

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

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

UNITE DE RECHERCHE DE SCIENCE
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

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

DOCTORATE TRAINING UNIT OF
LIFE SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DES SCIENCES
BIOMEDICALES

LABORATORY OF BIOCHEMISTRY, FACULTY OF MEDECINE AND BIOMEDICAL SCIENCES

Evaluation des effets protecteurs de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Omocarpum kirkii* S. Moore (Fabaceae) contre le cancer du sein induit par le 7,12-dimethylbenz(a) anthracène (DMBA) chez la rate Wistar

Mémoire présenté comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master en
Biochimie

Option : Biotechnologie et Développement

Par

TCHOUPE NGOGANG Harcel Brunel

Matricule : 21S2710

Licencié-ès Sciences

Sous la co-direction de :

Pr ZINGUE Stéphane

Maître de Conférences

FMSB, UYI

Pr PIEME Constant Anatole

Professeur

FMSB, UYI



ANNEE ACADEMIQUE 2023-2024

SOMMAIRE

SOMMAIRE	i
DEDICACE.....	iv
REMERCIEMENTS	v
LISTE DES ABREVIATIONS	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ANNEXES.....	ix
RESUME.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCTION	1
Chapitre I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	3
I.1. Généralité sur le cancer	3
I.1.1. Origine	3
I.1.2. Définition.....	3
I.1.3. Epidémiologie du cancer	3
I.1.4. Types de cancer	4
I.2. Généralité sur le cancer du sein	4
I.2.1. Anatomie du sein	4
I.2.2. Définition.....	4
I.2.3. Epidémiologie du cancer du sein.....	5
I.2.4. Cancérogenèse mammaire.....	5
I.2.5. Types histologiques des cancers	10
I.2.6. Types histologiques des tumeurs mammaires.....	11
I.2.7. Facteurs de risques du cancer	12
I.2.8. Symptômes du cancer du sein.....	14
I.2.9. Techniques de détection médicale du cancer du sein	15
I.2.10. Traitements conventionnels.....	16
I.2.11. Limites des traitements conventionnels	17
I.2.12. Chimio prévention du cancer du sein	17
I.3. <i>Omocarpum kirkii</i>	18
I.3.1. Origine et distribution géographique.....	18
I.3.2. Classification botanique	18

I.3.3. Description morphologique	19
I.3.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	19
I.3.5. Travaux pharmacologiques antérieurs réalisés avec <i>Omocarpum kirkii</i>	20
Chapitre II : MATERIEL ET METHODES.....	21
II.1. Matériel	21
II.1.1. Composés et réactifs	21
II.1.2. Collecte et identification de <i>Omocarpum kirkii</i>	21
II.1.3. Animaux expérimentaux	21
II.2. Méthodes	21
II.2.1. Protocole d'extraction de <i>Omocarpum kirkii</i>	21
II.2.2. Détermination des doses	22
II.2.3. Protocole expérimental.....	22
II.2.4. Préparation des solutions et tampons	26
II.2.5. Analyse histologique	26
II.2.6. Analyse hématologique	29
II.2.7. Estimation quantitative des teneurs en quelques métabolites secondaires de <i>Omocarpum kirkii</i> et détermination de la capacité antioxydante <i>in vitro</i> de <i>Omocarpum kirkii</i>	29
II.2.8. Dosage de quelques marqueurs du stress oxydatif	32
II.2.9. Dosage de quelques marqueurs de toxicité.....	34
II.2.10. Estimation du taux du biomarqueur du cancer du sein CA 15-3 et de quelques cytokines impliquées dans le cancer du sein.....	38
II.2.11. Analyse statistique	39
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	42
III.1. Résultats	40
III.1.1. Teneurs en quelques composés photochimiques et capacité antioxydante de l'extrait éthanolique de l'écorce de <i>omocarpum kirkii</i>	40
III.1.2. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur la de survie et la masse corporelle des rates	41
III.1.3. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur quelques paramètres tumoraux.....	42
III.1.4. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur le volume des tumeurs, la morphologie des tumeurs et le taux sérique de CA15-3	43
III.1.5. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur l'histoarchitecture des glandes mammaires	45
III.1.6. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur quelques cytokines inflammatoires	47
III.1.7. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur quelques paramètres du stress oxydatif	49
III.1.8. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur la masse relative des organes	51
III.1.9. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur quelques biomarqueurs de la toxicité.....	53
III.1.10. Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur quelques paramètres hématologiques	55

III.2 Discussion	57
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	62
CONCLUSION	62
PERSPECTIVES.....	62
REFERENCES.....	63
ANNEXES.....	a

DEDICACE

A mon père M. **NGOGANG** Clovis

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie **l'Eternel, le Dieu Tout Puissant**, de m'avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persévérance et de m'avoir permis d'achever ce travail.

La réalisation de ce travail de recherche a été possible grâce à l'assistance et la collaboration de plusieurs personnes à qui je tiens à exprimer ma gratitude. Il s'agit de :

❖ **Pr PIEME Constant Anatole**, Directeur de ce travail, pour m'avoir intégré dans le Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci pour vos conseils, l'aide financière que vous m'avez apporté et les conditions techniques mises à ma disposition.

❖ **Pr ZINGUE Stéphane**, Directeur de ce travail, pour m'avoir proposé ce sujet de recherche et d'en avoir effectué l'encadrement. Merci pour la disponibilité, le soutien financier et matériel et les encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

❖ **Pr MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef de Département de Biochimie à la Faculté des Sciences de l'université de Yaoundé I et à tous les enseignants du dit Département pour les enseignements et l'encadrement reçus tout au long de mon parcours académique.

❖ **Pr MENDIMI NKODO Joseph Marie**, Médecin Anatomo-pathologiste, pour avoir accepté de lire les sections histologiques et d'avoir apporté son expertise qui a grandement rehaussé ce travail.

❖ **Dr YAYA GBAWENG Joël**, enseignant chercheur de la Faculté des Sciences de l'université de Ngaoundéré, pour m'avoir assisté lors de la récolte de la plante.

❖ Mes aînés de laboratoire, en particulier, **Mme FOSTING Sorcelle Ines**, **M FOMAT PEHUIE Boris Hugor**, **Mme NKUIMI KAMI Bernie Ornella**, **M CHOUPPO Arnaud**, **M NGOUNE MOMO Jordan**, pour le soutien, et toutes l'aide qu'ils m'ont apportés durant la période de manipulation.

❖ Mes promotionnaires de Master **M ABAKAR BEN ISSA Ismaël** et **Mme NGAFFO NGOULAYE Yvannie** pour l'aide et la franche collaboration durant la réalisation de ce travail.

❖ Les membres de ma famille, **M TCHOUWA Sébastien**, **Mme NJAMPOUP Léonie**, **Mme NDOUKEU Sylvie**, **Mme TCHONANG Jaqueline** et **M NGOUNOU Jean Flaubert**, qui ont consenti d'importants sacrifices pour que je puisse conduire à terme ce travail.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ALAT	:	Alanine Aminotransférase
ASAT	:	Aspartate Aminotransférase
BIL	:	Bilirubine
CA15-3	:	"Carbohydrate Antigen 15-3"
CCMH	:	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CEE	:	Comité Européenne d'Etique
CREAT	:	Créatinine
DMBA	:	7,12-diméthylbenz (a) anthracène
EDTA	:	"Ethylene diamine tetra-acetic acid"
ERO	:	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESM	:	Erreur Standard sur la Moyenne
EtOH	:	Ethanol
GB	:	Globule blanc
GR	:	Globule rouge
HAP	:	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HER2	:	"Human epidermal growth factor receptor 2"
HGB	:	Hémoglobine
HCT	:	Hématocrite
HNC	:	Herbier National du Cameroun
IL- 6, 10	:	Interleukine 6, 10
INF-γ	:	Interféron γ
IRM	:	Imagerie à Résonnance Magnétique
MDA	:	Malondialdéhyde
NO	:	Monoxyde d'azote
PAL	:	Phosphatase Alcaline
ER	:	"Estrogen Receptor"
TAMOX	:	Tamoxifène
TNF-α	:	"Tumor Necrosis Factor α "
VEGF	:	"vascular Endothelial Growth Factor"
VGM	:	Volume Globulaire Moyen

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Types de cancers les plus courants.	4
Figure 2: Anatomie du sein.	5
Figure 3: Caractéristiques des cellules tumorales (Hanahan et Weinberg, 2011).....	6
Figure 4: Différentes étapes de la cancérogénèse.	7
Figure 5: Déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires.....	9
Figure 6: Balance d'équilibre entre les systèmes pro- et anti-oxydants.....	10
Figure 7: Photo de <i>Omocarpum kirkii</i> par Tchoupe Ngogang Harcel Brunel à Ngaoundéré dans la région de l'Adamaoua, le 18 Mai 2023.	19
Figure 8: Protocole d'extraction de <i>Omocarpum kirkii</i>	22
Figure 9: Protocole expérimental de l'évaluation de effets protecteur de l'extrait éthanolique de <i>Omocarpum kirkii</i> sur le cancer du sein induit par le DMBA sur les rates de souche Wistar.....	24
Figure 10: Courbe d'évolution pondérale (A) et de survie des animaux par la méthode de kaplan Meier (B).	41
Figure 11: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de <i>O. kirkii</i> sur la morphologie tumorale (A), le taux de CA15- 3 Sérique (B) et le volume tumoral (C).	44
Figure 12: Effets de l'extrait de <i>Omocarpum kirkii</i> sur l'histoarchitecture des glandes mammaires	46
Figure 13: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de <i>Omocarpum kirkii</i> sur le taux de quelques cytokines inflammatoires.	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Analyse quantitative des composés phénoliques présents dans <i>Omocarpum kirkii</i> et capacité antioxydante totale in vitro de <i>Omocarpum kirkii</i>	40
Tableau II: Activité chimioprotectrice de l'extrait éthanolique de <i>O. kirkii</i> sur le cancer du sein	42
Tableau III: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de <i>O. kirkii</i> sur quelques paramètres du stress oxydatif.....	50
Tableau IV: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de <i>O. kirkii</i> sur la masse relative de quelques organes	52
Tableau V: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de <i>O. kirkii</i> sur quelques paramètres biochimiques de toxicité.....	54
Tableau VII : Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de <i>O. kirkii</i> sur certains paramètres hématologiques chez les rates ayant des tumeurs mammaires.....	56

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I: Composition de l'aliment des rates (25 kg).....	a
ANNEXE II: Préparation d'autres solutions et tampons.....	a
ANNEXE III: Droite d'étalonnage des composés phénoliques.....	c
ANNEXE IV: Droite d'étalonnage des Flavonoïdes	c
ANNEXE V: Droite d'étalonnage des Flavanols	d
ANNEXE VI: Droite d'étalonnage des tanins	d
ANNEXE VII: Droite d'étalonnage de la capacité antioxydante par la méthode de FRAP	e
ANNEXE VIII: Droite d'étalonnage de la catalase.....	e
ANNEXE IX: Droite d'étalonnage des Nitrites	f
ANNEXE X: Droite d'étalonnage des protéines totales	f
ANNEXE XI: Droite d'étalonnage de CA15-3.....	g

RESUME

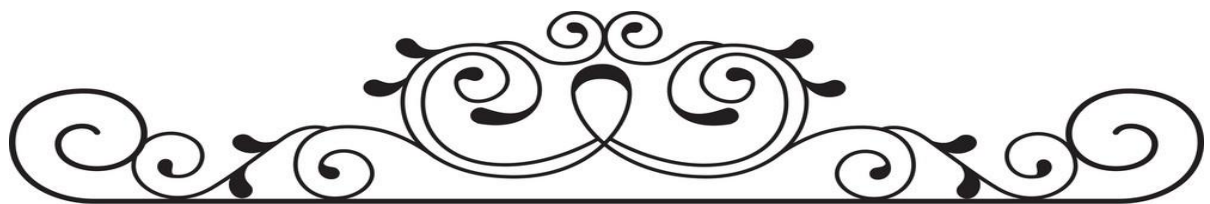
Le traitement du cancer du sein connaît ces dernières décennies de grandes avancées grâce à la révolution technologique. Néanmoins, le cancer du sein demeure un problème de santé publique mondial en l'occurrence dans les pays en voie de développement à cause du coût élevé du traitement, de l'indisponibilité du traitement et des résistances poussant les populations malades à faire recours aux plantes médicinales comme alternative. *Omocarpum kirkii* S. Moore (Fabaceae) est une plante utilisée en médecine traditionnelle Africaine pour le traitement de certaines maladies y compris le cancer. Elle a présenté des activités cytotoxiques contre les cellules du cancer *in vitro*. Au mieux de nos connaissances aucune étude n'a été faite sur les propriétés chimiopreventives de *O. kirkii* sur le cancer du sein *in vivo*. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'évaluer les propriétés anti-cancéreuses de *Omocarpum kirkii* sur le cancer du sein chez les rates Wistar. Pour ce faire, 48 rates femelles âgées d'environ 45 jours et pesant ± 80 g ont été réparties en 6 groupes de huit animaux chacun ($n = 8$) de la manière suivante : les groupes normal et DMBA (7,12-diméthylbenz (a) anthracène) respectivement contrôles normal et négatif ont reçu le véhicule (eau distillée), le médicament de référence tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC a servi de contrôle positif, tandis que les groupes tests étaient traités avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg. Après 10 jours de prétraitement aux différentes substances, les rates ont été exposées à une dose unique de 50 mg/kg PC de DMBA (dilué dans de l'huile d'olive) excepté le groupe normal. Le traitement s'est poursuivi jusqu'à la 22ème semaine, et les critères évalués incluaient l'incidence, la masse et le volume des tumeurs, l'histologie des tumeurs et des glandes mammaires, le taux du biomarqueur du cancer du sein CA15-3, ainsi que le statut antioxydant et le taux de cytokines inflammatoires. L'analyse phytochimique de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* a révélé la présence des composés phénoliques avec une plus grande teneur en flavonoïdes. Une incidence tumorale de 100% a été enregistrée chez les rates du groupe DMBA. De plus, le groupe DMBA a présenté une augmentation significative ($p < 0,001$) du volume tumoral, de la charge tumorale, du taux de CA15-3 aussi bien que des taux sériques des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , INF- γ , IL-6 et VEGF) et des marqueurs pro-oxydant MDA et NO. L'extrait de *O. kirkii* à toutes les doses testées a inhibé de manière significative l'incidence, la charge tumorale, le volume tumoral, le taux de CA 15-3, de même que les taux sériques des cytokines pro-inflammatoires. En outre il a augmenté le taux d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire), tout comme l'activité de la catalase (anti-oxydant) contre la baisse du taux des pro-oxydants. Il en ressort que *Omocarpum kirkii* a des effets protecteurs à toutes les doses testées, avec un meilleur effet observé à la dose de 50 mg/kg contre le cancer du sein induit par

le DMBA chez la rate Wistar. Ses effets seraient dus à ses activités antioxydante et anti-inflammatoire.

ABSTRACT

Breast cancer treatment has made significant advances in recent decades thanks to the technological revolution. Nevertheless, breast cancer remains a global public health issue, particularly in developing countries due to the high cost of treatment, the unavailability of treatment, and resistance driving sick populations to turn to medicinal plants as an alternative. *Omocarpum kirkii* S. Moore (Fabaceae) is a plant used in African traditional medicine for the treatment of certain diseases, including cancer. It has shown cytotoxic activities against cancer cells in vitro. To the best of our knowledge, no study has been conducted on the chemopreventive properties of *O. kirkii* on breast cancer in vivo. Therefore, the objective of this study was to evaluate the anti-cancer properties of *Omocarpum kirkii* on breast cancer in Wistar rats. For this purpose, 48 female rats aged approximately 45 days and weighing ± 80 g were divided into 6 groups of eight animals each ($n = 8$) as follows: the normal and DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) groups, respectively normal and negative controls, received the vehicle (distilled water), the reference drug tamoxifen at a dose of 3.3 mg/kg BW served as a positive control, while the test groups were treated with the ethanolic extract of *O. kirkii* bark at respective doses of 50, 100, and 200 mg/kg. After 10 days of pretreatment with the different substances, the rats were exposed to a single dose of 50 mg/kg BW of DMBA (diluted in olive oil) except for the normal group. The treatment continued until the 22nd week, and the evaluated criteria included tumor incidence, mass, and volume, tumor and mammary gland histology, breast cancer biomarker CA15-3 levels, as well as antioxidant status and inflammatory cytokine levels. The phytochemical analysis of the ethanolic extract of *O. kirkii* bark revealed the presence of phenolic compounds with a higher flavonoid content. A 100% tumor incidence was recorded in the rats of the DMBA group. Furthermore, the DMBA group showed a significant increase ($p < 0.001$) in tumor volume, tumor load, CA15-3 levels, as well as serum levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , INF- γ , IL-6, and VEGF) and pro-oxidant markers MDA and NO. The *O. kirkii* extract at all tested doses significantly inhibited tumor incidence, tumor load, tumor volume, and CA 15-3 levels, as well as serum levels of pro-inflammatory cytokines. Additionally, it increased IL-10 (anti-inflammatory cytokine) levels, as well as catalase (antioxidant) activity against the decrease in pro-oxidant levels. It appears that *Omocarpum kirkii* has protective effects at all tested doses, with the best effect observed at a dose of 50 mg/kg against DMBA-induced breast cancer in Wistar rats. Its effects are likely due to its antioxidant and anti-inflammatory activities.

Keywords: *Omocarpum, kirkii*, Breast cancer, inflammation, oxidative stress, CA15-3



INTRODUCTION



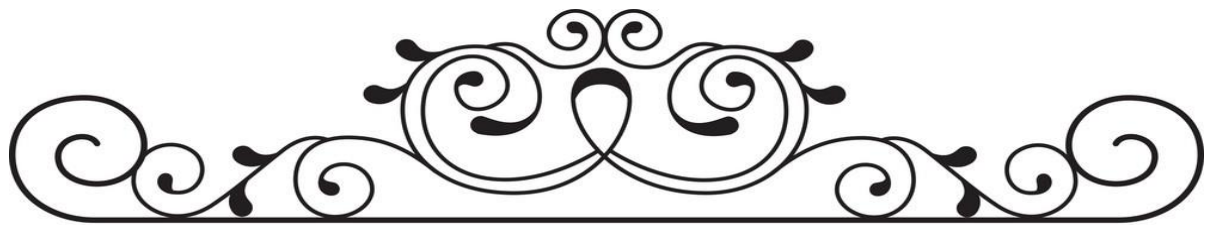
Le cancer peut être défini comme étant un groupe hétérogène de maladies caractérisées par un développement en plusieurs étapes comprenant une prolifération, une migration, une invasion et des métastases incontrôlées (Sarkar *et al.*, 2019). D'après Bray *et al* (2024), près de 20 millions de nouveaux cas de cancer ont été recensés dans le monde en 2022 avec environ 9,7 millions décès. Selon l'OMS, (2022) plus de 35 millions de nouveaux cas de cancer devraient être enregistrés d'ici 2050 si rien n'est fait, soit une augmentation de 77% par rapport aux 20 millions de cas estimés en 2022. Le cancer du sein est un problème de santé publique majeur chez les femmes en raison de ses taux de mortalité et de morbidité élevés (Kashyap *et al.*, 2023) et il se hisse à la deuxième place des cancers les plus diagnostiqués dans le monde avec 2 308 897 nouveaux cas et 665 684 décès en 2022 (Bray *et al.*, 2024). En Afrique, le taux de mortalité associé au cancer du sein s'élève à 91 252 décès pour 198 553 de cas recensés (OMS, 2022). Au Cameroun, il se classe au 1^{er} rang chez les femmes avec plus de 4000 nouveaux cas diagnostiqués et environ 2000 décès en 2022 (Bray *et al.*, 2024). La plupart (80 %) de ces cas sont détectés tardivement (Sung *et al.*, 2021). Des études ont corrélées l'apparition du cancer du sein à différents facteurs de risque, notamment les facteurs hormonaux tels que les œstrogènes endogènes et exogènes ; l'âge ; le sexe ; les facteurs génétiques tels que les mutations des gènes suppresseurs BRCA1 et BRCA2 ; les facteurs liés au mode de vie à l'instar de l'alcoolisme, le tabagisme; et les facteurs environnementaux tels l'exposition aux polluants atmosphériques, et en particulier aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comme le DMBA (Kashyap *et al*, 2023).

Dans le but de lutter contre cette pathologie plusieurs traitements sont couramment utilisés parfois seul ou en combinaison. Il s'agit notamment de la chirurgie, la radiothérapie, l'hormono thérapie, la chimiothérapie, les thérapies biologiques ciblées et l'immunothérapie (Rossi *et al.*, 2019). En cas de détection rapide de la maladie, ces traitements peuvent être efficaces. Cependant bien que la médecine moderne progresse toujours vers les traitements plus ciblés contre les cellules cancéreuses en augmentant l'espérance de vie des malades, plusieurs limites sont observées telles que les effets secondaires indésirables, des possibles effets de résistances et le coût élevé du traitement qui le rend non accessible aux populations (Tong *et al.*, 2018). La recherche de nouvelles alternatives satisfaisantes, c'est-à-dire abordables sur le plan du coût, présentant moins d'effets secondaires tout en étant efficaces, est un besoin courant du fait de richesse des plantes naturelles en métabolites secondaires (Koohpar *et al.*, 2015). La flore camerounaise n'a cessé de fournir de nouvelles pistes. Ainsi, plusieurs plantes médicinales camerounaises couramment utilisées ont montrés des potentiels anticancéreux dont : *Passiflora edulis* (Fotsing *et al.*, 2023), *Acacia seyal* (Zingue *et al.*, 2018), *propolis* (Zingue *et al.*, 2021),

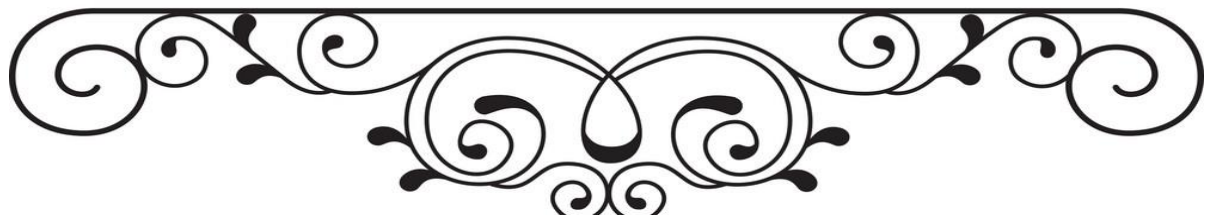
Annona muricata (Syed Najmuddin *et al.*, 2016). Afin d'apporter notre pierre à cet édifice nous nous sommes intéressés à *Omocarpum kirkii*.

Omocarpum kirkii S. Moore (Fabaceae) est une plante qu'on trouve en Afrique subsaharienne et au Cameroun dans la région de l'Adamaoua (Kamto *et al.*, 2020). Des études antérieures ont révélés la présence des bi-flavonoïdes, flavonoïdes, iso-flavonoïdes et des bisdihydrocoumarines dans la plante *O. kirkii* (Papers, 2011 ; Kamto *et al.*, 2017). L'extrait méthanolique des racines de *O. kirkii* a montré une activité antipaludique contre le *plasmodium falciparum* (Maregesi *et al.*, 2010). De plus une étude a démontré que les iso-flavonoïdes et bi flavonoïdes de *O. kirkii* sont des composés susceptibles d'être exploités en chimiothérapie anticancéreuse (Adem *et al.*, 2019). *Omocarpum, kirkii* a des activités anticancéreuses contre les cellules cancéreuses de la prostate humaine (Kamto *et al.*, 2023). Malgré les travaux qui ont été réalisés sur *Omocarpum kirkii*, à notre connaissance aucune étude n'a été menée sur le cancer du sein *in vivo*. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à vérifier si l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* contiendrait les métabolites secondaires à action bénéfique contre le cancer du sein. Dans de la présente étude il était question de démontrer les possibles effets protecteurs de l'extrait éthanolique de *Omocarpum kirkii* sur le cancer du sein induit par le DMBA chez la rate Wistar. De façon plus spécifique il était question de :

- ❖ déterminer l'activité anti-oxydante *in vitro* et la composition phytochimique de l'extrait de *Omocarpum kirkii* ;
- ❖ déterminer les effets antiprolifératifs de *Omocarpum kirkii* sur le cancer du sein, notamment sur l'incidence, le volume tumoral, la charge tumorale, histoarchitecture des tumeurs mammaires et sur un biomarqueur du cancer du sein (CA15-3) ;
- ❖ déterminer les effets de *Omocarpum kirkii* sur quelques paramètres du stress oxydatif (Catalyse, MDA, NO) et sur le taux de quelques cytokines inflammatoires (IL-10, IL-6, TNF- α , INF- γ , VEGF).



Chapitre I : REVUE DE LA LITTERATURE



I.1. Généralité sur le cancer

I.1.1. Origine

Le cancer est une maladie qui dure depuis des millénaires. Des papyrus datant de l'Égypte ancienne décrivaient déjà comment traiter ces tumeurs. Le plus connu étant le papyrus d'Edwin Smith datant de 1600 ans avant J-C, copie d'un manuscrit datant lui-même de 3000 à 2500 ans avant J-C (Weiss, 2000). L'origine du terme cancer est apparue plus tard dans la Grèce antique environ 400 ans avant JC au sein de l'école de médecine Hippocratique. Hippocrate aurait ainsi nommé "Karkinos" tout gonflement ou formation ulcéreuse et " Karkinoma" ce que nous appelons communément de nos jours « cancer » (Papavramidou *et al.*, 2010 ; Weiss, 2000). Le terme " Karkinos" en Grec signifie crabe et serait donc une analogie, la tumeur et les vaisseaux sanguins étendus autour de la tumeur représentant le corps et les pattes du crabe.

I.1.2. Définition

Le cancer peut être défini comme étant un groupe hétérogène de maladies caractérisées par un développement incontrôlé de la cellule en plusieurs étapes comprenant une prolifération, une migration, une invasion et des métastases incontrôlées (Sarkar *et al.*, 2019). En effet, le cancer est une maladie systémique qui présente initialement des manifestations locales (Zajicek, 1978) et évolue ensuite selon un processus en plusieurs étapes présentant diverses caractéristiques, notamment une prolifération rapide, une résistance à la mort cellulaire, une invasion locale et des métastases à distance (Yewei *et al.*, 2015).

I.1.3. Epidémiologie du cancer

Le cancer est un problème sociétal, de santé publique et économique majeur au 21^e siècle (Bray *et al.*, 2024). En 2022, près de 20 millions de nouveau cas de cancer ont été recensés dans le monde avec environ 9,7 millions de décès (GLOBOCAN, 2022 ; Bray *et al.*, 2024). D'après l'OMS, plus de 35 millions de nouveaux cas de cancer devraient être enregistrés en 2050, soit une augmentation de 77 % par rapport aux 20 millions de cas estimés en 2022 si rien n'est fait. Environ une personne sur cinq développe cette maladie au cours de sa vie et environ un homme sur neuf et une femme sur 12 en meurent (OMS, 2024). En Afrique, on a enregistré 1 180 000 de nouveau cas en 2022 et 756 600 de décès la même année (Bray *et al.*, 2024). Le Cameroun a enregistré environ 19 564 nouveaux cas de cancer avec 12 798 décès en 2022 avec une incidence estimée à 43 618 nouveaux cas d'ici 5 ans si aucune mesure n'est prise (Bray *et al.*, 2024).

I.1.4. Types de cancer

Plus d'une centaine de cancer sont dénombrés en fonction du tissu ou de l'organe affecté. D'après l'OMS, les plus courants sont : le cancer du poumon, le cancer du sein et le cancer colorectal (Bray *et al*, 2024) (Figure 1).

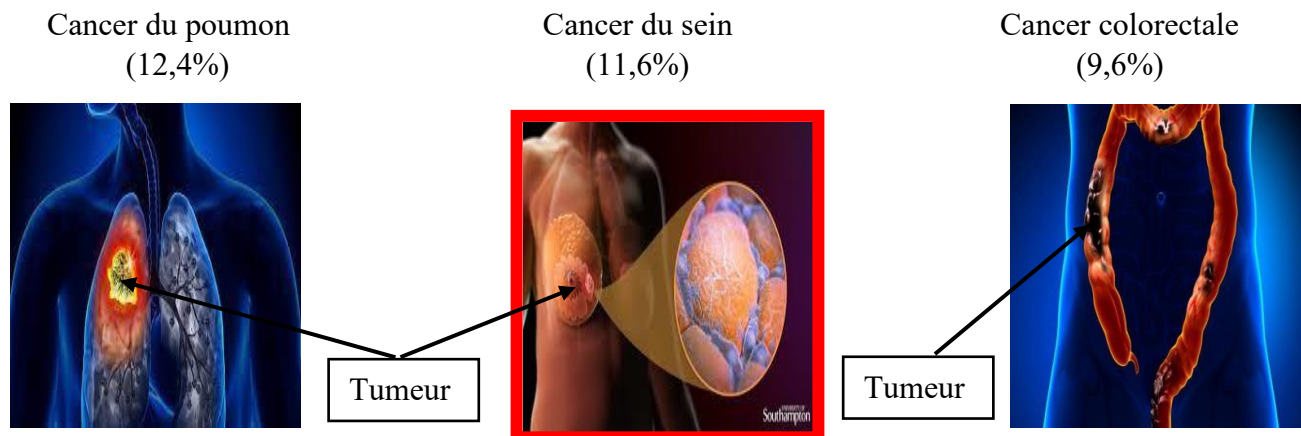


Figure 1: Types de cancers les plus courants.

I.2. Généralité sur le cancer du sein

I.2.1. Anatomie du sein

Le sein est composé d'une glande mammaire, de fibres de soutien (ligaments de Cooper) et de graisse (tissu adipeux), le tout recouvert par la peau (Figure 2). Il est situé par-dessus le muscle pectoral et on y trouve également des nerfs, des vaisseaux sanguin et lymphatique. La glande mammaire est divisée en 15 à 20 sections qu'on appelle lobes, composés de lobules, ceux-ci reliés à des canaux qui se rendent sous le mamelon (situé au centre du sein). On peut également observer des chaînes de ganglions lymphatiques qui filtrent les microbes et protègent le corps contre l'infection et la maladie. Le cancer du sein peut se développer tant au niveau d'un canal galactophore que d'un lobule et il peut également se retrouver au niveau des ganglions lymphatiques (Pandya et Moore, 2011).

I.2.2. Définition

Un cancer du sein est une maladie qui se développe à partir des cellules qui constituent la glande mammaire. Une cellule initialement normale se transforme et se multiplie de façon anarchique et excessive, pour former une masse appelée tumeur maligne (OMS, 2024). Le cancer du sein occupe la première place en terme d'incidence et de mortalité liée au cancer chez la femme dans le monde. Chaque année on estime qu'un million de femme dans le monde sont diagnostiqués d'un cancer du sein et que plus de 410000 sont susceptibles de mourir de cette pathologie (Frikha et Chlif, 2021).

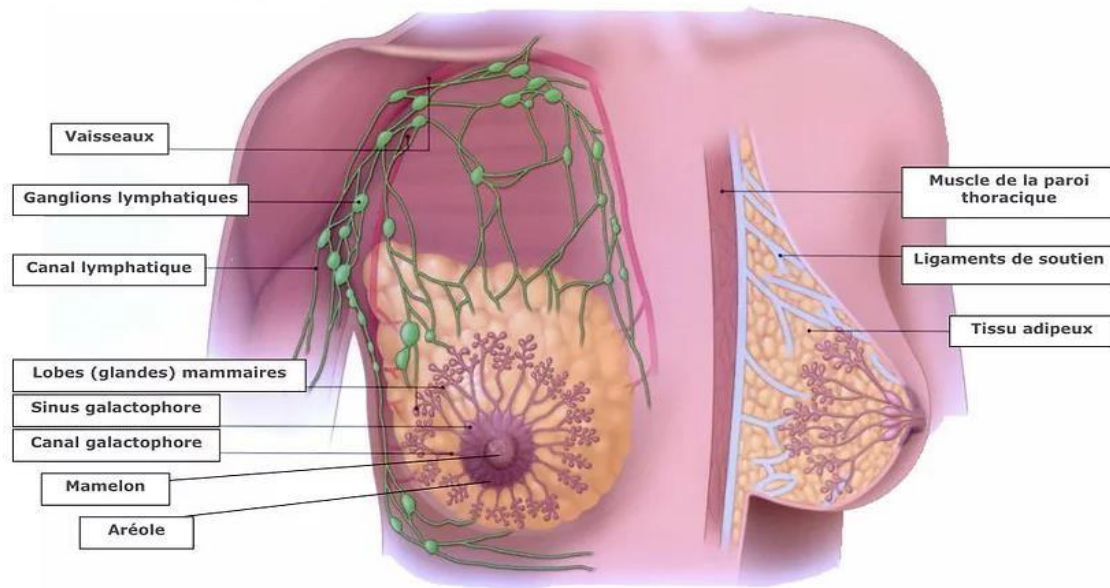


Figure 2: Anatomie du sein.

I.2.3. Épidémiologie du cancer du sein

Le cancer du sein demeure l'un des problèmes de santé les plus marquants chez la femme dans le monde (Sharma, 2019). Présent dans tous les pays, le cancer du sein touche les femmes de tout âge à partir de la puberté, mais son incidence croît au fur et à mesure que l'âge avance (OMS, 2024). Il représente le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme à travers le monde, le nombre de nouveaux cas étant estimé à plus de 2,3 millions en 2022 avec environ 665 684 décès (Bray *et al.*, 2024). L'Afrique détient le taux le plus élevé de mortalité par le cancer du sein avec 91 252 décès et 198 553 cas recensés (OMS, 2022). Au Cameroun le cancer du sein est le plus fréquent avec près de 4 207 nouveaux cas diagnostiqués et 2 285 décès en 2022 soit une augmentation de 20% (OMS, 2022).

I.2.4. Cancérogenèse mammaire

I.2.4.1. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses développent les mécanismes d'échappement aux défenses de l'organisme par la sécrétion des substances qui induisent en erreur certains systèmes de défense de l'organisme (Figure 3). Les cellules cancéreuses ont plusieurs caractéristiques qui les distinguent des cellules normales à savoir :

- altérations génétiques : qui peuvent être responsables de leur transformation maligne ;
- résistance à la mort cellulaire : les cellules cancéreuses peuvent éviter la mort cellulaire programme (apoptose) ;

- la prolifération incontrôlée : les cellules cancéreuses se multiplient de manière incontrôlée et rapide ce qui entraîne la formation des tumeurs ;
- angiogenèse : les cellules cancéreuses stimulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour assurer un apport en nutriments et oxygène à la tumeur ;
- échappement au système immunitaire : elles peuvent échapper à la reconnaissance et l'élimination par le système immunitaire, ce qui leur permet de se développer ;
- invasion et métastase : elles ont la capacité d'envahir les tissus environnants et de se propager à d'autres parties du corps, formant ainsi des métastases (Fouad et Aanei, 2017 ; Hanahan et Weinberg, 2011).

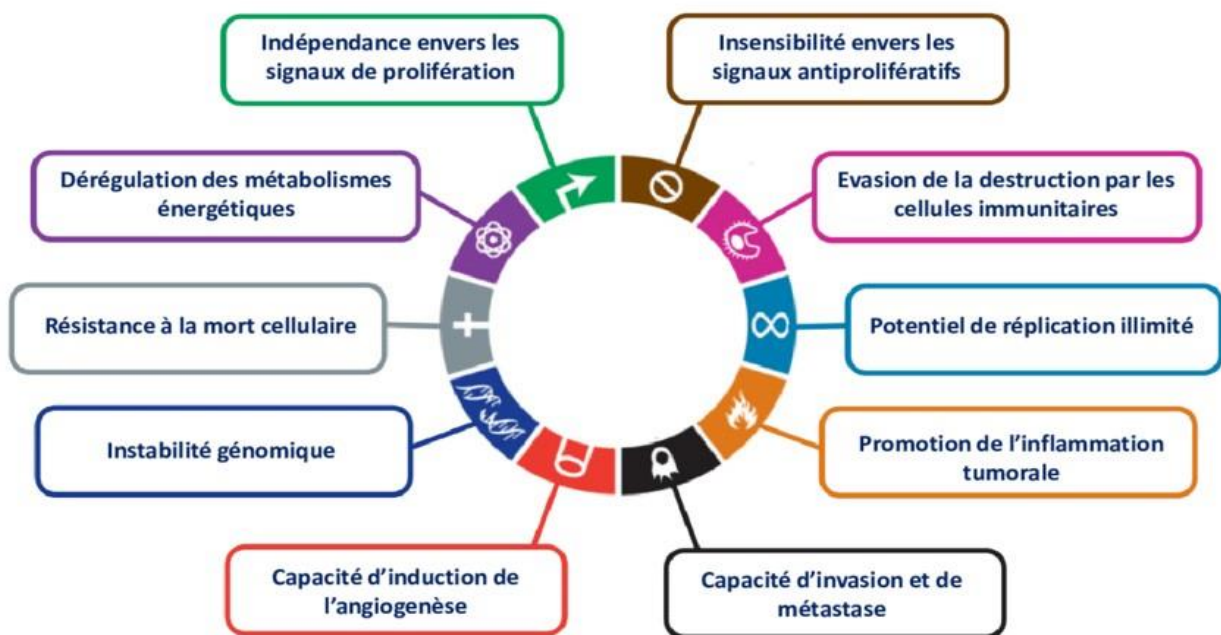


Figure 3: Caractéristiques des cellules tumorales (Hanahan et Weinberg, 2011).

I.2.4.2. Etapes de la cancérogénèse

La cancérogénèse est le processus par lequel une cellule normale devient cancéreuse. Elle passe généralement par trois étapes, à savoir l'initiation, la promotion et la progression (Figure 4). Ainsi donc :

❖ L'initiation

C'est une étape ponctuelle correspondant à l'altération du génome d'une cellule normale lui conférant la propriété d'échapper aux régulations cellulaires : Altérations de l'ADN d'origine endogène (erreurs au cours de la duplication de l'ADN), effet des radicaux libres sur l'ADN, altérations induites par des facteurs environnementaux cancérogènes (Petrović, 2016).

❖ La promotion

C'est une phase relativement longue au cours de laquelle la cellule initiée va proliférer et conduire progressivement au développement de cellules mutées. Divers facteurs endogènes

(facteurs de croissance et hormones) ou exogènes (toxiques chimiques, facteurs alimentaires, etc.), du fait de leur action répétitive, vont déréguler certains des mécanismes qui contrôlent la multiplication cellulaire (Hennings *et al.*, 1993). Cette deuxième phase de la cancérogenèse se termine quand un clone de cellules initiées est devenu capable d'échapper au contrôle tissulaire pour entrer dans la troisième phase.

❖ La progression

Cette étape est caractérisée par l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, de perte de différenciation, de l'invasion locale et métastatique. La progression est une étape irréversible caractérisée par une instabilité génétique résultant des mutations et de la prolifération cellulaire accompagnée d'une croissance cellulaire rapide et d'un phénomène d'invasion. Les cellules échappent aux différents processus de contrôle cellulaire (Faucet-Marquis, 2005) et peuvent migrer *via* la voie sanguine ou lymphatique vers d'autres tissus de l'organisme, où elles se fixent et développent des métastases.

❖ Invasion tumorale

Les cancers métastatiques sont responsables de plus de 90% des décès liés au cancer (Steeg, 2006). Cette étape implique une série d'événements appelée « cascade invasion-métastases ». Pour que les cellules cancéreuses migrent vers d'autres sites distants, elles doivent : envahir à travers la matrice extracellulaire (MEC), s'infiltrer dans le système vasculaire tumoral, s'extravaser au niveau du parenchyme des organes distants et manipuler les microenvironnements étrangers formant des micro-métastases, qui peuvent se développer en macro-métastases (Massagué *et al.*, 2016).

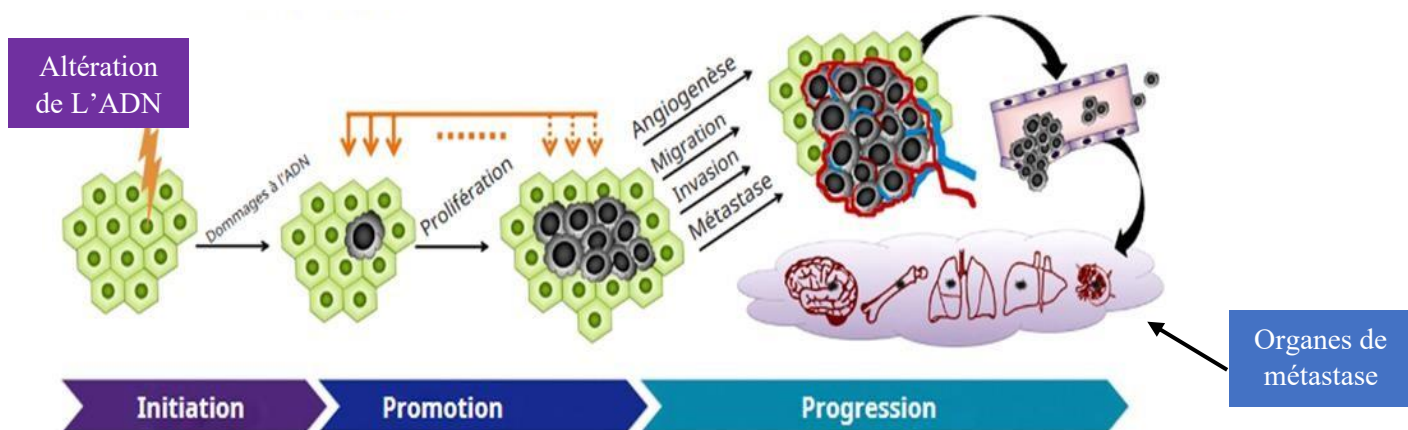


Figure 4: Différentes étapes de la cancérogenèse.

I.2.4.3. Angiogenèse

Les tumeurs sont constituées de cellules qui ont besoin d'oxygène et de nutriments comme les cellules saines du corps. L'angiogenèse tumorale désigne la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui alimentent une tumeur en nutriments et en oxygène. Les cellules

cancéreuses ont des besoins particulièrement élevés et nécessite donc de leur propre approvisionnement en sang. Afin d'assurer un traitement optimal, la tumeur libère le facteur de croissance VEGF ("vascular Endothelial Growth Factor"), qui stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Cuenod et Lartigau, 2004).

I.2.4.4. Inflammation et cancer

L'inflammation fait partir de la réponse du corps aux stimuli environnementaux interne et externe qui éliminent normalement l'agent agresseur et rétablissent la physiologie des tissus. Toutefois, lorsque cette condition devient chronique, elle peut engendrer diverses affections telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies auto-immunes l'Alzheimer et le cancer. De nos jours, les informations épidémiologiques révèlent que plus de 25% de tous les cancers sont associés à des infections chroniques et à d'autres formes d'inflammation non résolues (Vendramini-costa et Ecarvalho, 2012). Une inflammation chronique entraîne un remodelage tissulaire excessif, une perte de l'architecture tissulaire et des modifications de l'ADN et des protéines dues au stress oxydatif, tout cela augmentant les risques de développement d'un cancer (Visser *et al*, 2006). Les cytokines jouent un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire et immunitaire en remplissant différentes fonctions cellulaires. Elles sont produites en réponse aux blessures causées par les agents cancérogènes, les infections et l'inflammation. Au départ, leur fonction consiste à réduire les dommages et à encourager la réparation des tissus. Cependant, dans les maladies chroniques, leur production continue contribuera à la formation et à l'évolution des tumeurs (Dranoff, 2004). Elles sont classées comme pro inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) et antiinflammatoires (IL-10, TGF- β , IFN- γ) (Figure 5).

❖ Les cytokines pro-inflammatoires

Dans ce groupe on retrouve :

- IL-1 (interleukine 1), cytokine pro-inflammatoire qui peut favoriser la croissance tumorale en activant la voie de signalisation NF-K β ("Nuclear Factor-Kappa "b) et en induisant la production d'autres médiateurs inflammatoires. Elle peut également favoriser l'angiogenèse et la migration des cellules cancéreuses (Voronov *et al.*, 2003).
- IL-6 (interleukine 6), cytokine pro-inflammatoire qui favorise la croissance et la survie des cellules tumorales en activant la voie de signalisation STAT3("Signal Transducer and Activator of Transcription"3). Elle peut également stimuler l'angiogenèse et inhiber l'apoptose des cellules cancéreuses (Bromberg et Wang, 2009).

- $\text{TNF-}\alpha$ ("Tumor Necrosis Factor" α), cette cytokine pro-inflammatoire peut favoriser la survie des cellules tumorales, l'invasion et la métastase dans le cancer du sein (Vendramini-costa et Ecarvalho, 2012).

❖ Les cytokines anti-inflammatoires

Dans ce groupe on retrouve :

- IL-10 (interleukine 10), c'est une cytokine anti-inflammatoire qui est souvent étudiée pour son rôle dans la modulation de la réponse immunitaire et de l'inflammation dans le microenvironnement tumoral. Dans le cancer du sein, l'IL-10 peut être impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale et dans la promotion d'un environnement immunosuppresseur qui favorise la croissance tumorale.

- $\text{TGF-}\beta$ ("Transforming Growth Factor" β), est une cytokine multifonctionnelle qui peut avoir des effets contradictoires sur la cancérogenèse en fonction du stade du cancer. Les cellules humaines sont sensibles au TGF, ce qui permet de maintenir l'équilibre des tissus et de prévenir l'évolution de la tumeur vers des états malins. Il régule non seulement la prolifération, la différenciation, la survie et l'adhésion cellulaire, mais aussi le microenvironnement cellulaire (Massagué, 2008 ; Bieri et Moses, 2006).

- $\text{INF-}\gamma$ (interféron-gamma), est une cytokine qui régule les processus moléculaire, cellulaire et physiologique qui régissent les réponses immunitaires. Il peut contribuer à la suppression de la croissance tumorale en favorisant l'activation des cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles, qui peuvent cibler et détruire les cellules cancéreuses (McNab *et al.*, 2015).

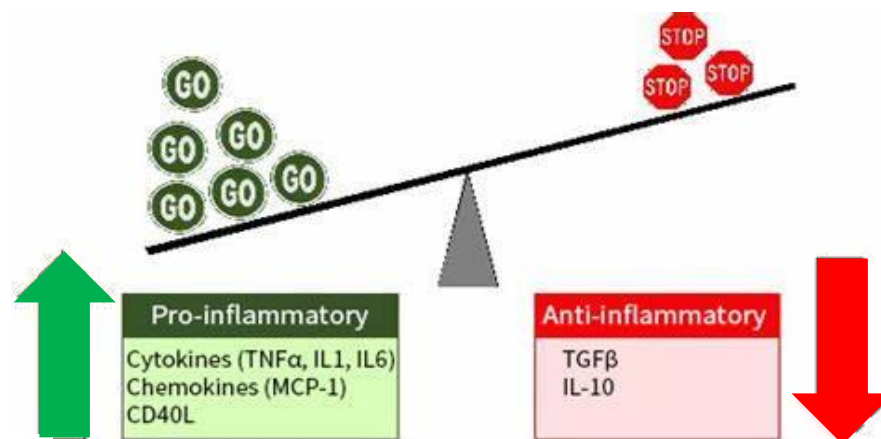


Figure 5: Déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires.

I.2.4.5. Stress oxydatif et cancer

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité des cellules à neutraliser ces espèces réactives (Pisosch et Pop, 2015). Ce déséquilibre survient lorsque les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont supérieurs aux antioxydants ce qui peut entraîner des dommages cellulaires, notamment des lésions à l'ADN, des altérations des protéines et des lipides, avec pour conséquence le développement du cancer (Jelic *et al.*, 2021) (figure 6).

Les rayonnements ionisants et certains agents environnementaux, substances chimiques, alcool, aliments, tabac, agents chimiothérapeutiques et agents infectieux contribuent à la production de ERO (Birben *et al.*, 2012). Une concentration élevée en ERO activera les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques tels que le glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase, la catalase qui sont les enzymes responsables de la première ligne de défense contre le stress oxydatif (Ighodaro et Akinloye, 2018).

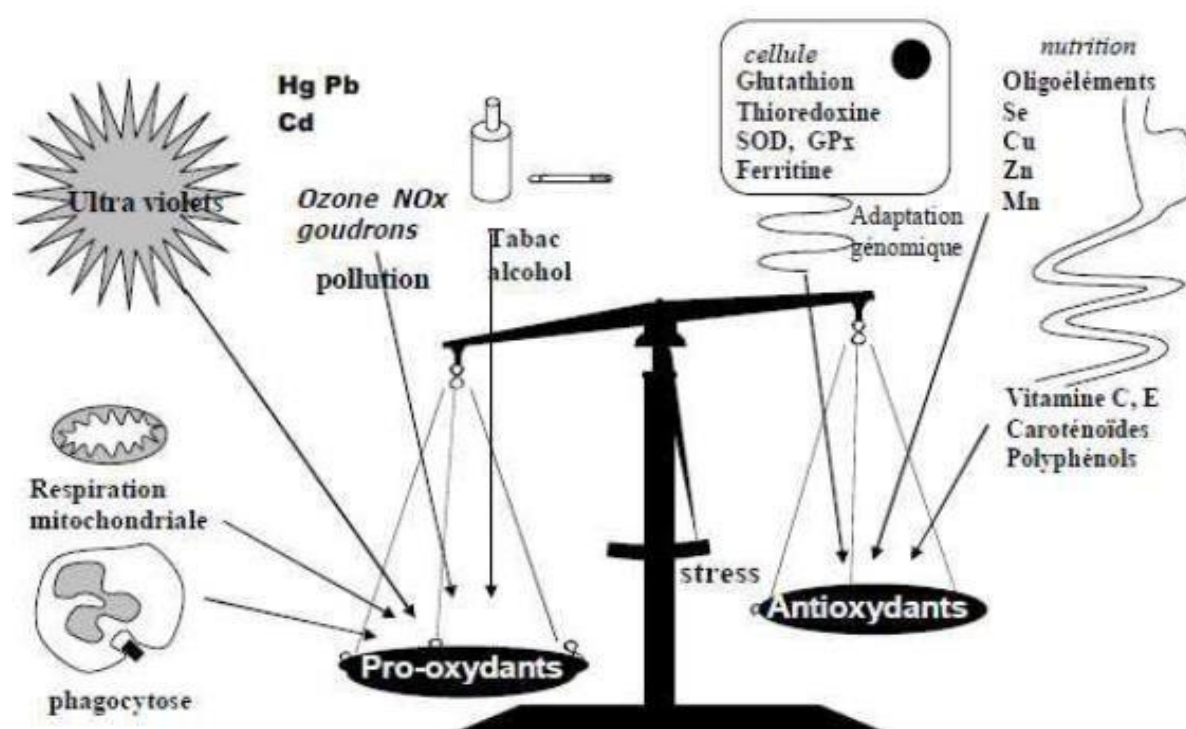


Figure 6: Balance d'équilibre entre les systèmes pro- et anti-oxydants.

I.2.5. Types histologiques des cancers

Les différentes formes de cancers suivant l'organe et le site de développement de maladie sont (ALLIAM, 2017) :

❖ Carcinomes

Ils 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 ; les adénocarcinomes, nés d'un épithélium glandulaire ferme.

❖ **Sarcomes**

Ces derniers se développent aux dépens des cellules du tissu conjonctif assurant le lien entre les éléments d'un même organe et occupant la fonction de remplissage et de soutien (os, muscle, graisse).

❖ **Cancers hématopoïétiques**

Ces types de cancers présentent trois sous-groupes à savoir : les leucémies qui affectent les cellules du sang ; les lymphomes touchant les cellules lymphatiques (ganglions) ; les myélomes caractérisés par une prolifération de certains types de globules blancs dans la moelle osseuse.

I.2.6. Types histologiques des tumeurs mammaires

Selon les travaux antérieurs, la majorité des cancers du sein naît de la jonction entre le canal galactophore terminale et les lobules. Le type histologique des cancers est un élément important pour la prise en charge thérapeutique et le pronostic de la maladie on distingue :

I.2.6.1. Cancer du sein *in situ* ou intraépithéliale

Les cancers du sein *in situ* représentent 15 à 20% des nouveaux cancers du sein. On distingue dans cette classe les carcinomes canauxiaux *in situ* (CCIS) et les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS) (Cutuli *et al.*, 2010). Il s'agit des cancers qui ne sont pas étendus hors du lobule ou des canaux où ils se trouvent (Vranso West *et al.*, 2017).

❖ **Carcinomes canauxiaux *in situ* (CCIS)**

Ils représentent 85 à 90% des cancers du sein *in situ* (Azaïs *et al.*, 2019) et sont caractérisés par une prolifération des cellules malignes à l'intérieur des canaux galactophores sans franchissement de la membrane basale (Azria *et al.*, 2008).

❖ **Carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS)**

Ils représentent environ 10 à 15% des cancers du sein *in situ*, soit approximativement 0,5 à 3,8% de l'ensemble des cancers du sein. Il est dû à l'accumulation des cellules anormales dans les lobules.

I.2.6.2. Cancer du sein invasif ou infiltrant

Ce type de cancer se produit lorsque des cellules anormales provenant des lobules ou des canaux lactifères se détachent immédiatement à proximité du tissu mammaire (Harris *et al.*, 2016). Les cellules cancéreuses peuvent passer du sein à différentes parties du corps par le biais

du système immunitaire ou de la circulation systémique (Zipperstein *et al.*, 2016). Ils sont généralement appelés cancer métastatique (Stevanovic *et al.*, 2006). On distingue le carcinome lobulaire infiltrant et le carcinome canalaire infiltrant.

❖ **Le carcinome lobulaire infiltrant (CLI)**

Il représente 5 à 15% de tous les cancers du sein (Sastre-Garau *et al.*, 1996). Il est moins fréquent que le carcinome canalaire infiltrant (CCI) (Rakha *et al.*, 2008). Le CLI prend naissance dans les glandes lactiques (lobules) du sein, mais s'étend fréquemment à d'autres parties du corps (Arpino *et al.*, 2004).

❖ **Le carcinome canalaire infiltrant (CCI)**

Il représente 70% à 80% des cancers infiltrants, et prend généralement naissance dans les canaux lactifères du sein et s'étend à la paroi du canal envahissant les tissus graisseux du sein et potentiellement d'autres parties du corps (Somari *et al.*, 2003).

Il existe d'autres types de cancer infiltrant aux nombres desquels les cancers médullaires, les carcinomes muqueux et le carcinome tubulaire (Priya *et al.*, 2017).

I.2.7. Facteurs de risques du cancer

Le cancer du sein est une maladie complexe qui peut être influencée par de nombreux facteurs de risque. Ils peuvent être classés en 4 catégories à savoir : les facteurs hormonaux, les facteurs génétiques, les facteurs liés au mode de vie et les facteurs environnementaux.

I.2.7.1. Facteurs hormonaux

❖ **Œstrogènes endogènes et exogènes**

Le risque de cancer du sein est lié aux œstrogènes endogènes et exogènes. Chez les femmes préménopausées, l'ovaire produit habituellement de l'œstrogène endogène et l'ovariectomie peut diminuer le risque de cancer du sein (Endogenous *et al.*, 2013). Le traitement hormonal substitutif et les contraceptifs oraux sont les principales sources d'œstrogènes exogènes. Depuis les années 1960, les contraceptifs oraux sont couramment employés et les formulations ont été améliorées afin de diminuer les effets secondaires (Soroush *et al.*, 2016).

❖ **L'âge et le sexe**

Le sexe et le vieillissement sont parmi les principaux facteurs de risque de développer le cancer du sein, car l'incidence du cancer du sein est fortement corrélée à l'âge (Siegel et Jemal, 2017). Le cancer du sein chez l'homme est rare, représentant environ 1% de tous les cancers du sein et moins de 1% de tous les néoplasies chez l'homme (Elbachiri *et al.*, 2017).

❖ **Menstruations précoces et ménopause tardive**

Le risque de contracter un cancer du sein est linéairement augmenté lorsque l'âge de la première menstruation augmente. Le risque de développer un cancer du sein est environ 20%

plus élevé chez les filles qui commencent à avoir leurs règles avant l'âge de 11 ans, par rapport à celles qui commencent à 13 ans (Masi *et al.*, 2017).

Le risque de cancer du sein est plus élevé chez les femmes qui sont ménopausées après 50 ans, par rapport à celles dont les menstruations cessent précocement. Chaque année supplémentaire, le risque de cancer du sein augmente d'environ 3%, à partir de l'âge présumé de la ménopause (Collaborative Group, 1997).

I.2.7.2. Facteurs génétiques

De nombreux gènes ont été incriminés dans l'éthologie du cancer du sein. Les mutations et l'amplification anormale des oncogènes et des anti-oncogènes jouent un rôle clé dans les processus d'initiation et de progression tumorales. Les gènes BRCA1 et BRCA2 sont deux oncogènes célèbres pour le risque de survenue du cancer du sein. BRCA1 et BRCA2 sont situés respectivement sur les chromosomes 17q21 et 13q12. Ils codent tous les deux pour des protéines suppresseurs de tumeurs. Le déficit en BRCA1 entraîne une dérégulation du point de contrôle du cycle cellulaire, une duplication anormale du centrosome, une instabilité génétique et éventuellement une apoptose (Dine et Deng, 2013). Une mutation seulement sur le gène BRCA2 est associée uniquement à une augmentation du risque du cancer du sein.

I.2.7.3. Facteurs liés au mode vie

❖ L'alcoolisme

Un mode de vie tel que la consommation excessive d'alcool peut élever le niveau d'hormones liées aux œstrogènes dans le sang et déclencher les voies des récepteurs des œstrogènes (Kungu *et al.*, 2002). De plus les femmes ayant un cancer du sein, et consommant au moins une boisson alcoolique par jour, ont une durée de survie diminuée de 15% à 40%, comparativement à celles qui ne boivent pas d'alcool (Feigelson *et al.*, 2001).

❖ Le tabagisme

Bien que la relation entre le tabagisme et le risque de cancer du sein demeure controversée, des mutagènes de la fumée de cigarette ont été détectés dans le liquide mammaire de femmes non allaitantes. Le risque de cancer du sein est également élevé chez les femmes qui fument et boivent (Risque relatif = 1,54) (Knight *et al.*, 2017). Jusqu'à présent, de nombreuses preuves démontrent que le tabagisme, en particulier à un âge précoce, présente un risque plus élevé de survenue d'un cancer du sein (Khalis, 2019).

❖ L'alimentation

Une alimentation riche en graisse (acides gras saturés), en viandes rouges et/ou transformées et pauvre en légumes est associée à un risque élevé de développer un cancer du sein (Makarem *et al.*, 2013).

I.2.7.4. Facteurs environnementaux

Le sein est l'un des organes qui est le plus vulnérable aux radiations. De plus, il a été démontré que l'exposition aux radiations ionisantes avant l'âge de 40 ans est liée à un risque de cancer du sein multiplié par trois (Key *et al.*, 2001). Le risque de cancer du sein est lié à l'exposition professionnelle et à l'exposition aux substances chimiques telles que l'arsenic présent dans l'eau de boisson et le benzène présent dans l'air intérieur (Carretier, 2020).

I.2.7.5. Autres facteurs

❖ Age précoce à la première maternité

Les femmes qui ont mené au moins une grossesse à terme avant l'âge de 30 ans présentent, en moyenne, un risque de cancer du sein diminué de 25% par rapport aux femmes nullipare (Layde *et al.*, 1989). Les femmes qui ont eu de huit à neuf accouchements présentent des risques réduits d'environ 30%, en comparaison avec celles qui ont eu cinq accouchements (Hinkula *et al.*, 2001).

❖ Allaitement naturel

L'effet de l'allaitement sur le risque de cancer du sein est controversé, probablement parce que la modification du risque, compte tenu de la durée moyenne de l'allaitement est faible. Les femmes qui ont allaité pendant une durée totale d'au moins 25 mois présentent un risque réduit de 33%, par rapport à celles qui n'ont jamais allaité (Collaborative Group, 2002).

I.2.8. Symptômes du cancer du sein

Les symptômes les plus fréquents que peuvent ressentir les personnes atteintes du cancer du sein sont les suivants :

- ❖ une boule dans le sein, c'est le signe le plus fréquent. Il s'agit d'une masse dure et non douloureuse avec des contours non réguliers ;
- ❖ des modifications au niveau du mamelon qui se rétracte en changeant de couleur. Il peut aussi être observer un écoulement au niveau du mamelon ;
- ❖ des modifications au niveau de la peau du sein, la peau prend un aspect de peau d'orange, se rétracte et devient rouge ;
- ❖ présence de ganglions axillaires (au niveau de l'aisselle ou alors sous le bras), c'est le signe d'une propagation des cellules cancéreuses ;

- ❖ changements au niveau de la forme et de la taille du sein avec l'apparition des signes inflammatoires comme une rougeur, chaleur, œdème au niveau du sein (Koo *et al.*, 2017).

I.2.9. Techniques de détection médicale du cancer du sein

La détection médicale du cancer du sein implique divers tests et procédures visant à identifier la présence d'un cancer dans le tissu mammaire. Ces tests sont essentiels pour un diagnostic et un traitement précoce. Les méthodes courantes de détection du cancer du sein sont les suivantes.

❖ Mammographie

C'est l'examen de dépistage le plus courant pour le cancer du sein. Il consiste en une radiographie des seins qui peut détecter des anomalies telles que des masses ou des microcalcifications (Delaloge *et al.*, 2016).

❖ Echographie mammaire

Technique d'imagerie médicale qui utilise des ondes sonores pour produire des images des tissus mammaires. Elle peut être utilisée comme complément à la mammographie dans le dépistage du cancer du sein, en particulier chez les femmes présentant des seins denses ou chez les femmes jeunes (Berg *et al.*, 2008).

❖ Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM joue un rôle crucial dans la détection du cancer du sein. Il s'agit d'un outil de diagnostic puissant qui utilise des ondes radio et des aimants puissants pour créer des images détaillées du tissu mammaire (Fowler et Strigel, 2022). Elle peut être utilisée comme complément à la mammographie et à l'échographie dans le dépistage du cancer du sein, en particulier chez les femmes à haut risque ou présentant des seins denses.

❖ Biopsie

Il est généralement considéré que la biopsie mammaire assistée par aspiration est plus simple à effectuer que la cytoponction, car elle utilise une aiguille plus fine et un système plus léger. La consultation est basée sur une échographie qui se concentre sur le nombre d'échantillons et le volume de tissu à saisir (Nakano *et al.*, 2018).

❖ Détection de la protéine CA15-3 (antigène glucidique 15-3)

Le CA15-3, également connu sous le nom d'antigène glucidique 15-3, c'est la protéine mucine 1 qui est présente à la surface des cellules cancéreuses du sein. Le dosage sanguin du CA15-3 est un test utilisé pour surveiller la progression du cancer du sein chez les personnes déjà diagnostiquées (Elakkiya *et al.*, 2017).

Pour résoudre ce problème de santé mondiale la médecine modernes propose plusieurs traitements conventionnels.

I.2.10. Traitements conventionnels

Le traitement du cancer du sein peut être divisé en deux grandes catégories : les traitements localisés et les traitements systémiques.

I.2.10.1. Traitements localisés

Ils peuvent être administrés seul ou en combinaison. Il s'agit de :

❖ La chirurgie

La chirurgie est souvent le premier traitement pour le cancer du sein. Elle peut consister en une tumorectomie (ablation de la tumeur), une mastectomie partielle ou totale (ablation partielle ou totale du sein) ou une mastectomie avec reconstruction mammaire (Doridot *et al.*, 2004).

❖ Radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayons X de haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses restantes après la chirurgie, réduire le risque de récurrence locale et traiter les métastases osseuses (Hennequin *et al.*, 2016).

❖ Thérapie ciblée

La thérapie ciblée agit de manière plus générale en tuant les cellules qui se divisent rapidement (y compris les cellules saines), elle vise des altérations spécifiques des cellules cancéreuses. Ces altérations peuvent être des mutations génétiques ou des protéines spécifiques présentes à la surface des cellules cancéreuses (Beddok *et al.*, 2023).

I.2.10.2. Traitements systémiques

Ils sont associés au plus grand nombre d'effets secondaires indésirables. Il s'agit de :

❖ Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'administration de médicaments anticancéreux par voie intraveineuse ou orale pour détruire les cellules cancéreuses qui se sont propagées dans d'autres parties du corps (Kahlain, 2004).

❖ Hormonothérapie

Pour les cancers hormono-dépendants comme celui du sein, l'hormonothérapie vise à bloquer l'action des hormones (œstrogènes et progestérone) sur les cellules cancéreuses. Ainsi le traitement par hormonothérapie permet de bloquer la synthèse et l'activité de ces récepteurs afin de diminuer le risque de récurrence locale dans le sein opéré, d'atteinte du sein controlatérale, une évolution généralisée sous la forme de métastase (Delozier, 2010). Les médicaments les plus fréquents sur le marché sont :

- Tamoxifène : il est utilisé depuis plusieurs années comme pharmacoprévention rentable chez les femmes qui présentent un risque élevé de cancer de sein ou qui ont déjà reçu un diagnostic de carcinome canalaire ou lobulaire *in situ* (Rossi *et al.*, 2019).
- Letrozole : qui est un inhibiteur de l'aromatase considérée comme le traitement de première intention du cancer du sein sensible aux œstrogènes à récepteurs d'œstrogènes positifs chez les femmes ménopausées (Patel *et al.*, 2021).

❖ Immunothérapie

L'immunothérapie vise à stimuler le système immunitaire du patient pour qu'il reconnaisse et attaque les cellules cancéreuses. Elle peut inclure l'utilisation d'anticorps monoclonaux, de vaccins thérapeutiques ou de cellules immunitaires modifiées (Verret et Loirat, 2016).

I.2.11. Limites des traitements conventionnels

Bien que tous ces traitements conventionnels disponibles soient essentiels, leurs efficacités ne sont souvent que partielles, surtout sur le long terme, avec un coût élevé qui les rends inaccessibles aux populations. Les principales limites recensées sont :

- ❖ La chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie tuent les cellules cancéreuses actives, mais ne détruisent pas les cellules souches cancéreuses qui peuvent être à l'origine de rechutes et métastases (McDermott et Wicha, 2010).
- ❖ Les thérapies systémiques comme la chimiothérapie sont toxiques et souvent accompagnées d'effets secondaires significatifs pouvant diminuer la qualité de vie (Ezeome & Anarado, 2018).
- ❖ Le risque de développer une résistance au traitement est élevé. Certaines cellules deviennent résistantes aux médicaments et se multiplient à nouveau (Holohan *et al.*, 2013).
- ❖ Le coût élevé des traitements conventionnels contre le cancer du sein constitue définitivement une barrière importante, surtout dans les pays en développement. Selon une étude publiée dans la revue médicale "The Lancet" (Aggarwal *et al.*, 2015), le fardeau économique de la maladie est exacerbé dans les pays à revenu faible et intermédiaire où le coût des soins est souvent payé directement par les patients.

I.2.12. Chimio-prévention du cancer du sein

La chimio-prévention des cancers consiste à administrer des substances naturelles ou composés synthétiques afin de prévenir, inhiber ou retarder leur développement (Desmetz *et al.*, 2018).

Étant donné la complexité du dépistage et du traitement du cancer du sein, les mesures de prévention prennent toute leur importance, notamment la sensibilisation de la population à l'hygiène de vie et aux comportements à risque (Reece *et al.*, 2012). De plus, certains gestes tels que l'autopalpation des seins et la chimioprévention deviennent de plus en plus efficaces pour lutter contre le cancer du sein (Alugoju *et al.*, 2021). La recherche scientifique sur les agents anticancéreux est devenue croissante dans le monde. L'une des stratégies communément utilisées est l'isolement des composés bioactifs des plantes et la synthèse des analogues structuraux des composés dérivés de plante, en s'inspirant de leurs usages en médecine traditionnelle (Ko et Aree, 2015). Ainsi, les plantes médicinales et les composés dérivés des plantes sont utilisés pour des propriétés anticancéreuses afin de fournir à la médecine moderne une efficacité thérapeutique et préventive.

D'importants effets anticancéreux ont été démontrés par les flavonoïdes contre différents modèles de cancer, tant *in vitro* qu'*in vivo*, en régulant les principales voies de signalisation impliquées dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, ainsi que dans la progression métastatique (Liskova *et al.*, 2020). De plus les composés phénoliques sont devenus de plus en plus importants en tant que potentiels composés anticancéreux. Les composés phénoliques ont un potentiel considérable comme des agents anticancéreux cytotoxiques qui favorisent l'apoptose, réduisent la prolifération et ciblent différents aspects du cancer (angiogenèse, croissance et différenciation, ainsi que métastases) (Abotaleb *et al.*, 2020).

Pour apporter notre pierre à cet édifice nous nous sommes intéressés à *Omocarpum kirkii*.

I.3. *Omocarpum kirkii*

I.3.1. Origine et distribution géographique

Omocarpum kirkii est une plante de la famille des Fabaceae, encore appelé *Omocarpum bibracteatum*, principalement distribué dans les régions orientales et australes de l'Afrique (Kokwaro, 1976). En Afrique subsaharienne et au Cameroun on retrouve *Omocarpum kirkii* dans la Région de l'Adamaoua (Kamto *et al.*, 2020). En Afrique occidentale, cette plante se trouve, au Niger et au Nigeria où elle est connue sous le nom de « Tsa » en haoussa (Fulton *et al.*, 1974).

I.3.2. Classification botanique

D'après le système APG III ("Angiosperm Phylogeny Group"III), la classification ethnobotanique de *Omocarpum kirkii* est la suivante.

- ❖ Sous-genre : Plantea
- ❖ Embranchement : Trachéophytes

- ❖ Division : Magnoliophyta
- ❖ Classe : Magnoliopsida
- ❖ Ordre : Fabales
- ❖ Famille : Fabaceae
- ❖ Genre : *Omocarpum*
- ❖ Espèce : *Omocarpum kirkii* S.Moore

I.3.3. Description morphologique

Omocarpum kirkii est un arbuste ou petit arbre à écorces rugueuses et grise de 2 à 9 cm de hauteur. Les feuilles sont généralement regroupées sur des pousses latérales courtes, avec 7 à 13 paires de folioles plus une foliole terminale. Les fleurs quant à elles sont grandes et roses, en forme de pois orientées vers l'extrémité des branches.



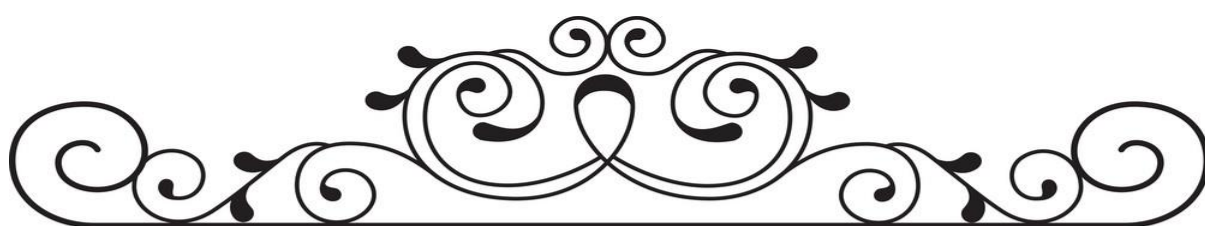
Figure 7: Photo de *Omocarpum kirkii* par Tchoupe Ngogang Harcel Brunel à Ngaoundéré dans la région de l'Adamaoua, le 18 Mai 2023.

I.3.4. Utilisation en médecine traditionnelle

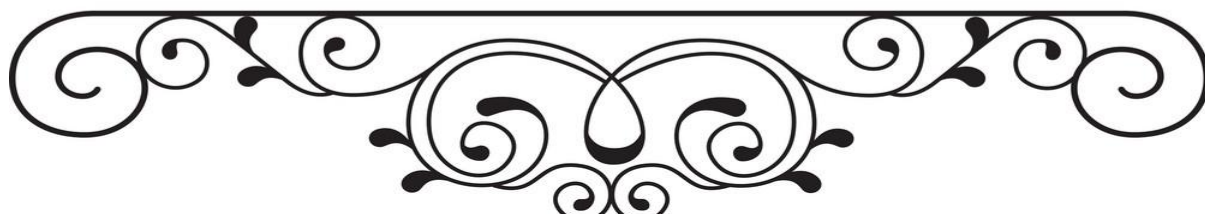
Omocarpum kirkii est couramment utilisée en médecine traditionnelle Africaine pour soigner les enflures, les affections rhumatismales, les douleurs gastriques, l'épilepsie, les hernies, les troubles digestifs, les céphalées, la fièvre et le paludisme (Chhabra *et al*, 1990 ; Maregesi *et al.*, 2007). Elle est également utilisée pour traiter l'œdème, les rhumatismes, les douleurs d'estomac et pour soulager les symptômes liés au cancer (Kokwaro, 1976).

I.3.5. Travaux pharmacologiques antérieurs réalisés avec *Omocarpum kirkii*

Plusieurs études antérieures ont été réalisées sur *Omocarpum kirkii* qui ont démontré des activités antibactérienne, antifongique et antipaludique (Kokwaro, 1976 ; Kuete *et al.*, 2019 ; Maregesi *et al.*, 2007). Des études chimiques ont révélé la présence de bi-flavonoïdes, de flavonoïdes, d'iso-flavonoïdes et de bisdihydrocoumarines dans l'extrait de *O. kirkii* (Kamto *et al.*, 2017 ; Xu *et al.*, 2012). De plus il a été démontré que *O. kirkii* possède des composés métaboliques secondaires tels que les iso-flavonoïdes et bi-flavonoïdes ayant un potentiel antiprolifératif pouvant être utilisées en chimiothérapie anticancéreuse (Adem *et al.*, 2019). Des rapports pharmacologiques antérieurs sur l'extrait méthanolique des racines de *O. kirkii* ont montrés leurs propriétés antiplasmodiales, des propriétés qui ont été attribuées aux (I-3, II-3) - biflavonoïdes et aux (I-3, II-3) -bi-4phényldihydrocoumarines (Maregesi *et al.*, 2010 ; Dhooghe *et al.*, 2010). Il a été démontré que deux composés phénoliques majoritaire de cette plante à savoir : 5,5'-di-Ô-méthyldiphysine (biscoumarine) et 7,7''-di-Ô-β-Dglucosyl(-) -chamaejasmine (biflavonoïde) ont présentés des activités inhibitrices contre les cellules cancéreuses de la prostate humaine (Kamto *et al.*, 2023) et ceci en induisant l'apoptose et inhibant la migration et l'invasion de ces cellules.



Chapitre II : MATERIEL ET METHODES



II.1. Matériel

II.1.1. Composés et réactifs

Le carcinogène mammaire 7,12 diméthylbenz(a) anthracène (DMBA, d'une pureté $\geq 98\%$), a été obtenu auprès de Sigma-Aldrich (Stanford, Allemagne), tandis que le citrate de tamoxifène (Norvatis Access®) a été obtenu 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 ELISA a été fourni par Milipore R&D systems, Inc, (Minneapolis, USA). Le kit de dosage immunoadsorption par enzyme liée (ELISA) de l'antigène du cancer 15-3 (CA 15-3) provenait de Monobind Inc® (Californie, USA). Les kits de réactifs de l'alanine transaminase (ALAT) et de la créatinine provenaient de Fortress Diagnostics Limited® (Muckamore, Royaume-Uni).

II.1.2. Collecte et identification de *Omocarpum kirkii*

Les écorces de *Omocarpum kirkii* ont été récoltées le 18 mai 2023 dans la région de l'Adamaoua (Ngaoundéré 1^{er}) à proximité du lac Tison dans l'après-midi entre 14h et 15h. La plante a ensuite été authentifiée à l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé par comparaison avec un spécimen de référence N° 40525/HNC.

II.1.3. Animaux expérimentaux

Pour cette étude, 48 rates albinos prépubères (70-80 g) de souche Wistar âgées de 40 à 45 jours ont été obtenues de l'animalerie de Physiologie Animale, Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I. Ces rates ont été élevées dans de grandes cages en plastiques en groupes de huit animaux chacun (n=8), à température ambiante. Elles avaient un accès libre à l'eau, à un régime alimentaire standard dont la composition a été consignée à l'annexe I.

II.1.4. Appareillage

II.2. Méthodes

II.2.1. Protocole d'extraction de *Omocarpum kirkii*

Une fois récoltée, l'écorce de *Omocarpum Kirkii* a été bien séchée à l'ombre pendant seize jours et broyées. Un kilogramme de poudre a été macérée dans 5 litres d'éthanol à 96°C pendant 72 heures à température ambiante, puis filtré en deux étapes (d'abord avec un tamis à mailles très fines et ensuite avec un papier filtre Whatman n°4). Le filtrat a été séché en utilisant un évaporateur rotatif à basse pression (175 mbar) à une température de 40 °C, afin de produire 48 g d'extrait brut (4,8%). Ce dernier a été conservé à 4°C (Figure 8).

Calcul du rendement :
$$R = \frac{\text{Masse de l'extrait sec (g)}}{\text{Masse de l'extrait brut (g)}} \times 100$$

$$R = \frac{48}{1000} \times 100 \longrightarrow R = 4,8 \%$$

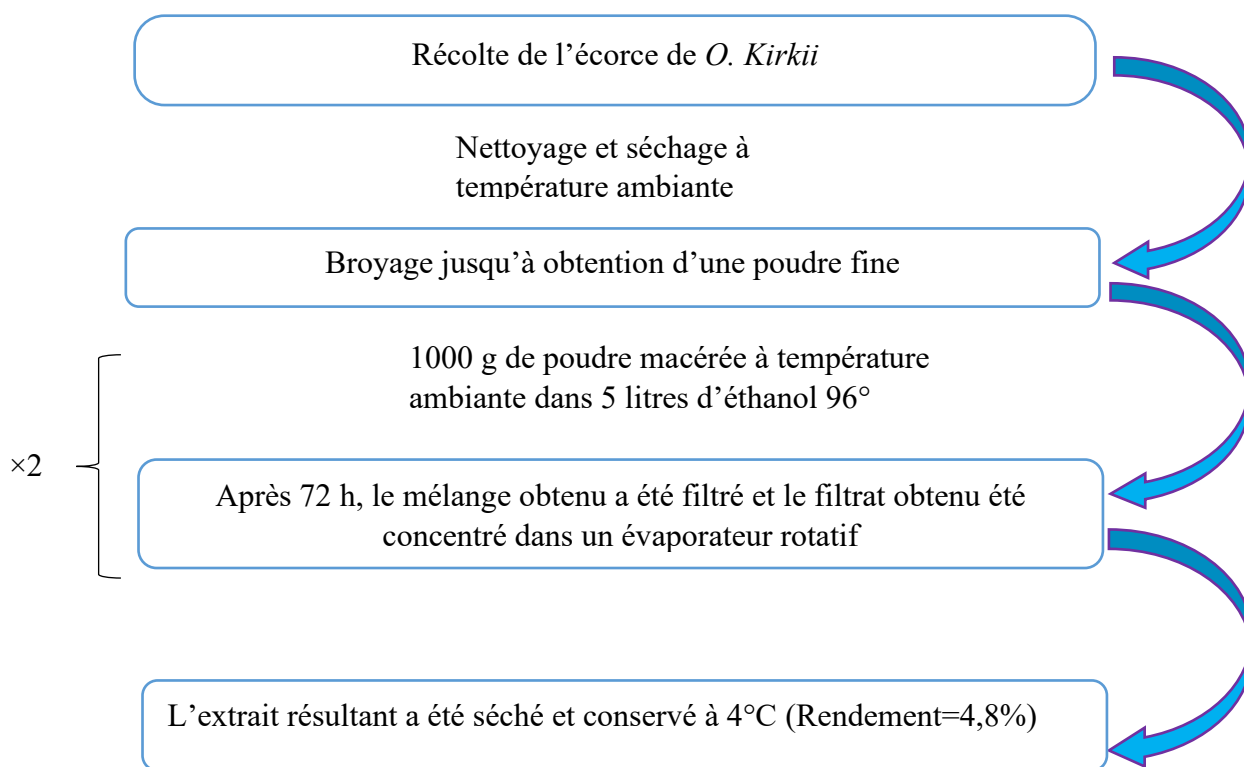


Figure 8: Protocole d'extraction de *Omocarpum kirkii*.

II.2.2. Détermination des doses

Les rates prépubères (~45 jours) ont été traitées avec le cancérigène DMBA pour développer des tumeurs mammaires à une dose de 50 mg/kg PC (Ramachandran *et al.*, 2017). Le médicament de référence a été le tamoxifène (TAMOX), un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (MSRO), administré à une dose de 3,3 mg/kg PC (Maltoni *et al.*, 1997). En ce qui concerne l'extrait éthanolique des écorces de *Omocarpum kirkii* les différentes doses ont été choisies en référence aux doses thérapeutiques généralement utilisées (OK50, OK100, OK200 mg/kg PC). Nous avons utilisé ces différentes doses par rapport au fait que d'après la littérature on ne retrouve pas des travaux sur *O. Kirkii* indiquant les doses utilisées.

II.2.3. Protocole expérimental

Les effets anticancéreux de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* sur le cancer du sein ont été évalués chez les rates Wistar âgées de 40 à 45 jours. Pour ce faire, 48 rates ont été

acclimatées pendant 10 jours puis randomisées en 6 groupes de 8 animaux chacun. Ensuite chaque groupe a été prétraité par gavage pendant 10 jours de la manière suivante :

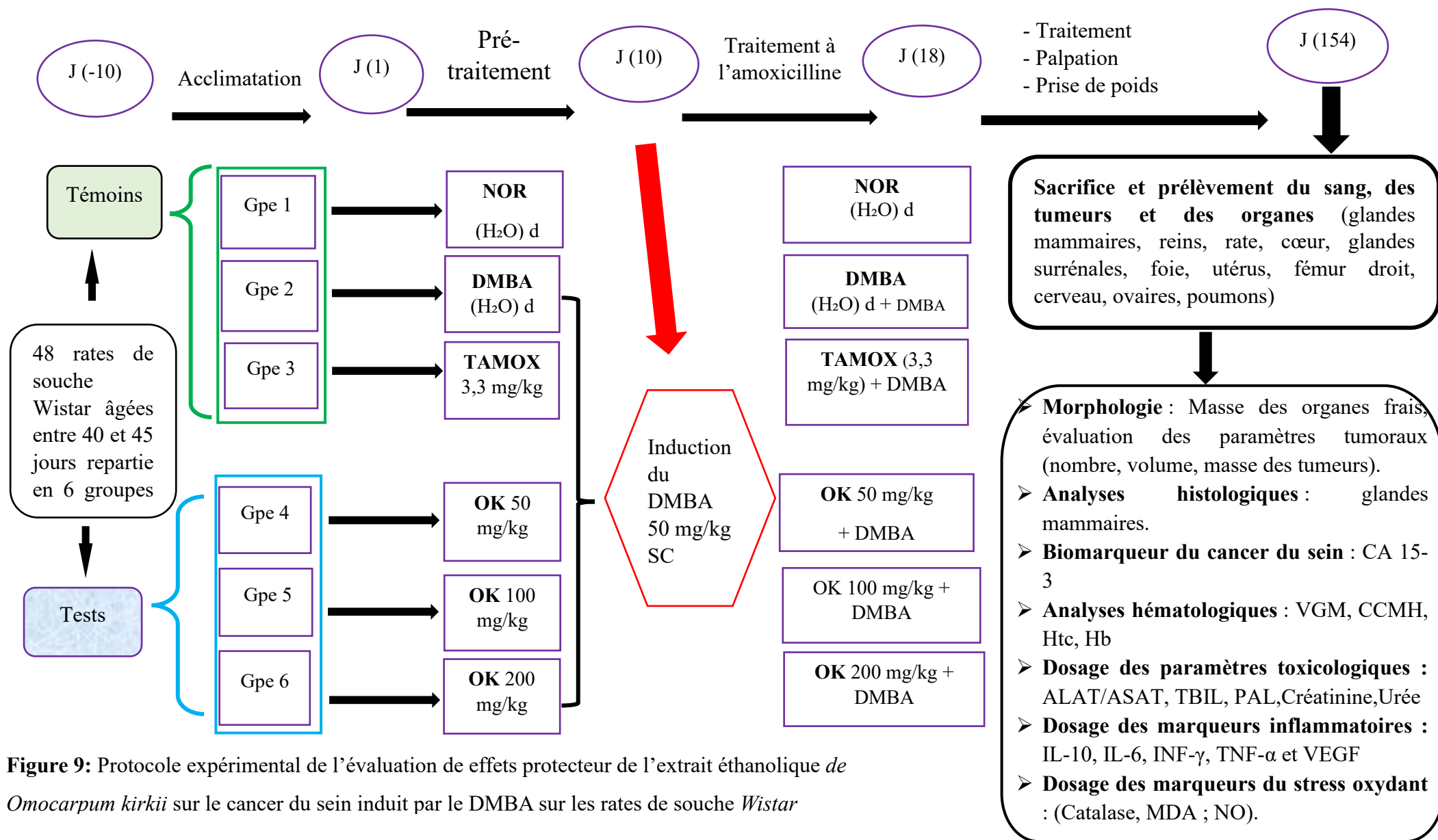
- ❖ Groupe I ; servant de témoin normal (NOR), recevait uniquement de l'eau distillée
- ❖ Groupe II ; servant de témoin négatif (DMBA), recevait l'eau distillée
- ❖ Groupe III ; servant de témoin positif (TAMOX), a reçu le Tamoxifène à la dose 3,3 mg/kg.
- ❖ Groupe IV, V et VI ; étaient les groupes tests (OK50, OK 100, OK 200), recevaient l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. Kirkii* aux doses respectives 50 mg/kg, 100 mg/kg et 200 mg/kg PC.

Après ces 10 jours de prétraitement, le cancer du sein a été induit chez toutes les rates exceptées celles du groupe normal avec le DMBA à une dose unique de 50 mg/kg PC dissout dans 1ml d'huile d'olive par voie intraperitoirelle. Les animaux ont par la suite été soumis à un traitement à l'amoxicilline pendant 8 jours pour prévenir les infections de la peau au niveau où l'effraction de la peau a été faite lors de l'induction. Les animaux du groupe normal quant à eux ont reçu de l'huile d'olive unique (véhicule de dilution du DMBA).

La prise du poids corporelle a commencé au début de l'expérimentation et se faisait de manière hebdomadaire et la palpation des glandes mammaires des rates a commencé une semaine avant l'induction et s'est poursuivi tous les 2 jours durant d'expérimentation (Figure 9). Le temps d'apparition des tumeurs était aussitôt noté. L'autopsie a été réalisée sur les animaux morts au cours de l'expérimentation et les organes résultants ont été conservés pour les analyses ultérieures. Les animaux morbides ont été sacrifiés et les organes prélevés ont été conservés pour ses analyses ultérieures. L'expérimentation a duré 5 mois aux termes desquels tous les animaux ont été soumis à un jeûne non hydrique de 12 h.

Après 12h de jeûne, les animaux ont été sacrifiés par décapitation sous anesthésie (kétamine, valium). Ensuite, le sang a été prélevé par ponction intracardiaque et transféré dans des tubes contenant l'anticoagulant d'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) d'une part pour les analyses hématologiques, d'autre part le sang a été recueilli dans les tubes secs et stériles, puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 min, le surnageant a été délicatement prélevé et conservé dans des microtubes à - 20°C pour des dosages biochimiques ultérieurs. Les tumeurs mammaires ont été prélevées, pesées, et la taille de chacune d'elle a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume de chaque tumeur lorsqu'elle était décelé a été déterminé en utilisant la formule de Faustino-Rocha *et al* (2013). Les organes majeurs de métastases du cancer du sein (foie, poumon, cerveau, fémur...), les cibles primaires des œstrogènes (utérus, ovaires, glandes mammaires), certains organes d'intérêt dans l'étude de toxicité (foie, reins, poumons) et d'autres organes lymphoïdes (fémur, rate, thymus) ont également été prélevés et pesés.

Une partie des tumeurs ou des glandes mammaires a été broyée et homogénéisée avec du tampon phosphates (0,1M ; PH 7,5) puis centrifugée à 3000 tours/min pendant 15 min. les surnageants obtenus ont été prélevés, conservés à -20⁰C, dans les microtubes pour des analyses toxicologiques (ALAT/ASAT, TBIL, PAL, Créatinine, Urée), inflammatoire (IL-10, IL-6, INF- γ ; TNF- α et VEGF) et d'un biomarqueur du cancer du sein (CA15-3) ultérieures. Tous les organes ont été débarrassés de l'excès de sang dans une solution physiologique de NaCl, puis fixés dans le formol 10% pour des analyses histologiques.



II.2.3.1. Expression des résultats

L'expression de la masse relative de l'organe (MRO) en mg/kg de la poids corporel (PC) s'est effectuée suivant la formule suivante :

$$\text{MRO (mg/kg)} = [\text{masse de l'organe (mg)} / \text{masse corporelle (kg)}] \times 10^6$$

II.2.3.2. Analyse morphologique des tumeurs mammaires

L'analyse de la glande mammaire et des tumeurs mammaires a consisté à rechercher les modifications subies par les lobules, la dilatation ou non des conduits lobulaires qui sont des indicateurs d'un effet anticancéreux ou protecteur de la substance testée. Il est en effet bien connu que le DMBA est un carcinogène de la glande mammaire entraînant une hyperplasie sévère des unités lobulaires mammaires, une dilatation des conduits qui se remplissent de cellules tumorales, et une diminution de la quantité de tissu conjonctif (Zingue *et al.*, 2018). Ainsi, les indicateurs de l'effet anticancéreux de l'extrait sur la glande mammaire sont constitués par : une faible prolifération et une faible dilatation lobulaire (Al-Dhaheiri *et al.*, 2008), avec régression du grade de la tumeur (Russo *et al.*, 2000).

Les paramètres directement mesurables étaient :

❖ La charge tumorale totale

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

❖ Pourcentage d'inhibition lié à la charge tumorale

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{charge tumorale chez le DMBA} - \text{charge tumorale chez les groupes tests}) / \text{charge tumorale chez le DMBA}] \times 100$$

❖ Pourcentage d'inhibition lié à la masse tumorale

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{masse relative des tumeurs chez le DMBA} - \text{masse relative des tumeurs chez groupes tests} / \text{masse relative chez le DMBA}) \times 100$$

❖ Indice tumoral

Il correspond aux nombres d'animaux porteurs d'au moins une tumeur par groupe.

$$\text{Incidence tumorale} = (\text{nombre d'animaux ayant développé des tumeurs} / \text{nombre totale d'animaux}) \times 100$$

Il s'exprime en pourcentage d'inhibition.

❖ Volume des tumeurs (Faustino-Rocha *et al.*, 2013)

$$\text{Volume des tumeurs (cm}^3\text{)} = \text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{épaisseur} \times \pi/6$$

II.2.4. Préparation des solutions et tampons

La préparation des différentes solutions utilisées dans ce travail, s'est faite de la manière suivante :

❖ Solution de DMBA

Le DMBA a été utilisé à la dose de 50 mg/kg PC pour induire le cancer du sein les rates âgées de 40 à 45 jours. Pour un poids corporel moyen de 75 g, 280 mg de DMBA ont été pesée et dissous dans 14 mL d'huile d'olive, puis l'ensemble a été porté à l'ultrason Elmason de manière à obtenir une solution homogène (Ramachandran *et al.*, 2017).

❖ Solution de tamoxifène

Le tamoxifène a été utilisé dans cette étude comme produit de référence administré aux animaux du groupe témoin positif à la dose de 3,3 mg/kg PC (Maltoni *et al.*, 1997). Pour les animaux de poids moyen de 75 g, 14 mg de tamoxifène ont été dissous dans 55 mL d'eau distillée (véhicule) de façon à obtenir une solution homogène.

❖ Préparation des extraits

L'extrait éthanolique des écorces de *Omocarpum kirkii* à différentes doses (50, 100 et 200 mg/kg de PC) testées a été préparée comme suite : la quantité d'extrait de chaque dose a été calculée en fonction du poids moyen des animaux de chaque groupe puis pesée et dissous avec de l'eau distillée (1 ml/kg) était le volume d'administration des animaux de chaque groupe.

❖ Formol 10%

Cette solution a été utilisée pour fixer les tissus. La préparation s'est faite à partir du formol commercial (solution concentrée à 40%). Pour obtenir un volume final de 1000 ml, un volume initial de 100 ml de formol a été introduit dans une éprouvette graduée, et ajusté à 1000 ml avec de l'eau distillée.

II.2.5. Analyse histologique

L'histologie encore appelée art des artefacts est l'étude de la morphologie et de la composition des tissus normaux ou anormaux ayant subi une série d'étapes permettant une bonne observation microscopique des tissus vivants prélevés. 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 : la fixation, la macroscopie ou "trimming", la déshydratation, l'inclusion, la coupe, la coloration et le montage.

➤ **Fixation**

Elle a consisté en la mise des tissus prélevés aussitôt dans du formol à 10% 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 aussi le potentiel tinctorial des différents constituants cellulaires.

➤ **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 étiquetées.

➤ **Déshydratation**

La déshydratation proprement dite fait suite à la fixation des tissus, qui devront être inclus dans un milieu suffisamment rigide pour être coupés en tranches fines de l'ordre du micromètre. A 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 %).

➤ **Eclaircissement**

C'est la seconde étape de la déshydratation qui 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 tels que le xylène ou le toluène. 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 le déshydrations.

➤ **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).

➤ **Inclusion**

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

➤ **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.

➤ **Coloration**

Pour la visualisation des constituants cellulaires et tissulaires, on utilise généralement des colorants en leur faisant capter et fixer ces colorants de façon plus ou moins sélective. 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%.

➤ **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 consistait 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 monté.

➤ **Expression des résultats de l'histopathologie**

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

II.2.6. Analyse hématologique

Les paramètres hématologiques suivants ont été déterminés : le taux de globules blancs (lymphocytes, monocytes, granulocytes), le taux de globules rouges, les plaquettes sanguines, l'hématocrite (Htc), le taux d'hémoglobine (Hb), le volume globulaire moyen (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) à l'aide d'un hémacytomètre.

II.2.7. Estimation quantitative des teneurs en quelques métabolites secondaires de *Omocarpum kirkii* et détermination de la capacité antioxydante *in vitro* de *Omocarpum kirkii*

II.2.7.1. Dosage des phénols totaux

➤ Principe

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

➤ Mode opératoire

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

➤ Expression des résultats

La teneur en phénols totaux a été déterminée par extrapolation sur une courbe d'étalonnage (Annexe III). La teneur en polyphénols a été exprimée en mg équivalent d'acide caféique/g de matière sèche (mg EAC/g MS).

II.2.7.2. Dosage des flavonoïdes

➤ 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 (Harborne, 1998).

➤ Mode opératoire

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

0,2 mL de NaOH 1 mM 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.

➤ **Expression des résultats**

La teneur en flavonoïdes est déterminée par extrapolation sur une courbe d'étalonnage (Annexe IV), et exprimée en mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait sec ($\mu\text{g eq /g d'extrait sèche}$).

II.2.7.3. Dosage des flavonols

➤ **Principe**

En solution éthanolique les flavonols sont chélatés par l' AlCl_3 , et la densité optique est mesurée entre 380 et 460 nm (Kumaran, 2007).

➤ **Mode opératoire**

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 concentration en flavonols a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe V), établie à partir de la quercétine et est exprimée en mg d'équivalents de quercétine par g de d'extrait sec ($\mu\text{g eq quercétine /g d'extrait sèche}$).

II.2.7.4. Dosage des tanins condensés totaux

➤ **Principe**

En présence de la vanilline, les tanins réagissent avec celle-ci et se transforment en anthocyonidols de couleur rouge qui absorbe à 550 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de tannins présents dans l'échantillon.

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 50 μL d'extrait a été ajouté à 1500 μL de la solution vanilline/méthanol à 4%, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 μL d'acide chloridrique concentré (HCl) a été additionné, le mélange obtenu a été laissé réagir 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 VI) la concentration en tanins condensés des extraits a été exprimée à partir de cette courbe.

II.2.7.5. Détermination du potentiel antioxydant *in vitro* de *Omocarpum kirkii* par la méthode de " Ferric Reducing Antioxydant Power " (FRAP)

➤ Principe

Il est basé sur la réduction des ions ferriques (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) due à l'action des molécules antioxydantes présentes dans l'extrait a testé. Les ions Fe^{2+} formés, interagissent avec le 2,4,6-tris(2-pyridyl) -s-triazine (TPTZ) pour former un complexe bleu-cyanée qui absorbe à 593 nm (Benzie et Strain, 1996).

➤ Mode opératoire

A 0,1 mL d'extrait, 3 mL de réactif de TPTZ fraîchement préparé ont été ajoutés après 5 min d'incubation. L'absorbance réactionnel a été détecté à 593 nm.

➤ Expression des résultats

Les résultats finaux ont été exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique/g de matière sèche (mg EAA/gMS) en utilisant l'équation de régression de la courbe d'étalonnage : $y = 0,0202 x$ (Annexe VII).

II.2.7.6. Détermination de l'activité antiradicalaire de *Omocarpum kirkii* au «1,2-Diphényle-2-picrilhydrazyle » DPPH

➤ Principe

Une diminution de l'absorbance à 517 nm est observée au fur et à mesure que le radical DPPH est piégé par les antioxydants pour former le DPPH-H stable (Molyneux, 2004).

➤ Mode opératoire

A 3 mL d'extrait, 0,3 mL de solution méthanolique de DPPH (0,1 mM) ont été ajoutés. Après homogénéisation puis incubation pendant 30 minutes, l'absorbance réactionnel a été détecté à 517 nm.

➤ Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{DO contrôle} - \text{DO}}{\text{DO contrôle}} \right] \times 100$$

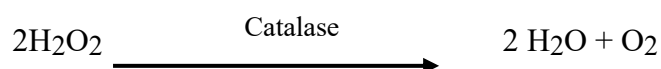
II.2.8. Dosage de quelques marqueurs du stress oxydatif

II.2.8.1. Détermination de l'activité de la catalase

La détermination de l'activité de la catalase a été effectuée selon la méthode décrite par Sinha (1972).

➤ Principe

Le peroxyde d'hydrogène est rompu en présence de la catalase et se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu-vert d'acide perchlorique instable. Ce dernier sera ensuite décomposé par la chaleur et forme un complexe vert qui absorbe à la longueur d'onde de 570 nm.



➤ Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, 50 µL d'échantillon à analyser (homogénat de tumeurs ou de glande mammaire) et 700 µL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5) ont été introduit. Le chronomètre était déclenché lorsqu'on ajoutait 200 µL de solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (50 mM) et après 1 min, la réaction a été arrêtée par ajout de 2 mL de la solution de dichromate de potassium/acide acétique. Dans le tube témoin, on a introduit 800 µL de tampon phosphate (0,1M, pH 7,5). L'ensemble des tubes était chauffé à 100°C pendant 10 min et après refroidissement, la densité optique a été lue à 620 nm.

➤ Expression des résultats

La quantité de peroxyde d'hydrogène a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage et l'activité spécifique de la catalase a été exprimée en µM de H₂O₂/min/mg de protéine (Annexe VIII). L'activité de la catalase a été exprimée en mM de peroxyde d'hydrogène consommés/min.

II.2.8.2. Dosage d'un marqueur de la peroxydation lipidique : malondialdéhyde (MDA)

➤ Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm (Yagi et Kunio, 1976).

➤ Mode opératoire

Dans des tubes à essai en verre ont été introduit 83 µL d'homogénat de la glande mammaire ou des tumeurs et 167 µL de réactif TBA puis fermés hermétiquement. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 100 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes, les tubes ont été ouverts permettant l'évacuation des gaz

formés lors de la réaction puis centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm à l'aide du spectrophotomètre (Genesis, UV Spectrophotomètre, Japan). La concentration du MDA a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

➤ **Expression des résultats**

La concentration du malondialdéhyde exprimée en mol/g de tissu a été calculée grâce au rapport suivant.

$$[\text{MDA}] (\mu\text{M}) = \text{DO} / \epsilon \times l$$

DO = densité optique ; l = longueur de la cuve = 1 cm ; ϵ = coefficient d'extinction molaire = $1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.2.8.3. Dosage indirecte du monoxyde d'azote par la mesure des nitrites

➤ **Principe**

Le monoxyde d'azote acidifié, produit un agent nitrosant qui réagit avec l'acide sulfanilique, pour donner l'ion diazonium. Ce dernier se couple au naphtyléthylènediamide pour former un dérivé azoté qui absorbe à 540 nm.

➤ **Mode opératoire**

Le dosage du monoxyde d'azote a été réalisé suivant la méthode décrite par Grand *et al.*, (2001). Pour ce faire une dilution en série de la solution de NaNO_2 dans des tubes à essais a été réalisée. Ensuite 25 μL d'échantillon ont été introduite dans le tube à essai, 200 μL de réactifs de Griess et 200 μL d'eau distillée ont été additionnés puis agités et incubés pendant 10 minutes à température ambiante. Les densités optiques ont été lues à 570 nm.

➤ **Expression des résultats**

La concentration de NaNO_2 dans les différents tubes d'échantillons a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe IX).

II.2.8.4. Dosages des protéines totales

➤ **Principe**

Cette méthode est basée sur la réaction entre le réactif de biuret et la solution protéique en présence du sel cuivrique, avec formation d'un complexe bleu insoluble qui absorbe à 540 nm et dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

➤ Mode opératoire

Dans un tube à essai contenant 100 µL d'homogénat, 1 mL de réactif de biuret a été introduit dans le mélange et incubé à 25°C pendant 10min. L'absorbance a été lue à 540 nm.

➤ Expression des résultats

Les résultats ont été obtenus grâce à la courbe d'étalonnage (Annexe X).

II.2.9. Dosage de quelques marqueurs de toxicité

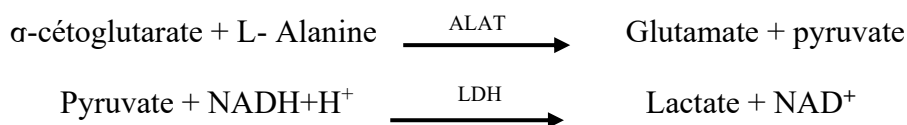
II.2.9.1. Détermination de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT)

Le kit de dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) de Cell Biolabs nous a permis de mesurer l'activité de l'ALAT à l'aide d'une série de réactions enzymatiques.

➤ Principe

Dans les échantillons, l'ALAT réagit avec l'alanine pour transférer un groupe amino à un autre substrat, produisant du glutamate et du pyruvate. Le pyruvate est ensuite détecté à l'aide de la sonde colorimétrique. Les échantillons et les étalons sont incubés pendant 30 à 60 minutes, puis lus avec un étalon à un lecteur de microplaques spectrophotométriques (540-570 nm). L'activité de l'ALAT est directement proportionnelle au taux de pyruvate généré dans la réaction. Les niveaux d'ALAT de l'échantillon sont déterminés par comparaison avec les étalons connus de pyruvate.

Le dosage est basé sur la mesure cinétique de l'alanine aminotransférase sérique dans un système réactionnel dont la finalité est l'oxydation du coenzyme NADH, H⁺ selon la réaction suivante :



➤ Mode opératoire

Un mL (1 mL) de réactif de travail a été pipeté dans lequel 0,1 mL d'échantillon a été ajouté. L'absorbance initialement lue, le chronomètre a été lancé ensuite les absorbances ont été lues toutes les minutes pendant 3 min à 340 nm.

➤ Expression des résultats

$$\text{GPT(ALAT) (U/L)} = \Delta \text{Abs. /min}$$

II.2.9.2. Dosage de l'aspartate Aminotransférase (ASAT)

Le kit de dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) de Cell Biolabs mesure l'activité de l'ASAT à l'aide d'une série de réactions enzymatiques.

➤ Principe

Le dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) est basé sur la mesure de l'activité de l'ASAT par une série de réactions enzymatiques. L'ASAT dans les échantillons réagit avec l'aspartate pour transférer un groupe amino en l' α -cétooglutarate, produisant ainsi du glutamate et de l'oxaloacétate. Le glutamate est ensuite détecté par la sonde colorimétrique. Les échantillons et les étalons sont incubés pendant 60 à 120 minutes, puis les absorbances sont lues à l'aide d'un lecteur de plaque spectrophotométrique standard à 96 puits (450 nm). L'activité de l'ASAT est directement proportionnelle à la quantité de glutamate générée dans la réaction. Les niveaux d'ASAT des échantillons sont déterminés par comparaison avec les étalons de glutamate connus.

➤ Mode opératoire

Pour réaliser ce test, 50 μ L des étalons de glutamate dilués ont été introduit dans des tubes à essais contenant le standard ou les échantillons dans chaque puits d'une plaque de microtitration à 96 puits. Puis, 150 μ L du réactif préparé a été introduit dans chaque puits, le mélange a été soigneusement homogénéisé dans chaque puits. Immédiatement l'absorbance a été lu pour chaque micro-puits à l'aide d'un lecteur de microplaques spectrophotométrique (450 nm). Le point de temps initial a été noté ($T_{initial}$) et la lecture initiale de l'absorbance de la plaque faite ($A_{initial}$). La plaque a été couverte pour la protéger de la lumière et poursuivre l'incubation à 37°C pendant 60 à 120 minutes

➤ Expression des résultats

$$GPT(ASAT) (U/L) = \Delta Abs. / min$$

II.2.9.3. Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine s'est fait suivant les

instructions du kit cypress diagnostics (Belgique).

➤ Principe

La créatinine présente dans une solution basique de picrate forme un complexe rouge. La différence d'absorbance (520 nm) à des moments prédéterminés pendant la conservation est proportionnelle à la concentration de la créatine dans l'échantillon.

➤ **Mode opératoire**

Dans un tube à essai, 100 µl de sérum ont été ajoutés à 1 ml de la solution de travail après agitation, l'absorbance initiale a été lue à 520 nm puis à 30 s et 90 s après stabilisation du mélange

➤ **Expression des résultats**

$$\text{Concentration créatinine (mg/dL)} = \text{DO (échantillon)} / \text{DO (standard)} \times 2(\text{conc. Standard})$$

II.2.9.4. Dosage de la phosphatase Alcaline (PAL)

➤ **Principe**

Dans des conditions alcalines, la phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse du phosphate de p-nitrophényle disodique pour produire de l'orthonitrophénol et de l'acide phosphorique. Dans des conditions fortement alcalines, le p-nitrophénol est jaune vif et a un pic d'absorption maximal à 405 nm. Par conséquent, l'activité de l'ALP peut être calculée en mesurant la valeur de la DO à 405 nm.

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 50 µL de standard a été ajouté dans les puits standard, 50 µL d'échantillon ont été ajoutés dans les puits d'échantillon et 50 µL de solution tampon ont été ajoutés dans les puits de contrôle. Ensuite 50 µL de solution de travail (substrat) ont été ajoutés dans les puits de contrôle et les puits d'échantillon et 50 µL de solution tampon ont été ajoutés dans les puits standards. Le mélange a été Incubé à 37°C pendant 10 min. puis 100 µL de solution stop ont été ajoutés dans chaque puits. Le mélange a été et les valeurs OD ont été lues à 405 nm.

➤ **Expression des résultats**

$$\text{PAL(U/L)} = (\Delta A - b) \div a + T \times f$$

Où : a : Pente de la courbe standard ; b : Ordonnée à l'origine de la courbe standard ; ΔA : OD échantillon – OD control ; T : Temps de réaction, 10 min ; f : Coefficient de dilution de l'échantillon avant l'essai.

II.2.9.5. Dosage de l'urée

➤ **Principe**

Il est basé sur la décomposition de l'urée en ion ammoniacal et en dioxyde de carbone. L'ion ammoniac peut réagir avec l'agent chromogène phénol et former une substance bleue en

milieu alcalin, et la réduction de la substance bleue est proportionnelle à la teneur en urée, qui peut être calculée par le dosage colorimétrique à 580 nm.

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 0,02 ml de solution de travail standard d'urée 10 mmol/L a été introduit dans le tube standard. Un volume de 0,02 ml d'échantillon a été introduit dans le tube d'échantillon et contrôle. Ensuite 0,25 ml de solution de travail enzymatique a été introduit au tube standard et au tube échantillon, 0,25 ml d'enzyme dilué a été ajouté au tube contrôle. Le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un agitateur vortex et incubé à 37°C pendant 10 min. Les valeurs de DO ont été lues à 580 nm.

➤ **Expression des résultats**

$$\text{Urée (mg/dL)} = (\Delta A1/\Delta A2) \times C \times f$$

Où : $\Delta A1$ = DO échantillon-DO control ; $\Delta A2$ = DO standard-DO blanc ; C : concentration du standard 10mmol/L ; f : facteur de dilution.

II.2.9.6. Dosage de la Bilirubine totale

➤ **Principe**

Sous l'action d'un accélérateur, la liaison hydrogène dans la bilirubine indirecte est rompue, ce qui permet à la bilirubine indirecte insoluble et à la bilirubine directe de réagir avec le réactif azoté pour former de la bilirubine azotique dans des conditions acides. La bilirubine azotique générée présente une absorption maximale à 565 nm. Le contenu en bilirubine totale dans le sérum peut être obtenu en mesurant le changement d'absorbance.

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 80 µL d'acide a été introduit dans les tubes standard, échantillon et contrôle. 160 µL de solution de travail ont été ajoutés dans les tubes standard et les tubes échantillon et 160 µL d'eau doublement distillée ont été ajoutés dans les tubes contrôle. Un volume de 30 µL de standard 25 µmol/L a été introduit dans les tubes standard et 30 µL d'échantillon ont été ajoutés dans les tubes d'échantillon. Le mélange a été homogénéisé et incubé à 37°C pendant 5 min. 20 µL de solution stop ont été ajouté dans chaque tube. Le mélange a été homogénéisé et incubé à 37°C pendant 5 min. les valeurs de DO de chaque puits ont été mesurés à 565 nm.

➤ **Expression des résultats**

$$\text{BIL (}\mu\text{mol/L)} = A2 \div A1 \times C \times f$$

Où : A_2 : la valeur DO de l'échantillon - la valeur DO du contrôle d'échantillon ; A_1 : la valeur de DO de la norme - la valeur de DO de la commande de norme ; C : Concentration de l'étalon (25 $\mu\text{mol/L}$) ; f : Facteur de dilution de l'échantillon avant l'essai.

II.2.10. Estimation du taux du biomarqueur du cancer du sein CA 15-3 et de quelques cytokines impliquées dans le cancer du sein

Les taux de CA 15-3, IL-10, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$ et VEGF ont été mesurés en suivant les directives du kit ELISA provenant de Cell biolabs. Le kit mesure les formes excrétées ou soluble des différents marqueurs, la limite de sensibilité du kit étant de 4 U/ml .

➤ Principe

La méthode immunoenzymatique est une technique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

➤ Mode opératoire

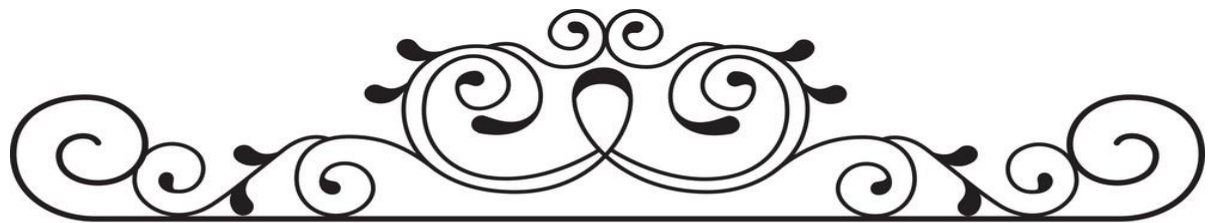
Les réactifs utilisés ont été ramenés à température ambiante avant de procéder au dosage. Un volume de 25 μl du contrôle, ou de l'échantillon dilué ont été pipetés et mis respectivement dans les puits standards, contrôles et tests. Ensuite, 100 μl d'anticorps biotinylé marqué ont été ajoutés dans chaque puits, mélangés par agitation douce de la plaque qui a été portée à incubation à température ambiante pendant 60 minutes. Elle a ensuite été décantée et 350 μl de tampon de lavage ont été ajoutés aux puits puis décantés. Le procédé de lavage a été répété deux fois. Par la suite, 100 μl du réactif enzymatique ont été ajoutés à chaque puits, la plaque a été couverte et incubée comme précédemment. Le procédé de lavage a été répété trois fois puis, 100 μl du réactif substrat ont été ajoutés à tous les puits et la plaque incubée pendant 20 minutes à température ambiante. Un volume de 50 μl de solution stop a été ajouté dans chaque puits et la plaque a été agitée doucement pendant 15 à 20 secondes. L'absorbance a été lue dans chaque puits à 450 nm grâce à un lecteur de plaque ELISA de marque VersaMaxTM (Molecular Devices, USA).

➤ Expression des résultats

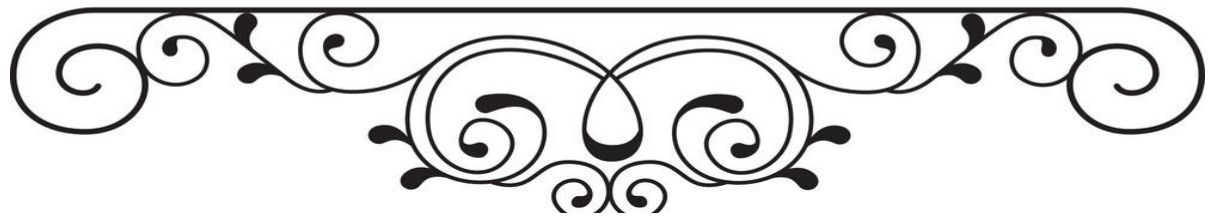
Une courbe dose-réponse a été utilisée pour déterminer la concentration de CA 15-3 (U/ml) (Annexe XI), IL-10, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$ et VEGF dans les échantillons. Cette courbe a été tracée en faisant correspondre l'absorbance des puits standards aux concentrations respectives des différents marqueurs respectivement.

II.2.11. Analyse statistique

L'analyse statistique s'est faite en utilisant le logiciel GraphPad Prism Version 8. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard sur la moyenne (ESM). Compte tenu de la taille de l'échantillon ($n=8$), une analyse de variance (ANOVA) à un facteur suivi du post-test de Dunett a été utilisée pour corréler la différence entre les variables. Les valeurs ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $*p<0,05$; $**p<0,01$ et $***p<0,001$.



CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION



III.1. Résultats

III.1.1. Teneurs en quelques composés photochimiques et capacité antioxydante de l'extrait éthanolique de l'écorce de *omocarpum kirkii*

Le taux de différents métabolites secondaires ainsi que l'évaluation de la capacité antioxydante totale *in vitro* de l'extrait de *O. kirkii* sont résumés dans le tableau I ci-dessous. Il en ressort que les flavonoïdes sont les métabolites secondaires les plus abondants, avec une quantité de $67,5 \pm 4,4$ mg EAQ/g MS, tandis que les tannins sont présents en faible quantité avec une valeur de $6,0 \pm 0,2$ mg EAT/ g MS. Cet extrait possède une capacité à réduire les radicaux libres ferreux par la méthode de FRAP avec une teneur de 2960 ± 5 mg EAA/mg MS.

Tableau I: Analyse quantitative des composés phénoliques présents dans *Omocarpum kirkii* et capacité antioxydante totale *in vitro* de *Omocarpum kirkii*.

Classes phytochimiques		Teneur dans l'extrait de <i>O. kirkii</i>	
Phénols totaux (mg EAG/g MS)		$697,80 \pm 10,3$	
Flavonoïdes (mg EQ/g MS)		$67,5 \pm 4,4$	
Flavonols (mg EQ/g MS)		$9,61 \pm 0,1$	
Tanins totaux (mg EAT/g MS)		$6,0 \pm 0,2$	
Capacité antioxydante totale		Teneur dans l'extrait de <i>O. kirkii</i>	
FRAP (mg EAA/mg MS)		$2960,0 \pm 5,0$	
DPPH	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)	IC 50
	62,5	13,3	399,1
	125,0	20,1	
	250,0	36,4	
	500,0	59,8	

DPPH : 2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyle ; FRAP : "Ferric Reducing Antioxydant Power" ; mg EAA/mg MS : mg d'équivalent d'acide Ascorbique par g d'extrait sèche ; mg EAG/g MS : mg d'équivalent d'acide gallique par g de masse extrait sèche ; mg EAT/ g MS : mg d'équivalent d'acide tannique par g d'extrait sèche ; mg EQ/g MS : mg d'équivalent d'acide quercétine par g de masse extrait sèche.

III.1.2. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur la de survie et la masse corporelle des rates

La figure 10A montre l'évolution de la masse corporelle des animaux pendant 22 semaines d'expérimentation. Les animaux avaient une croissance normale tout au long de l'expérimentation. Il a été observé une diminution significative ($p < 0,01$) à partir du jour 126 jusqu'à la fin dans le groupe TAMOX comparé au groupe DMBA tandis que, les rates traitées par l'extrait de *O. kirkii* à la dose de 200 mg/kg ont montrées une augmentation significative de $p < 0,05$ aux jours 70, 98 et 140.

La figure 10B quant à elle montre la courbe de survie des animaux durant 22 semaines de d'expérimentation. Il en ressort que aucun décès n'a été enregistré chez les rates normales alors que les animaux des groupes DMBA et TAMOX enregistrent respectivement des survies de 62,5 % et 75%. Le traitement avec l'extrait de *O. kirkii* à la dose de 50 mg/kg bien que n'ayant pas amélioré la survie, a retardé la survenue de décès jusqu'à la 12^{ème} semaine (soit une survie de 62,5%), tandis qu'aux doses de 100 et 200 mg/kg PC les taux de survies de 62,5% et 50% ont respectivement été observés.

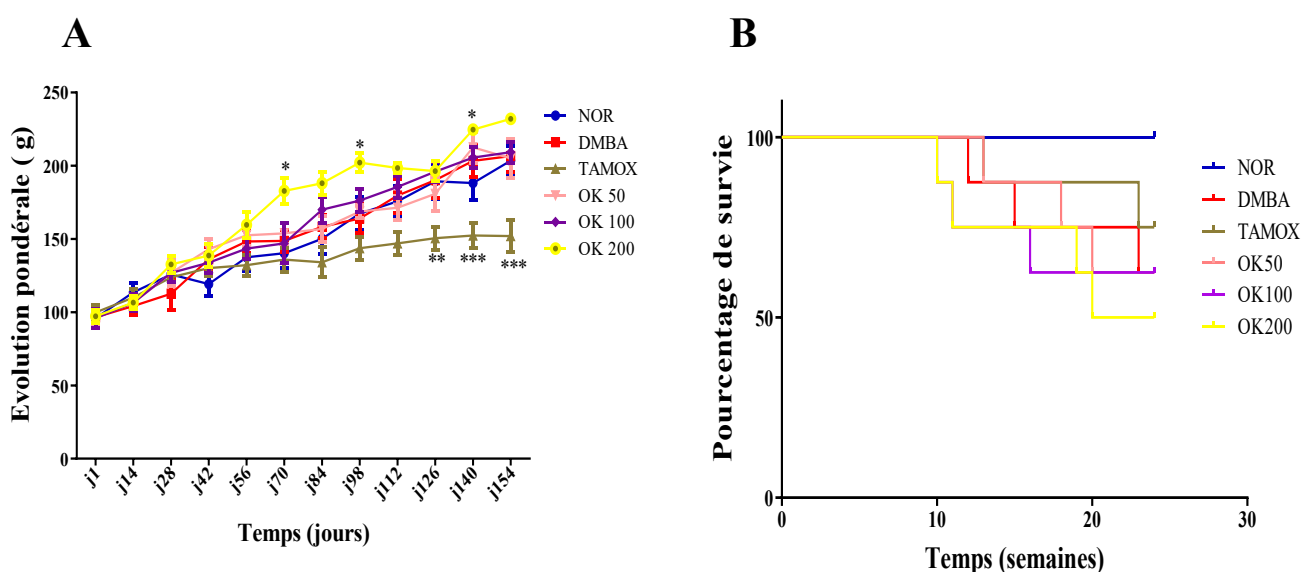


Figure 10: Courbe d'évolution pondérale (A) et de survie des animaux par la méthode de Kaplan Meier (B).

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests (OK50, OK100, OK200) ont été traités avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. Kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Tous les groupes excepté le groupe témoin normal ont été exposés au DMBA à une dose unique (50 mg/kg).

III.1.3. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur quelques paramètres tumoraux

Le Tableau II illustre les paramètres tumoraux relevés chez les rates exposées au DMBA après 22 semaines d'expérimentation. Aucune tumeur n'a été enregistrée dans le groupe normal, alors que 100% des rates du groupe DMBA ont développé des tumeurs mammaires avec une masse moyenne de $20,28 \pm 3,87$ mg/kg, soit une charge tumorale de $96,62 \pm 17,17$ mg/kg. Le traitement au standard tamoxifène a réduit l'incidence des tumeurs, soit 25% contre 100% dans le groupe DMBA. De plus une diminution significative ($p < 0,01$) de la masse relative moyenne des tumeurs a été observée chez les rates du groupe TAMOX quittant de $20,28 \pm 3,78$ mg/kg chez le DMBA à $7,09 \pm 1,99$ mg/kg. En ce qui concerne l'extrait de *O. kirkii*, il a inhibé de manière significative le développement des tumeurs mammaires ainsi que la croissance tumorale. En effet, il a significativement prévenu contre l'augmentation de la charge tumorale à toutes les doses testées 50 ($16,22 \pm 3,82$ mg/kg, $p < 0,001$), 100 ($66,20 \pm 31,84$ mg/kg, $p < 0,001$) et 200 ($1,39 \pm 0,88$ mg/kg, $p < 0,001$) mg/kg, comparé à une charge tumorale de $96,62 \pm 17,17$ mg/kg chez les rates du groupe DMBA.

Tableau II: Activité chimioprotectrice de l'extrait éthanolique de *O. kirkii* sur le cancer du sein

Paramètres	Nombre de rates avec tumeurs	Incidence des tumeurs (%)	Masse des tumeurs	Charge tumoral (mg/kg)	% d'inhibition lié à la charge tumorale
NOR	0	-	-	-	-
DMBA	8/8	100	$20,2 \pm 3,8###$	$96,6 \pm 17,1###$	-
TAMOX	2/8	25	$7,0 \pm 1,9^{**}$	$54,3 \pm 2,0^{***}$	44
OK50	2/8	25	$2,9 \pm 0,3^{***}$	$16,2 \pm 3,8^{***}$	84
OK100	2/8	25	$11,1 \pm 2,2^{*}$	$66,2 \pm 31,8^{***}$	32
OK200	1/8	13	$0,6 \pm 0,0^{***}$	$1,3 \pm 0,8^{***}$	97

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests (OK50, OK100, OK200) ont été traitées avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. Kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ ESM (n=8). Tous les rates à l'exception des animaux normaux ont reçu du DMBA à une dose de 50 mg/kg. Significativité comparée au groupe DMBA : $^{*}p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$ et $^{***}p < 0,001$ (n=8). Significativité comparée au groupe NOR : $^{###}p < 0,001$ (n=8).

III.1.4. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur le volume des tumeurs, la morphologie des tumeurs et le taux sérique de CA15-3

Les effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* sur la morphologie tumorale (A), le taux de CA15-3 Sérique (B) et le volume tumoral (C) sont présentés dans la figure 11.

Il a été observé un taux de CA 15-3 élevé ($p < 0,001$) dans le groupe DMBA comparé au groupe normal. Le taux de CA15-3 a été réduit de $13,8 \pm 0,7$ U/ml dans le groupe DMBA à $10,6 \pm 1,3$ U/ml dans le groupe TAMOX. L'extrait de *O. kirkii* a réduit le taux de CA15-3 de $13,84 \pm 0,77$ U/mL dans le groupe DMBA à $8,7 \pm 0,6$ U/mL (50 mg/kg ; $p < 0,001$) $9,4 \pm 0,5$ U/mL (100 mg/kg ; $p < 0,01$) et $11,5 \pm 0,3$ U/mL (200 mg/kg ; $p < 0,05$).

En accord avec les résultats sur l'incidence des tumeurs, les rates du groupe DMBA ont présentés les plus grosses tumeurs comparées aux différents autres groupes. Le traitement avec le tamoxifène a réduit de manière significative ($p < 0,001$) le volume tumoral ($678,5 \pm 195,7$ mm³ dans le groupe TAMOX contre $10989,1 \pm 2848,2$ mm³ dans le groupe DMBA). L'extrait de *O. kirkii* a réduit significativement le volume tumoral de $10989,1 \pm 2848,2$ mm³ dans le groupe DMBA à $1117,0 \pm 116,2$ mm³ à la dose de 50 mg/kg ($p < 0,001$), $5425,2 \pm 1185,6$ mm³ à la dose de 100 mg/kg ($p < 0,05$) et $0,5 \pm 0,0018$ mm³ à la dose de 200 mg/kg ($p < 0,001$).

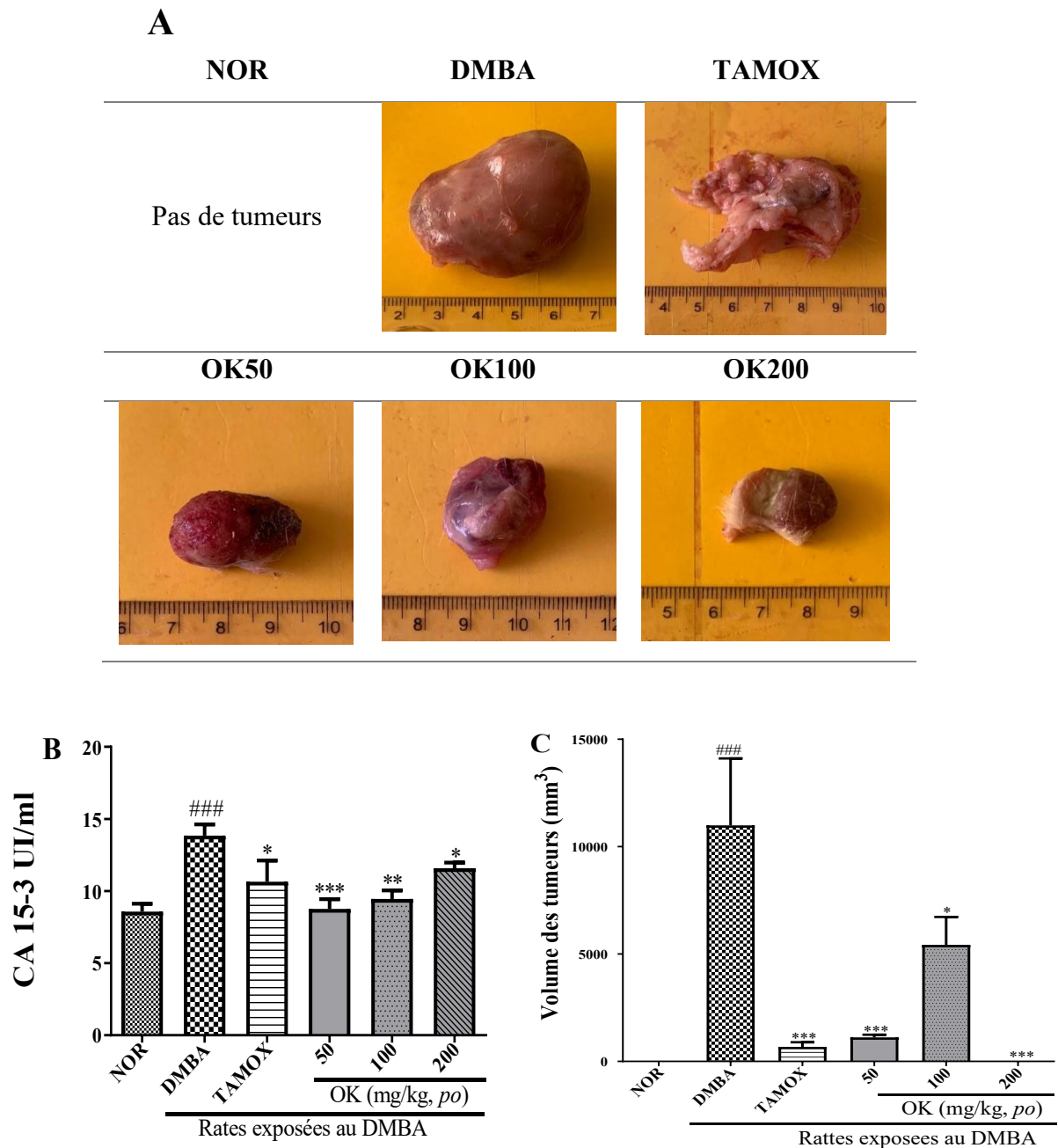


Figure 11: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* sur la morphologie tumorale (A), le taux de CA15- 3 Sérique (B) et le volume tumoral (C).

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests (OK50, OK100, OK200) ont été traités avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. Kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ ESM (n=8). Toutes les rates à l'exception des animaux normaux ont été exposées au DMBA à une dose de 50 mg/kg. Significativité comparée au groupe DMBA : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ (n=8). Significativité comparée au groupe NOR : ### $p < 0,001$ (n=8).

III.1.5. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur l'histoarchitecture des glandes mammaires

La figure 12 présente les effets de *O. kirkii* sur la microarchitecture du tissu mammaire. Les rates du groupe normal présentent un parenchyme mammaire normal fait de nombreux lobules d'adipocytes qui bordent des plages de tissus conjonctifs d'où émergent des canaux galactophoriques de calibres variables dont l'épithélium des glandes est bien différencié et s'accompagnant toujours d'une assise des cellules épithéliales. En ce qui concerne les rates du groupe DMBA, ces dernières présentent un parenchyme mammaire occupé par une prolifération tumorale faite des cellules disposées en grappe compacte, celles-ci présentent un certain degré d'anisocytose (existence d'une différence de taille entre les cellules sanguines d'une même lignée cellulaire) et d'anisocaryose (inégalité de la taille des noyaux au sein d'une population cellulaire homogène); bien que tantôt arrondi tantôt fusiformes. Les sections des tumeurs mammaires provenant du groupe TAMOX montrent une prolifération tumorale existante montrant d'abord sur une plage des cellules tumorales tantôt arrondies, tantôt fusiformes présentant des caractères d'anisocytose et d'anisocaryose marquées; celles-ci sont disposées tantôt de façon compacte, tantôt dissociées dans un stroma conjonctif tantôt dense tantôt œdématié ou encore complètement nécrosé. Les éléments cellulaires sont plus dissociés que dans le groupe DMBA dans quelques plages et il y a persistance d'adipocytes. Les rates traitées avec l'extrait éthanolique de *O. kirkii* présentent un parenchyme mammaire modifié par une prolifération de cellules tumorales faite de placards et travées dont certaines sont disposées en file indienne avec présence de plages de nécroses entre les dites cellules en ce qui concerne la dose de 50 mg/kg. A la dose de 200 mg/kg, les cellules en file indienne sont bordées par du tissu conjonctif jeune en pleine tumeur alors que ce tissu devient plus dense à la périphérie de la tumeur. En ce qui concerne la dose de 100 mg/kg, les rates présentent une architecture mammaire modifiée par une prolifération de cellules tumorales faite de canaux galactophoriques dilatés renfermant dans leur lumière du matériel nécrotique ou inflammatoire.

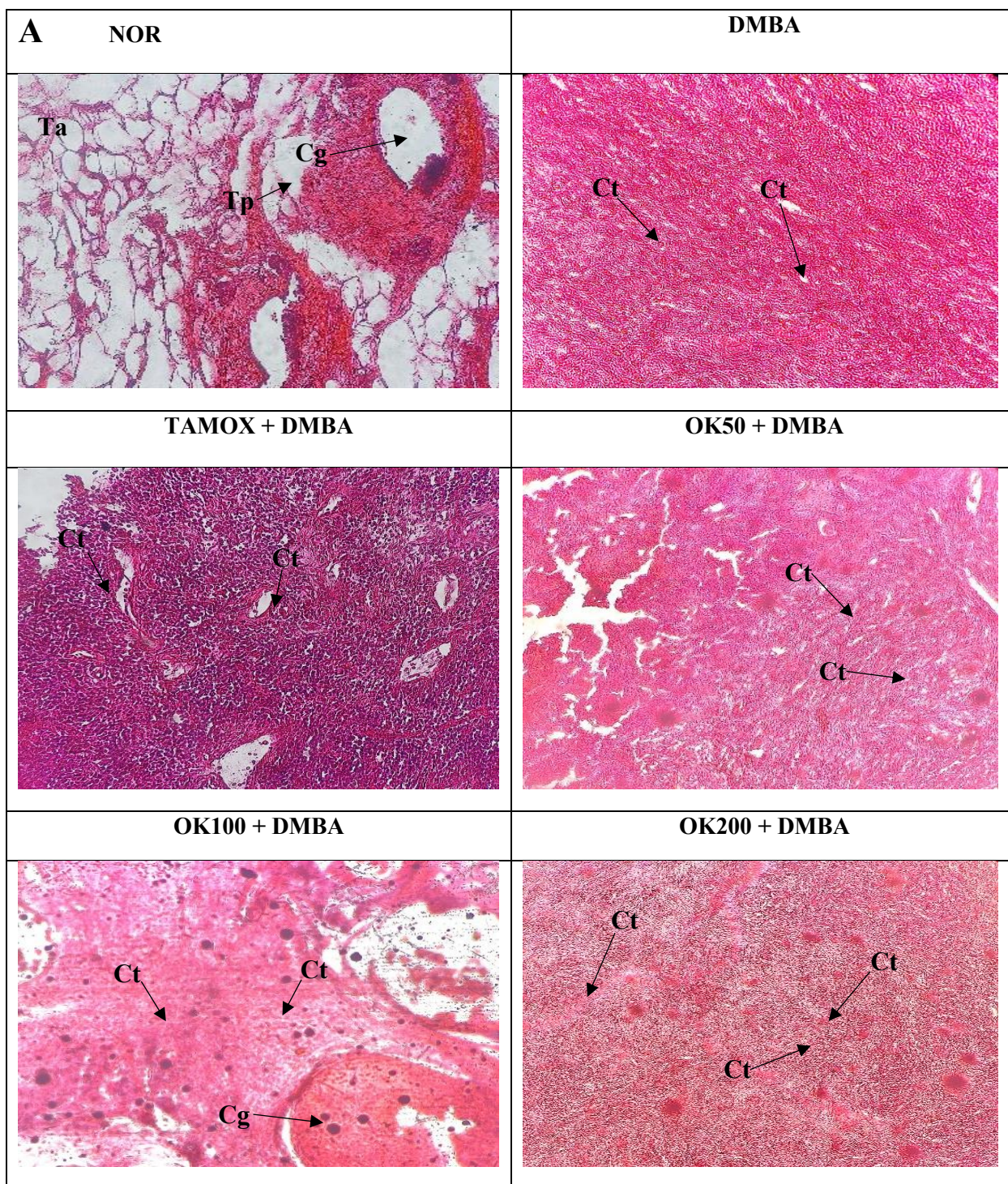


Figure 12: Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur l'histoarchitecture des glandes mammaires

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests (OK50, OK100, OK200) ont été traitées avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ ESM (n=8). Cg : Canal galactophorique ; Ct : Cellule tumorale, So : Stroma œdématisé ; Ta : Tissu adipeux ; Tp : Tissu conjonctif palléal.

III.1.6. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur quelques cytokines inflammatoires

Les effets de l'extrait éthanolique de *O. kirkii* sur les taux sériques de quelques cytokines après 22 semaines sont présentés dans la figure 13. Le DMBA a induit une augmentation significative des taux d'IL-6 ($p < 0,01$), TNF- α ($p < 0,001$), INF- γ ($p < 0,001$) et VEGF ($p < 0,001$) associée à une réduction significative ($p < 0,05$) du taux sérique d'IL-10 comparé au groupe normal. En comparaison au groupe DMBA, le traitement au tamoxifène a prévenu de manière significative l'augmentation des taux d'IL-6 ($p < 0,001$), de TNF- α ($p < 0,05$), d'INF- γ ($p < 0,01$) et de VEGF ($p < 0,001$). A l'instar du tamoxifène, le traitement avec l'extrait éthanolique de *O. kirkii* à toutes les doses testées a prévenu de manière significative l'augmentation des taux sériques d'IL-6, de TNF- α et de VEGF (au moins $p < 0,01$), tandis que seules les doses de 100 et 200 mg/kg ont prévenu de manière significative ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement) l'augmentation des taux sériques de l'INF- γ . Des effets opposés ont été enregistrés en ce qui concerne le taux sérique d'IL-10 où l'extrait à toutes les doses testées a entraîné une augmentation de ce paramètre, cependant l'effet le plus puissant a été observé avec la dose de 50 mg/kg ($p < 0,001$).

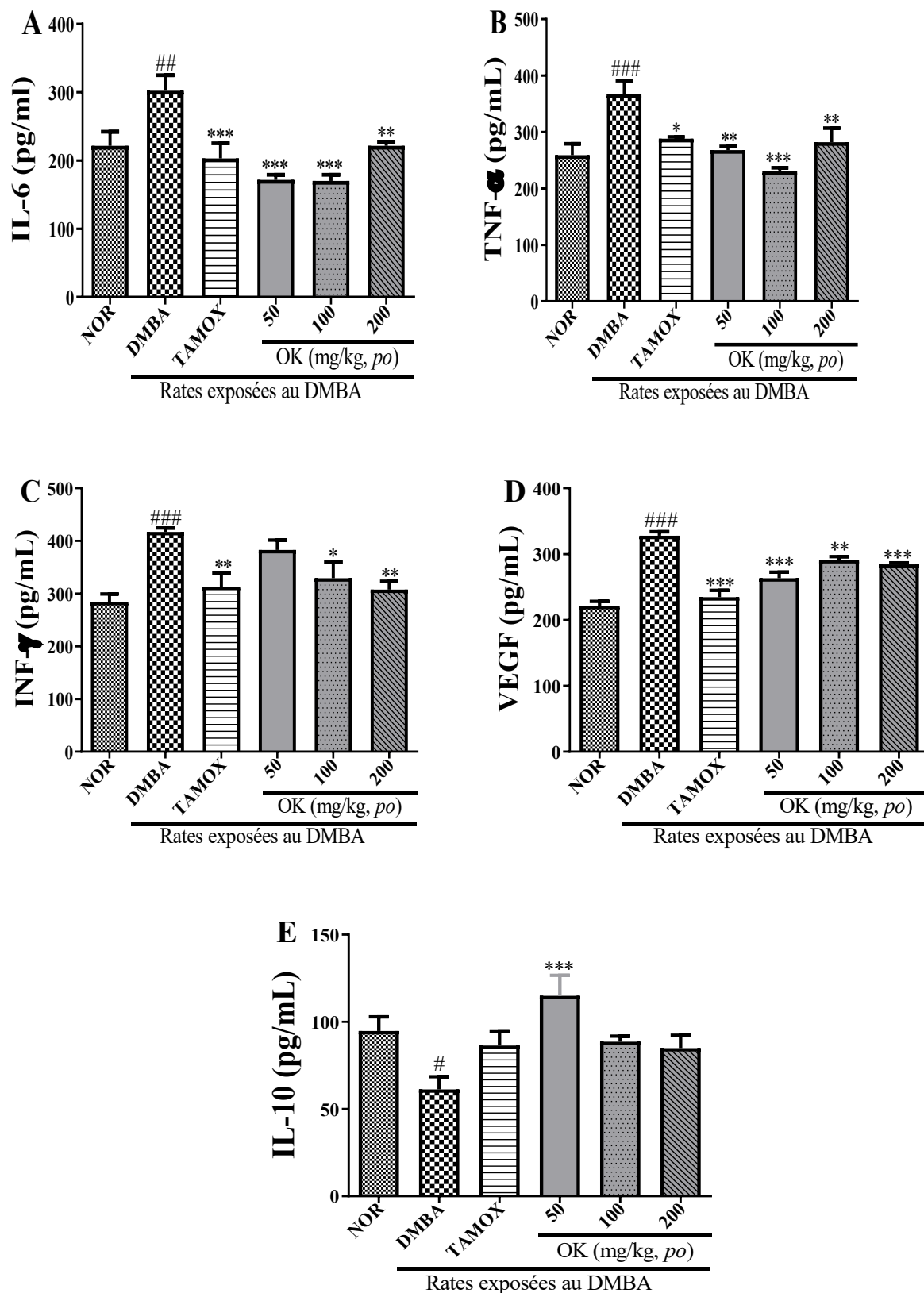


Figure 13: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Omocarpum kirkii* sur le taux de quelques cytokines inflammatoires.

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests

(OK50, OK100, OK200) ont été traitées avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. Kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ ESM (n=8). Significativité comparée au groupe DMBA : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n = 8). Significativité comparée au groupe NOR : ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (n = 8).

III.1.7. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur quelques paramètres du stress oxydatif

Le tableau III montre les effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* sur quelques paramètres du stress oxydatif et sur le taux des protéines totales. En comparaison au groupe normal, le DMBA a entraîné une augmentation significative du taux de MDA ($p < 0,001$), de l'oxyde nitrique ($p < 0,01$) et des protéines totales ($p < 0,001$), ainsi qu'une baisse significative ($p < 0,001$) de l'activité de la catalase (CAT). Par contre le tamoxifène et l'extrait de *O. kirkii* à toute les doses ont empêché de manière significative ($p < 0,001$) l'augmentation du taux de MDA comparé au groupe DMBA. En comparaison au groupe DMBA, le traitement avec le tamoxifène a entraîné une baisse significative ($p < 0,001$) des taux tissulaires de MDA, de NO et de protéines totales et inversement, il a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'activité de la catalase. Tout comme le tamoxifène, l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* à toutes les doses testées a entraîné une baisse significative des taux de MDA ($p < 0,001$), NO ($p < 0,001$) et de protéines totales ($p < 0,001$), ainsi qu'une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'activité de la catalase (au moins $p < 0,05$).

Tableau III: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* sur quelques paramètres du stress oxydatif

Paramètres	NOR	DMBA	TAMOX	<i>O. kirkii</i> (mg/kg PC)		
				50	100	200
MDA (Mm/mg)	0,3 ± 0,0	1,6 ± 0,1###	0,4 ± 0,1***	0,9 ± 0,1***	0,8 ± 0,2***	0,2 ± 0,0***
L'oxyde nitrique (NO)	3,6 ± 0,1	18,4 ± 1,1###	1,1 ± 1,1***	5,4 ± 0,3***	7,6 ± 2,0***	3,4 ± 0,0***
Protéines totales (mg/mL)	4,7 ± 0,1	20,4 ± 1,5###	15,6 ± 0,8***	14,8 ± 0,5***	13,2 ± 0,2***	4,9 ± 0,0***
Catalase (mM de H ₂ O ₂ /min/mg)	6,3 ± 0,0	0,6 ± 0,1##	2,8 ± 0,8**	2,8 ± 0,9**	2,1 ± 0,06*	6 ± 0,00***

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests (OK50, OK100, OK200) ont été traitées avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. Kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Les valeurs représentent les moyennes ± ESM (n=8). Significativité comparée au groupe DMBA : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n = 8). Significativité comparée au groupe NOR : ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (n = 8).

III.1.8. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur la masse relative des organes

Les données du tableau IV montrent que le DMBA a entraîné une augmentation significative du poids relatif du foie ($p < 0,01$), des reins ($p < 0,01$), de la rate ($p < 0,001$) et des surrénales ($p < 0,01$), ainsi qu'une baisse significative de la masse relative de l'utérus ($p < 0,05$) comparé au groupe normal. Comparé au groupe DMBA, le tamoxifène a induit une baisse significative de la masse du foie ($p < 0,05$), du cœur ($p < 0,05$), de la rate ($p < 0,01$), de l'utérus ($p < 0,001$), et des ovaires ($p < 0,001$), ainsi que qu'une augmentation significative de la masse relative du fémur ($p < 0,001$). Tout comme le tamoxifène, l'extrait éthanolique à toutes les doses testées a entraîné une baisse significative de la masse relative de l'utérus (au moins $p < 0,05$), tandis que seules les doses de 100 et 200 mg/kg ont entraîné une réduction significative ($p < 0,001$) des masses relatives du foie et de la rate, ainsi qu'une réduction significative des masses relatives des ovaires ($p < 0,001$) et des reins ($p < 0,05$) à la dose de 200 mg/kg.

Tableau IV: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* sur la masse relative de quelques organes

Organes	NOR	DMBA	TAMOX	<i>Omocarpum Kirkii</i> (mg/kg PC)		
				50	100	200
Foie	28128,4 ± 1549,2	35604,6 ± 1483,3##	29829,3 ± 1960,2*	32579,9 ± 1760,5	26263,7 ± 873,1***	25624,8 ± 1067,9***
Poumons	8172,3 ± 421,5	7314,9 ± 454,4	7574,4 ± 718,0	7389,7 ± 464,7	8123,8 ± 334,7	6898,5 ± 31,8
Reins	4218,1 ± 167,8	5755 ± 361,8##	6612,3 ± 415,2	5414,7 ± 280,7	5608,7 ± 514,9	4379,0 ± 120,3*
Coeur	2815,1 ± 121,7	2813,4 ± 169,6	3320,6 ± 128,2*	3017,1 ± 96,3	2726,2 ± 160,7	2571,5 ± 42,5
Rate	2924,5 ± 133	6447,9 ± 378,0####	4604,6 ± 266,1**	5439,2 ± 1009,0	2861,9 ± 210,2***	3381,5 ± 149,2***
Fémur	2777,1 ± 140,5	2476,3 ± 131,6	3351,6 ± 227,9**	2521,1 ± 183,3	2704,6 ± 249,2	2889,0 ± 83,3
Thymus	1224,1 ± 54,4	1119,9 ± 64,4	1032,8 ± 86,5	1073,5 ± 138,2	1131,1 ± 79,2	812,1 ± 68,5
Surrénales	202,0 ± 12,8	310,5 ± 20,0##	266,2 ± 18,2	292,5 ± 30,6	309,3 ± 59,7	154,3 ± 13,3**
Uterus	2698,2 ± 88,1	2144,9 ± 181,2#	773,4 ± 61,7***	1144,6 ± 51,0***	1595,1 ± 159,1*	1532,2 ± 151,6**
Ovaires	537,1 ± 40,7	554,6 ± 18,5	176,2 ± 22,4***	536,5 ± 77,7	418 ± 30,1	237,4 ± 21,6***

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests (OK50, OK100, OK200) ont été traitées avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. Kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Les valeurs représentent les moyennes ± ESM (n=8). Significativité comparée au groupe DMBA : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n = 8). Significativité comparée au groupe NOR : # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (n = 8).

III.1.9. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur quelques biomarqueurs de la toxicité

Les données du tableau V montre que sur les paramètres biochimiques de la fonction hépatique et rénale, le DMBA a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) des activités ALAT, ASAT et de la PAL ($p < 0,001$), des taux de créatinine ($p < 0,01$), urée ($p < 0,001$) et bilirubine totale ($p < 0,001$) comparé au groupe normal. En comparaison au DMBA, l'extrait éthanolique de *O. kirkii* à toutes les doses testées a prévenu de manière significative l'augmentation des activités de l'ALAT ($p < 0,001$) et l'ASAT ($p < 0,001$), des taux sériques de bilirubine totale ($p < 0,001$) et de créatinine (au moins $p < 0,05$). Seules les doses de 100 et 200 mg/kg ont prévenu de manière significative (au moins $p < 0,01$) l'augmentation du taux sérique d'urée, tandis que seule la dose de 200 mg/kg a prévenu significativement ($p < 0,01$) l'activité de la PAL. Ces effets sont similaires à ceux du tamoxifène en ce qui concerne l'activité de l'ALAT et du taux sérique de bilirubine totale pour lesquels le tamoxifène a prévenu de manière significative ($p < 0,001$) l'augmentation.

Tableau V: Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* sur quelques paramètres biochimiques de toxicité.

Paramètres	NOR	DMBA	TAMOX	<i>Omocarpum Kirkii</i> (mg/kg PC)		
				50	100	200
ALAT (U/L)	62,6 ± 4,9	105,8 ± 2,5###	72,5 ± 1,9***	76,0 ± 4,1***	61,0 ± 3,5***	81,6 ± 2,0***
ASAT (U/L)	199,5 ± 6,3	295,9 ± 1,3###	297,9 ± 14,0	173,5 ± 5,6***	204,0 ± 5,2***	198,8 ± 11,6***
PAL (U/L)	303,8 ± 20,4	418,4 ± 13,5###	366,1 ± 24,3	352,8 ± 17,8	371,5 ± 22,3	312,9 ± 11,1**
BIL (μmol/L)	3,2 ± 0,2	5,3 ± 0,1###	3,9 ± 0,3***	3,4 ± 0,1***	3,2 ± 0,2***	3,5 ± 0,2***
CREAT (mg/dL)	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1##	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,0***	1,0 ± 0,0*	1,1 ± 0,0*
Urée (mg/dL)	21,1 ± 0,9	31,2 ± 1,3###	31,6 ± 1,2	27,9 ± 1,9	24,1 ± 0,5**	22,0 ± 1,3***

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests (OK50, OK100, OK200) ont été traitées avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Les valeurs représentent les moyennes ± ESM (n=8). Significativité comparée au groupe DMBA : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n = 8). Significativité comparée au groupe NOR : ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (n = 8).

III.1.10. Effets de l'extrait de *Omocarpum kirkii* sur quelques paramètres hématologiques

Le tableau VI montre une augmentation significative des taux de globule blanc ($p < 0,01$), de monocytes et de granulocytes ($p < 0,001$) chez le groupe DMBA comparé au groupe Normal. Dans le groupe témoin positif (TAMOX), les taux de globule blanc et de granulocytes diminuent significativement ($p < 0,01$) comparé au groupe DMBA. En ce qui concerne les groupes tests (*O. kirkii*), le taux de globules blancs diminue de façon significative ($p < 0,01$) aux doses 100 et 200 mg/kg en comparaison au groupe DMBA. Le taux de monocytes diminue significativement d'au moins ($p < 0,05$) à toutes les doses testées de l'extrait de *O. kirkii* par rapport au groupe DMBA.

Il a également été observé une diminution significative d'au moins $p < 0,01$ de la quantité de globules rouges, lymphocytes, hémoglobine et hématocrite dans le groupe DMBA comparé au groupe normal. Dans le groupe TAMOX on note une augmentation significative d'au moins $p < 0,001$ du taux des paramètres hématologiques précédents comparé au groupe DMBA. Concernant l'extrait des *O. kirkii*, tous les groupes (50, 100, 200 mg/kg) ont vu leur taux de globule rouge, lymphocytes, hémoglobine et hématocrite augmenter de manière significative d'au moins $p < 0,05$ en comparaison avec le groupe DMBA.

Le taux de plaquettes sanguines a augmenté de façon significative ($p < 0,001$) de 591 ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dans le groupe normal à 867,3 ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dans le groupe DMBA. Chez le groupe contrôle positif (TAMOX), on note une diminution non significative de la quantité des plaquettes sanguines par rapport comparé au groupe DMBA. Chez les animaux traités avec l'extrait de *O. kirkii*, le taux des plaquettes sanguines diminue de façon significative ($p < 0,001$) à la dose 100 mg/kg.

Tableau VII : Effets de l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* sur certains paramètres hématologiques chez les rates ayant des tumeurs mammaires.

Paramètres	NOR	DMBA	TAMOX	<i>Omocarpum kirkii</i> (mg/kg, PC)		
				50	100	200
GB ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	8,7 $\pm$ 0,8	15,8 $\pm$ 1,4###	7,9 $\pm$ 1,0**	14,5 $\pm$ 2,8	7,3 $\pm$ 0,7**	7,9 $\pm$ 0,5**
Monocytes (%)	0,5 $\pm$ 0,2	10,6 $\pm$ 1,1####	6,6 $\pm$ 2,3	6,1 $\pm$ 0,2*	3,1 $\pm$ 1,1***	5,9 $\pm$ 0,2*
Granulocytes (%)	17,8 $\pm$ 2,6	38,1 $\pm$ 4,8####	16,3 $\pm$ 1,4**	19,9 $\pm$ 6,8*	26,1 $\pm$ 2,4	16,3 $\pm$ 2,8**
Lymphocytes (%)	79,4 $\pm$ 2,2	59,3 $\pm$ 5,5##	78,7 $\pm$ 1,2**	73,8 $\pm$ 6,8*	70,7 $\pm$ 1,7	83,9 $\pm$ 0,7***
GR ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7,1 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,2####	7,7 $\pm$ 0,0***	7,2 $\pm$ 0,3***	6,8 $\pm$ 0,1*	8,1 $\pm$ 0,2***
HGB	13,9 $\pm$ 0,1	8,7 $\pm$ 0,4####	11,7 $\pm$ 1,3*	12,4 $\pm$ 0,9**	13,2 $\pm$ 0,1***	14,8 $\pm$ 0,1***
Plaquettes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	591,0 $\pm$ 33,2	867,3 $\pm$ 42,0####	793,2 $\pm$ 33,1	737,3 $\pm$ 58,5	572,5 $\pm$ 18,6***	794,3 $\pm$ 19,6
HCT	40,5 $\pm$ 0,9	30,7 $\pm$ 1,0####	42,9 $\pm$ 2,7***	42,7 $\pm$ 2,0***	42,5 $\pm$ 0,7***	46,8 $\pm$ 0,7***

Les groupes témoins normal (NOR) et négatif (DMBA) ont tous deux reçus de l'eau distillée (véhicule) ; le groupe témoin positif (TAMOX) a été traité avec du tamoxifène à la dose de 3,3 mg/kg PC ; les groupes tests (OK50, OK100, OK200) ont été traitées avec l'extrait éthanolique de l'écorce de *O. Kirkii* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ ESM (n=8). Significativité comparée au groupe DMBA : * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 (n = 8). Significativité comparée au groupe NOR : ## p < 0,01 ; #### p < 0,001 (n = 8).

III.2 Discussion

Les options de traitements efficaces pour le cancer du sein sont en constante expansion, ce qui a entraîné une augmentation des taux de réponse, de la survie sans progression et/ou de la survie globale (O'Shaughnessy, 2005). Toutefois, malgré les avancées continues de la médecine moderne vers des traitements plus spécifiques aux cellules cancéreuses qui améliorent l'espérance de vie des patients, plusieurs limites sont identifiées comme les effets secondaires indésirables, les résistances potentielles et le coût élevé du traitement qui le rend inaccessible à la population (Tong *et al.*, 2018). Dans cette situation, il est essentiel de trouver de nouvelles substances naturelles antitumorales. L'une des principales stratégies consiste à étudier les substances naturelles locales en se basant sur leur utilisation traditionnelle (Kuete *et al.*, 2016). Dans cette étude, nous avons évalué le potentiel chimio-préventif de l'extrait de l'écorce de *Omocarpum kirkii* sur un modèle de cancer du sein induit par le DMBA chez la rate de souche Wistar, connu comme étant œstrogéno-dépendant. Ce modèle d'induction est largement employé en raison de l'exposition quotidienne de l'Homme aux hydrocarbures aromatiques polycycliques par la consommation de viandes cuites à une température extrêmement élevée, de combustibles fossiles à combustion incomplète et de la fumée de cigarette (Sagiv *et al.*, 2009). Ainsi le DMBA induit un cancer qui se forme à partir des cellules épithéliales canalaire et s'avère très similaire tant sur le plan immunologique, biochimique qu'histologique au cancer du sein retrouvé chez la femme. Il permet jusqu'à ce jour de mettre en évidence les effets potentiels chimio-préventifs de divers produits naturels par administration d'une dose unique (de 30 à 100 mg/kg PC) de ce dernier par voie orale ou locale chez des rates prépubères âgées d'environ 60 jours (Russo et Russo, 2000 ; Zingue *et al.*, 2019). Cela s'explique par la prolifération accrue au niveau des canaux terminaux de leurs glandes mammaires à cet âge, ce qui les rend extrêmement sensibles aux carcinogènes (Ibrahim *et al.*, 2016).

Des recherches ont montré que chez des rates en phase de transition hormonale (environ 60 jours), l'administration d'une dose unique de DMBA (50-80 mg/kg PC) par voie orale ou locale entraîne le développement du cancer du sein 15 à 25 semaines plus tard (Zingue *et al.*, 2018 ; Gul *et al.*, 2021). Dans cette étude, en accord avec les résultats précédents, l'administration d'une dose de 50 mg/kg de DMBA localement dans la glande mammaire chez des rates Wistar d'environ 60 jours, pesant environ 80g, a entraîné le développement de tumeurs mammaires dès la 17ème semaine, avec une incidence de 100% dans le groupe DMBA à la fin de l'expérimentation. Par contre, les rates du groupe normal n'ont montré aucun signe ou symptôme de croissance de tumeur mammaire. En effet, sous l'action des enzymes du cytochrome P450 (CYP1A1 et CYP1B1), le DMBA est activé métaboliquement grâce à son principal intermédiaire mutagène réactif, le 7,12-diol-DMBA. Celui-ci peut causer des

dommages à l'ADN formant ainsi des adduits d'ADN et entraînant l'activation des voies de signalisation cellulaire et la prolifération des cellules tumorales. Plus spécifiquement, il induit le cancer du sein dans des modèles précliniques en activant le récepteur cytosolique cellulaire "aryl hydrocarbon receptor" (AhR). Lorsque AhR est activé, cela entraîne une translocation dans le noyau et se combine avec la protéine de translocation nucléaire AhR. Le complexe AhR/ARNT induit la transcription des gènes en se liant à des sites spécifiques de reconnaissance de l'ADN en amont des gènes sensibles à l'AhR formant ainsi des adduits d'ADN (Alvarado *et al.*, 2017). Les analyses histopathologiques (figure 12) ont montré un parenchyme mammaire fait d'une prolifération dense de cellules tumorales chez les animaux du groupe DMBA, tandis que ceux traités par l'extrait éthanolique de *O. kirkii* à toutes les doses présentaient un parenchyme mammaire fait de prolifération d'éléments tumoraux rappelant un carcinome canalaire infiltrant aux doses de 50 et 200 mg/kg, tandis qu'à la dose de 100 mg/kg l'histoarchitecture évoque un comédocarcinome.

Une réduction significative ($p < 0,01$) du gain de poids des animaux du groupe TAMOX a été observée à partir du 126ème jour jusqu'à la fin de l'expérimentation, comparé au groupe DMBA. Ce résultat suggère que la prise du tamoxifène a un effet anorexigène. Ces résultats concordent avec les recherches de Zingue et collaborateurs (2018), qui ont démontré que le tamoxifène pouvait provoquer une diminution du poids corporel des animaux allant jusqu'à 22% sur une période de 6 mois. L'origine de ce phénomène serait due à une augmentation de la production d'opiomélanocortine par le tamoxifène, un peptide anorexigène qui réduit l'appétit des rats entraînant donc leur perte de poids.

En accord avec les résultats concernant la croissance tumorale, on observe une augmentation significative du taux sérique de CA15-3 dans le groupe DMBA comparé aux rates normales. Cette observation suggère une prolifération accrue des cellules mammaires chez les rates du groupe DMBA, ce qui peut expliquer leur survie plus faible. En effet, le taux du biomarqueur sérique du cancer du sein CA15-3 joue un rôle clé dans la prédiction d'un taux élevé de prolifération cellulaire (Duffy *et al.*, 2010). Le CA15-3, un antigène du cancer, est un biomarqueur fréquemment employé pour le suivi et l'évaluation de la réponse au traitement anticancéreux (Shao *et al.*, 2015). Il est bien connu que la prolifération des cellules s'accompagne d'une augmentation des taux de protéines cellulaires. L'extrait de *Omocarpum kirkii* a inhibé l'augmentation du taux de protéines totales ainsi que le taux de la protéine Mucin-1 (CA15-3), qui est une protéine transmembranaire surexprimée dans le cancer du sein (Rahn *et al.*, 2001), suggérant ainsi des effets chimio-préventifs de *Omocarpum kirkii* contre la croissance des cellules cancéreuses mammaires, qui pourraient être attribués à ses propriétés cytotoxiques

(Adem *et al.*, 2019 ; Kamto *et al.*, 2023). Le tamoxifène a présenté des effets similaires ; ce qui est en accord avec de nombreux travaux précédents (Karimi *et al.*, 2019 ; Zingue *et al.*, 2019 ; Mefegue *et al.*, 2021). En tant qu'inhibiteur de la fixation des œstrogènes endogènes sur les récepteurs aux œstrogènes. Le tamoxifène agit en empêchant la multiplication des cellules cancéreuses dans les glandes mammaires, car les œstrogènes favorisent la prolifération des cellules initiées dans ce modèle de cancer (Hamabam et Weinberg, 2011).

Pour mieux comprendre les voies par lesquelles *Omocarpum kirkii* exerçait ses effets chimiopréventifs, certaines cytokines inflammatoires ont été analysées. La réponse inflammatoire joue un rôle important dans l'initiation des tumeurs, l'angiogenèse et les métastases. Selon les données de la littérature, les molécules telles que l'IL-6, le TNF- α l'IL-10, l'INF- γ et le médiateur inflammatoire VEGF sont des cytokines connues pour jouer un rôle dans la progression du cancer du sein (Nikitovic *et al.*, 2015). Il a été constaté que l'IL-6, le TNF- α et l'INF- γ sont principalement des cytokines pro-inflammatoires associées à la croissance tumorale et à l'angiogenèse, tandis que l'IL-10 présente une activité anti-inflammatoire. La réduction des cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- α , INF- γ et VEGF, ainsi que l'augmentation du taux sérique de la cytokines anti-inflammatoire IL-10 après le traitement à l'extrait éthanolique de *Omocarpum kirkii* s'alignent bien avec les résultats publiés par Gacche et Dhole (2011) qui signalent que divers extraits de plantes médicinales présentent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires par la modulation des cytokines telles que TNF- α , IL-6 et IL-10. *Omocarpum kirkii* à toutes les doses testées a diminué significativement le taux de VEGF, ce qui suggère une action anti-inflammatoire, comme c'est le cas pour certains travaux effectués sur d'autres plantes (Cazarin *et al.*, 2015).

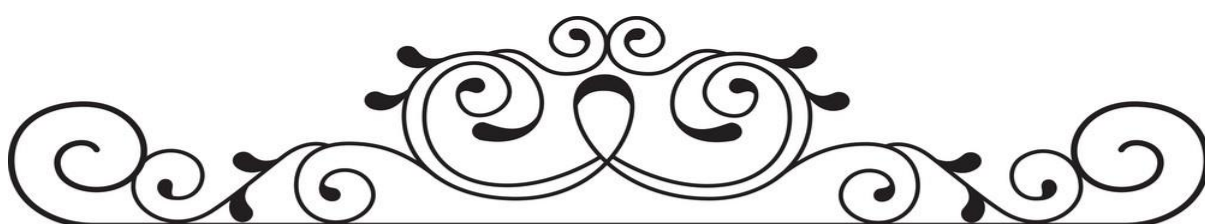
Le DMBA induit ses effets cancérogènes par la libération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et une augmentation de la peroxydation lipidique, qui entraînent des dommages au niveau de l'ADN (Sharma *et al.*, 2012). Dans cette étude le DMBA a induit un stress oxydatif significatif comme en témoigne l'augmentation du MDA et la diminution de l'activité de la catalase. L'augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de MDA dans le groupe DMBA comparé au groupe normal dans ce travail est en accord avec les travaux de Erejuwa *et al.* (2013), qui montrent que les taux sériques de MDA sont extrêmement élevés chez les patients cancéreux comparés aux patients normaux. L'effet protecteur du tamoxifène observé dans notre étude est corroboré par les travaux de Nazarewicz *et al.* (2007), qui ont démontré les propriétés antioxydantes du tamoxifène *in vivo*. L'extrait de *O. kirkii* à toutes les doses a significativement ($p < 0,001$) protégé contre l'augmentation du taux de MDA ; ce qui suggère une prévention contre les dommages de la membrane cellulaire. La catalase qui est une enzyme antioxydante joue un rôle clé dans la défense cellulaire contre les dommages causés par les radicaux libres

(Ighodaro et Akinloye, 2018). Dans cette étude, Le carcinome mammaire induit par le DMBA a présenté une réduction significative de l'activité fonctionnelle de l'antioxydante enzymatique la catalase ce qui est en accord avec les travaux de Sharma *et al.* (2012) qui stipulent que le DMBA provoque une diminution des enzymes antioxydantes dans les tissus mammaires. Par contre, l'extrait de *O. kirkii* a significativement augmenté l'activité de la catalase ce qui lui confère des propriétés antioxydantes. L'augmentation du l'oxyde de nitrite (NO) observée dans le groupe DMBA est conforme aux résultats de Fakhoury *et al.* (2016), qui ont rapporté une augmentation de la production de NO dans les cellules cancéreuses mammaires. L'extrait de *O. kirkii* a diminué de manière significative, à toutes les doses testées, le taux d'oxyde nitrique dans le tissu mammaire par rapport au groupe témoin DMBA. Ce qui précède suggère que *O. kirkii* exerce une partie de ses effets anticancéreux *via* ses propriétés antioxydantes en passant par ses métabolites secondaires qui sont pour la plupart des flavonoïdes (kamto *et al.*, 2017).

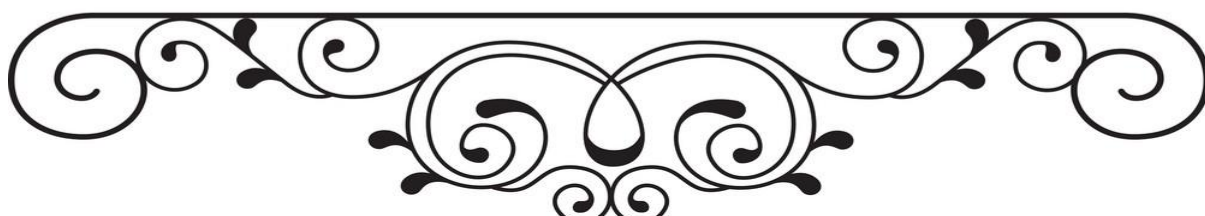
La modification de la masse relative des organes est un indicateur des effets secondaires potentiels des substances toxiques (Piao *et al.*, 2013). Le DMBA est un cancérigène puissant qui induit des tumeurs dans divers organes chez les rongeurs (Yan *et al.*, 2010). L'augmentation significative du poids du foie, des reins, de la rate et des surrénales observée suggère une réponse inflammatoire et une perturbation du métabolisme dans ces organes due aux propriétés cancérigènes et toxiques du DMBA (Cavalieri *et al.*, 1988 ; Miyata *et al.*, 2001). Dans la présente étude, le DMBA a provoqué une augmentation de la masse relative du foie corrélée à une augmentation des enzymes ALAT et ASAT. Ces observations sont cohérentes aux travaux de Sharma *et al.* (2012), Ichihara *et al.* (2011) qui ont montré que le DMBA induit un stress oxydatif hépatique et des dommages cellulaires. Parallèlement l'augmentation du poids de la rate pourrait être une réponse à la toxicité systémique. En effet, selon Bonfanti *et al.* (2009), l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comme le DMBA entraîne une hyperplasie lymphoïde réactive à l'origine d'une splénomégalie. Il est également connu que l'exposition au DMBA perturbe le métabolisme des lipides dans les tissus rénaux ce qui peut contribuer à augmenter la masse relative des reins et induire des altérations tissulaires ayant pour conséquence une défaillance rénale caractérisée par une augmentation des taux sériques de créatinine et d'urée tel qu'observé dans la présente étude (Tiam *et al.* 2020). Ces effets hépato et néphrotoxique du DMBA ont été reversés par l'administration de l'extrait éthanolique de *O. kirkii* à toutes les doses testées tant sur le plan tissulaire que biochimique, traduisant ainsi son potentiel rôle protecteur des fonctions hépatique et rénale. Cette action pourrait être due à la présence des flavonoïdes puissants antioxydants, comme observé dans d'autres plantes médicinales (Kuete *et al.*, 2013) capables de reverser et/ou limiter les altérations cellulaires liés au carcinogène.

Le tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (SERM), est couramment utilisé dans la prévention secondaire du cancer du sein. Il exerce son action en interagissant avec les récepteurs aux œstrogènes présents dans les cellules. Bien que son effet principal soit d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses dépendantes des œstrogènes, il a également des effets sur d'autres tissus, notamment l'ovaire et l'utérus, entraînant une diminution de leur masse relative probablement par inhibition de la folliculogenèse d'une part et de la prolifération cellulaire au niveau de l'endomètre à l'origine d'une atrophie, ce qui traduit ses propriétés antiœstrogéniques (Jordan, 2003). Des effets similaires ont été enregistrés suite au traitement avec l'extrait éthanolique de *O. kirkii* ce qui pourrait indiquer sa richesse en phytoestrogènes ou d'autres composés modulant l'activité œstrogénique, comme observé dans d'autres plantes médicinales (Patisaul et Jefferson, 2010). Son action hépatoprotectrice a également été rapportée, ceci caractérisée par une réduction de la masse relative du foie et de enzymes hépatique ALAT tel qu'observé dans la présente étude (Ben Kheder *et al.*, 2020).

Le système hématopoïétique est connu comme étant très sensible aux xénobiotiques et toute altération de ce système est un indicateur d'effets nocifs de substances et de l'état physiopathologique (Diallo *et al.*, 2010). Dans la présente étude, le DMBA a entraîné une diminution significative des taux de globule rouge, d'hémoglobine et d'hématocrite corrélée à une augmentation du taux de globules blancs. De même, un taux élevé de bilirubine est perçu comme étant un signe de destruction importante de globules rouges et par conséquent d'hémoglobine et donc d'anémie. L'extrait éthanolique de l'écorce de *O. kirkii* a protégé les cellules sanguines contre les l'hématotoxicité induite par le DMBA, renforçant ainsi l'hypothèse de son innocuité *in vivo*.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES



CONCLUSION

Au terme de ce travail, qui avait pour objectif de montrer les effets protecteurs de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Omocarpum kirkii* sur le cancer du sein induit par le DMBA chez la rate Wistar, il en ressort que :

- l'extrait éthanolique de l'écorce de *Omocarpum kirkii* est riche en composés phénoliques et présente une activité antioxydante ;
- l'extrait éthanolique de l'écorce de *Omocarpum kirkii*, à toutes les doses testées a inhibé significativement l'incidence, la charge tumorale, le volume tumoral et le biomarqueur du cancer du sein (CA15-3) ;
- l'extrait éthanolique de l'écorce de *Omocarpum kirkii*, à toutes les doses testées a inhibé les taux de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, INF- γ , VEGF) en augmentant le taux de la cytokine anti-inflammatoire (IL-10) tout en augmentant l'activités de l'enzyme anti-oxydante (catalase) et en diminuant le taux de MDA (marqueur de la peroxydation lipidique).

Pris dans l'ensemble ces résultats montrent que *Omocarpum kirkii* a des effets chimio-préventifs contre le cancer du sein induit par le DMBA chez la rate Wistar grâce à ses activités antioxydantes et anti-inflammatoires, avec un meilleur effet observé à la dose de 50 mg/kg.

PERSPECTIVES

Nous nous proposons dans un avenir proche de :

- effectuer une étude toxicologique de *Omocarpum kirkii*
- évaluer le potentiel cytotoxique des composés bioactifs présents dans *Omocarpum kirkii* sur les cellules cancéreuses mammaires in vivo



REFERENCES



- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D.** (2020). Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules*, 10(2), 221.
- Adeloye, D., Olaperi, Y., Sowunmi., Wura, J., Rotimi, A.D., Adeosun, A., Ann O., Sanjay, M.A.** (2018). « Estimating the incidence of breast cancer in Africa: a systematic review and meta-analysis ». *Journal of Global Health* 8 (1): 010419.
- Adem, Fozia A., et al.** (2019). "Cytotoxicity of isoflavones and biflavonoids from *Ormocarpum kirkii* towards multi-factorial drug-resistant cancer." *Phytomedicine* 58: 152853.
- Aggarwal A, Ginsburg, O et Brigham ,EP.** (2015). "Prioritising cancer control in low-resource and middle-resource countries". *The Lancet Oncology*. 16 (15): e709-e718.
- ALLIAM (Alliance des Ligues francophones Africaines et Méditerranéennes).** (2017). Les cancers en Afriques Francophones. *Ligue Nationale Contre le Cancer (France)*. 13 : 1-36.
- Alugoju, P., Nyshadham, S. N., Chaitanya, V.K., Swamy, k et Kumar, K.P.** (2021). « Chapter 7 - Phytotherapy for Breast Cancer ». In *A Theranostic and Precision Medicine Approach for Female-Specific Cancers*, édité par Rama Rao Malla et Ganji Purnachandra Nagaraju, *Academic Press*.129-63.
- Al-Dhaheri., Hassouna, I., Al-Salam S, et Karam, S.** (2008). « Characterization of Breast Cancer Progression in the Rat ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1138 (octobre): 121-31.
- Arpino, G., Bardou, P.J., Gary, M., Clark et Elledge, R.** (2004). « Infiltrating Lobular Carcinoma of the Breast: Tumor Characteristics and Clinical Outcome ». *Breast Cancer Research: BCR* 6 (3): R149-156.
- Azaïs, H., Maingon, P., Maïa, E., Nikpayam, M., Gonthier, C., Belghiti, J., Canlorbe, G et Uzan C.** (2019). « [For which patients could we consider de-escalation in the management of ductal carcinomas in situ] ». *Gynecologie, Obstetrique, Fertilité & Senologie* 47 (12): 872-79.
- Azria, D., Auvray, H., Barillot, I., Baumann, P., Benyoucef, A., Bons-Rosset, F., et Bontemps P.,** (2008). « Radiothérapie des carcinomes canalaire in situ : impact du complément d’irradiation du lit tumoral ». *Cancer/Radiothérapie* 12 (6-7): 571-76.
- Beddok, A., Cottu, P., Fourquet, A., & Kirova, Y.** (2023). Radiothérapie et thérapie ciblée pour la prise en charge du cancer du sein : mise au point. *Cancer/Radiothérapie*.
- Ben Kheder, Nadia ; Moalla, Safa ; Chtourou, Yassine ; Gdoura, Radhouane et Snoussi, Mejd.** (2020). Hepatoprotective effect of tamoxifen against oxidative stress induced liver injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 126: 110082.

- Benzie, I.F. F et Strain, J.J.** (1996). « The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay ». *Analytical Biochemistry* 239 (1): 70-76.
- Berg, W. A., Blume, J. D., Cormack, J. B., Mendelson, E. B., Lehrer, D., Bohm-Velez, M., et les investigateurs ACRIN, P.** (2008). Dépistage combine par echographie et mammographie versus mammographie seule chez des femmes ayant un risque eleve de cancer du sein. *JAMA-français*, 299(18), 2151.
- Bierie, B., et Moses, H. L.** (2006). TGF- β and cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 17(1-2), 29-40.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., et Kalayci, O.** (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5, 9-19.
- Bonfanti, P., Colombo, A., Orsi, F., Nizzetto, I., Andrioletti, M., Bacchetta, R., Mantecca, P., Fascio, U., Vailati, G., et Vismara, C.** (2009). "Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development" *Environmental pollution*, 157(12), 3192-3198.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., et Jemal, A.** (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263.
- Bromberg, J., et Wang, T. C.** (2009). Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer cell*, 15(2), 79-80.
- Carretier, J.** (2020). « Synthèse :
Incidence du cancer en France ». *Environnement, Risques&Santé* 5(1):12.[http://www.yearbookers.jle.com/edocs/synthese incidence du cancer_en_france_317156/yb_synthese.phtml?tab=texte](http://www.yearbookers.jle.com/edocs/synthese_incidence_du_cancer_en_france_317156/yb_synthese.phtml?tab=texte).
- Cavalieri E, Rogan E, et Sinha D.** (1988). Carcinogenicity of aromatic hydrocarbons directly applied to rat mammary gland. *JNCI*; 80(15): 1085-1092.
- Chhabra, S. C., R. L. A. Mahunnah, et E. N. Mshiu.** "Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. IV. Angiosperms (Mimosaceae to Papilionaceae)." *Journal of Ethnopharmacology* 29.3 (1990): 295-323.
- Cazarin., Betim, C., da Silva, K J., Colomeu, C.T., Batista, A.G., Meletti, L.M., Rizzato, J.A.P et Stanislau, B.J.** (2015). « Intake of Passiflora Edulis Leaf Extract Improves Antioxidant and Anti-Inflammatory Status in Rats with 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic Acid Induced Colitis ». *Journal of Functional Foods*, 17 (août): 575-86.

- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.** (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *The Lancet*, 350(9084), 1047-1059.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.** (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The lancet*, 360(9328), 187-195.
- Cuenod, C. A., et Lartigau, E.** (2004). Angiogenèse tumorale et imagerie. *Journal de Radiologie*, 85(9), 1375.
- Cutuli, B., Barreau, B., Bellocq, J., Bonnier, P., Fignon A., Fondrière E., et al.,** 2010. « Cancer du sein in situ ». *Oncologie* 12 (2) : 153-57.
- Delaloge, S., Bachelot, T., Bidard, F. C., Espie, M., Brain, E., Bonnefoi, H., ... et Rouzier, R.** (2016). Dépistage du cancer du sein : en route vers le futur. *Bulletin du Cancer*, 103(9), 753-763.
- Delozier, T.** (2010). Hormonothérapie du cancer du sein. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*, 39(8), F71-F78.
- Desmetz, C., Maudelonde, T., et Solassol, J.** (2008, November). Aspects biologiques de la cancérogenèse : quelles cibles pour la prévention ? In 30^e Journées de la Société Française de Sénologie et de Pathologie Mammaire (SFSPM), La Baule, 2008. *Prévention du cancer du sein (mythe ou réalité ?)* Datebe SAS. (Pp. 46-59).
- Diallo A, Eklou G, Agbonon A, Aklikokou K, Creppy E et Gbeassor M.** (2010). Acute and subchronic (28-days) oral toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Lannea kerstingii* Engl. and K. Krause (Anacardiaceae) stem bark. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 5: 343-349.
- Dine, J., et Deng, C. X.** (2013). Mouse models of BRCA1 and their application to breast cancer research. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32, 25-37.
- Doridot, V., Nos, C., Aucouturier, J. S., Sigal-Zafrani, B., Fourquet, A., et Clough, K. B.** (2004). Le traitement chirurgical conservateur du cancer du sein. *Cancer/radiothérapie*, 8(1), 21-28.
- Dranoff, G.** (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11-22.
- Duffy, J., Evoy, D et McDermott E.W.** (2010). « CA 15-3: Uses and Limitation as a Biomarker for Breast Cancer ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical*

- El Hasasna, H., Saleh, A., Samri, H. Al, Athamneh, K., Attoub, S., Arafat, K., Benhalilou, N., Alyan, S., Viallet, J., Dhaheri, Y. Al, Eid, A., et Iratni, R. (2016).** Rhus coriaria suppresses angiogenesis, metastasis and tumor growth of breast cancer through inhibition of STAT3, NF κ B and nitric oxide pathways. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–15.
- Elakkiya, V., Menon, M. P., Nataraj, D., Biji, P., et Selvakumar, R. (2017).** Optical detection of CA 15.3 breast cancer antigen using CdS quantum dot. *Iet Nanobiotechnology*, 11(3), 268-276.
- Elbachiri., Meriem., Safini, F., Zineb, B., Benchekroun N., Hassan, J., Tawfiq, S.S et Abdellatif, B. (2017).** « [Breast cancer in men: about 40 cases and literature review] ». *The Pan African Medical Journal* 28: 287.
- Ellman, G L., (1959).** « Tissue Sulfhydryl Groups ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82 (1): 70-77.
- Endogenous H, Breast Cancer Collaborative G, Key TJ, et al. (2013)** Hormones sexuelles et risque de cancer du sein chez les femmes préménopauses: une réanalyse collaborative des données individuelles des participants de sept études prospectives. *Lancette Oncol.*14: 1009-1019.
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, A.S et Mohd, S., Wahab A. (2013).** « Evidence in Support of Potential Applications of Lipid Peroxidation Products in Cancer Treatment ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Ezeome, ER et Anarado, AN. (2018).** « Use of complementary and alternative medicine by cancer patients at the university of Nigeria cheaching hospital, ituku-ozala, Enugu, Nigeria: pattern and determinants » *Journal of Ethnopharmacology*.
- Fakhoury, I., Saad, W., Bhaijee, F., Painter, J., Heilbrun, L., Sakr, W., Hwang, C., Lawson, D., Grignon, D., Pontes, J. E., Albrecht, M., et Ratnam, M. (2016).** "Nitric oxide synthase and breast cancer: role of TIMP-1 in NO-mediated Akt activation". *PLoS One*.
- Faucet-Marquis., et Virginie. (2005).** « L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. ».
- Faustino-Rocha, A.P., Oliveira, J.P., Teixeira-Guedes, C., Ruben Soares-Maia., Rui Gil da Costa., et Bruno Colaço. (2013).** « Estimation of Rat Mammary Tumor Volume Using Caliper and Ultrasonography Measurements ». *Lab Animal* 42 (6): 217-24.

- Feigelson, H. S., Calle, E. E., Robertson, A. S., Wingo, P. A., et Thun, M. J.** (2001). Alcohol consumption increases the risk of fatal breast cancer (United States). *Cancer Causes & Control*, 12, 895-902.
- Fouad, Y.A et Aanei C.** (2017). « Revisiting the hallmarks of cancer ». *American Journal of Cancer Research* 7 (5): 1016-36.
- Fowler, A. M., et Strigel, R. M.** (2022). Clinical advances in PET–MRI for breast cancer. *The Lancet Oncology*, 23(1), e32-e43.
- Frikha, N., et Chlif, M.** (2021). Un aperçu des facteurs de risque du cancer du sein. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 205(5), 519-527.
- Fulton, H. D., et al** (1974). "Inventaire des ressources du nord du Cameroun." *Département de l'agriculture des États-Unis, Service de conservation des sols, USAID-FAC-France* : 64-67.
- Gacche et Dhole** (2011). Pharmaceutical Biology. "Evaluation of the anti-inflammatory activity of Citrus maxima Burm. and Withania somnifera Dunal in carrageenan-induced paw edema model".
- GLOBOCAN.** (2020). The Global Cancer Observatory - All cancers. *International Agency for Research on Cancer - WHO*, 419, 199–200. <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Hanahan, D., et Weinberg, A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Harborne, A.J.** (1998). *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer Science & Business Media.
- Harris, H., Nofisat, I. N., McShane, L.M., Deborah, E., Collyar, A., Gonzalez-Angulo, E et Hammond, H.** (2016). « Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (10): 1134-50.
- Hennings, H., Glick, A.B., Greenhalgh, D.A., Morgan, D. L., Strickland, J. E., Tennenbaum, T et Yuspa, S.H.** (1993). « Critical Aspects of Initiation, Promotion, and Progression in Multistage Epidermal Carcinogenesis ». *Experimental Biology and Medicine* 202 (1): 1-8.
- Hennequin, C., Barillot, I., Azria, D., Belkacémi, Y., Bollet, M., Chauvet, B et Mahé, M. A.** (2016). Radiothérapie du cancer du sein. *Cancer/Radiothérapie*, 20, S139-S146.

- Hinkula, M., Pukkala, E., Kyrrönen, P et Kauppila, A.** (2001). Grand multiparity and the risk of breast cancer: population-based study in Finland. *Cancer causes & control*, 12, 491-500.
- Holohan,C., Van Schaeybroeck, S., Longley, DB et Johnston, PG.**(2013). Cancer drug resistance and evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*.
- Huang L, Zhang R, et Lan Y.** (2010). Anti-inflammatory effects of menthol on acute airway inflammation model in mice. *Int Immunopharmacol*; 10(8): 955-62.
- Ibrahim, M.A., Reda, H., Elbakry et Naglaa, B.** (2016). « Effect of Bisphenol A on Morphology, Apoptosis and Proliferation in the Resting Mammary Gland of the Adult Albino Rat ». *International Journal of Experimental Pathology* 97 (1): 27-36.
- Ichihara, Takeshi; Husain, Amna; Pascual, Juan M.; Kamata, Yuka et Nakae, Dai.** (2011). Dimensions of DMBA/croton oil-induced squamous cell carcinogenesis and its chemoprevention. *Cancer Sci*; 102(9): 1769-73.
- Ighodaro, O.M et Akinloye, A.** (2018). « First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid ». *Alexandria Journal of Medicine* 54 (4)
- Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M et Srdjenovic, U.** (2021). Le stress oxydatif et son rôle dans le cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, 17(1), 22-28.
- Jordan VC.** (2003). Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov*; 2(3): 205-213.
- Kahlain, K.** (2004). Chimiothérapie néoadjuvante dans le traitement conservateur du cancer du sein.
- Kamto, E. L. D., Carvalho, T. S. C., Mbing, J. N., Matene, M. C. N., Pegnyemb, D. E et Leitão, G. G.** (2017). Alternating isocratic and step gradient elution high-speed counter-current chromatography for the isolation of minor phenolics from *Ormocarpum kirkii* bark. *Journal of Chromatography A*, 1480, 50–61.
- Kamto, E. L., Leitão, G. G., da Silva, V. A. D., Ferreira-Pereira, A., Ngo Mbing, J et Pegnyemb, D. E.** (2020). Bioactive non-polar compounds from *Ormocarpum kirkii* Bark: A source of fungal multidrug resistance inhibitors. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(2), 177-182
- Kamto, E. L. D., Zingue, S., Grein, T., Kamdem, B. P., Maxeiner, S., Rutz, J et Leitão, G. G.** (2023). Two Phenolic Compounds (Biscoumarin and Biflavonoid) From *Ormocarpum*

- kirkii S. Moore (Fabaceae) Exhibit Anticancer Properties Against Human Prostate Cancer Cells. *Journal of Herbal Medicine*, 42, 100811.
- Karimi, B., Ashrafi, M., Shomali, T et Yektaseresht, A.** (2019). « Therapeutic Effect of Simvastatin on DMBA-Induced Breast Cancer in Mice ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* 33 (1): 84-93.
- Key, T.J., Verkasalo, P et Banks, E.** (2001). « Epidemiology of Breast Cancer ». *The Lancet Oncology* 2 (3): 133-40.
- Khalis, M.** (2019). Les facteurs de risque de cancer du sein chez les femmes marocaines dans la région Fès, Maroc (*Doctoral dissertation, Université de Lyon*).
- Knight, J. A., Fan, J., Malone, K. E., John, E. M., Lynch, C. F., Langballe, R et WECARE Study Collaborative Group.** (2017). Alcohol consumption and cigarette smoking in combination: A predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *International journal of cancer*, 141(5), 916-924.
- Ko, E., et Aree, M.** (2015). « Natural Products for Chemoprevention of Breast Cancer ». *Journal of Cancer Prevention* 20 (4): 223-31.
- Koo, M., von Wagner, C., Gary, A., Abel, McPhail S., Greg, P. Rubin, et Lyratzopoulos G.** (2017). « Typical and Atypical Presenting Symptoms of Breast Cancer and Their Associations with Diagnostic Intervals: Evidence from a National Audit of Cancer Diagnosis ». *Cancer Epidemiology* 48 (juin): 140-46.
- Koohpar, Z. K., Entezari, M., Movafagh, A et Hashemi, M.** (2015). Anticancer activity of curcumin on human breast adenocarcinoma: Role of Mcl-1 gene. *International Journal of Cancer management*, 8(3).
- Kokwaro, John O.** (1976) *Medicinal plants of east Africa*. East African Literature Bureau, Kampala, Nairobi, Dar es Salaam.
- Kuete, Victor; Nkuete, Armelle HL; Mbaveng, Armelle T; Wiench, Benjamin; Wabo, Hippolyte K; Tane, Pierre et Efferth, Thomas** (2013). "Cytotoxicity and modes of action of 4'-hydroxy-2',6'-dimethoxychalcone and other flavonoids toward drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cell lines". *BMC complementary and alternative medicine* 13,147.
- Kuete, V., Joachim, K., Dzotam, I.K., Voukeng, A.G., Fankam et Efferth, T.** (2016). « Cytotoxicity of Methanol Extracts of Annona Muricata, Passiflora Edulis and Nine Other Cameroonian Medicinal Plants towards Multi-Factorial Drug-Resistant Cancer Cell Lines ». *SpringerPlus* 5 (1): 1666.

- Kuete, V., Omosa, LK, Midiwo, JO, Karaosmanoglu, O., et Sivas, H.** (2019). Cytotoxicité de phénoliques et terpénoïdes naturels de la flore kenyane vers les cellules de carcinome. *J. Ayurveda Intégré. Méd.* 10, 178-184.
- Kumaran, A et Karunakaran, R.J.** (2007). « In Vitro Antioxidant Activities of Methanol Extracts of Five Phyllanthus Species from India ». *LWT - Food Science and Technology* 40 (2):
- Kungu, A., Hamajima, N., et Hirose, K.** (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British journal of cancer*, 87(11), 1234–1245.
- Layde, P. M., Webster, L. A., Baughman, A. L., Wingo, P. A., Rubin, G. L., Ory, H. W et Cancer and Steroid Hormone Study Group.** (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*, 42(10), 963-973.
- Leemol, D., et Kuttan, K.** (2001). « Effect of Withania Somnifera on DMBA Induced Carcinogenesis ». *Journal of Ethnopharmacology* 75 (2): 165-68.
- Liskova, A., Koklesova, L., Samec, M., Smejkal, K., Samuel, S. M., Varghese, E., Abotaleb, M., Biringer, K., Kudela, E., Danko, J., Shakibaei, M., Kwon, T. K., Büsselberg, D et Kubatka, P.** (2020). *Flavonoids in Cancer Metastasis. Cancers*, 12(6), 1498.
- Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., Liu, J et Ni, Y.** (2015). Modèles mammésiens de tumeurs malignes primaires induites chimiquement exploitables pour la recherche théragnostique préclinique basée sur l'imagerie. *Imagerie quantitative en médecine et chirurgie*, 5(5), 708.
- Makarem, N., Chandran, U., Bandera, E. V et Parekh, N.** (2013). Dietary fat in breast cancer survival. *Annual review of nutrition*, 33, 319-348.
- Maltoni, M., Pirovano, M., Nanni, O., Marinari, M., Indelli, M., Gramazio, A et Terzoli, E.** (1997). « Biological Indices Predictive of Survival in 519 Italian Terminally Ill Cancer Patients. Italian Multicenter Study Group on Palliative Care ». *Journal of Pain and Symptom Management* 13 (1): 1-9.
- Maregesi, S. M., Ngassapa, O. D., Pieters, L et Vlietinck, A. J.** (2007). Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: plants used to treat infectious diseases. *Journal of ethnopharmacology*, 113(3), 457–470.
- Maregesi, S., Van Miert, S., Pannecouque, C., Feiz Haddad, M. H., Hermans, N., Wright, C. W., Vlietinck, A. J., Apers, S et Pieters, L.** (2010). Screening of tanzanian medicinal

- plants against plasmodium falciparum and human immunodeficiency virus. *Planta Medica*, 76(2), 195-201.
- Massagué, J.** (2008). TGF β in cancer. *Cell*, 134(2), 215-230.
- Massagué, J., et Obenauf, A.C.** (2016). « Metastatic Colonization by Circulating Tumour Cells ». *Nature* 529 (7586) : 298-306.
- Masi, C.M., Dionne J., Blackman et Peek, E.M.** (2007). « Interventions to Enhance Breast Cancer Screening, Diagnosis, and Treatment among Racial and Ethnic Minority Women ». *Medical Care Research and Review: MCRR* 64 (5 Suppl): 195S-242S.
- McDermott SP et Wicha, MS.** (2010.) « Targeting breast cancer stem cells». *Molecular Oncologie*.
- McNab., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack. A et O'Garra, A.** (2015). « Type I Interferons in Infectious Disease ». *Nature Reviews Immunology* 15 (2): 87-103.
- Medina et al.** (2010). "Angiogenesis in cancer: a growing spotlight on VEGF" *Biomedical Research International*.
- Mefegue, F., Kamto, L., Kenmogne, L.V., Awounfack, C.F., Noundou, X., Tantoh, D., Njamen D et Zingue S.** (2021). « Anti-Breast Cancer Potential of Anonidium Mannii (Oliv.) Engl. & Diels Barks Ethanolic Extract: UPLC-ESI-QTOF-MS Detection of Anticancer Alkaloids ». *Journal of Ethnopharmacology* 276 (août): 114131.
- Misra, H.P et Fridovich, I.** (1972). « The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase ». *The Journal of Biological Chemistry* 247 (10): 3170-75.
- Miyata, M., Furukawa, M., Takahashi, K., Gonzalez, K.J et Yamazoe Y.** (2001). « Mechanism of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Immunotoxicité: Role of Metabolic Activation at the Target Organ ». *The Japanese Journal of Pharmacology* 86 (3): 302-9.
- Nakano, S., Imawari, Y., Mibu, A., Otsuka, M et Oinuma T.** (2018). « Differentiating Vacuum-Assisted Breast Biopsy from Core Needle Biopsy: Is It Necessary? » *The British Journal of Radiology* 91 (1092): 20180250.
- Nazarewicz, R. R., Zenebe, W. J., Parihar, A., Larson, S. K., Alidema, E., Choi, J et Ghafourifar, P.** (2007). "Effect of short-term administration of tamoxifen and steroidal hormones on lipid peroxidation in rat tissues". *Archives of Medical Science*.
- Nikitovic, D., Holcapfel, B. N., Zvelebil, M et Costas, J.** (2015). The role of pro- and anti-inflammatory cytokines in breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35, 159-167.

- O'Shaughnessy J.** (2005) Prolonger la survie avec la chimiothérapie dans le cancer du sein métastatique. *Oncologue*; 10 (Suppl 3): 20–29.
- Pandya S, Moore RG.** (2011) Breast development and anatomy. *Clin Obstet Gynecol.* Mar ;54(1) :91-5.
- Papers, O.** (2011). Herbal Medicines and Infectious Diseases: Characterization by LC - SPE - NMR of Some Medicinal Plant Extracts Used against Malaria. 1139–1148.
- Patel., Jankiben, R., Karen, M., Gallegos, R. Walker, Davidson, A.M., Davenport, I et Tilghman S.L.** (2021). « Mammospheres of letrozole-resistant breast cancer cells enhance breast cancer aggressiveness ». *Oncology Letters* 22 (2): 1-10.
- Patisaul,H.B et Jefferson , Z.**(2010). "The pros and cons of phytoestrogens" *Frontiers in Neuroendocrinology*,31(4),400-419.
- Petrović, N.** (2016). MiR-21 might be involved in breast cancer promotion and invasion rather than in initial events of breast cancer development. *Molecular diagnosis & therapy*, 20(2), 97-110.
- Piao, Y., Liu, Y et Xie, X.** (2013). « Change Trends of Organ Weight Background Data in Sprague Dawley Rats at Different Ages ». *Journal of Toxicologic Pathology* 26 (1) : 29-34.
- Pisoschi AM, Pop A.** (2015) Le rôle des antioxydants dans la chimie du stress oxydatif : une revue. *Eur J Med Chem* ;97: 55-74.
- Priya, V., et Prasaad, P.** (2017). « Tubulo-lobular carcinoma: a rare mixed invasive carcinoma of breast ». *Int J Res Med Sci* 5: 2818-20.
- Rahn, J.J., Dabbagh, I., Pasdar, M et Hugh J.C.** (2001). « The Importance of MUC1 Cellular localization in Patients with Breast Carcinoma ». *Cancer* 91 (11): 1973-82.
- Rakha, E. A., El-Sayed, M.E., Powe, D.G., Green, A.R., Habashy, H., Grainge, M.J et Robertson, F.G.** (2008). « Invasive Lobular Carcinoma of the Breast: Response to Hormonal Therapy and Outcomes ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 44 (1): 73-83.
- Ramachandran Srinivasan, RS, Amballa Chaitanyakumar, AC, Anbazhagan Mageswari, AM, Ajitha Gomathi, AG, Kumar, JGSP, Mathiyazhagan Jayasindu, MJ et Gothandam, KM** (2017). L'administration orale de *Dunaliella salina* lyophilisée, une algue marine riche en caroténoïdes, réduit la progression tumorale chez le rat induit par un cancer mammaire.

- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P et Jackson R.** (2012). *campbel biologie*. 4 th ed, Pearson, Quebec, Canada: 479-482.
- Russo, J., et Irma, H., et Russo.** (2000). « Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland ». *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5 (2): 187-200.
- Rossi, L., Mazzara, C., et Pagani, O.** (2019). Diagnosis and treatment of breast cancer in young women. *Current treatment options in oncology*, 20(12), 86.
- Sagiv., Sharon, K., Mia, M., Gaudet, M., Page E., Shantakumar S., Susan L., Teitelbaum., Bell P.** (2009). « Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–DNA Adducts and Survival among Women with Breast Cancer ». *Environmental Research* 109 (3) : 287-91.
- Sarkar B, Ullah A, Islam S et Hossain S.** (2019) Potentiel anticancéreux des plantes médicinales du Bangladesh et leurs composés efficaces contre le cancer. *J PharmacognPhytochem*. 8 :827–33.
- Sastre-Garau, X., Jouve, B., Asselai A., Vincent-Salomon., Beuzeboc T., Dorval, C., Durand, A. Fourquet et Pouillart, P.** (1996). « Infiltrating Lobular Carcinoma of the Breast. Clinicopathologic Analysis of 975 Cases with Reference to Data on Conservative Therapy and Metastatic Patterns ». *Cancer* 77 (1): 113-20.
- Shao, Y., Xianfu, S., He, Y., Chaojun, L et Hui, L.** (2015). « Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer ».
- Siegel RL, Miller KD et Jemal A.** (2017). Statistiques sur le cancer. *CA Cancer J Clin*. 2017; 67: 7-30.
- Singleton, V.L., Orthofer, R et Lamuela-Raventós, M.R.** (1999). « [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent ». In *Methods in Enzymology*, 299:152-78. Oxidants and Antioxidants Part A. Academic Press.
- Sharma, N., Bhatt, D. C., et Singh, R.** (2012). "7,12-Dimethylbenz[a]anthracene induced changes in the hepatic metabolism of male Wistar rats: Effect of Terminalia arjuna bark extract" *Toxicology Letters*, 211(1), 18)-27.
- Sharma, R., et Vinayak, M.** (2012). "7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mouse skin tumorigenesis: Role of oxidative stress". *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Sharma, R.** (2019). « Breast Cancer Incidence, Mortality and Mortality-to-Incidence Ratio (MIR) Are Associated with Human Development, 1990–2016: Evidence from Global Burden of Disease Study 2016 ». *Breast Cancer* 26 (4): 428-45.

- Steeg, P.S.** (2006). « Tumor Metastasis: Mechanistic Insights and Clinical Challenges ». *Nature Medicine* 12 (8): 895-904.
- Stevanovic A., Lee P., et Wilcken N.,** 2006. « Metastatic Breast Cancer ». *Australian Family Physician* 35 (5): 309-12.
- Somiari, I., Sullivan, A., Russell, S., Somiari, S., Hai Hu, R.J et Alisha, G.** (2003). « High-Throughput Proteomic Analysis of Human Infiltrating Ductal Carcinoma of the Breast ». *Proteomics* 3 (10): 1863-73.
- Soroush, A., Farshchian, N., Komasi, S., Izadi, N., Amirifard, N et Shahmohammadi, A.** (2016). The role of oral contraceptive pills on increased risk of breast cancer in Iranian populations: a meta-analysis. *Journal of cancer prevention*, 21(4), 294.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A et Bray, F.** (2021). « Global Cancer Statistics (2020): GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* n/a (n/a). Consulté le 6 mai 2021.
- Syed Najmuddin, S. U. F., Romli, M. F., Hamid, M., Alitheen, N. B et Abd Rahman, N. M. A. N.** (2016). Anti-cancer effect of Annona Muricata Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–20.
- Tian, Yaoyu; Sun, Lixin; Liu, Xiaoming; Li, Botong; Wang, Qihao; Dong, Jing; Liu, Pingping; Ge, Rongsen; et Bai, Yilin.** (2020). "Metabolomics analysis of the toxicity of environmental pollutant 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rat kidney" *Enviromental pollution*, 265?114783.
- Tong, C. W. S., Wu, M., Cho, W. C. S et To, K. K. W.** (2018). Recent advances in the treatment of breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 8(JUN).
- Vendramini-Costa, D et Ecarvalho, J.** (2012). Mécanismes de liaison moléculaire entre inflammation et cancer. *Conception pharmaceutique actuelle*, 18(26), 3831-3852.
- Verret, B., et Loirat, D.** (2016). Immunothérapie et cancer du sein. *Oncologie*, 18(9-10), 551-558.
- Visser KE, Eichten A, et Coussens, LM.** (2006) Rôles paradoxaux du système immunitaire au cours du développement du cancer. *Nat. Rév. Cancer*; 6: 24-37.
- Voronov, E., Shouval, D. S., Krelm, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., ... et Apte, R. N.** (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2645-2650.

- Vranso, W., Ann-Katrine., Wullkopf, L., Christense, A., Leijnse, N., Magelund, J., Mathiesen J., Erler, J.T et Oddershede, L.B.** (2017). « Division Induced Dynamics in Non-Invasive and Invasive Breast Cancer ». *Biophysical Journal* 112 (3): 123a.
- Xu, Yong-Jiang, et al.** (2012): "Rapid isolation and identification of minor natural products by LC–MS, LC–SPE–NMR and ECD: Isoflavanones, biflavanones and bisdihydrocoumarins from *Ormocarpum kirkii*." *Phytochemistry* 79 121-128.
- Yagi et Kunio.** (1976). « A Simple Fluorometric Assay for Lipoperoxide in Blood Plasma ». *Biochemical Medicine* 15 (2): 212-16.
- Yan J, Xuan Y, Cinquin O et Hatzfeld A.** (2010). Review of DMBA-induced mouse tumor models. *Methods Mol Biol*; 610: 45-66.
- Yewei Liu, Ting Yin, Yuanbo Feng¹, Marlein Miranda Cona¹, Gang Huang, Jianjun Liu, Chanson Shaoli, Yansheng Jiang, Qianxia, Johannes V. Swinnen, Guy Bormans, Uwe Himmelreich, et Raymond Oyen, Yicheng Ni.**(2015). « Mammalian models of chemically induced primary malignancies».
- Zajicek G.** (1978). Cancer as a systemic disease. *Med Hypotheses* 1978; 4:193-207.
- Zingue, S., Cisilotto, J., Tueche, A.L., Tantoh, D., Mello, L.J., Njamen D et Creczynski Pasa. B.** (2018). « The Hydro-Ethanollic Extract of *Acacia Seyal* (Mimosaceae) Stem Barks Induced Death in an ER-Negative Breast Cancer Cell Line by the Intrinsic Pathway of Apoptosis and Inhibited Cell Migration ». *Journal of Ethnopharmacology*
- Zingue, S., Silihe, K., Fouba, I., Boukar A., Tueche, A.B., Njuh A et Njamen D.** (2019). « Potential of Regular Consumption of Cameroonian Neem (*Azadirachta Indica* L.) Oil for Prevention of the 7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene-Induced Breast Cancer in High-Fat/Sucrose-Fed Wistar Rats ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*
- Zingue, S., Cisilotto, J., Charly, R., Fogang, M., Ndinteh, D. T., Njamen, D., Tchoupang, E. N., Fohouo, N. T et Creczynski-pasa, T. B.** (2021). Les effets antitumorales mammaires de l ' extrait éthanolique de propolis de la région de l ' Adamaoua (Cameroun) se font par apoptose via la voie mitochondriale médiée par les espèces réactives de l ' oxygène. C, 1–13.
- Zipperstein, M.J., Guzman, A et Kaufman, L.J.** (2016). « Evaluating Breast Cancer Cell Morphology as a Predictor of Invasive Capacity ». *Biophysical Journal* 110 (3): 621a.



ANNEXES



ANNEXE I: Composition de l'aliment des rates (25 kg)

Constituants	Proportions (%)
Maïs	50
Poisson sec	14
Tourteau de blé	5
Arachide	8
Os	5
Palmiste	7
Premix	1
Farine de blé	10

ANNEXE II: Préparation d'autres solutions et tampons

❖ Alcool à 50%, 70%, 80 %

L'alcool est utilisé pour déshydrater les organes et stériliser les matériels. La préparation s'est faite par dilution de l'éthanol 95% se référant à la table de dilution des alcools ou table de Gay-Lussac.

❖ Hématoxyline de Harris

Composante de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE). Pour une préparation de 200 mL, 1 mg d'hématoxyline, 10 mL d'alcool absolu, 20 g sulfate d'aluminium potassique, et 0,5 g d'oxyde de mercure rouge ont été mélangés. Ensuite le mélange a été complété avec de l'eau distillée. Le mélange obtenu a été filtré et la solution d'Hématoxyline de Harris recueillie et conservé à 4 °C jusqu' à utilisation.

❖ Eosine alcoolique à 0,5%

Elle est utilisée pour colorer les noyaux en bleu-violets. Pour obtenir cette solution, 3 g d'éosine ont été dissouts dans 100 mL d'eau distillée. A cette solution initiale, 125 mL d'éthanol 95° ont été ajoutés et le volume final complété à 500 mL avec de l'eau distillée. Après homogénéisation et filtration, 2 gouttes d'acide acétique ont été ajoutées. La solution finale obtenue a été conservée à l'abri de la lumière et filtrée avant usage.

❖ Solution d'eau gélatinée

Elle a servi à faire adhérer les corps sur les lames porte-objets. Pour préparer 100 mL de cette solution, 5 mg de poudre de gélatine ont été dissouts dans 80 mL d'eau distillée et ce mélange a été complété à 100 mL à l'eau distillée.

❖ **Solution d'orange G à 10%**

Elle entre dans la composition de l'éosine alcoolique. Cette solution a été obtenue par dilution de 10 g d'orange G dans 100 mL d'eau distillée.

❖ **Solution d'éthanol/xylène**

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

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

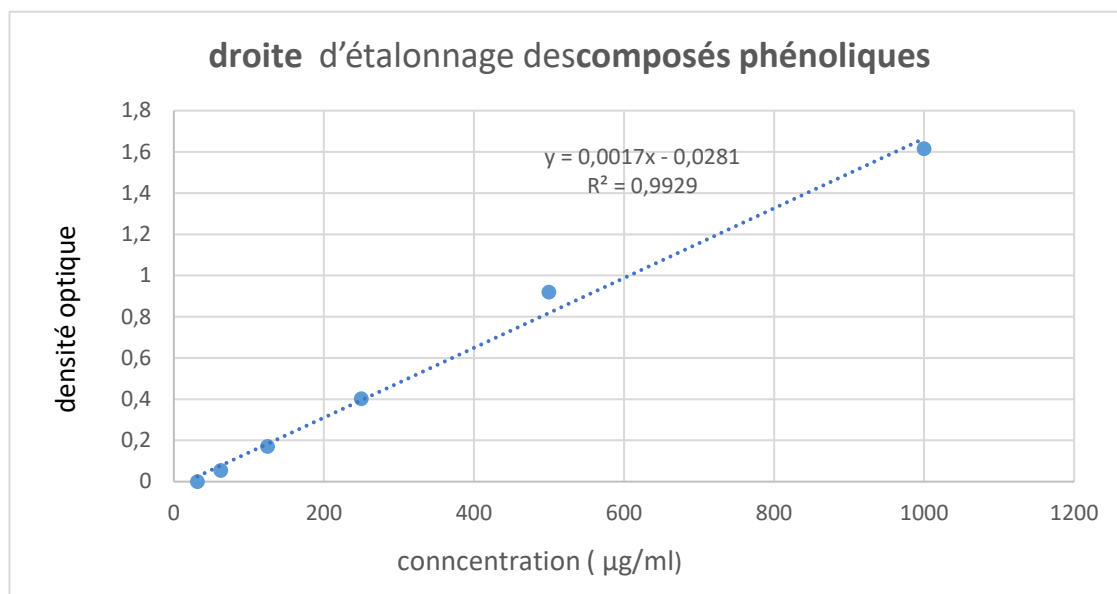
Cette solution a été obtenue par dilution de 6 g d'acide phosphotungstique dans le mélange suivant : 450 mL de vert lumière à 0,02%, 100 mL de brun Bismarck à 0,5% et 450 mL de solution d'éosine à 0,5%.

❖ **Solution de Biuret**

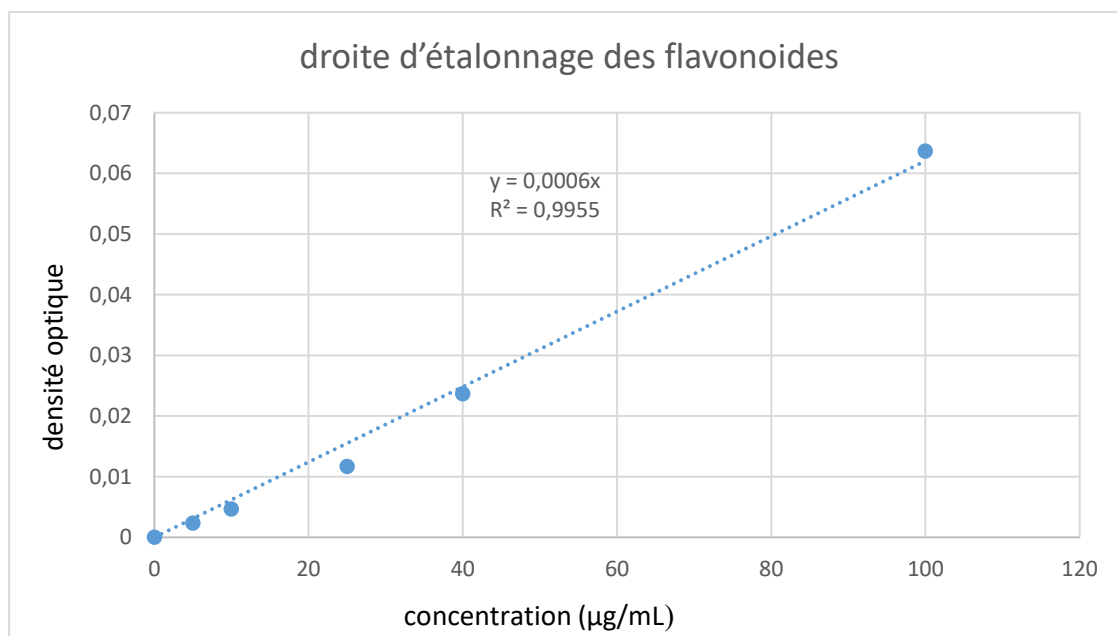
C'est la solution réactive pour doser les protéines totales, faite de deux solutions : solution A composée de 0,75 g de sulfate de cuivre hydraté ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) et 3 g de tartrate de sodium et de potassium dissouts dans 100 mL d'eau distillée. La Solution B quant à elle était faite de 15 g de soude dissouts dans 100 mL d'eau distillée. Les deux solutions ont été mélangées et le volume final ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée.

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

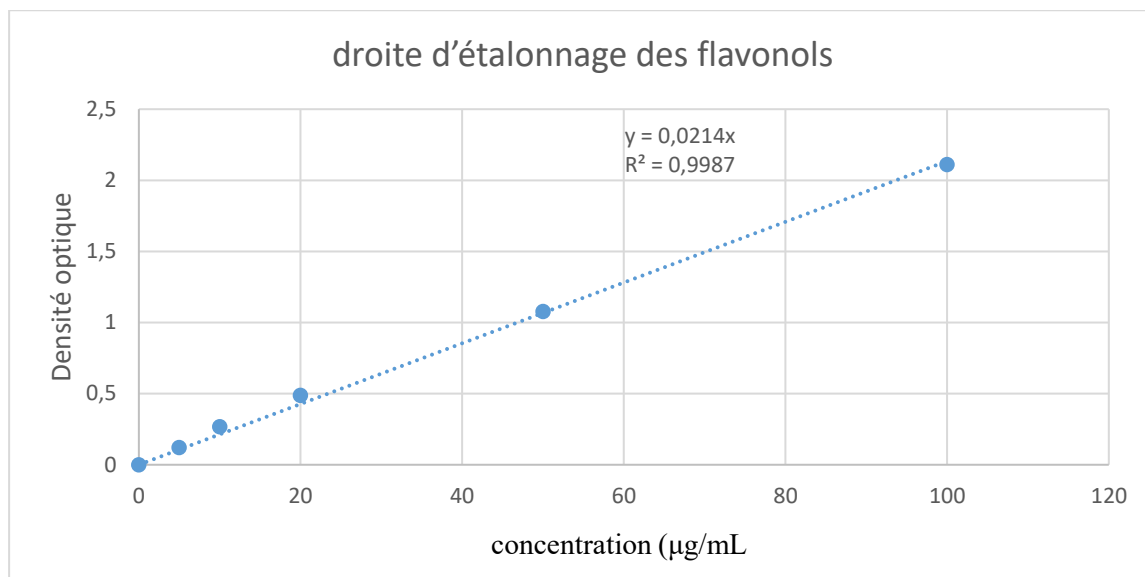
Cette solution a permis de préparer les homogénats de la glande mammaire. Les composantes de ce tampon phosphate sont : 4,08 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) et 11,75 g de phosphate disodique hydraté ($\text{NaHPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$) qui ont été successivement pesés et dissouts dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour atteindre 1 L.



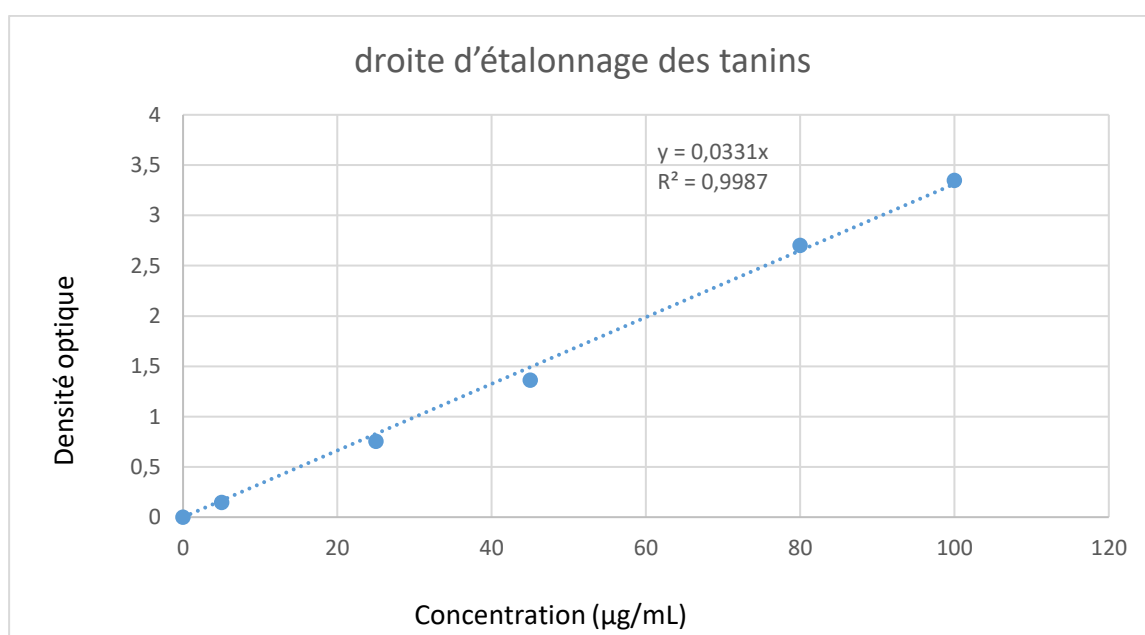
ANNEXE III: Droite d'étalonnage des composés phénoliques



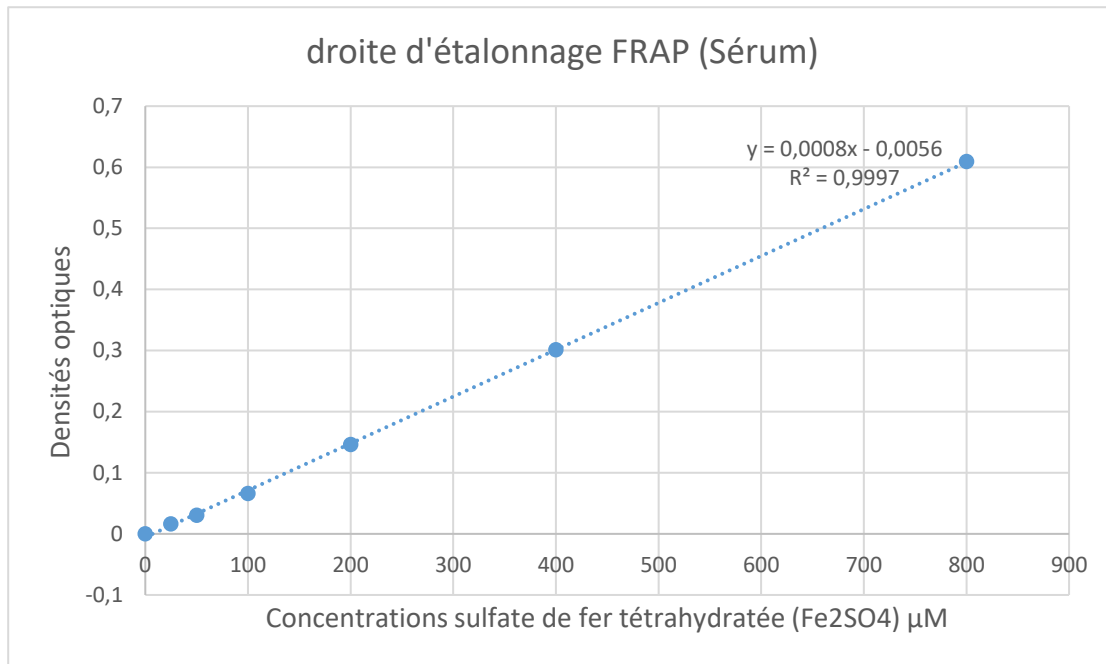
ANNEXE IV: Droite d'étalonnage des Flavonoïdes



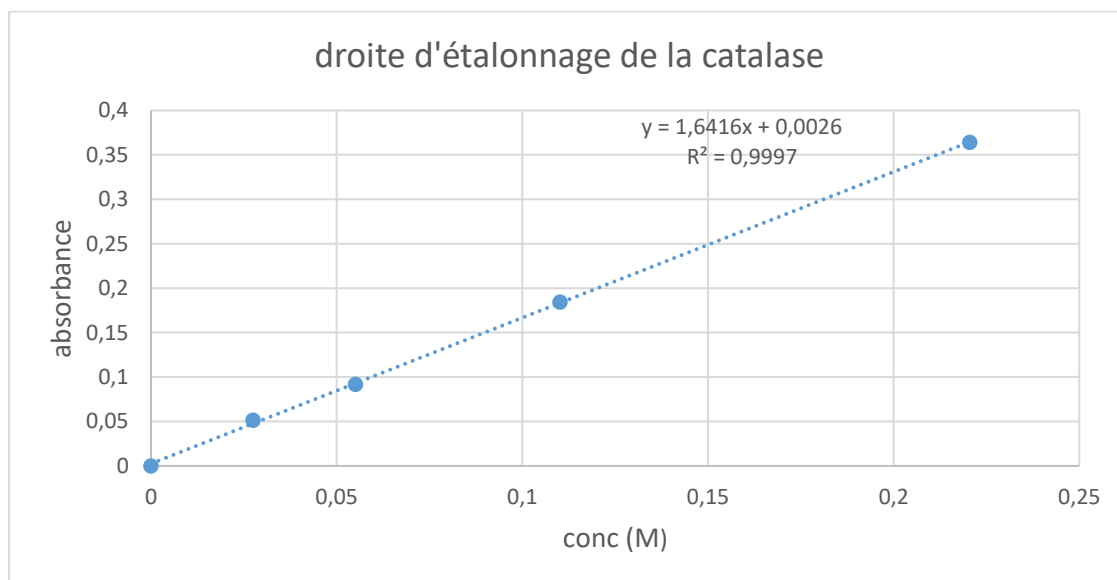
ANNEXE V: Droite d'étalonnage des Flavanols



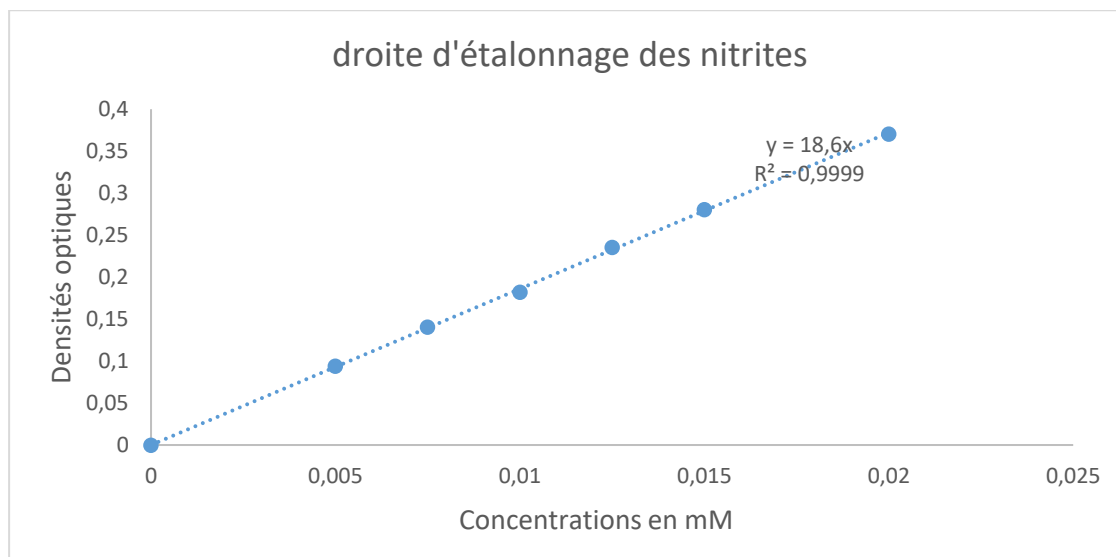
ANNEXE VI: Droite d'étalonnage des tanins



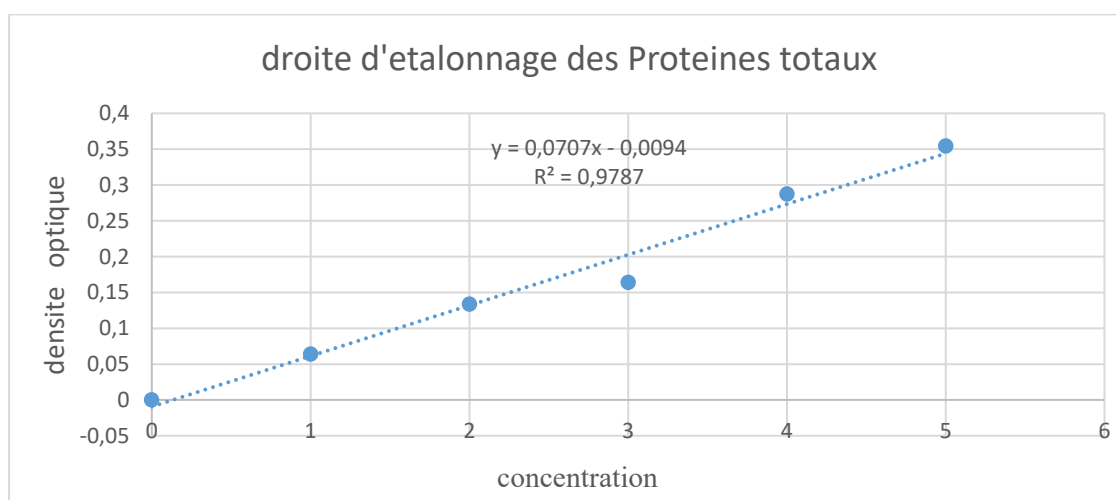
ANNEXE VII: Droite d'étalonnage de la capacité antioxydante par la méthode de FRAP



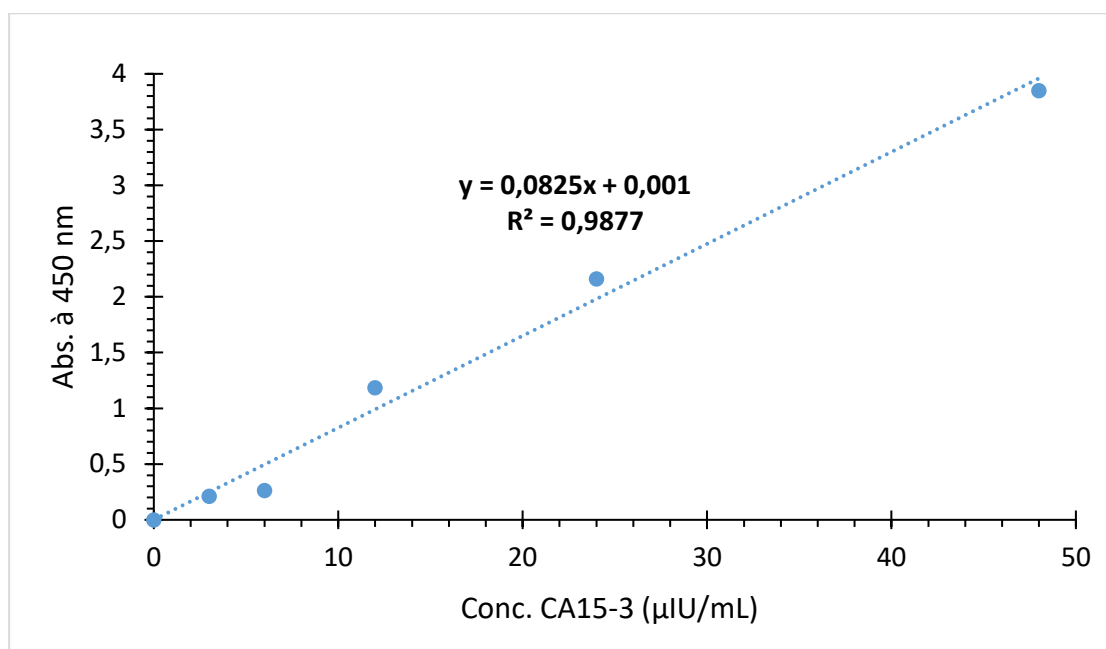
ANNEXE VIII: Droite d'étalonnage de la catalase



ANNEXE IX: Droite d'étalonnage des Nitrites



ANNEXE X: Droite d'étalonnage des protéines totales



ANNEXE XI: Droite d'étalonnage de CA15-3