus ou moins sélective sur les tissus. La technique de coloration qui a été utilisée est la technique usuelle et classique de coloration des préparations histologiques, qui est celle à l'hématoxyline-éosine, dans laquelle l'hématoxyline colore les constituants acides du noyau en bleu-violacé et l'éosine les constituants basiques du cytoplasme en rose-rouge. La procédure de coloration s'est déroulée en deux étapes :

- Déparaffinage et réhydratation

Il s'agit d'une étape au cours de laquelle les coupes ont été débarrassées de la paraffine dans des bains de xylène et réhydratées dans des bains d'alcool à des concentrations décroissantes jusqu'à de l'eau distillée. Chaque bain avait une durée de 5 min.

- Coloration

Après le déparaffinage, les lames contenant les sections d'organes ont été passées successivement dans les bains d'hématoxyline de Harris, d'eau de robinet, d'eau distillée, d'eau lithinée et d'eau acidifiée, d'alcool à 80% et 95%, d'éosine alcoolique et enfin dans l'éthanol 95%.

❖ Le montage

De fines lamelles en plastique ont été utilisées dans cette étude pour protéger les sections sur les lames porte-objets dans le but de conserver. La résine synthétique (baume de Canada) est un milieu de montage non miscible à l'eau. Pour ce faire, les coupes ont d'abord été déshydratées avant d'être montées. Cette opération s'est faite en deux étapes : la première a consisté en la déshydratation dans trois bains d'alcool absolu (3 × 5 minutes) et la deuxième en l'éclaircissement dans trois bains de xylène (3 × 5 minutes) avant d'être montées.

❖ Expression des résultats de l'histopathologie

L'analyse microscopique des sections de glandes mammaires et des tumeurs a été effectuée au moyen d'un équipement complet consistant en une camera AxiosKop 40 reliée à un ordinateur ou les images sont transférées, éditées et analysées avec des logiciels MRGrab 1.0 et AxioVision 3.1, tous fournis par ZEISS (Hallbermoos, Allemagne).

II.2.7- Analyse hématologique

Les paramètres hématologiques suivants : taux de globules blancs (lymphocytes, monocytes, granulocytes), taux de globules rouges, ont été déterminés grâce à un analyseur Humancount 30TS qui est un compteur automatique des cellules sanguines à partir de sang contenu dans un tube à EDTA (éthylène diamine tétra acétique).

II.2.8- Détermination de taux de quelques cytokines

❖ Principe

Elle consiste en la détection simultanée des différents analytes à l'aide de deux types d'anticorps monoclonaux spécifiques : des anticorps de capture pré-couplés aux différentes billes magnétiques de spectre de fluorescence codé et des anticorps de détection reliés au fluorochrome via le système biotine streptavidine. Le complexe analyte-anticorps obtenu est lu à l'aide de Lumineux MAGpix Analyser, qui comporte deux lasers : un laser spécifique aux billes magnétiques, permettant d'identifier chaque analyte au cours de la lecture et un autre laser permettant de déterminer l'intensité de la fluorescence associée à l'excitation du fluochrome. Cette intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'analyte capturé.

❖ **Mode opératoire**

Les cytokines IL-6, IL-12, TNF α , INF γ , EGF et la fractalkine ont été dosées simultanément à l'aide d'un kit de dosage multiplex ("Human Premixed Multi-Analyte kit") suivant les consignes du kit. Dans chaque puits de la microplaque à 96 puits ont été introduits 200 μ L de tampon de dosage puis scellés et mélangés à l'aide un agitateur à plaque pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, la plaque a été essorée à l'aide des serviettes absorbantes, puis 25 μ L de chaque contrôle ont été ajoutés dans les puits appropriés, et 25 μ L de tampon de dosage ont été introduits dans les puits d'échantillon dans lesquelles 25 μ L de solution matricielle et 25 μ L d'échantillon dilué au 12^{ième} ont été introduits dans les puits appropriés puis mélangés, et 25 μ L de billes mélangées ou prémélangées ont été introduits. La plaque par la suite a été incubée sur un agitateur de plaque pendant 2 h à température ambiante. Après incubation, le contenu a été retiré délicatement de la plaque, puis les puits ont été lavé 2 fois de suite grâce à la solution de tampon de dosage, après avoir été lavés, 25 μ L d'anticorps de détection ont été introduits dans chaque puits, et elle a été de nouveau recouverte avec du papier à aluminium. La plaque a été portée en incubation sur un agitateur de plaque pendant 1 h à température ambiante. Après incubation, 25 μ L de solution de streptavidine -phycoérythrine (révélateur) a été ajoutée dans les puits contenant les anticorps de détections puis scellée de nouveau et recouverte avec le papier à aluminium, et incubée de nouveau pendant 30 min sur un agitateur de plaque à température ambiante. Puis le contenu a été retiré délicatement des puits, ensuite la plaque a été lavée 2 fois avec un tampon et 125 μ L de fluide de gaine ont été introduits dans tous les puits, dans lesquels les billes en suspension ont été remis sur un agitateur de plaque pendant 5 min. l'ensemble a été lu à l'aide d'un lecteur "*Lumineux MAGpix Analyzer*" (XMAP Technologie, USA).

❖ **Expression des résultats**

La courbe des intensités médianes de fluorescence des cytokines standard obtenues en fonction de leurs concentrations a permis d'extrapoler les concentrations plasmatiques en pg/ml des différentes cytokines pour chaque échantillon.

II.2.9- Détermination du taux de protéines totales et de quelques paramètres du stress oxydatif

Les principaux paramètres du stress oxydatif et les niveaux de protéines totales ont été mesurés dans les glandes mammaires (NOR) et les tumeurs. En effet, le niveau de glutathion réduit (GSH) a été mesuré

selon la méthode de Sehirli *et al.* (2008) avec quelques modifications. Les activités de catalase et superoxyde dismutase (SOD) ont été évaluées selon les méthodes rapportées par Misra et Fridovich (1972) et Sinha (1972), respectivement. Le malondialdéhyde (MDA), qui est un biomarqueur de la peroxydation des membranes lipidiques, a été évalué selon le protocole de Wilbur *et al.* (1949). La méthode de Gonal *et al.* (1949) a permis de déterminer les niveaux de protéines totales dans les échantillons.

II.2.10- Évaluation du biomarqueur du cancer du sein CA15-3

❖ Principe

Le test CA 15-3 ELISA est basé sur le principe d'un dosage immuno-enzymatique en phase solide. Le système de dosage utilise un anticorps monoclonal dirigé contre un déterminant antigénique distinct sur la molécule CA 15-3 intacte est utilisé pour l'immobilisation en phase solide (sur les puits de microplaque). Un anticorps anti-CA 15-3 conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) se trouve dans la solution de conjugué anticorps-enzyme. L'échantillon de test est autorisé à réagir séquentiellement avec les deux anticorps, ce qui entraîne la prise en sandwich des molécules de CA 15-3 entre la phase solide et les anticorps liées à l'enzyme. La concentration de CA 15-3 est directement proportionnelle à l'intensité de la couleur de l'échantillon l'absorbance a été lue à 450 nm.

❖ Mode opératoire

Après dilution de l'échantillon (1 :21), 25 µL de l'échantillon ont été introduits dans une microplaque de 96 puits. Puis 100 µL d'anticorps de détection biotinylé ont été ajoutés dans chaque puits pendant 20 à 30 secondes. La microplaque a été ensuite portée en incubation pendant 60 min à température ambiante puis rincée trois fois avec 350 µL de tampon de lavage. Ensuite 100 µL d'une solution de streptavidine – HRP ("Horseradish peroxidase incorporated") a été ajouté dans chaque puits. La microplaque a été incubée pendant 20 min puis rincée 03 fois avec 300 µL de tampon de lavage.

❖ Expression des résultats

La concentration en CA 15-3 de chaque groupe a été extrapolée de la courbe d'étalonnage du CA 15-3 (annexe X). La concentration sérique de CA15-3 a été exprimée en UI/mL.

II.2.11- Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (ESM) et analysés à l'aide de Graphpad prism 5.0. L'ANOVA (analyse de la variance) suivie du test post-hoc de Dunnett ont été utilisés pour comparer tous les groupes au groupe témoin négatif (DMBA). Le test t de student non apparié a été utilisé pour comparer les différences entre le groupe témoin négatif (DMBA) et le groupe témoin normal (NOR). Le seuil de signification a été fixé à $p < 0,05$.



**CHAPITRE III : RESULTATS ET
DISCUSSION**

III.1- Résultats

III.1.1- Effets de *Annona muricata* sur le cancer du sein

III.1.1.1- Effets sur la survie et l'évolution pondérale des animaux

La Figure 12A montre le taux d'animaux survivants après 20 semaines d'expérimentation. Aucun décès n'a été observé dans le groupe normal (NOR), tandis que le taux de survie le plus bas a été enregistré dans le groupe DMBA (62,5%), suivi des animaux traités par JAM+ pris 3 fois par semaine et tous les jours (62,5%) et FAM (75%). Les rats traités avec JAM- ont eu la plus faible incidence de décès (80% de survie).

L'évolution pondérale des animaux au cours des 20 semaines d'expérimentation est représenté par la Figure 12B. Aucune différence significative n'a été observée d'une part entre les animaux du groupe DMBA en comparaison à ceux du groupe normal, et d'autre part, entre les animaux des groupes traités aux extraits de *A. muricata* et ceux du groupe DMBA.

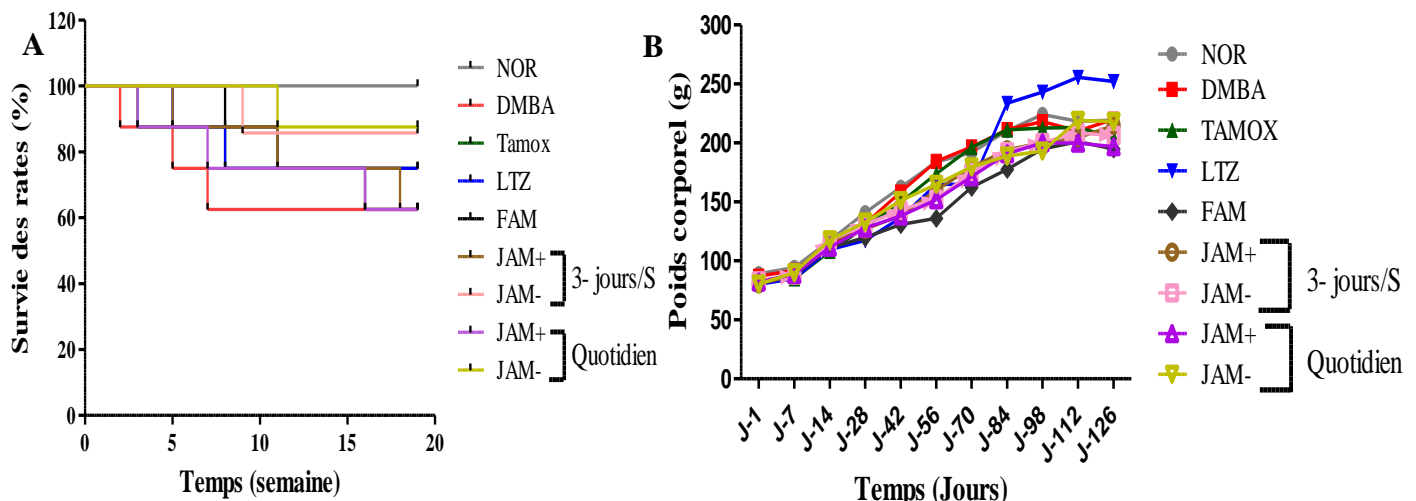


Figure 11 : Courbe de Kaplan Meir présentant le taux de survie (A) et évolution de la masse corporelle (B) après 20 semaines de traitement.

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées au tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique de feuilles de *A. muricata* à 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus de *A. muricata* naturel (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour).

III.1.2.2- Effet de *A. muricata* sur la masse relative des organes et sur quelques paramètres hématologiques

Le Tableau V montre que le DMBA a induit une augmentation significative de la masse du foie ($p < 0,01$) et de la rate ($p < 0,05$) et une diminution significative de la masse du thymus ($p < 0,001$) et du fémur ($p < 0,05$), alors qu'il n'a pas modifié la masse des reins. Tous les groupes traités ont prévenu

de manière significative ($p < 0,001$) la réduction de la masse du thymus à l'exception du JAM+ pris 3 jours/semaine (non significatif) et de FAM qui l'a plutôt diminué (de $768 \pm 40,3$ mg/kg dans le DMBA à $439,24 \pm 27$ mg/kg).

La masse des reins a diminué ($p < 0,01$) suite au traitement avec le LTZ de $5780,8 \pm 322,3$ mg/kg dans le groupe DMBA à $4851,5 \pm 103,1$ et JAM- pris quotidiennement de $5780,8 \pm 322,3$ mg/kg dans le groupe DMBA à $4926,08 \pm 105,8$ ($p < 0,01$). Tous les animaux traités ont empêché de manière significative ($p < 0,001$) l'augmentation de la masse de la rate par comparaison aux rates du groupe DMBA.

L'analyse hématologique montre que le nombre de globules blancs a augmenté ($p < 0,01$) dans le groupe DMBA par rapport au groupe normal (de $12,45 \pm 0,54 \times 10^3/\mu\text{l}$ chez les rates normales à $15,42 \pm 0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ dans le groupe DMBA). La sous-population hématologique la plus affectée était celle des granulocytes qui a également augmenté de manière significative ($p < 0,01$) de $18,4 \pm 1,51\%$ chez les rates normales à $27,62 \pm 1,34\%$ dans le groupe DMBA. Tous les traitements ont protégé de manière significative ($p < 0,001$) contre l'augmentation du nombre de granulocytes. Dans le même sens, tous les traitements ont augmenté le pourcentage de lymphocytes bien que non significatif avec les groupes FAM et JAM+ (aux deux extraits). Le traitement par le DMBA a réduit de manière significative ($p < 0,05$) le nombre de globules rouges (de $8 \pm 0,46 \times 10^3/\mu\text{l}$ chez les rates normales à $5,58 \pm 0,76 \times 10^3/\mu\text{l}$ chez le DMBA). Les standards (tamoxifène et létrozole) ont empêché ($p < 0,05$) cette diminution. S'agissant de *A. muricata*, seuls JAM+ pris quotidiennement (de $5,58 \pm 0,76 \times 10^3/\mu\text{l}$ chez les rates du groupe DMBA à $7,1 \pm 0,4 \times 10^3/\mu\text{l}$) et JAM- pris 3 fois par semaine (de $5,58 \pm 0,76 \times 10^3/\mu\text{l}$ chez les rates du groupe DMBA à $7,05 \pm 0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$) ont présenté des effets similaires.

Tableau II : Effet de *A. muricata* sur la masse relative de certains organes et sur les paramètres hématologiques.

Organes (mg/kg)	3-Jours/S						Quotidiennement		
	NOR	DMBA	TAMOX	LTZ	FAM	JAM+	JAM-	JAM+	JAM-
Thymus	1396,7± 40,3	768 ± 40,3 ^z	1423,7 ± 20,9 ^c	976,4 ± 43,2 ^b	439,3 ± 27,1 ^c	826,5 ± 54,3	1332,2± 36,2 ^c	1116,1 ± 35,1 ^c	1143,1 ± 32,1 ^c
Foie	30381 ± 624,7	35214,6 ± 1331,6 ^y	30922,6 ± 235,4 ^a	29049,9 ± 488,3 ^c	30794,4 ± 908,1 ^b	33716,5 ± 1684,2	32127,2 ± 715,2	30970,6 ± 396,6 ^a	29203,2 ± 560,5 ^c
Reins	5618 ± 113,6	5780,8 ± 322,3	5902,1 ± 83,6	4851,5 ± 103,1 ^b	5767 ± 136,3	5888,7 ± 115,6	5588,1 ± 72,4	5506,3 ± 80,9	4926,1 ± 105,8 ^b
Fémur	2569,7 ± 84,7	2257 ± 106 ^x	3044,2 ± 41,1 ^c	2647,83 ± 91,1 ^a	3217,7 ± 92,5 ^c	2960,1 ± 47,2	2571,3 ± 94,1	2673,1 ± 75,4 ^b	2868,6 ± 106 ^c
Rate	6000 ± 85,5	7127,4 ± 710,6 ^x	4335,3 ± 44,5 ^c	3055,7 ± 19,9 ^c	3413,2 ± 69,1 ^c	4263,6 ± 180,1 ^c	4568,9 ± 251,1 ^c	4148,1 ± 120,8 ^c	3948,1 ± 109,1 ^c
Hématologie									
Globules blancs (×10 ³ /μL)	12,5 ± 0,54	15,42 ± 0,51 ^y	12,8 ± 0,7	6,9 ± 0,6	9,9 ± 1	351,2 ± 128,1 ^c	10,4 ± 0,9	6 ± 1,1	6,5 ± 0,7
Lymphocytes (%)	69,8 ± 5	66 ± 0,4	79,7 ± 2,5 ^a	83,6 ± 1,2 ^b	73,7 ± 3,9	79,6 ± 3,4	79,7 ± 5,1 ^a	70,2 ± 3,3	81,9 ± 5,2 ^a
Monocytes (%)	5,2 ± 0,5	6,32 ± 0,9	4,6 ± 0,9	3,8 ± 0,7	13,3 ± 4,2	24,4 ± 2,4 ^c	4,3 ± 1,02	15,6 ± 0,6 ^b	3,8 ± 1,4
Granulocytes (%)	18,4 ± 1,5	27,62 ± 1,34 ^y	16,8 ± 1,4 ^c	13,2 ± 0,7 ^c	9,9 ± 1,3	11,2 ± 1,2 ^c	10,8 ± 1,3 ^c	19,5 ± 0,4 ^c	6,8 ± 0,4 ^c
Globules rouges (×10 ³ /μL)	8 ± 0,5	5,58 ± 0,76 ^x	7,8 ± 0,4 ^a	7,5 ± 0,8 ^a	6,6 ± 0,4	6,2 ± 0,2	7,05 ± 0,5 ^a	7,1 ± 0,4 ^a	6,2 ± 0,4

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées avec du tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique de feuilles de *A. muricata* à 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus naturellement sucré de *A. muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour). Significativité par rapport au groupe NOR : ^x*p* < 0,05, ^y*p* < 0,01, ^z*p* < 0,001. Significativité par rapport au groupe DMBA : ^a*p* < 0,05, ^b*p* < 0,01, ^c*p* < 0,001.

III.1.2.3- Effets de *Annona muricata* sur l'incidence, la charge et la masse relative des tumeurs

Le tableau III présente les effets de *A. muricata* sur l'incidence des tumeurs, la masse, le volume des tumeurs, la charge tumorale et le pourcentage d'inhibition de la charge tumorale. Aucune tumeur n'a été enregistrée dans le groupe normal, alors que 100 % des rates du groupe DMBA ont développé des tumeurs mammaires. S'agissant de *A. muricata*, FAM et JAM- pris 3 jours/semaine ont réduit l'incidence de la tumeur à 25%, tandis que JAM+ pris 3 jours/semaine et JAM- pris quotidiennement ont réduit l'incidence de la tumeur à 37,5%. De plus, le jus de *A. muricata* (JAM+) pris quotidiennement a réduit l'incidence des tumeurs à 62,5%. Les traitements au tamoxifène et au létrozole ont réduit l'incidence des tumeurs respectivement de 12,5% et 37,5% par rapport au groupe DMBA.

Une diminution significative ($p < 0,001$) de la masse relative des tumeurs a été observée chez les rates traitées avec les standards [de $13,4 \pm 1,8$ mg/kg chez le DMBA à $3,07 \pm 0,02$ mg/kg chez le tamoxifène et $0,32 \pm 0,03$ mg/kg chez le létrozole]. La masse tumorale est passée de $13,4 \pm 1,8$ mg/kg chez le DMBA à $6,9 \pm 1,4$ mg/kg. En effet, le JAM- pris 3 jours/semaine ($0,31 \pm 0,03$ mg/kg) ou quotidiennement ($0,62 \pm 0,01$ mg/kg) était plus puissant que le JAM+ pris 3 jours/semaine ($2,2 \pm 0,04$ mg/kg) ou quotidiennement ($1,3 \pm 0,6$ mg/kg).

Le pourcentage d'inhibition de la charge tumorale le plus élevé a été observé dans le groupe traité au létrozole (96,2 %) et à le JAM- pris 3 jours/semaine (98,6%), suivi par les jus de *A. muricata* avec (JAM+ = 89,6%) ou sans (JAM- = 89,9%) sucres pris quotidiennement.

Tableau III : Activité chimio-préventive de l'extrait du jus de *A. muricata* après 20 semaines de traitement.

	Nbre de rats avec tumeur	Incidence des tumeurs (%)	Masse tumorale (mg/kg)	Charge tumorale (g)	Inhibition de la charge tumorale (%)
NOR	0/8	0	-	-	-
DMBA	8/8	100	$13,4 \pm 1,8$	972,9	-
Tamox	1/8	12,5	$3,07 \pm 0,02^c$	295,2	69,7
LTZ	3/8	37,5	$0,32 \pm 0,03^c$	37,2	96,2
FAM	2/8	25	$6,9 \pm 1,4^c$	257,7	73,5
3- jours/S					
JAM+	3/8	37,5	$2,2 \pm 0,04^c$	397,9	59,1
JAM-	2/8	25	$0,31 \pm 0,03^c$	13,5	98,6
Quotidiennement					
JAM+	5/8	62,5	$1,3 \pm 0,6^c$	100,8	89,6
JAM-	3/8	37,5	$0,62 \pm 0,01^c$	98,4	89,9

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées au tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique de feuilles de *A. muricata* à 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus de *A. muricata* naturel (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour). Significativité par rapport au groupe DMBA : $^c p < 0,001$.

III.1.2.4- Effets de *Annona muricata* sur la morphologie des tumeurs et sur le taux de CA15-3

La Figure 13A montre que les rates exposées au DMBA uniquement ont présenté des tumeurs mammaires les plus volumineuses comparé à celles des autres groupes. Les traitements par le tamoxifène et letrozole ont réduit de manière significative ($p < 0,001$) le volume tumoral (de $7,91 \pm 0,73 \text{ cm}^3$ dans le groupe DMBA à $0,45 \pm 0,01 \text{ cm}^3$ chez le groupe Tamox et $0,20 \pm 0,01 \text{ cm}^3$ chez le groupe LTZ) ainsi que le niveau de CA 15-3 (de $4,18 \pm 0,76 \text{ U/mL}$ dans le groupe DMBA à $1,86 \pm 0,38 \text{ U/mL}$ dans le groupe Tamox et $1,39 \pm 0,39 \text{ U/mL}$ dans le groupe LTZ) comparé au groupe DMBA. Les feuilles et les jus du fruit de *A. muricata* à toutes les fréquences (3 jours/semaine ou quotidiennement) ont également réduit de manière significative ($p < 0,001$) le volume tumoral (de $7,9 \pm 0,73 \text{ cm}^3$ dans le groupe DMBA à $1,13 \pm 0,11 \text{ cm}^3$ avec JAM+ et $0,15 \pm 0,01 \text{ cm}^3$ avec JAM-) et le niveau de CA 15-3 (de $4,18 \pm 0,76 \text{ U/mL}$ dans DMBA à $1,86 \pm 0,31 \text{ U/mL}$ dans le groupe JAM+ et $1,47 \pm 0,51 \text{ U/mL}$ dans le groupe JAM-) comparé au groupe DMBA. Cet effet était toutefois plus prononcé avec JAM-

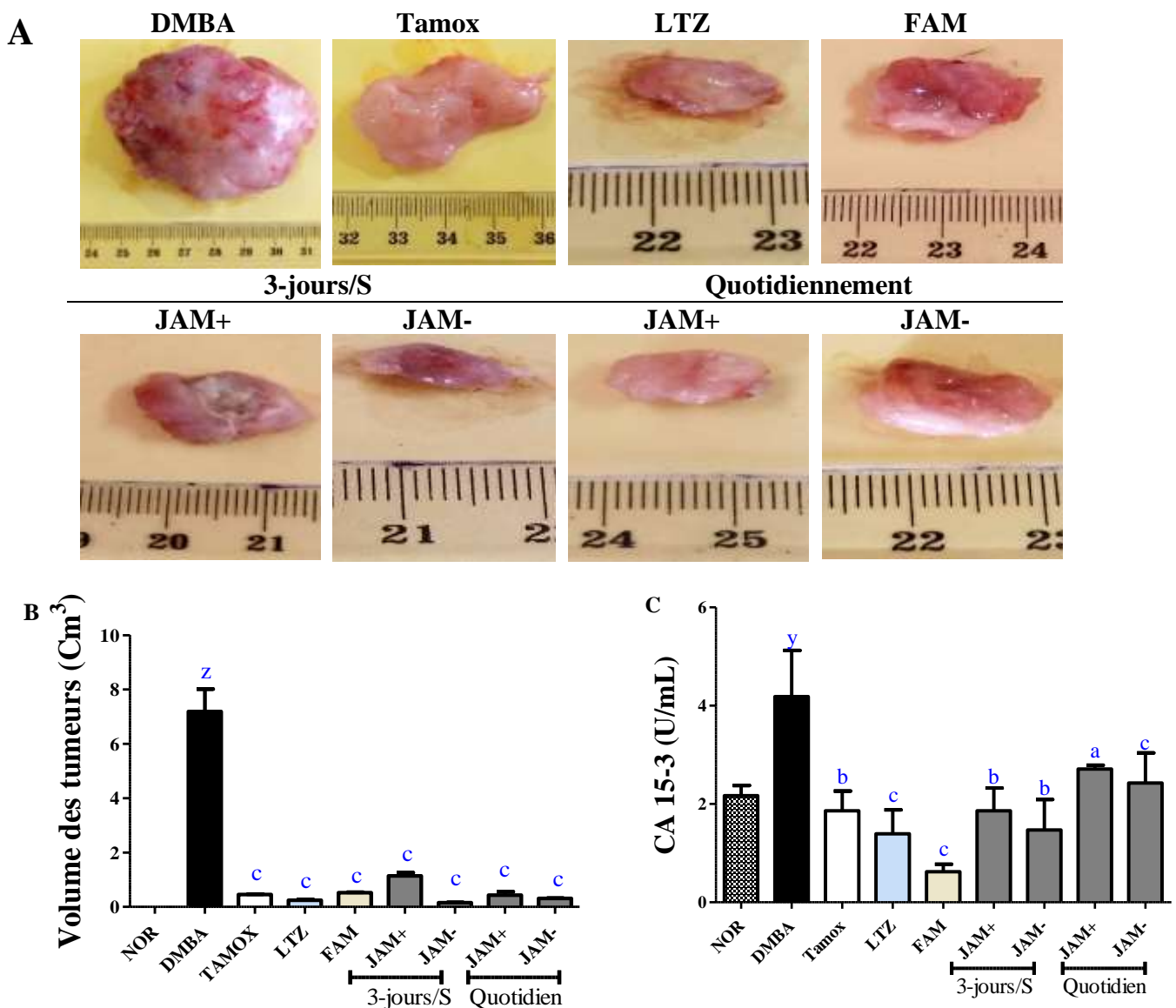


Figure 12 : Effets de l'extrait des feuilles et de jus de *A. muricata* sur la morphologie (A), le volume tumoral (B) et le taux de CA15-3 (C).

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées avec du tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique de feuilles de *A. muricata* à la dose de 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus naturel de *A. muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à la dose de 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour). Significativité par rapport au groupe DMBA : ^a*p* < 0,05 ; ^b*p* < 0,01 et ^c*p* < 0,001. Significativité par rapport au groupe NOR : ^z*p* < 0,001 ; ^y*p* < 0,01 par rapport au groupe NOR (n = 8).

III.1.2.5- Histopathologie des tumeurs mammaires

Les microphotographies (Figure 14) des glandes mammaires des rates du groupe normal (NOR) montrent un parenchyme mammaire normal avec des acini présentant des cellules mononucléaires entourées d'adipocytes. Les sections des tumeurs mammaires provenant du groupe DMBA ont montré un carcinome canalaire cribriforme de haut grade Scarff-Bloom-Richardson (SBR III) avec une faible infiltration lymphocytaire (< 5%) et environ 30% de comédonécrose (Tableau IV). Les tumeurs mammaires des rates traitées par le tamoxifène et le létrozole étaient principalement de type fibrosarcome et de bas grade (SBR I) sans infiltration lymphocytaire et avec 20 % de comédonécrose (observée uniquement chez les rates traitées par le létrozole). Les rates traitées avec l'extrait éthanolique des feuilles de *A. muricata* (FAM) présentaient un carcinome canalaire cribriforme de grade SBR II, avec 30% d'infiltration lymphocytaire, tandis que celles traitées avec les jus de *A. muricata* présentaient principalement des carcinomes canaux cribriformes de bas grade [SBR I pour JAM- (aux deux fréquences d'administration) et de grade moyen (SBR II pour JAM+)]. Il est intéressant de mentionner que seules les rates recevant les jus de *A. muricata* de façon intermittente présentent une infiltration lymphocytaire (20%).

Tableau IV : Implication des différents traitements sur la typologie histologique des tumeurs.

	Type histologique	Grade SBR	Infiltration lymphocytaire (%)	Nécroses & comedo-nécroses	
DMBA	CCC	III	< 5%	30%	
Tamox	Fibrosarcome	I	0%	0%	
LTZ	Fibrosarcome	I	0%	< 5%	
AMF	CCC	II	30%	20%	
3-jours/S	AMJ+	CCC	20%	20%	
	AMJ-	CCC	I	20%	15%
Quotidiennement	AMJ+	Fibrosarcome	II	0%	0%
	AMJ-	CA & fibrosarcome	I	0%	20%

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées avec du tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique de feuilles de *A. muricata* à 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus naturellement sucré de *A. muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour).

Légende : CCC = Carcinome Canalaire Cribiforme ; CA = Carcinome Anaplasique.

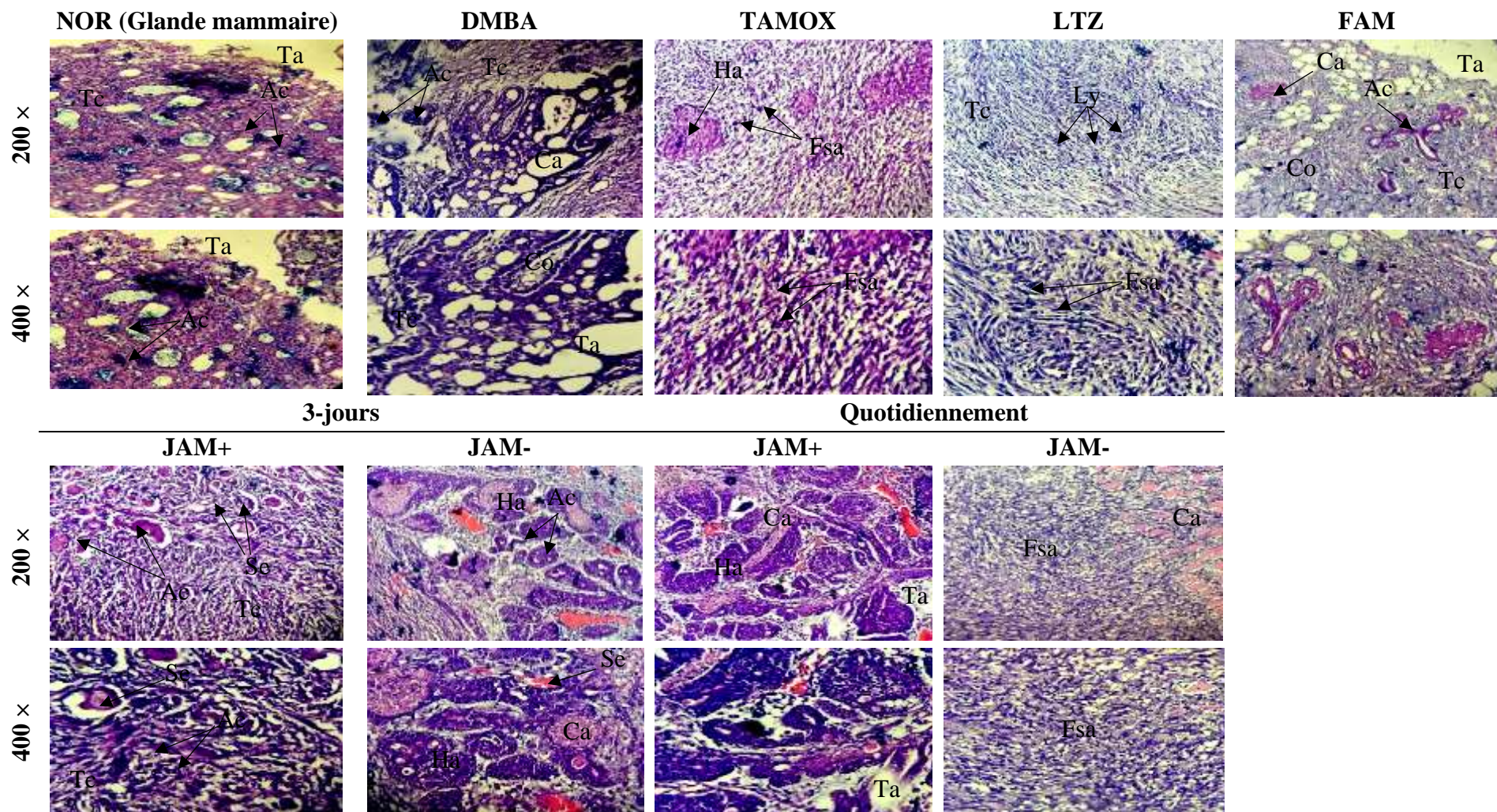


Figure 13 : Histopathologie des glandes mammaires et des tumeurs mammaires.

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées avec du tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique de feuilles de *A. muricata* à 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus naturellement sucré de *A. muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour). Ac = Acinus ; Ta = Tissu adipeux ; Tc = Tissu conjonctif ; Ca = Carcinome ; Ly = Lymphocyte ; Ha = Hyperplasie atypique ; Fsa = Fibrosarcome ; Se = Sécrétion éosinophile ; Co = Codemo-nécrose .

III.1.2.5- Effets de *A. muricata* sur quelques cytokines pros et antiinflammatoires

La Figure 15 présente les effets des différents traitements sur les taux sériques de quelques cytokines après 20 semaines d'expérimentation. Le DMBA a induit une augmentation significative des taux de TNF- α ($p < 0,001$), IL-6 ($p < 0,001$), IL-12 ($p < 0,001$) et EGF ($p < 0,05$), mais n'a pas significativement modifié les taux de IFN- γ et de fractalkine comparé au groupe témoin normal. Les traitements au tamoxifène et au létrozole ont significativement ($p < 0,001$) réduit les taux sériques de TNF- α , IL-6, IL-12 ($p < 0,01$) avec LTZ et EGF, alors qu'ils ont augmenté significativement les taux d'IFN- γ par rapport au groupe DMBA. Tous les groupes traités avec l'extrait éthanolique des feuilles de *A. muricata* ainsi qu'avec les jus de fruits de *A. muricata* ont significativement ($p < 0,001$ à l'exception de JAM+ pris 3 jours/semaine, $p < 0,05$) diminué les taux sériques de TNF- α et de l'EGF (sauf JAM-) comparé au groupe DMBA. Aucun changement significatif n'a été observé sur le taux de fractalkine. Seuls les jus de *A. muricata* moins sucré (JAM-) pris 3 jours/semaine ont significativement ($p < 0,001$) augmenté le taux sérique d'IFN- γ tout comme les témoins positifs. L'extrait éthanolique des feuilles et les jus de *A. muricata* ont significativement ($p < 0,001$) diminué les taux d'IL-6 et d'IL-12 comparé au groupe DMBA.

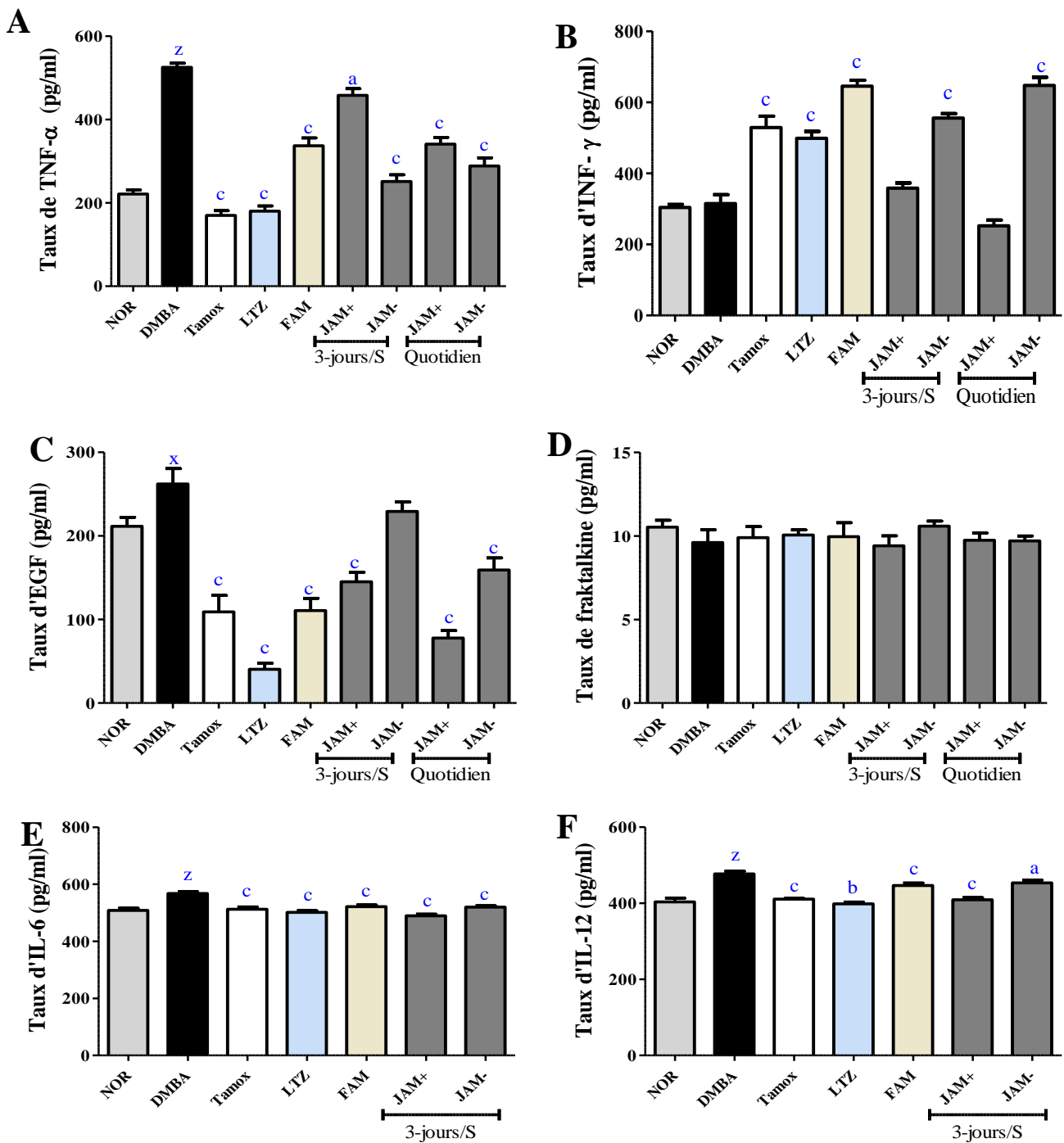


Figure 14 : Effets de l'extrait des feuilles et des jus de *A. muricata* sur certains niveaux de cytokines.

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées avec du tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique de feuilles de *A. muricata* à 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus naturel de *A. muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour). Significativité par rapport au groupe DMBA : ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ et ^c $p < 0,001$. Significativité par rapport au groupe NOR : ^z $p < 0,001$ par rapport au groupe NOR (n = 8).

III.1.2.7- Effet de *A. muricata* sur certains paramètres du stress oxydatif, sur l'activité de l'ALT et sur le taux de créatinine

Le Tableau VI présente les effets de *A. muricata* sur certains marqueurs du stress oxydatif après 20 semaines d'expérimentation. Une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de protéines totales a été observée dans le groupe DMBA comparé au groupe normal. Les groupes témoins positifs (Tamox et LTZ) ainsi que l'extrait éthanolique des feuilles et les jus de fruit de *A. muricata* ont prévenu de manière significative l'augmentation du taux de protéines totales induite par le DMBA, avec un effet optimal avec JAM+ (de $0,9 \pm 0,01$ chez le DMBA à $0,1 \pm 0,00$ g/l) et JAM- (de $0,9 \pm 0,01$ chez le DMBA à $0,4 \pm 0,03$ g/l) pris 3 jours/semaine.

Concernant l'activité de la catalase, une augmentation non significative a été observée chez les rats du groupe DMBA par rapport aux rates du groupe normal. Le LTZ et toutes les rates traitées avec l'extrait éthanolique des feuilles ainsi que les jus de fruits de *A. muricata* ont présenté une augmentation significative (au moins $p < 0,05$) de l'activité de la catalase comparé à celles du groupe DMBA.

En ce qui concerne l'activité de la SOD, elle a diminué significativement chez les rates du groupe DMBA par rapport aux rates du groupe normal. Tous les traitements, à l'exception du JAM+ pris 3 jours/semaine, ont augmenté significativement ($p < 0,05$) l'activité de la SOD.

Les rates du groupe DMBA ont présenté un taux de GSH inférieur ($p < 0,01$) par rapport aux rates du groupe normal. Tous les traitements ont augmenté les taux de GSH, bien que cela ne soit significatif qu'avec JAM- aux deux fréquences ($p < 0,05$ quotidiennement et $p < 0,01$ 3 jours/semaine).

Le taux de MDA a augmenté significativement ($p < 0,01$) chez les rates du groupe DMBA comparé aux rates du groupe NOR. Seuls les groupes Tamox ($p < 0,05$), LTZ ($p < 0,01$), JAM+ pris quotidiennement et JAM- pris 3 jours/semaine ont empêché de manière significative la peroxydation de la membrane lipidique induite par le DMBA. FAM et les autres groupes traités avec les jus de *A. muricata* ont présenté une diminution non significative de ce paramètre.

Les rates du groupe DMBA ont montré une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'activité de l'ALT (de $230,6 \pm 35,6$ chez les rates normales à $362,3 \pm 11,6$ chez les rates DMBA) et du taux de créatinine (de $0,33 \pm 0,01$ chez les rates normales à $0,75 \pm 0,2$ chez les rates DMBA) par rapport aux rates normales. Tous les traitements ont diminué l'activité de l'ALT et le taux sérique de créatinine.

Tableau V : Effets de *A. muricata* sur certains paramètres du stress oxydatif, l'activité de l'alanine transaminase (ALT) et des taux de créatinine.

	NOR	DMBA	Tamox	LTZ	FAM	3-jours/S		Quotidiennement	
						JAM+	JAM-	JAM+	JAM-
Protéines (g/l)	0,3 ± 0,01	0,9 ± 0,01 ^x	0,7 ± 0,02	0,6 ± 0,03 ^a	0,1 ± 0,02 ^c	0,1 ± 0,003	0,4 ± 0,03 ^b	0,6 ± 0,01	0,8 ± 0,01
Catalase (mM de H ₂ O ₂ /min/mg de protéines)	2,36 ± 0,4	4,6 ± 0,25	3,7 ± 0,7	7,3 ± 0,9 ^a	8,3 ± 1,5 ^a	8,7 ± 0,62 ^a	8,05 ± 1 ^a	9,8 ± 0,36 ^b	13,5 ± 1,2 ^c
MDA (mM/mg de protéines)	9,3 ± 0,9	16,2 ± 1,04 ^y	13,1 ± 1,02 ^a	11,3 ± 4,34 ^b	14,3 ± 4,2	15,75 ± 5,03	10,5 ± 2,32 ^b	10,5 ± 6,8 ^a	11,4 ± 2,42
GSH (mM/mg de protéines)	25,3 ± 2,8	11,3 ± 1,6 ^y	25,8 ± 2,4	14,6 ± 0,1	12,1 ± 1,5	12,1 ± 2,2	15,1 ± 2,86	16,4 ± 1,2	20,5 ± 4,5 ^a
SOD (unité/mg de protéines)	1,3 ± 0,2	0,61 ± 0,3	1,71 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,4 ^a	1,3 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,01	1,1 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,4 ^a
ALAT (U/I)	230,6 ± 35,6	362,3 ± 11,6 ^y	259 ± 36,9 ^a	282,3 ± 45,4 ^a	259 ± 25,8 ^a	165,6 ± 9,9 ^c	157,2 ± 24,3 ^c	113,2 ± 22,4 ^c	182 ± 22,7 ^b
Créatinine (g/l)	0,33 ± 0,1	0,75 ± 0,2 ^y	0,6 ± 0,1	0,45 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,06	0,58 ± 0,02	0,40 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,02 ^a	0,38 ± 0,03 ^a

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées avec du tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique de feuilles de *A. muricata* à 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus naturellement sucré de *A. muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour). Significativité par rapport au groupe NOR : ^x*p* < 0,05, ^y*p* < 0,01. Significativité par rapport au groupe DMBA : ^a*p* < 0,05, ^b*p* < 0,01, ^c*p* < 0,001.

III.1.2.8- Effets de *A. muricata* sur l'histo-architecture de quelques organes d'intérêt en toxicité

La Figure 16 montre les effets des différents traitements sur les microarchitectures des reins, de la rate, du foie, des poumons et du thymus. Les rates du groupe normal présentent des reins avec un espace urinaire et un glomérule bien différencié ; leur foie a un parenchyme normal avec des hépatocytes mononucléaires. L'histo-architecture du poumon est normale avec des sacs alvéolaires normaux, tandis que la rate présente des pulpes blanche et rouge bien différenciées dans un parenchyme normal. Les microphotographies des animaux exposés au DMBA présentent une infiltration leucocytaire dans le foie, les poumons et les reins et une désorganisation de la pulpe blanche de la rate. Le DMBA a également induit une diminution de la densité des lymphocytes corticaux et un épaississement du septum interlobulaire dans le thymus par rapport au groupe témoin normal. Les traitements par le tamoxifène, le létrozole et les extraits de *A. muricata* ont empêché la diminution de la densité des lymphocytes corticaux dans le thymus, l'infiltration leucocytaire dans les reins, le foie et les poumons ainsi que la désorganisation de la pulpe blanche de la rate.

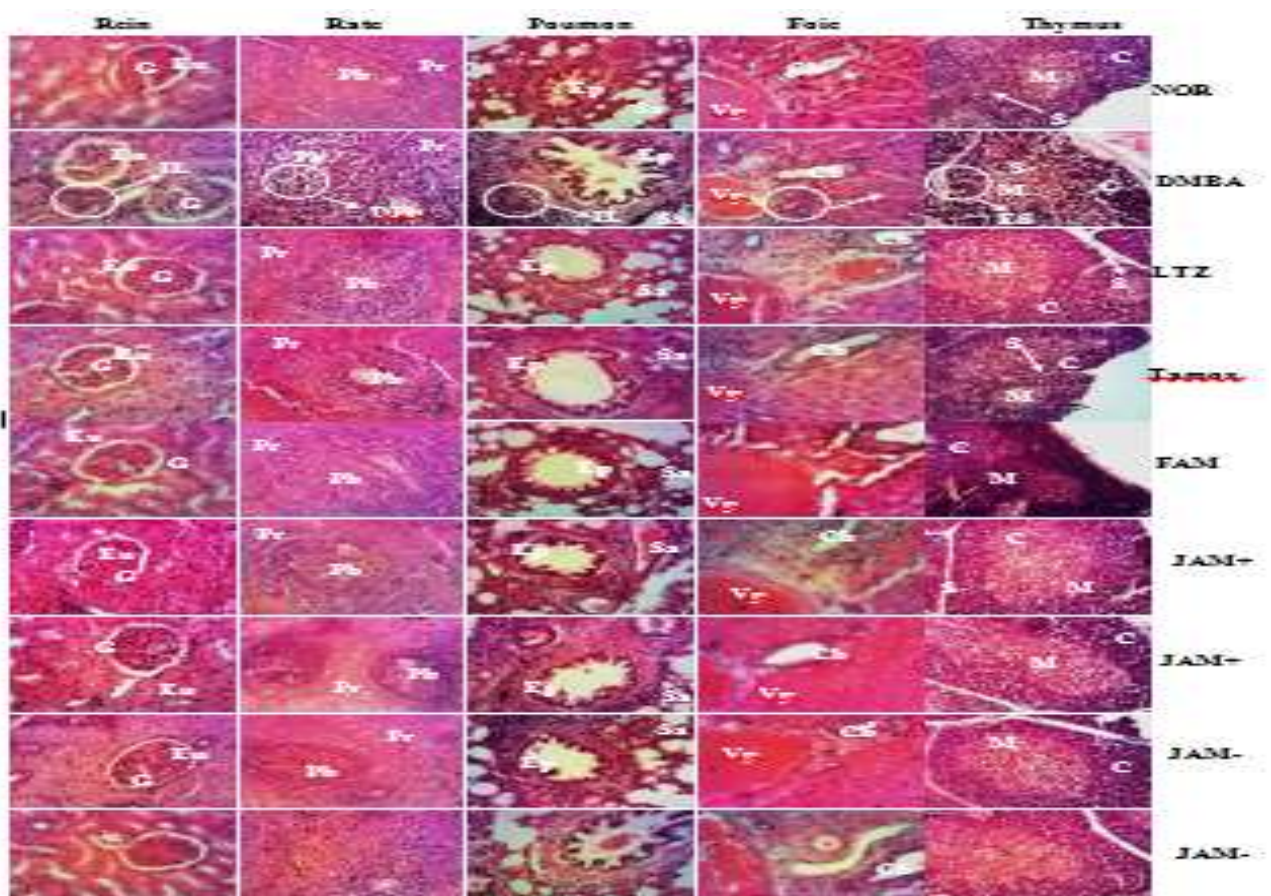


Figure 15 : Effets de l'extrait de feuilles et des jus de *A. muricata* sur la microarchitecture des reins ($\times 200$), de la rate ($\times 100$), des poumons ($\times 100$), du foie ($\times 200$) et du thymus ($\times 400$) après une coloration H&E.

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont reçu de l'eau distillée (véhicule) ; Tamox = rates servant de témoin positif 1, traitées avec du tamoxifène à 3,3 mg/kg PC ; LTZ = rates servant de témoin positif 2, traitées avec du létrozole à 1 mg/kg PC ; FAM = rates traitées avec l'extrait éthanolique des feuilles de *A. muricata* à 200 mg/kg PC. JAM = rates traitées avec du jus naturellement sucré de *A. muricata* (JAM+) ou moins sucré (JAM-) à 200 mg/kg PC à 2 fréquences différentes (3 fois/semaine et chaque jour). Eu = espace urinaire, G = glomérule, IL = infiltration leucocytaire, PB = pulpe blanche, Pr = pulpe rouge, DPb = désorganisation de la pulpe blanche, Ep = épithélium pulmonaire, Sa = sac alvéolaire, Vp = veine porte, Cb = canal biliaire, Cm = couche médullaire, Si = septum interlobulaire, C = cortex, ESI = épaississement du septum interlobulaire.

III.2- Discussion

Le cancer du sein est le type de cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde entier, y compris au Cameroun (Sung *et al.*, 2021). Des traitements sont disponibles, mais ils présentent de nombreux inconvénients et leur coût élevé limite leur utilisation, en particulier dans les pays en développement, où la mortalité est élevée en raison de plusieurs autres problèmes tels que l'insuffisance des infrastructures sanitaires et les itinéraires thérapeutiques tortueux des patients (Geretto *et al.*, 2017, Zingue *et al.*, 2021). De nombreux patients dans ces régions se tournent vers la médecine traditionnelle, qui est accessible et présente peu ou pas d'effets secondaires. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 80% des populations d'Afrique et de certains pays d'Asie utilisent encore des préparations à base de plantes médicinales pour traiter leurs maladies, y compris le cancer (OMS, 2018). Ainsi, la recherche de substances naturelles antitumorales est un besoin courant et l'une des principales stratégies qui consiste à étudier les substances naturelles locales sur la base de leurs utilisations traditionnelles (Mbaveng *et al.*, 2017). Dans cette optique, le présent travail a été réalisé pour mieux comprendre le potentiel anticancéreux de *A. muricata*.

L'hydrocarbure aromatique polycyclique DMBA est la substance la plus utilisée pour induire le cancer du sein chez les rates en transition hormonale (~60 jours), lorsque leurs canaux mammaires terminaux subissent une prolifération active sous l'action des œstrogènes endogènes (Ariazi *et al.*, 2005). En accord avec ce qui précède, 100% des rates exposées au DMBA uniquement, ont développé des tumeurs mammaires dans cette étude. Il convient de noter que le cancer du sein induit par le DMBA chez les rates est un modèle plébiscité de cancer œstrogéno-dépendant qui se développe à partir des cellules épithéliales canalaire et ressemble fortement au cancer retrouvé chez les femmes sur les plans biochimique, immunologique et histologique (Russo et Russo, 2000). L'histopathologie a montré que le DMBA a induit un carcinome canalaire cribiforme de grade Scarff-Bloom-Richardson (SBR III) avec une faible infiltration lymphocytaire. Le taux du biomarqueur CA 15-3 a également augmenté de manière significative dans le sérum des rats du groupe DMBA. Le CA 15-3 et le grade SBR sont tous deux des facteurs pronostiques importants dans le cancer du sein, qui sont généralement associés à un taux de prolifération cellulaire élevé (Duffy *et al.*, 2010) ; ce qui justifie également que ce modèle animal soit grandement sollicité, et que le cancer du sein le plus fréquemment rencontré chez la femme est de type carcinome canalaire (70%). De plus, le grade élevé observé dans ce modèle animal est en droite ligne avec les observations faites sur la population des femmes camerounaises qui arrivent tard à l'hôpital avec des tumeurs à des stades avancés à cause de nombreux itinéraires thérapeutiques. Dans ce modèle de cancer, l'initiateur (DMBA) induit des changements irréversibles dans les gènes cellulaires et les œstrogènes endogènes promeuvent la

prolifération des cellules initiées conduisant à une croissance anormale et à d'autres mutations qui peuvent progresser dans d'autres tissus (Hanahan et Weinberg, 2011).

Dans cette étude, les extraits de *A. muricata* (feuilles et jus) ainsi que les substances de référence (tamoxifène et létrozole) ont réduit significativement l'incidence des décès, l'incidence des tumeurs, le volume et la masse relative des tumeurs, les taux de protéines totales dans les tumeurs et les taux de CA 15-3 comparés au groupe DMBA. Ces résultats suggèrent un effet protecteur des substances testées sur la cancérogenèse mammaire. Le cancer s'accompagne généralement d'une augmentation des taux de protéines cellulaires, comme observée dans cette étude. En effet, la protéine Mucin-1 est une protéine transmembranaire présente à la surface des membranes plasmiques des cellules épithéliales d'un organisme, utilisée comme biomarqueur du cancer. Elle est surexprimée dans le cancer du sein ce qui lui confère une valeur pronostique (Rahn *et al.*, 2001). L'augmentation de l'expression de la protéine Mucin-1 dans cette étude est en accord avec la croissance de la tumeur, les traitements quant à eux l'ont diminué. Le modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (tamoxifène) et l'inhibiteur de l'aromatase (létrozole), utilisés comme substances de référence dans cette étude ont significativement inversé la cancérogenèse car ils sont connus pour empêcher la multiplication des cellules cancéreuses en inhibant la synthèse des œstrogènes ou en entrant en compétition avec les œstrogènes endogènes pour la fixation sur leurs récepteurs dans les glandes mammaires (American Cancer Society, 2016). Ces effets seraient en accord avec de nombreuses études, qui ont montré l'effet protecteur du tamoxifène et du létrozole dans le cancer du sein induit par le DMBA chez la rate (Bishayee *et al.*, 2016 ; Mefegue *et al.*, 2021).

De nombreuses études ont rapporté le potentiel inhibiteur de *A. muricata* sur le cancer du sein induit chez les rates. Dans une étude, il a été démontré que les feuilles de *A. muricata* sont capables d'inhiber le cancer du sein canalaire invasif de grade SBR III développé dans le groupe DMBA, d'améliorer les changements histologiques et de réduire les indices de prolifération à la dose de 300 mg/kg (Sulistyoningrum *et al.*, 2017). Dans une autre étude, les frottis d'ADN obtenus à partir de l'électrophorèse en gel d'agarose ont montré que l'extrait des feuilles de *A. muricata* préviendrait les dommages induits par le DMBA sur l'ADN. De plus, l'analyse histopathologique montre un effet chimio-préventif de cet extrait contre l'hyperplasie lobulaire mammaire induit par le DMBA (Minari et Okele, 2014). Ces effets chimio-préventifs de *A. muricata* seraient dus à ses métabolites bioactifs qui peuvent bloquer le cycle cellulaire des cellules cancéreuses à la phase G1 et favoriser l'apoptose par la voie intrinsèque (impliquant les Bax, la caspase-3 et les protéines). En outre, ils peuvent agir via la voie antioxydante ou antagoniser les œstrogènes pour leur fixation sur les récepteurs (Moghadamtousi *et al.*, 2015 ; Zeweil *et al.*, 2019). Les flavonols triglycosides, les alcaloïdes, les composés phénoliques, les megastigmanes, les cyclopeptides, les acétogénines annonaciennes et les huiles essentielles sont les différents phyto-constituants bioactifs contre le cancer détectés dans *A.*

muricata. Ils exercent leur cytotoxicité soit par l'inhibition de la synthèse d'ATP en bloquant les complexes mitochondriaux, soit par la promotion de l'apoptose par la stimulation de la production de la protéine pro-apoptotique Bax et à l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et des oncogènes (Prasad *et al.*, 2019).

En Afrique, et au Cameroun en particulier, les populations consomment à la fois les décoctions des feuilles et le jus de la pulpe de *A. muricata* pour prévenir le cancer. De plus, certains y ajoutent du sucre synthétique pour y relever le goût. Partant du fait que le sucre stimule la cancérogenèse (Goncalves *et al.*, 2019), nous nous sommes questionnés sur l'impact du sucre contenu dans le fruit de *A. muricata* sur son potentiel chimio-préventif. Il a été démontré que la consommation des boissons sucrées est associée à l'incidence de cancers y compris le cancer du sein (Yan *et al.*, 2016). Nous avons constaté dans cette étude que l'administration des jus naturels et moins sucrés a réduit l'incidence, le volume, le taux de CA15-3. Cette protection s'expliquerait par le fait que les jus de *A. muricata* soient riches en molécules bioactives contre la cancérogenèse, notamment les polyphénols et les polysaccharides qui sont efficacement impliqués dans les processus d'inhibition de croissance des cellules tumorales et favorisent le processus de mort cellulaire programmée (apoptose) (Diallo *et al.*, 2018). Toutefois, la réduction tumorale était plus marquée chez les animaux ayant reçu le jus moins sucré de *A. muricata* 3 fois par semaine. Ceci s'expliquerait par la présence dans le jus naturel de certains sucres réducteurs notamment le glucose et le fructose (Observatoire des marchés du CIRAD, 2013), dont la cellule cancéreuse se nourrirait pour sa croissance. Se référant au mode de consommation de ce jus par la population, deux fréquences d'administration ont été étudiées : 3 jours par semaine et tous les jours quelle que soit la nature du jus. La fréquence de 3 jours/semaine a montré de meilleurs effets chimio-préventifs. Ceci pourrait s'expliquer par le phénomène de saturation en composés bioactifs ou "down régulation", qui se caractérise par une diminution d'activité lorsque le principe actif est surabondant dans le microenvironnement cellulaire.

Pour mieux comprendre les effets des extraits des jus naturels et moins sucrés de *A. muricata*, le statut antioxydant des animaux a été évalué. En effet, il est bien établi que le carcinogène mammaire DMBA induit une partie de ses effets par la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui à leur tour endommagent l'ADN (Kalyani *et al.*, 2017). Conformément à la diminution de l'incidence des tumeurs, du volume et de la masse des tumeurs, des protéines totales dans les tumeurs ainsi que du taux sérique de CA 15-3, les jus et l'extrait éthanolique des feuilles de *A. muricata* ont présenté un effet antioxydant ; mis en évidence par une augmentation des activités de la SOD et de la catalase ainsi que des taux de GSH et une diminution des taux de MDA par rapport aux rates du groupe DMBA. Il convient de noter que la SOD et la catalase sont des enzymes cytoplasmiques ubiquitaires qui protègent les cellules des radicaux libres produits au cours du métabolisme cancérigène (Kalyani *et al.*, 2017). Leur augmentation significative suite au traitement par *A. muricata* suggère sa capacité

à piéger les radicaux libres, ce qui est en accord avec nos résultats *in vitro* et également avec de nombreux travaux scientifiques dans la littérature (Kalyani *et al.*, 2017). En outre, le GSH, qui est l'une des premières lignes de défense contre les ERO a été augmenté et le MDA (marqueur de la peroxydation lipidique) a été diminué par rapport au groupe DMBA. Ces résultats confirment l'effet antioxydant de *A. muricata* qui, à son tour pourrait partiellement expliquer ses effets anticancéreux. Toutefois l'effet protecteur de *A. muricata* était plus marquée chez les rates recevant le jus moins sucré. En effet, l'organisme, dans le métabolisme du glucose produit le GLUT1 considéré comme un oncogène, il est également le principal transporteur de glucose dans les lignées cellulaires du cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) (Barbosa et Martel, 2020). Pris dans l'ensemble, ces résultats expliqueraient la protection du jus naturel comparé au jus moins sucré contre le stress oxydatif dans ce modèle.

L'inflammation joue un rôle important dans l'initiation, la promotion, l'angiogénèse et les métastases des tumeurs (Murugaiyan et Saha 2009). Afin d'élucider les mécanismes immunologiques et antinéoplasiques attribués à *A. muricata*, plusieurs taux sériques de cytokines ont été mesurés parmi lesquels IL6, IL-12, TNF- α , EGF et fractalkine. Les médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF- α et IL-6 sont les principaux impliqués dans l'inflammation liée au cancer et l'inhibition de ces cytokines pourrait protéger contre les tumeurs mammaires induites chimiquement (Kalyani *et al.*, 2017). *A. muricata* a réduit significativement ($p < 0,001$) les taux sériques de TNF- α (un agent inflammatoire fortement exprimé dans les carcinomes mammaires) et d'IL-6 (un régulateur de la réponse immunitaire à l'infection, qui favorise le développement tumoral au cours des stades ultérieurs du cancer) (Kalyani *et al.*, 2017 ; Ahmad *et al.*, 2018). L'IL-6 est une cytokine inflammatoire connue pour réguler de nombreux cancers dont le cancer du sein et des études ont montré que la régulation à la hausse de l'IL-6 entraîne une résistance des cellules cancéreuses aux médicaments chimiothérapeutiques (Soygur *et al.*, 2007 ; Hodge *et al.*, 2004). Il est à noter que dans cette étude, une diminution significative de l'IL-6 a été observée dans les groupes traités avec *A. muricata*. D'autre part, l'IL-12 régule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les tumeurs en croissance (Sgadari *et al.*, 1996). De manière intéressante, une diminution significative de l'IL-12 a été observée dans les groupes traités avec *A. muricata* en comparaison avec le DMBA. Une diminution de ces cytokines inflammatoires suggère une activité anti-inflammatoire du jus de *A. muricata* qui est réputé contenir les composés anti-inflammatoires suivant : l'annonacine, l'annomuricine E, la muricoréacine, la quécertine et la murihexocine C (Abdul *et al.*, 2018). Cette réduction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires pourrait être due à la capacité de ces composés à supprimer les lipopolysaccharides (LPS), les voies NF-KB et MAPK induites par les LPS et les niveaux de p-JNK, p-ERK1/2 et p-p38 dans la voie MAPK (Li *et al.*, 2017). Le niveau élevé d'INF- γ est généralement corrélé à une croissance de la tumeur et sa réduction est un bon pronostic dans la gestion du cancer

(Ni et Lu, 2018). Il n'a pas été augmenté après le traitement par l'extrait des feuilles *A. murica* et de certaines fréquences du jus dans cette étude.

Le taux de survie des rats du groupe DMBA était faible (62,5%) par rapport aux autres groupes, ce qui suggère une morbidité plus élevée, en accord avec l'incidence, la charge et le volume des tumeurs mammaires les plus élevés. Cela pourrait s'expliquer par l'immunotoxicité de ce carcinogène contre les organes lymphoïdes (Miyata *et al.*, 2001). En outre, le DMBA a induit une augmentation significative de la masse du foie et de la rate et une diminution significative de la masse du thymus et du fémur, alors qu'il n'a pas modifié la masse des reins. La modification de la masse relative des organes est un indicateur des potentiels effets nocifs des substances toxiques (Ying *et al.*, 2013). L'augmentation significative de la masse du foie frais après l'administration de DMBA est en corrélation avec l'augmentation de l'activité ALT, un biomarqueur de la fonction hépatique. Bien qu'il n'ait pas modifié la masse des reins frais, le DMBA a augmenté de manière significative le taux de créatinine, ce qui correspond à la désorganisation du parenchyme rénal et à l'infiltration de leucocytes observées durant l'analyse histopathologique. L'extrait éthanolique des feuilles et les jus de *A. muricata* ont empêché l'augmentation de la masse du foie et des reins ainsi que l'activité de l'ALT et les taux de créatinine suggérant un effet protecteur dans le foie. De plus, la diminution significative du nombre de globules rouges et l'augmentation significative du nombre de globules blancs dans le groupe DMBA par rapport aux rats normaux ont confirmé l'hémato-toxicité de ce carcinogène. En effet, le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles des xénobiotiques et constitue donc un indicateur important de l'état physiologique et physiopathologique (Diallo *et al.*, 2010). Les jus de *A. muricata* ont protégé les cellules sanguines contre les effets hémolytiques induits par le DMBA, renforçant ainsi l'hypothèse de son innocuité *in vivo*, mais cette protection était plus marquée chez les animaux recevant le jus moins sucré de *A. muricata*.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude visait à évaluer *in vivo* l'activité anticancéreuse sur le sein des jus de la pulpe naturel (JAM+) et moins sucré de *A. muricata*. Dans cette étude :

- Les extraits de *A. muricata* (feuilles et jus) et les standards (tamoxifène et létrozole) ont réduit significativement l'incidence des décès, l'incidence des tumeurs, le volume et la masse des tumeurs, les taux sériques de protéines totales dans les tumeurs et les taux de CA 15-3 par rapport au groupe DMBA ;
- Les médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF- α et IL-6 ainsi que le taux d'INF- γ ont été réduits après le traitement par *A. muricata* ;
- *A. muricata* a présenté une activité antioxydante, mise en évidence par une augmentation des activités SOD et catalase ainsi que du niveau de GSH, tandis qu'il a diminué le niveau de MDA par rapport au DMBA.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'effet anti-cancéreux sur le sein de *A. muricata*. Cependant, le jus non sucré pris de manière intermittente a mieux protégé que le jus naturel, ceci doit être pris en considération dans la prévention du cancer.

PERSPECTIVES

Nous nous proposons dans les prochaines études de :

- Évaluer l'activité curative des extraits du jus de *Annona muricata* sur le cancer du sein ;
- Formuler un alicament à base de la pulpe du jus de *Annona muricata* ;
- Évaluer d'autres doses et fréquences de prises de ce jus ;
- Évaluer la toxicité aux fréquences ayant de bonnes activités.



RÉFÉRENCES

- Abdul SM, Jantan I, Haque A and Arshad L. (2018).** Exploring the leaves of *Annona muricata* L as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. *Frontiers in pharmacology*. 9: 1-20.
- Adeyemi DO, Komolafe OA, Adewole OS, Obuotor EM and Adenowo TK. (2008).** Anti Hyperglycemic Activities of *Annona Muricata* (Linn). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medecines*. 6: 62-69.
- AFNOR. (1982).** Products derived from fruits and vegetables. *Recueil des normes françaises*. 2nd edition, Paris la Défense France.
- Ahmad N, Ahmad N, Naqvi AA, Shehzad A and Al-Ghamdi MS. (2016).** Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy. *Journal of Traditional and Complementary Medecines*. 7: 195-204.
- Ahmad N, Ammar A, Storr SJ, Green AR, Rakha E and Ellis IO. (2018).** IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early-stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 67: 537-549.
- American Cancer Society. (2016).** Cancer Facts and Figures. Atlanta, GA: *American Cancer Society* Inc. 12-43.
- Amin MN, Ahmed SS, Ibrahim M, Hakim M, Ahammed S, Kabir A, and Sultana F. (2020).** Cytokines Inflammatoires Dans La Pathogénèse Des Maladies Cardiovasculaires et Du Cancer. *SAGE Open Medicine* 8 (janvier).
- Baillet F, Follezou JY, Taillibert S, Fouret P, Mazon JJ, Rixe O, Renard A, Delcourt A, Noë G, Haertig A. (2015).** Cours de cancérologie. Niveau DCEM3 2002-2003, faculté de médecine, Université Pierre et Marie Curie, France. 298.
- Balkwill F. (2009).** Tumour Necrosis Factor and Cancer. *Nature Reviews Cancer*. 9: 361-371.
- Bats AS. (2020).** Syndrome héréditaire de prédisposition au cancer du sein et de l’ovaire : diagnostic et implications thérapeutiques. *Annales de Pathologie*.
- Beudry M, Chiasson S and Lauzière J. (2006).** Biologie de l’allaitement : le sein, le lait, le geste. *Presses de l’Université du Québec*. 45-47.
- Bidla G, Titanji V, Joko B, el-Ghazali G, Bolad A and Berzins K. (2004).** Antiplasmodial activity of seven plants used in african folk medicine. *Indian Journal of Pharmacology*. 36: 245–246.
- Bishayee A, Mandal A, Bhattacharyya P and Bhatia D. (2016).** Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. *Nutrition and Cancer*. 68: 120-130.
- Botta B, Delle MG, Misiti D, Vitalia and Zappia G. (2001).** Arylteralin lignans: chemistry, pharmacology and biotransformations. *Current Medinal Chemistry*. 8: 1363-1381.
- Bouyahya A (2016).** Alicaments : des aliments aux médicaments, quel apport pour la santé ? *Annales des Sciences de la Santé*. 1: 1-3.
- Bouyahya A and Berezgoun K. (2016).** Les nutrithérapies sont-elles efficaces contre les maladies du cancer ? *Annales des Sciences de la Santé*, ISSN : 2421-8936.
- Charfi N, Chaâbane A, Mnif F, Ben Jmaâ M, Hadj Kacem, F and Abid M. (2012).** P248 Obésité et cancer. *Diabetes & Metabolism*. 38: A89.
- Chaudhry G, Jan R, Mohamad H and Muhammad TST. (2019).** Vitexro tundifolia fractions induce apoptosis in human breast cancer cell line, MCF-7, via extrinsic and intrinsic pathways. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 14: 273-285.
- Chen DS and Mellman I. (2013).** Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. 39: 1-10.

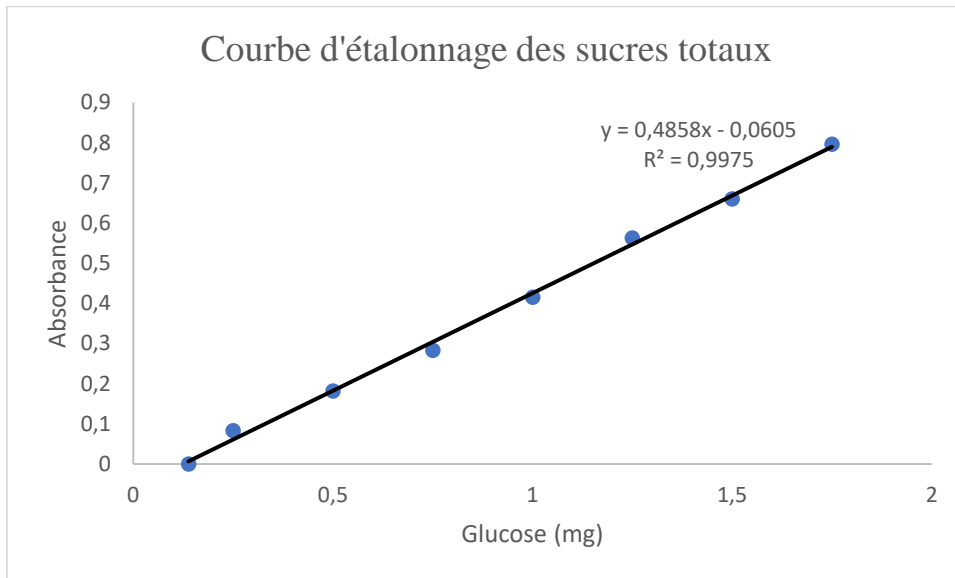
- Chiocca E, Antonio JS, Yu RV, Lukas IH, Keith SL, Hiroshi L, Nakashima DA and Triggs. (2019).** Regulatable Interleukin-12 Gene Therapy in Patients with Recurrent High-Grade Glioma: Results of a Phase 1 Trial. *Science Translational Medicine* 11.
- Clere N. (2016).** Les traitements du cancer du sein. *Acta pharma.* 55: 20-25.
- Contor L. (2001).** Functional Food Science in Europe. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases journal.* 11: 320.
- Cos S and Sanchez-Barcelo EJ. (2000).** Melatonin and mammary pathological growth, *Frontiers in Neuroendocrinology.* 21: 133-17.
- Dai Y, Hogan S, Schmelz EM, Ju YH, Canning C and Zhou K. (2011).** Selective growth inhibition of human breast cancer cells by graviola fruit extract in vitro and in vivo involving downregulation of EGFR expression. *Nutrition and Cancer.* 63: 795-801.
- Duffy MJ, Evoy D and McDermott EW. (2010).** CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clinica Chimica Acta-journals.* 411: 1869–1874.
- Elhadri H. (2018).** Les tumeurs évoluées du sein à propos de 35 cas. Etude rétrospective et revue de la littérature-. Thèse du doctorat en médecine. Univ ; CADI AYYAD - MARRAKECH : 218pp.
- Ellman G. (1959).** Tissue sulfhydryl group. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 82:7077.
- Fareed KNA, Woode E, Terlabi EO and Larbie C. (2012).** Bilirubin Lowering Potential of *Annona muricata* (Linn.) In Temporary Jaundiced Rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology.* 7: 33-40.
- George VC, Kumar DRN, Suresh PK and Kumar RA. (2015).** Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. *Journal of Food Science Technology.* 52: 2328-2335.
- Grouthier Virginie (2015).** Suivi prospectif de 60 femmes présentant une polyadénomatoase mammaire : description radiologique et facteurs associés à son évolution. *Médecine humaine et pathologie.* dumas-01223448.
- Grundy A, Poirier AE, Khandwala F, Grevers X, Friedenreich CM and Brenner DR. (2017).** Cancer incidence attributable to lifestyle and environmental factors in Alberta in 2012: summary of results. *Canadian Medical Association Journal Open.* 5: 540-545.
- Guegang GE, Sandjong TI, Tebeu PM, Temgoua BA, Sando Z, Moulion JR and Gonsu FJ. (2012).** Contribution de l'échographie dans le dépistage et le diagnostic des cancers du sein: une expérience de Yaoundé, Cameroun, *Clinics in Mother and Child Health.* 9: 1-4.
- Halabalaki M, Alexi X, Aligiannis N, Lambrinidis G, pratsinis H, Florentin I, Mitakou S, Mikros E, Skaltsounis AL, and Alexis MN. (2006).** Estrogenic activity of isoflavonoids from *Onobrychis ebenoides*, *Planta medicina.* 72: 488-493.
- Hamid RA, Foong CP, Ahmad Z and Hussain MK. (2012).** Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 22: 630-641.
- Institut National du Cancer (INCa). (2014).** Les traitements des cancers du sein. Collection Guides patients Cancer info. Consulté à l'adresse www.e-Cancer.fr.
- Ishola IO, Awodele O, Olusayero AM and Ochieng CO. (2014).** Mechanisms of analgesic and antiinflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. *Journal of Medical Food.* 17: 1375-1382.
- ITIS Standard Report Page: Annonaceae [Internet].** [cité 30 mars 2017]. Disponible sur: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRptsearch_topic=TSN&search_value=18092#null.

- Iversen L, Sivasubramaniam S, Lee AJ, Fielding S and Hannaford PC. (2017).** Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 216 :580 [e1580.e9].
- Jaramillo MC, Arango GJ, González MC, Robledo SM, Velez ID. (2000).** Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*. 71: 183-186.
- Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, and Swerdlow AJ. (2017).** Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Research*. 19: 1-14.
- Kalyani KC, Ellutla M, Bodduluru LN, Kasala ER, Uppulapu SK, Kalyankumarraju M and Lahkar M. (2017).** Preventive effect of berberine against DMBA-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Biomedecine and Pharmacology*. 92: 207-214.
- Kumar A, Gautam B, Dubey C and Tripathi PK, (2014).** A review: Role of doxorubicin in treatment of cancer. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research*. 5: 4117-4128.
- Lamoral-Theys D, Pottier L, Dufrasne F, Nève J, Dubois J, Kornienko A, Kiss R et Ingrassia L. (2010).** Natural polyphenols that display anticancer properties through inhibition of kinase activity. *Current Medicinal Chemistry*. 17: 812-825.
- Layde, PM, Webster LA, Baughman AL, Wingo PA, Rubin GL and Ory HW. (1989).** The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. *Journal of Clinical Epidemiology*. 4: 963–973.
- Le corgne A. (2016).** Rôle du pharmacien d'officine dans la prise en charge du cancer du sein après chirurgie mammaire. Thèse d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Bourgogne : 126pp.
- Lemaire J, Larrue R, Perrais M, Cauffier C, Pottier N. (2020).** Aspects fondamentaux du développement tumoral. *Bulletin du Cancer*. 107: 1144-1160.
- Li Y, He S, Tang J, Ding N, Chu X and Cheng L. (2017).** Andrographolide inhibits inflammatory cytokines secretion in LPS-stimulated RAW264.7 cells through suppression of NF- κ B/MAPK signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1.
- Liu Y, Nguyen N and Colditz GA. (2015).** Links between Alcohol Consumption and Breast Cancer: A Look at the Evidence. *Women's Health*. 11: 65–77.
- Maignien E (2005).** Le corosol: *Annona muricata* L. [Thèse d'exercice]. [1970-2013, France]: Université de Bordeaux II.128pp.
- Malik S, Cusido RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazon J and Bonfil M. (2014).** Biotechnological approaches for producing aryltetralin lignans from *Linum* species. *Phytochemistry reviews*. 13: 893-913.
- Maltoni C, Minardi F, Pinto C, Belpoggi F and Bua L. (1997).** Results of Three Life Span: Experimental Carcinogenicity and Anticarcinogenicity Studies on Tamoxifen in Rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 837: 469-512.
- Ménan H, Banzouzi J-T, Hocquette A, Péliissier Y, Blache Y and Koné M. (2006).** Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. *Journal Ethnopharmacol*. 105: 131-136.
- Merviel P, Jouvance O, Naepels P, Fauvet R, Cabry-Goubet R, Gagneur O and Gondry J. (2011).** Existe-t-il encore des facteurs de risque de survenue d'un cancer du sein ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 39: 486– 490.
- Misra H. and Fridovich I. (1972).** Determination of the level of superoxide dismutase in whole blood. Yale University Press New Haven. 10: 101-109.
- Miyata M, Furukawa M, Takahashi K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y. (2001).** Mechanism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. *Japanese Journal of Pharmacology*. 86: 302-309.

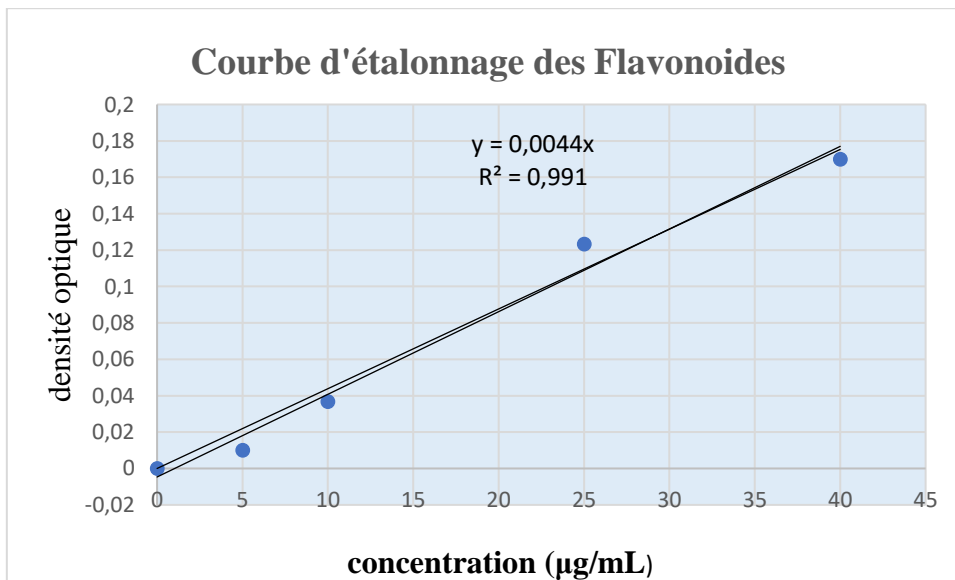
- National Cancer Institute. (2018).** "Targeted Cancer Therapies". www.cancer.gov. Retrieved 28 March 2018.7-30.
- Ngueguim TF, Massa ZB, Kouamouo J, Tchuidjang A, Dzeufiet DDP, Kamtchouing P, and Dimo T. (2014).** Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 151: 784-790.
- Roslida A.H., Foong CP, Zuraini A and Mohd KH. (2012).** Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 22: 630-641.
- Russo J and Russo IH. (2000).** Atlas and histologic classification of Tumors of rat mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 5: 187-200.
- Sagiv SK, Gaudet MM, Eng SM, Abrahamson PE, Shantakumar S, Teitelbaum SL, Bell P, Thomas JA, Neugut AI, Santella RM and Gammon MD. (2009).** Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and survival among women with breast cancer. *Environmental Research*. 109: 287-291.
- Salhi A. (2017).** Système d'aide pour le suivi de l'évolution d'une tumeur mammaire après chimiothérapie. Thèse de doctorat en traitement d'image et vision artificiel. Université. BADJI MOKHTAR – ANNABA :190 pp.
- Sancho-Garnier H and Colonna M. (2019).** Épidémiologie des cancers du sein. *Presse Médecine*. 48: 1076-1084.
- Sando Z, Kemfang JD, Kasia JM, Yomi J, Nana NA, Ngassam A, Domkam I and Ndom P. (2015).** Breast cancer survival in Cameroon: Analysis of Cohort of 404 patients at the Yaoude General Hospital. *Advances in Breast Cancer Research*. 4: 44-52.
- Sgadari C, Angiolillo AL and Tosato G. (1996).** Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*. 87(9): 3877-82.
- Shu L, Cheug KL, Khor TO, Chen C, and Kong AN. (2010).** Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Revue*. 29: 483-502.
- Singleton V and Rossi Jr J. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.
- Sinha K. (1972).** Colorimetric assay of catalase. *Analyze biochemistry*. 47: 389-394.
- Song M, Garrett WS and Chan AT (2015).** Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology*. 148: 1244-1260.
- Wilbur K, Bernhein F and Shapiro O. (1949).** Determination of lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 24: 3959-3964.
- World Cancer Research Fund International. (2007).** Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. In 1. publ. Edited By *American Institute for Cancer Research*. AICR, Washington, DC.
- Yaghjian L, Colditz GA and Collins LC. (2011).** Mammographic breast density and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women according to tumor characteristics. *Journal National Cancer Institute*. 103: 1179-1189.
- Ying P, Yunen L and Xiaodong X. (2013).** Change Trends of Organ Weight Background Data in Sprague Dawley Rats at Different Ages. *Journal of Toxicology Pathology*. 26: 29-34.
- Zeweil MM, Sadek KM, Taha NM, El-Sayed Y and Menshawy S. (2019).** Graviola attenuates DMBA-induced breast cancer possibly through augmenting apoptosis and antioxidant pathway and downregulating estrogen receptors. *Environ Sciences Pollution Research*. 26: 15209-15217.
- Zingué S, Atenguena EO, Zingué LL, Tueche AB, Njamen D, Nkoum AB and Ndom P. (2021).** Epidemiological and clinical profile and survival of patients followed for breast cancer between 2010 and 2015 at the Yaounde General Hospital, Cameroon. *PanAfrican Medical Journal*. 36: 861-873.



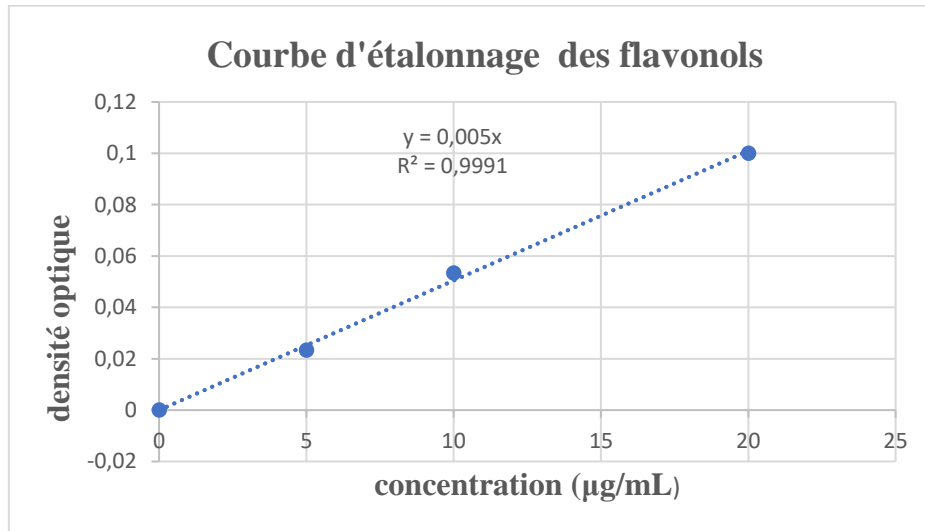
ANNEXES



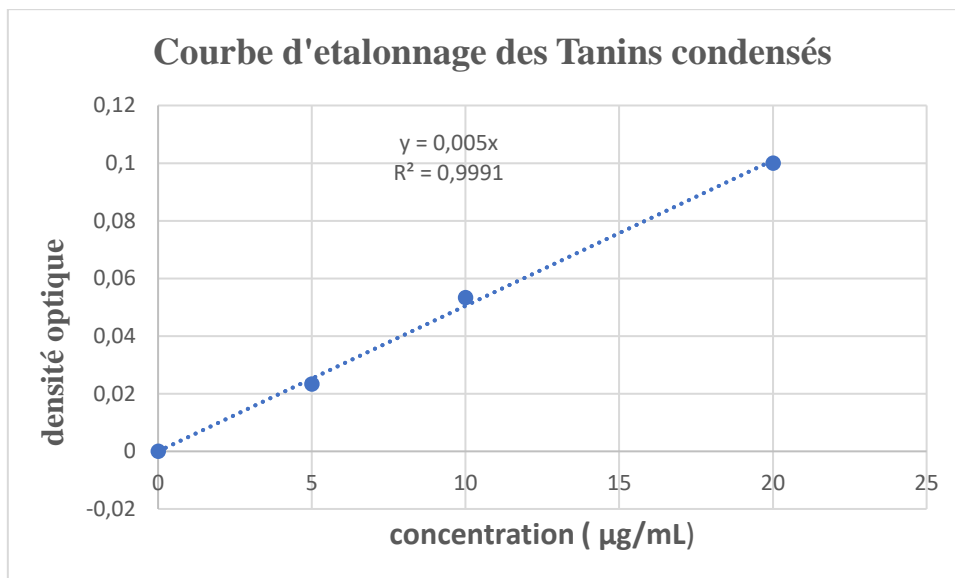
Annexes I : Courbe d'étalonnage des sucres totaux



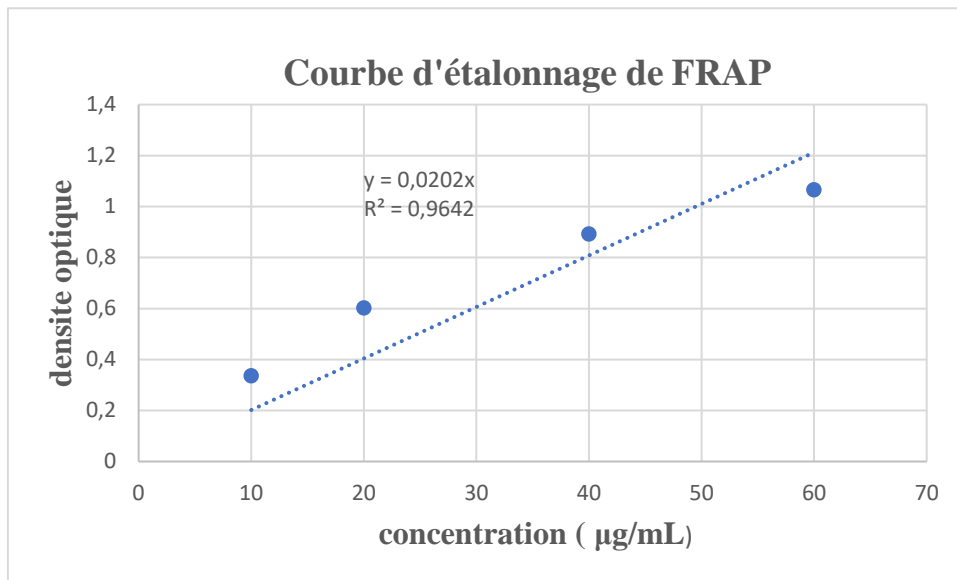
Annexes II : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



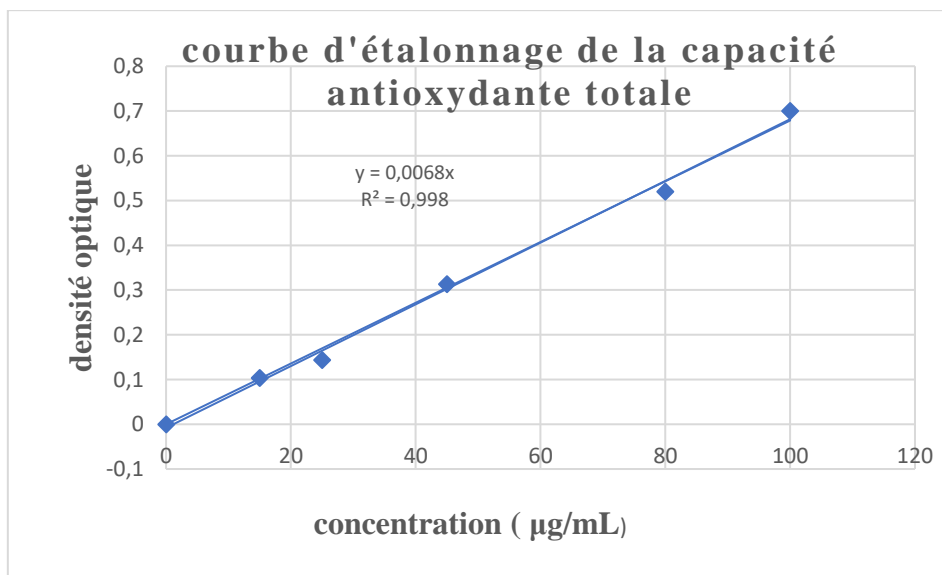
Annexes III : Courbe d'étalonnage des flavonols



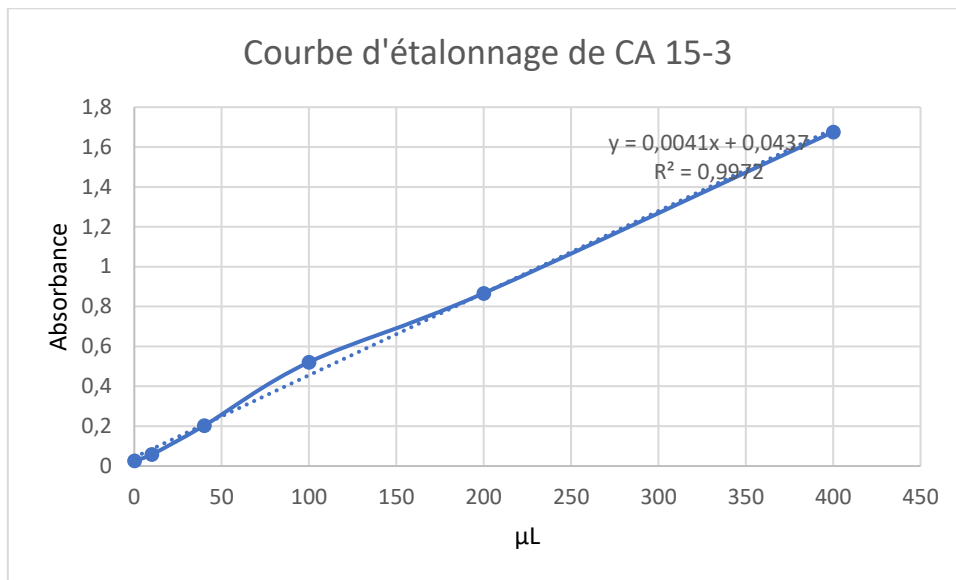
Annexes IV : Courbe d'étalonnage des tanins



Annexes V : Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante par la méthode de FRAP



Annexes VI : Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante totale.



Annexes VII : Courbe d'étalonnage du taux de CA 15-3.

Annexes VIII : Réactifs

I. Dosages des flavonoïdes totaux

❖ Solution de nitrite de sodium (NaNO_2) 5 %

NaNO_2 1 g ; eau distillée QSP 20 mL

❖ Solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) 10 %

AlCl_3 2 g ; eau distillée QSP 20 mL

❖ Solution hydroxyde de sodium (NaOH) 1 mM

NaOH 2 mg ; eau distillée QSP 50 mL

II. Dosage des flavonols

❖ Solution éthanolique d' AlCl_3 2%

AlCl_3 0,4 g ; eau distillée QSP 20 mL

❖ Solution d'acétate de sodium (CH_3COONa) 50g/L

(CH_3COONa) 5g ; eau distillée QSP 100 mL

III. Détermination du potentiel antioxydant de l'extrait par la méthode de FRAP

❖ Tampon acétate 300 mM ; pH 3,6 ; Pka 4,7

Acide acétique 4,13 mL ; Acétate de sodium 0,66 g

Dissoudre 0,66g d'acétate de sodium dans 200 ml d'eau, puis ajuster le pH à 3,6 par titration avec 4,13 mL d'acide acétique, et compléter le volume à 250 mL.

❖ Solution de TPTZ 10mM

HCl 40 mM (0,86 mL HCl 12M + Eau distillé QSP 25 mL) 25 mL ; TPTZ 0,078 g

❖ Solution FeCl_3 10 mM

FeCl_3 0,34 g ; eau distillée QSP 25 mL

❖ Réactif de FRAP

Mélanger les solutions de tampon acétate (300 mM ; Ph 3,6), de TPTZ (10mM) et de FeCl_3 (10mM) dans les proportions 10 : 1 : 1.

IV. Détermination du potentiel antioxydant par la méthode du phosphomolydates

❖ H_2SO_4 0,6

H_2SO_4 6,94 M 1,73 mL ; eau distillée QSP 20 mL

❖ NaH_2PO_4 28 mM

NaH_2PO_4 77,28 mg ; eau distillée QSP 20 mL

❖ Molybdate d'ammonium 4 mM

Molybdate d'ammonium 0,25 g ; eau distillée QSP 50 mL

❖ Réactif phosphomolydates Mélanger aux proportions 1 : 1 : 1 du H_2SO_4 0,6 M, du NaH_2PO_4 28 mM ; et du molybdate d'ammonium 4 mM.

**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

12 November 2021

**Prof. Stéphane Zingué & Prof. Dieudonné Ndjamen, Principal
Investigators (PIs)** University of Yaoundé I

Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2021-010 (please use this reference number for all correspondences)

Protocol Title: « Chemopreventive effects of three Cameroonian ethnomedicinal plants (*Annona muricata*, *Duguetia confinis*, and *Passiflora edulis*) against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in Wistar rats »

Investigator(s) Name(s): - Prof. Zingué Stéphane, Prof. Ndjamen Dieudonné, Silihe Kamga Kevine

- Mbou Defo William
- Fotsing Sorelle Ines
- Nkuimi Kami Bernie Ornella
- Ossomba Eric

The research protocol title above aims at contributing to better knowledge on the use of Cameroonian ethnomedicinal plants (*Annona muricata*, *Duguetia confinis*, and *Passiflora edulis*). The proposed research has 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, UY1, on the 29th of October 2021.

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 study is of great interest considering the benefits of better knowledge on the use of these Cameroonian ethnomedicinal plants, which are greatly appreciated by the Cameroonian populations. Detecting the bioactive ingredients of these plants could be a potential source of synthesis of new natural antitumor substances. The investigation will focus on tumor burden, tumor incidence, tumor mass and volume, oxidative stress status in the tumor as well as tumor histoarchitecture, hematological and biochemical parameters. This methodology is appropriate, with reasonable risks to the incriminated animals (rats). The ethical considerations are satisfactory, and the management of the rats' biodegradable carcass (to be buried at the end of the experiments), is appropriate. The CVs of investigators describe them as capable of implementing the research protocol.

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:


- 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 which are made to eliminate immediate hazards to the fauna/study participant; (2) All risks that may be rare or remote and especially those which 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 study to the JIRB at completion or one year from the date of issue 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 given for one-year renewable, on the condition that a progress report is submitted to the JIRB. While the JIRB has given its approval for this study on a satisfactory ethical basis, it is still necessary for the investigators to obtain other relevant Administrative authorization from the community representatives where the work will be carried out. Investigators should familiarize themselves with the Nagoya Protocol and plan to obtain a research permit from the MINRESI and/or MINEPIA.

Sincerely,


Professor Wilfred F. Mbacham
Coordinator of the CRFDS/SE
Chair of the JIRB




Ass. Prof. Frederic Nico Njayou
Coordinator for Animal Research
Bioethics, Faculty of Science, UYI

Annexes IX : Clairance éthique