

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

**Etude de l'effet antiangiogénique des
petites molécules.**

Présenté par :

➤ BOUGHOUES Rania.

➤ KHITER Fayza.

Devant le jury composé de :

*Président : ZOUAGHI Mohammed (MAA).

*Examinatrice : BOUTALAA Saber (MAA).

*Promoteur : MOUSSAOUI Bilal (MAA).

Année Universitaire : 2020/2021



Remerciement

*Avant toute chose, nous tenons à remercier le bon **Dieu**, le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience.*

*Tout d'abord un grand merci pour l'encadrant Monsieur **Bilal MOUSSAOUI** , votre présence et votre disponibilité permanente, pour vos conseils et votre soutien, et pour nous avoir fourni ses idées nécessaires à l'expérimentation, ayant permis la réalisation sans difficulté du présent travail.*

*Nos remerciements vont aux membres du jury Mr **ZOUAGHI Mohammed** et Mr **BOUTALAA Saber** qui nous fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.*

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des enseignants du département des Sciences de la Nature et de la Vie qui ont contribué à notre formation.

Nous remercions aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loi, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.





DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à mes plus chers êtres au monde :

*A mes chères parents : ma mère Razika et mon père Ramdane pour leur amour, leur tendresse,
et pour leur soutien durant toutes les étapes de ma vie. J'espère qu'un jour, je pourrai leur rendre
un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que Dieu leur prête tout le bonheur.*

*A mon chère frère Mouhamed amine et mes belles sœurs Manel, Khadija. Pour leurs encouragements
et pour leur soutien moral et physique.*

A mon très cher marié : Sami

*A toute la famille de mon mariés, Ma belle-mère Fatima, mon beau-père Mahieddine,
ma belle-sœur Khawla, Imane, Ahlam et beau-frère Hichame et aux enfants les plus
adorables Alaa errahmane, Aline ,Amdjed et Rinad. Dieu leur prête tout le bonheur.*

A mon chère et belle binôme :Fayza

*A tous ce qui ont enseigné moi au long de ma vie scolaire .Pour tout leur amour, leur soutien,leur
encouragement, leur assistance et leur présence dans ma vie.*

A toute mes chères ami (e)s : WISSAM, SALSABIL, SARA, CHAIMA, SOUMIA.

Merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.

A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

A toute ma famille.

RANIA





DEDICACE

Je dédie ce travail :

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

*A mes chères Parents, ma mère **Nasira** et mon père **Al bahi***

*Pour tous leurs amours, leurs sacrifices, leurs tendresses et leur soutien tout le
long de mes études.*

*A mon chères frères : **Djamale**.*

*A mes chères sœurs : **Meriem, Samiha, Basma**.*

*A mon chère : **Rokia**.*

*A mes chère : **Hadile, Ghofrane, Alaa, Khadidja, Sodjoude, Siradje**.*

*A mon chère binome : **Rania**.*

*. Pour tout leur amour, leur soutien, leur encouragement, leur assistance et leur
présence dans ma vie. A toute ma famille. A tous mes ami (e)*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce Projet soit possible,
je vous dis merci.*

KHITER FAYZA



Liste des Abréviations

Ang 1 Angiopoietin 1

ADN Acide Désoxyribonucléique

BFGF Basic Fibroblast Growth Factor

CAM Chorioallantoic membrane

CE Cellule Endothéliale

FGF Fibroblast Growth Factor

VEGF Vascular endothelial growth factor

PDGF Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDGF R Récepteur des facteurs de croissance dérivé des plaquettes

VEGF Vascular endothelial growth factor

VEGF-C Vascular endothelial growth factor-C

VEGF-D Vascular endothelial growth factor-D

VEGF-R Vascular endothelial growth factor receptor

VEGFR-1 Vascular endothelial growth factor receptor-1

VEGFR-2 Vascular endothelial growth factor receptor-2

VEGFR-3 Vascular endothelial growth factor receptor-3

UV Ultra-violet

NK Natural killer

C-KIT Stem-cell Growth Factor Receptor

DMBA diméthylbenzanthracène

TSG Les gènes suppresseurs de tumeurs

P53 Protéines qui inhibent normalement la division cellulaire

RB Rétinoblastome

FGF Fibroblast growth factor

PDGFR- Récepteurs du facteur de croissance endothélial dérivé des plaquettes

FLT3 La tyrosine kinase-3 de type Fms

MMP Métalloprotéinases matricielles

TIMP Inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases

ECM Matrice extra cellulaire

VEGFR-1, 2 et 3 Croissance endothélial vasculaire récepteurs

KIT Facte récepteur de facteur de cellules souches

LYVE-1 Marqueur spécifique de l'endothélium lymphatique,

TGF- β 1 Transforming growth factor

HIF1 Hypoxia Inductible Factor 1 α

O₂ Oxygène

HTA Hypertension artérielle

RR Risque relatif

Liste des figures

Figure 1 : Caractéristique des cellules cancéreuses (Lemaire et al, 2020).	7
Figure 2 : Les étapes du processus de cancérogenèse.	11
Figure 3 : Structure d'un vaisseau sanguin (Robert, 2009).	16
Figure 4 : Evènements cellulaires majeurs et acteurs moléculaires des deux phases de l'angiogénèse (Robert, 2009).	21
Figure 5 : Une voie régulant la croissance tumorale.	23
Figure 6 : Les composants vasculaires des métastases tumorales.	24
Figure 7 : Désinfection et notation du date et heure.	34
Figure 8 : Incubation des œufs dans un incubateur d'œufs (WQ01).	35
Figure 9 : Vérification de la fécondité des œufs.	35
Figure 10 : Détection du localisation de chambre d'air et prélèvement de l'albumine.	36
Figure 11 : Oeuf découpé et recouverte de ruban adhésif transparent.	36
Figure 12 : Ré incubation des œufs <i>in ovo</i> et <i>ex ovo</i> .	34
Figure 13 : Préparation de Dexasone® (Dexaméthasone phosphate 4mg/ml).	37
Figure 14 : Préparation de Spafon® (phloroglucinol 40mg/4ml).	37
Figure 15 : Préparation de Rhitene® (Dichlorohydrate de Cétirizine 10mg/ml).	39
Figure 16 : Préparation de l'extrait aqueux d'oignon (<i>Allium cepa</i>).	39
Figure 17 : Préparation de l'extrait aqueux d'ail (<i>Allium sativum</i>).	40
Figure 18 : Application 5ul de solutions préparées sur la CAM.	40
Figure 19 : Application de l'extrait aqueux d' <i>Allium sativum</i> .	41
Figure 20 : Observations de la CAM sous stéréomicroscope.	42
Figure 21 : Un diagramme qui résume les étapes de l'expérimentation	42
Figure 22 : Vaisseaux du sac vitellin.	45
Figure 23 : Vaisseaux de la CAM	45
Figure 24 : CAM à J8	45
Figure 25 : CAM à J14	45
Figure 26 : Observation des vaisseaux primaire, secondaire et tertiaire sous stéréomicroscope.	46
Figure 27 : Résorption des vaisseaux sanguins dexa à J12.	46
Figure 28 : Vascularisation normale de la CAM	46
Figure 29 : Œuf traité par l'eau physiologique, observation à J12	47
Figure 30 : Un œuf traité par Rhitene® 10mg /ml ,observation à J12	47
Figure 31 : Le traitement des CAM par l'extrait brut de l'ail <i>Allium cepa</i> , <i>in ovo</i> , observation à J12	47
Figure 32 : Un œuf traité par spafon® 40mg/4ml, observation à J12	48
Figure 33 : Un œuf traité par spafon® 40mg/4ml, observation à J12, sous stéréomicroscope	48
Figure 34 : Aspect d'un embryon et ses CAM, amnios et sac vitellin <i>ex ovo</i> à J8	48
Figure 35 : Effet de l'extrait brut de l'ail sur la CAM appliqué, <i>ex ovo</i> , à J8.	49
Figure 36 : Effet de l'extrait brut de l'ail sur la CAM appliqué, <i>in ovo</i> , à J8.	49
Figure 37 : Effet de l'extrait brut de l'ail sur la CAM appliqué, <i>in ovo</i> , à J8, observation sous stéréomicroscope	49
Figure 38 : Embryon mort <i>ex ovo</i> .	50

Figure 39 : Embryon mort <i>in ovo</i>	50
Figure 40 : Embryon (CAM) infecté	50
figure 41 : Histogramme représente l'action des traitements sur la vascularisation des CAM.....	51

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification de <i>Allium sativum</i> (Integrated taxonomic information system - repar 2021).....	29
Tableau 2 .Minéraux et oligo-élément identifiés dans 100g d'ail frais (Sendel, 1995).....	30
Tableau 3. Classification de <i>Allium cepa</i> (Integrated taxonomic information system - repar 2021).....	31

Résumé

Récemment, des progrès incontestables ont été accomplis dans la prise en charge de la pathologie tumorale. Ainsi, l'utilisation des agents antiangiogéniques a été considérée comme une stratégie prometteuse qui permettra de bloquer la progression tumorale et d'améliorer l'efficacité des médicaments. Cette étude explore, *in ovo*, et *ex ovo* l'effet inhibiteur des médicaments Rhitene et, spafon et Dexaméthasone en plus de la décoction de la plante de *Allium cepa* et d'*Allium sativum*. vis-à-vis la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM). L'extrait aqueux, riche en triterpènes et en composés phénoliques, a été testé, *in vivo*, sur le modèle CAM. Pour cela, une série de dilution a été préparé à partir du macérat. Les données obtenues montrent qu'une dose équivalente à 2 µg de Dexaméthasone diminue la vascularisation de la CAM à un pourcentage de 99 % de blocage par rapport au témoin., L'extrait brut de l'oignon affiche un potentiel anti-angiogénique considérable, il inhibe 56% de la vascularisation du CAM ; spafon la diminue de 42% et le Rhitene (cétérizine) ne traduit aucune interaction avec les vaisseaux, l'extrait brute de l'ail se traduit par une irritation des CAM, des saignements et des thromboses. l'oignon et l'ail mérite une exploration approfondie de son potentiel angiostatique dans le cadre d'une approche thérapeutique.

Les mots clés : cancer, angiogenese, la membrane chorioallantoïdienne, Dexaméthasone , Rhitene , Spafon, extraits de *Allium cepa*, et d'*Allium sativum*.

الملخص

في السنوات القليلة الماضية، تم إحراز تقدماً لا يمكن إنكاره في قابلية التحكم في الأمراض الخبيثة وبالتالي، تم اعتبار استخدام العوامل المضادة لتكوين الأوعية الدموية استراتيجية واعدة يمكن أن تمنع تطور الورم وتحسين تأثير الأدوية عليه. من خلال هذا العمل تم استكشاف التأثير المثبط للجزيئات الصغيرة بما في ذلك أدوية مثل : Dexamethasone و Rhitene ومستخلص نبات *Allium sativum et Allium cepa* , في مواجهة الأوعية الدموية للغشاء المشيمي (CAM)، كون هاته النبتة تحتوي على العديد من المركبات الثانوية كالمكونات الفينولية والتربينات الثلاثية والتي تستخدم في العلاج الطبيعي التقليدي أو الحديث على نطاق واسع.

تظهر البيانات التي تم الحصول عليها أن جرعة تعادل 2 ميكروغرام من ديكساميثازون تقلل من الأوعية الدموية في الغشاء المشيمي بنسبة 99 ٪ مقارنة بالشاهد، كما يُظهر المستخلص الخام للبصل إمكانات كبيرة مضادة لتولد الأوعية بنسبة تثبيط تقدر بـ 56 ٪، بينما يخفضها spafon بنسبة 42 ٪. بينما لا يُظهر Rhitene (ceterizin) أي تأثير على تكون الأوعية ، في حين يؤدي المستخلص الخام من الثوم إلى تهيج CAM والنزيف والتخثر.

مما سبق يظهر ان البصل و الثوم يمكن ان يرشحا لدراسات معمقة قصد استعمالهما كعلاج مضاد لتخليق الاوعية الدموية لدى مرضى السرطان.

كلمات المفتاحية : سرطان ، تخليق الاوعية الدموية ، غشاء المشيمي ، ثوم ، البصل ، ريتان ، ديكساميثازون و سبافون.

Abstract

In the last few years, undeniable progress has been made in the management of tumor pathology. Thus, the use of antiangiogenic agents has been considered as a promising strategy that can block tumor progression and improve the effect of drugs. This study explores, *in ovo*, the inhibitory effect of the drugs Rhitene, spafon and Dexaméthasone in addition to the plant decoction of *Allium cepa* and *Allium sativum* against the vascularization of the chorioallantoic membrane (CAM). The aqueous extract, rich in triterpenes and phenolic compounds, was tested, *in vivo*, on the CAM model. For this, a dilution series was prepared from the macerate. The data obtained shows that a dose equivalent to 2 µg of Dexaméthasone decreases the vascularization of the CAM with a percentage of 99% of blockage compared to the control. The crude extract of the onion shows a considerable anti-angiogenic potential, it inhibits 56% of CAM vascularization; spafon decreases it by 42% and Rhitene (ceterizin) does not show any interaction with the vessels. The crude extract of garlic results in irritation of CAMs, bleeding and thrombosis. Onion and garlic merits further exploration of its angiostatic potential as part of a therapeutic approach.

Keywords: cancer, angiogenesis, chorioallantoic membrane, Dexaméthasone, Rhitene, spafon, extracts of *Allium cepa*, and *Allium sativum*. Cétérizine .

SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I La biologie de cancer

I. Cancer.....	5
1. Définition du cancer.....	5
2. Caractéristiques des cellules cancéreuses	5
3. Causes du cancer	7
4. Les étapes du processus de cancérogenèse.....	9
4.1. L'initiation	9
4.2. Promotion.....	9
4.3. Progression.....	10
5. Gènes du cancer et les gènes suppresseurs de tumeur.....	11
6. Traitement.....	12
6.1. Traitements conventionnelles.....	12
• La chirurgie.....	12
• La radiothérapie.....	13
• Chimiothérapie.....	13
• Hormonothérapie.....	13
• Thérapie photodynamique.....	13
• Thérapie génique	13
6.2. Traitement ciblé	14
• Thérapie antiangiogénique.....	14
• Immuno-thérapie.....	14

CHAPITRE II L'Angiogenese

II. Vasculogenèse, Angiogenèse et Lymphangiogenèse.....	16
1. Vasculogenèse.....	16
2. Lymphangiogenèse.....	16
3. Angiogenèse.....	17
4. Médiateurs de l'angiogenèse.....	17
4.1. Les activateurs de l'angiogenèse.....	17
• VEGF.....	17
• FGF (fibroblastgrowth factor)	17
• PDGF (Facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes)...	18
• HGF (Facteur de croissance des hépatocytes).....	18
4.2. Les inhibiteurs de l'angiogenèse.....	18
4.2.1. Inhibiteurs naturelles.....	18
• L'angiostatine.....	18
• Endostatine.....	19
• La thrombospondine.....	19
• Inhibiteurs de protéases	19
5. Les étapes de l'angiogenèse.....	19
5.1. La déstabilisation (désassemblage).....	19
5.2. La sélection	20
5.3. La migration.....	20
5.4. La fusion et la formation de la lumière.....	20
5.5. La maturation et le flux.....	20
6. L'angiogenèse pathologique.....	21
6.1. L'angiogenèse tumorale.....	22
6.2. Les étapes de l'angiogenèse tumorale.....	22
7. Rôle de l'angiogenèse dans la progression tumoral et la métastas.	23
8. Thérapie anti-angiogénique.....	24
8.1. Inhibiteurs des VEGF	25

• Le bevacizumab (Avastin).....	25
• Sunitinib (Nexavar).....	25
8.2. Inhibiteurs des récepteurs de VEGF.....	25
• Inhibiteurs de la tyrosine kinase.....	25
9. Effets indésirables de la classe des antiangiogéniques.....	26
9.1. Toxicité cardiovasculaire.....	26
• HTA.....	26
• Thromboses veineuses et artérielles.....	26
9.2. Toxicité rénale : protéinurie.....	26
9.3. Toxicité hématopoïétique.....	26
9.4. Occlusions/perforations digestives.....	26

CHAPITRE III Phytothérapie

III. Phytothérapie.....	28
Généralités	28
1. <i>Allium sativum</i> (ail)	28
1.1. Description de l'ail	28
1.2. Classification de l'ail	29
1.3. Composition chimique ;.....	29
1.4. Propriétés biologiques d' <i>Allium sativum</i>	30
2. <i>Allium cepa</i> (oignon)	30
2.1. Description générale l' <i>Allium cepa</i>	30
2.2. Composition chimique de l' <i>Allium cepa</i>	31
2.3. Les Activités pharmacologique de l' <i>Allium cepa</i>	31
2.4. Classification	31

CHAPITRE IV Matériels et Méthodes

IV. Matériels et méthodes	34
1. Collecte des œufs et incubation.....	34
2. Préparation des membranes chorioallantoïdiennes.....	35
3. Préparation des substances testées.....	37
3.1. Origine de Dexasone ® 4mg /ml et préparation de solution.....	37
3.2. Origine de Spafon ® 1g et préparation de solution.....	38
3.3. Origine de Rhitene ® 10mg /ml et préparation de solution.....	38
3.4. Origine du Matériel biologique (Végétal) et préparation de l'huile de <i>l'Allium cepa</i> (oignon).....	39
3.5. Origine du Matériel biologique (Végétal) et préparation de l'huile d'ail (<i>Allium sativum</i>).....	39

CHAPITRE V Résultats et Discussions

1. Evaluation qualitative.....	45
2. Evaluation quantitative	51
CONCLUSION.....	55

Références bibliographiques

Annexes

Introduction



Introduction

À l'origine de près de 10 millions de décès en 2020, le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde. Près d'un décès sur six est dû au cancer à l'échelle mondiale (Ferlay et al, 2020). Environ 70 % des décès par cancer surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (OMS, 2021).

Toute augmentation de la population cellulaire tumorale exige une augmentation préalable de la densité capillaire tumorale. L'angiogenèse joue un rôle essentiel dans le développement de cancer, son évolution et ses métastases (Folkman, 2003).

La thérapie anticancéreuse étant radicale et impliquant plusieurs types de traitements, suivant le type et le degré d'évolution, la chirurgie (Chodez et al, 2015), l'irradiation (Vordermark, 2016) et/ou la chimiothérapie (Young and Burchenal, 1971; Parimi and Chi, 2016). D'autres approches médicamenteuses sont en cours de développement ou viennent d'être intégrées à l'arsenal thérapeutique tel que l'immunothérapie (Grossman et al, 2016; Hellmann et al, 2016) et les inhibiteurs de l'angiogenèse (Cao, 2004).

Depuis plus de trois décennies, on a proposé de cibler l'angiogenèse pour bloquer la croissance tumorale et, bien sûr, sa progression pour donner des métastases (Folkman, 1971). L'administration des facteurs anti-angiogéniques pourraient avoir un effet anticancéreux indirect en provoquant une régression du sang apporté à la tumeur (Rojer et al, 2006).

L'avènement de la thérapie anti-angiogénique a suscité beaucoup d'espoir voir d'exagération, certains zélés sont allés jusqu'à annoncer la victoire finale contre le cancer (Lowy, 2001; Markel, 2001). Cependant, l'utilisation à grand échelle de cette catégorie thérapeutique commence à révéler ses limites ainsi que les risques inhérents (Abdel-Rahman et Fouad, 2014). Sans oublier le fardeau économique qu'exerce le recours à des médicaments de référence, princeps (Coon et al, 2010).

D'autre part, le développement de novo de médicaments est un processus long et coûteux. De plus en plus, les développeurs de médicaments cherchent à mettre en œuvre des stratégies rentables et à moindre risque pour le développement de produits pharmaceutiques (Mucke, 2015). Ainsi a vu le jour le reprofilage des médicaments, qui consiste à les réorienter vers d'autres applications, autres que celle pour laquelle ces anciens médicaments ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché (Kirtonia et al, 2021).

Spafon est un médicament antispasmodique, préparation injectable par voie intramusculaire ou intraveineuse, utilisé pour traiter les douleurs abdominales.

Rhitene est un médicament antihistaminique à usage systémique (R : système respiratoire ; D : système dermatologie),

A notre connaissance, ces molécules n'ont fait l'objet d'aucune étude afin d'explorer leurs potentiel anti-angiogénique. C'est la première fois qu'on recourt au modèle expérimental *in vivo*, le test CAM, pour explorer son effet anti-angiogénique.

La dexason est un médicament stéroïde de synthèse, préparation injectable par voie intramusculaire, intraveineuse, ou localement (intra articulaire, intra-lésionnelle, tissus mous), utilisé pour son effet anti-inflammatoire pour traiter certaines infections.

L'ail est largement connu pour ses propriétés préventives et propriétés curatives des troubles cardiovasculaires en abaissant le cholestérol et les triglycérides sériques, inhibant la coagulation sanguine (Warshafsky et al, 1993). Des effets préventifs contre le cancer de préparations l'ail (Caragay, 1992).

L'oignon possède un large éventail de propriétés pharmacologiques, notamment des effets antimicrobiens, antioxydants, analgésiques, anti-inflammatoires, antidiabétiques, Les antioxydants alimentaires jouent un rôle crucial dans la suppression du stress oxydatif, qui peut provoquer l'initiation et la progression de plusieurs maladies, notamment le cancer, le diabète, l'inflammation et les maladies cardiovasculaires (Razavi-Azarkhiavi et al. 2014).

Ainsi, cette étude se décline en :

- Une synthèse bibliographique des connaissances actuelles dans le domaine de la biologie des cancers, l'angiogenèse et les traitements anti-angiogéniques.
- Une exploration, *in vivo*, du pouvoir inhibiteur du processus angiogénique des médicaments dexason, spafon et des extraits aqueux de l'ail et de l'oignon.

I. Synthèse bibliographique



CHAPITRE I :

*La biologie de
cancer*

I. Cancer

1. Définition du cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle et complexe (Cheeseman, et al, 2016). D'un point de vue clinique, le cancer est un grand groupe de maladies, peut-être jusqu'à un cent ou plus, qui varient selon leur âge d'apparition, taux de croissance, état de différenciation cellulaire, détectabilité diagnostique, invasivité, potentiel métastatique, réponse au traitement et pronostic (Hejmadi, 2009).

Le cancer peut être défini comme une maladie dans laquelle un groupe de cellules anormales se développe de manière incontrôlable en ne respectant pas les règles normales de division cellulaire. Les cellules normales sont constamment soumises à des signaux qui dictent si la cellule doit se diviser, se différencier en une autre cellule ou mourir. Par contre Les cellules cancéreuses développent un certain degré d'autonomie par rapport ces signaux, ce qui entraîne une croissance et une prolifération incontrôlées (Hejmadi, 2009). Ce déséquilibre est causé par des multiples changements dans l'expression génique conduisant à un équilibre dérégulé de la prolifération et mort cellulaire et finalement évoluer vers une population de cellules « tumeur » qui peuvent envahir les tissus voisins (Raymond, 2007). Ces tumeurs se développent rapidement et libèrent des cellules qui peuvent former de nouvelles tumeurs dans d'autres organes, par un phénomène appelé métastase (Robinson, 2002).

L'environnement et le patrimoine génétique jouent également un rôle important dans la prédisposition au développement de la maladie (Cheeseman et al, 2016).

Le cancer représente un gigantesque défi pour la médecine mondiale. Chaque année, 8 millions de personnes meurent de cette maladie, en faisant ainsi la première cause mondiale de décès. Il est estimé que d'ici au 2035, les décès imputables au cancer atteindront près de 15 millions. Près de 70 % de cas apparaîtront dans des pays en voie de développement qui sont aussi les moins équipés pour traiter une telle pathologie (Cheeseman et al, 2016).

2. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Le cancer est un phénomène cellulaire qui se produit lorsque les cellules acquièrent certaines anomalies et des nouvelles propriétés (Raymond, 2007).

Selon le modèle proposé par Douglas Hanahan et Robert Weinberg en 2000, Les tumeurs sont considérées comme des tissus complexes, dans lesquels les cellules cancéreuses recrutent et utilisent des cellules normales afin d'améliorer leur propre survie et prolifération. Les 6 caractéristiques de ce modèle actuellement accepté peuvent être décrites à l'aide d'une analogie avec les feux de circulation (Figure 1).

- 1) Immortalité : Division cellulaire continue et réplication illimitée.
- 2) Produire des signaux « Go » (facteurs de croissance des oncogènes).
- 3) Ignorer les signaux « Stop » (signaux anti-croissance des gènes suppresseurs de tumeurs).
- 4) Résistance à la mort cellulaire (apoptose).
- 5) Angiogenèse : Induction de la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins.
- 6) Métastase : Propagation à d'autres sites (Hejmadi, 2009).

Ces propriétés, ou phénotypes malins, permettent aux cellules de former des masses multicellulaires qui ont le potentiel de tuer l'organisme (Raymond, 2007). Chacune est plus ou moins développée selon les tumeurs, résulte de l'altération de l'expression ou de la séquence d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (Bouyahya et al, 2018).

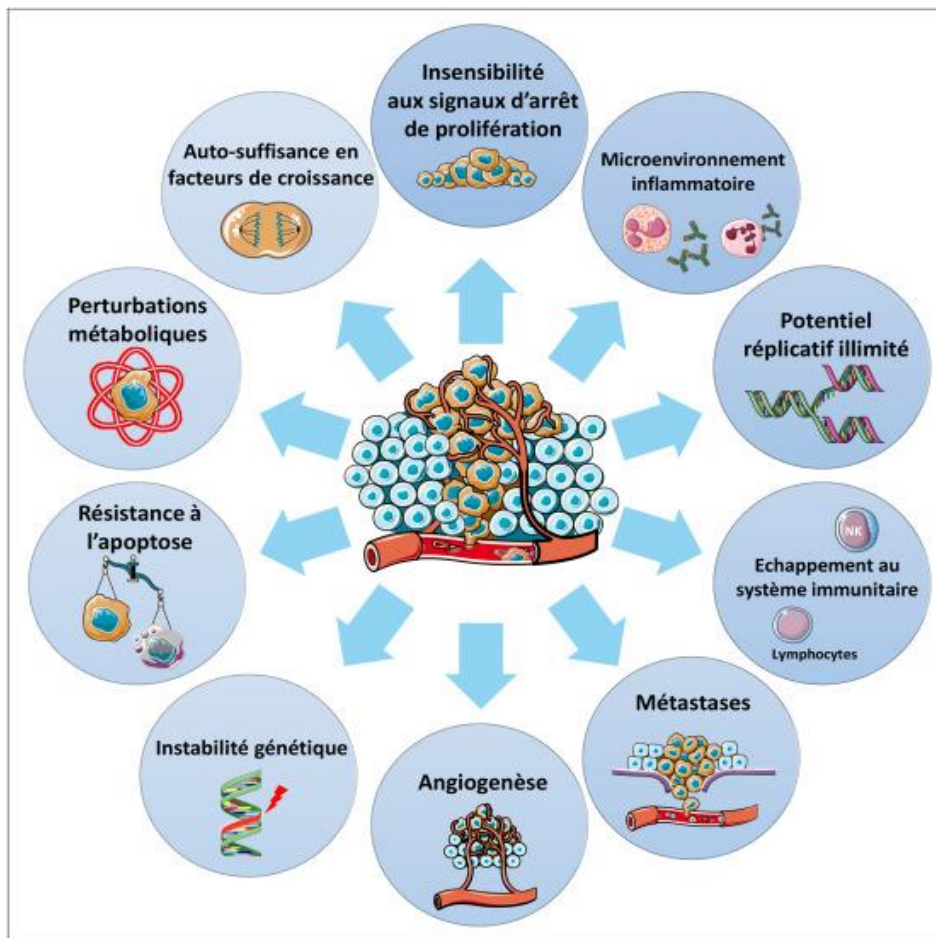


Figure 1: Caractéristique des cellules cancéreuses (Lemaire et *al*, 2020).

3. Causes du cancer

Qui cause les altérations cellulaires qui produisent un cancer ? Peut-être la question la plus importante dans la biologie de cancer (Raymond, 2007).

La plupart des cancers sont causés par des agents environnementaux appelés carcinogènes (Rojer et *al*, 2006). Un cancérigène est une substance, un rayonnement ou organisme microbien, qui est directement impliqué dans l'initiation du cancer (Klopffleisch, 2016).

Un nombre énorme d'agents cancérogènes ont été identifiés depuis l'observation originale du XVIII^e siècle selon laquelle la suie provoque le cancer du scrotum chez les ramoneurs (Rojer et *al*, 2006).

Ces agents peuvent être répartis en plusieurs classes :

- Les agents physiques (rayons ultraviolets solaires, rayonnements ionisant) (Fridman et

Sautès-Fridman, 2014) : Plusieurs types de rayonnement peuvent provoquer le cancer chez l'homme. Le rayonnement atomique, comme celui produit par le radon, un gaz radioactif créé naturellement par la désintégration de l'uranium, causé des cancers du poumon chez les travailleurs de l'extraction du minerai d'uranium. D'autres types de rayonnement tels que les rayons X et la lumière ultraviolette (UV) sont également cancérogènes (Rojer et *al*, 2006).

- Les composés chimiques (Fridman et Sautès-Fridman, 2014) : Ces derniers peuvent être d'origine endogène, formés au cours du métabolisme cellulaire ou exogène (alcool, tabac), apportés dans l'organisme par l'air respiré ou les aliments (Monier & Tubiana, 2008). Les produits chimiques cancérogènes et l'irradiation (ionisante et ultraviolette) sont connus pour affecter l'ADN et être mutagène dans certaines conditions (Raymond, 2007).

- Les agents biologiques (virus, bactéries, parasites) (Fridman et Sautès-Fridman, 2014) : L'infection par des agents pathogènes est une importante cause d'apparition de cancer. Aujourd'hui environ 20 % des cancers humains sont imputables à des infections par des agents pathogènes. D'ici au 2050, la majorité des cancers humains pourraient être dus à des infections (cheesmen et *al*, 2016).

- Mode de vie et environnement : Les taux d'incidence de divers cancers sont fortement liés aux facteurs environnementaux et au mode de vie (Raymond, 2007).

On s'attend à ce que plus d'un demi-million de décès chaque année soient causés par des choix de mode de vie tels que l'obésité, l'inactivité physique et les régimes alimentaires (faible en légumes, riches en sel ou en nitrates sont liés aux cancers de l'estomac et de l'œsophage, tandis que les régimes riches en graisses et faibles en fibres sont liés aux cancers de l'intestin, du pancréas, du sein et de la prostate) (Hejmadi, 2009).

- Âge : Bien que le cancer puisse survenir chez des personnes de tout âge, il est courant dans la population vieillissante (Hejmadi, 2009).

Tous ces agents sont mutagènes c'est-à-dire qu'ils provoquent des mutations ou changements dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) et la structure des chromosomes, qui à leur tour entraînent une division cellulaire incontrôlée (Kahn, 1987). Ceci est généralement dû à sa capacité à endommager directement le génome ou à influencer indirectement le génome

par interruption de processus métaboliques cellulaires qui induisent ensuite des modifications génétiques ou épigénétiques (Klopfleisch, 2016).

4. Les étapes du processus de cancérogenèse :

L'apparition d'une tumeur cliniquement décelable est l'aboutissement d'un processus qui peut s'étendre sur de nombreuses années. Au départ du phénomène tumoral et au cours d'étapes successives, des événements génétiques ou épigénétiques sont invoqués pour rendre compte de la conversion progressive d'une cellule normale en cellule maligne (Monier, 2000).

Le processus de développement néoplasique a été divisé en étapes définies opérationnellement d'initiation, de promotion et de progression, chacune pouvant également comporter plusieurs étapes (Couch, 1996).

4.1. L'initiation

La première étape de la cancérogenèse est le développement des aberrations génétiques dans les potentielles cellules tumorales. Ces aberrations sont principalement des mutations avec les changements réels dans le nucléotide séquence de la cellule (Klopffleisch, 2016). L'altération du génome rendant les cellules capables de se diviser en absence d'une incitation venue du tissu. Il résulte d'altérations génétiques et épigénétiques de la cellule perturbant son bon fonctionnement (Cheeseman et al, 2016).

Les initiateurs de tumeurs provoquent des mutations génétiques qui peuvent toucher des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs (Ségala, 2012). A l'échelle expérimentale, l'initiation peut être provoquée par l'application sur la peau d'un rongeur d'un agent chimique mutagène, par exemple le DMBA (diméthylbenzanthrène)(Tubiana, 2008). Les composés comme le DMBA sont génotoxiques, bien qu'ils doivent être métabolisés en composés qui réagissent avec l'ADN. Le métabolite réactif est référé comme le cancérogène ultime, qui est l'initiateur réel (Rojeret al, 2006).

Ces modifications du génome n'ont pas de conséquence détectable et peuvent rester inapparentes jusqu'au décès de l'animal, sauf s'il y aurait une phase de promotion (Tubiana, 2008).

4.2.Promotion

Cette étape est caractérisée par l'expression d'un gène altéré et la prolifération des cellules initiées (mendelsohn et al, 2014). Plusieurs agents dits promoteurs de carcinogenèse sont impliqués dans cette étape ; La nutrition et les habitudes alimentaires, l'alcoolisme, le

tabagisme, les infections, les traumatismes répétés et l'âge sont les plus importants (King, 1996).

Les promoteurs tumoraux accélèrent la progression tumorale sans provoquer directement de mutations sur l'ADN (Abel et al, 2009). Elle résulte d'une cascade d'interactions entre les cytokines et leurs récepteurs, ce qui amène à la perte de l'homéostasie tissulaire et l'émergence de clones cellulaires transformées (King, 1996). Souvent, ils sont des stimulateurs de la prolifération cellulaire. L'action d'un promoteur tumoral seul sur des cellules saines est totalement nulle sur l'initiation de l'oncogenèse. Son effet de promotion tumorale n'a lieu que sur des cellules qui ont déjà initié l'oncogenèse (Abel et al, 2009).

4.3. Progression

Une deuxième série d'expérimentations animales a montré que les tumeurs, une fois formées, subissaient d'autres changements (progression) comme démontré par la dédifférenciation, de plus en plus la croissance autonome et le comportement agressif (Rojer et al, 2006).

La progression tumorale installe une instabilité génétique qui augmente radicalement le taux des mutations (Monier, 2000). L'instabilité génétique conduit les cellules cancéreuses à l'acquisition de nouvelles propriétés d'indépendance et de nouvelles caractéristiques fonctionnelles (Liotta, 1992). (Voir Figure 2).

Au cours de la progression, la prolifération des cellules tumorales est incontrôlable et le cancer devient cliniquement détectable. Cependant, du fait du nombre très important de mitoses, les cellules finissent par acquérir certaines propriétés d'autonomie de croissance, une adaptabilité métabolique et une pharmacorésistance (Liotta, 1992). De plus les cellules acquièrent la capacité d'envahir les tissus voisins et de migrer (Struhl, 2007).

Il n'est pas toujours apprécié que la génération d'erreurs ne s'arrête pas une fois un cancer a été formé ; les cancers continuent de changer leur comportement à mesure qu'ils se développent, en fait cela crée des problèmes lorsqu'il s'agit de traiter les patients. Par exemple, un cancer du sein peut être initialement sensible aux mêmes hormones qui influencent le sein normal, mais deviennent alors insensibles à ces hormones (Rojer et al, 2006).

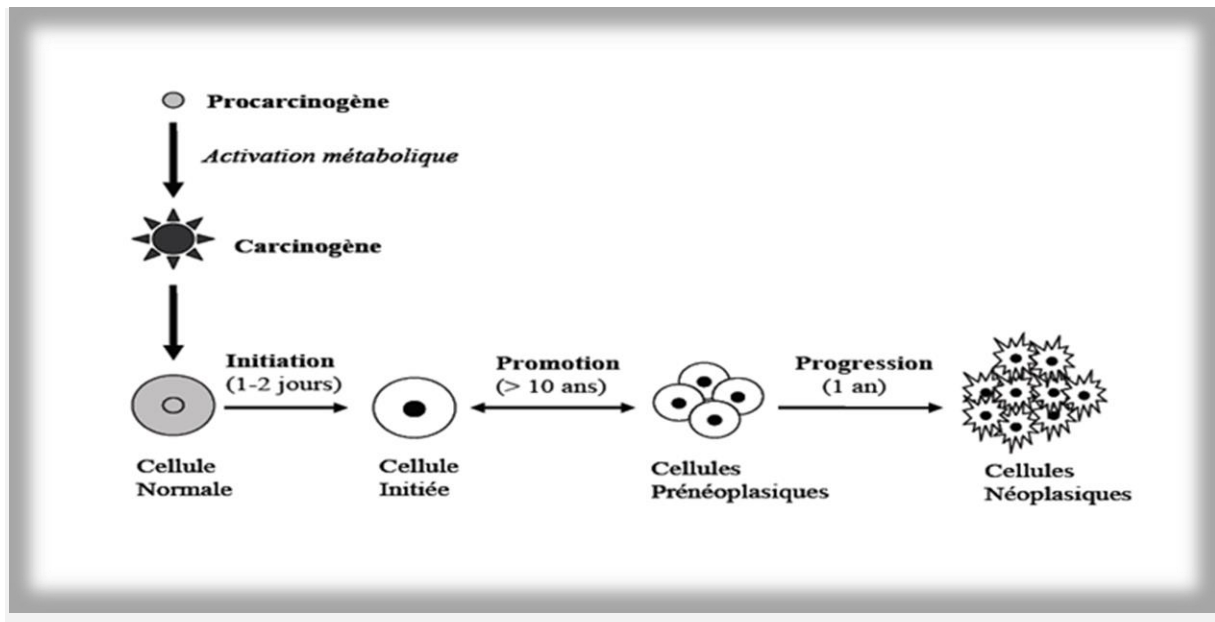


Figure 2 : Etapes du processus de cancérogenèse.

5. Gènes du cancer et Les gènes suppresseurs de tumeur

On sait maintenant que certains gènes, les proto-oncogènes, sont spécifiquement concernés avec la régulation normale de la prolifération cellulaire. Ces gènes peuvent muter, dérégulant ainsi la croissance cellulaire ; dans ce cas, les gènes sont appelés oncogènes.

Aditionnellement, de nombreux cancers sont générés par la perte de gènes spécifiques impliqués dans la réparation des dommages cellulaires, mort cellulaire ou inhibition de la croissance. On les appelle gènes suppresseurs de tumeurs. Il est clair que le cancer peut se développer à partir de changements dans l'un ou l'autre de ces deux systèmes de régulation (Rojer et al, 2006).

Les proto-oncogènes sont des gènes cellulaires normaux (Couch, 1996), stimulent la division cellulaire en produisant des protéines qui réparent, renouvellent les tissus et permettent de dépasser l'état embryonnaire (Filder, 2003). Situés sur la sous-bande chromosomique 10q11.2, codent pour un récepteur tyrosine kinase exprimé dans les tissus et les tumeurs dérivés de la crête neurale (Eng, 1999). Lorsque ces gènes sont activés de manière inappropriée par des événements génétiques (mutations, amplifications, fusions ou délétions) ou épigénétiques (méthylations) modifient la régulation de la croissance et de la différenciation (Couch, 1996), et ont un effet positif sur la prolifération cellulaire (gain de fonction) (Bieche, 2004).

Le terme gène suppresseur de tumeur n'était pas même inventé jusqu'au début des années 1980, bien que leur existence ait été implicite à partir des expériences de fusion

cellulaire de Henry Harris, qui a montré que si une cellule normale était fusionnée avec une cellule maligne, le phénotype était généralement non malin (Raymond, 2007).

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent pour prévenir ou réparer les dommages génomiques, ou inhiber la propagation de cellules cancéreuse en arrêtant leur croissance (sénescence cellulaire) ou induisant la mort cellulaire (apoptose). Certains suppresseurs de tumeurs par intérim semblent retarder le développement des phénotypes de vieillissement (Campisi, 2003).

Les gènes suppresseurs de tumeurs (TSG) codent pour des protéines qui inhibent normalement la division cellulaire (Hejmadi, 2009), tel que p53 et rétinoblastome RB qui sont au cœur des deux principales voies de suppression tumorale qui contrôlent les réponses cellulaires aux stimuli oncogènes (Campis, 2003).

Toutes les mutations qui entraînent une inactivation fonctionnelle de ces protéines sont appelées mutations de perte de fonction car elles suppriment les freins habituels à la capacité de prolifération. L'activité fonctionnelle des protéines TS peut également être affectée par des oncoprotéines (inhibitrices/compétitrices) ou par une dérégulation (statut de phosphorylation) (Hejmadi, 2009).

6. Traitement

La thérapie anticancéreuse étant radicale et impliquant plusieurs types de traitements, elle est délivrée par des équipes de spécialistes travaillant dans de grands hôpitaux (Rojer et *al*, 2006).

6.1. Traitements conventionnels

- **La chirurgie**

L'objectif principal de la chirurgie est d'enlever la totalité de la tumeur et, le cas échéant, les métastases dans les lymphatiques régionaux. C'est la pierre angulaire du traitement de tumeurs solides, et il peut, dans certains cas, aboutir à une guérison complète. Dans les temps anciens, la chirurgie du cancer a souvent entraîné une perte de fonction et des déformations indésirables; récemment, il y a eu une tendance à minimiser la chirurgie et à conserver autant de forme et fonctionner autant que possible (Rojer et *al*, 2006).

- **La radiothérapie**

La radiothérapie est une méthode de traitement qui utilise les rayonnements ionisants (Meyer et *al*, 2007). La plupart des radiographies thérapeutiques utilisent un appareil spécialisé qui délivre un faisceau étroit de rayons X à haute énergie sur une zone bien définie du corps. Cela permet de traiter les tumeurs superficielles et profondes sans traumatisme chirurgical. La radiothérapie repose sur la génération d'espèces réactives de l'oxygène à partir de l'oxygène moléculaire pour endommager l'ADN, et cet oxygène est délivré par le sang (Rojer et *al*, 2006). Ce traitement peut être utilisé seul, ou avec une chirurgie ou une chimiothérapie (Meyer et *al*, 2007).

- **Chimiothérapie :**

Le terme « chimiothérapie » est classiquement limité à l'utilisation de médicaments cytotoxiques ou cytostatiques qui tuent respectivement les cellules malignes ou les empêchent de proliférer (Rojer et *al*, 2006). La chimiothérapie est également utilisée pour réduire la taille d'une tumeur trop volumineuse et faciliter ainsi son traitement par la chirurgie (Chabner et Roberts, 2005).

- **Hormonothérapie**

Le traitement des cancers hormono-sensibles repose sur le principe de la privation de cancer de l'hormone mitogène, qui peut être atteint soit en empêchant la synthèse de stéroïdes ou en bloquant leurs effets au niveau des cellules cibles via le récepteur (Rojer et *al*, 2006).

- **Thérapie Photodynamique**

La lumière visible à elle seule n'endommage pas les cellules, mais elle peut avoir des effets délétères en présence de produits chimiques sensibles à la lumière (photosensibles) tels que les porphyrines plus oxygène. La thérapie photodynamique a été adaptée de telle sorte que la porphyrine est administré par voie systémique et le cancer cible est illuminé avec une lumière focalisée à 630 nm sur le cancer et non sur les tissus environnants (Rojer et *al*, 2006).

- **Thérapie génique**

La thérapie génique consiste à insérer des gènes dans des cellules malignes ou normales afin de modifier l'expression des gènes pour un bénéfice thérapeutique. Les gènes sont transfectés à l'aide de virus ou des vecteurs non viraux (Rojer et al, 2006).

6.2. Traitements ciblés

- **Thérapie antiangiogénique**

L'une des limites des thérapies anticancéreuses conventionnelles est leurs utilisations souvent limitées pour provoquer la régression de tumeurs qui ont subi des métastases généralisées. L'un des avantages potentiels de la thérapie antiangiogénique est que, au moins chez les animaux de laboratoire, les agents antiangiogéniques peuvent provoquer une régression des lésions métastatiques et empêchent également leur dissémination (Rojer et al, 2006).

- **Immuno thérapie**

Bien que les progrès dans ce domaine aient été substantiels, ces formes de thérapie ne peuvent pourtant être considérés comme aussi importantes que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. En ce qui concerne l'immunothérapie, il existe deux approches de base :

- Immunothérapie active impliquent l'utilisation de vaccins ou de produits bactériens, tandis que l'immunothérapie passive impliquent l'administration d'anticorps ou de cellules lymphoréticulaires. Le problème majeur semble être que les antigènes cancéreux trouvés à la surface des cellules affectées sont également trouvés dans les tissus normaux. Cette absence de différence distincte a signifié que l'immunisation contre les tumeurs est difficile (Rojer et al, 2006).

CHAPITRE II.

L'Angiogenèse

II. Vasculogénèse, Angiogenèse et Lymphangiogenèse

1. Vasculogénèse

Les vaisseaux sanguins sont fondamentalement composés de cellules endothéliales, qui s'interconnectent pour former les tubes qui dirigent et maintiennent le flux sanguin et la perfusion tissulaire (voir Figure 3). Au cours de l'embryogenèse, les vaisseaux sanguins se développent via deux processus : la vasculogénèse, par laquelle les cellules endothéliales naissent à partir de types de cellules progénitrices ; et l'angiogenèse, dans laquelle de nouveaux capillaires poussent à partir de vaisseaux existants (Hanahan et Folkman, 1996).

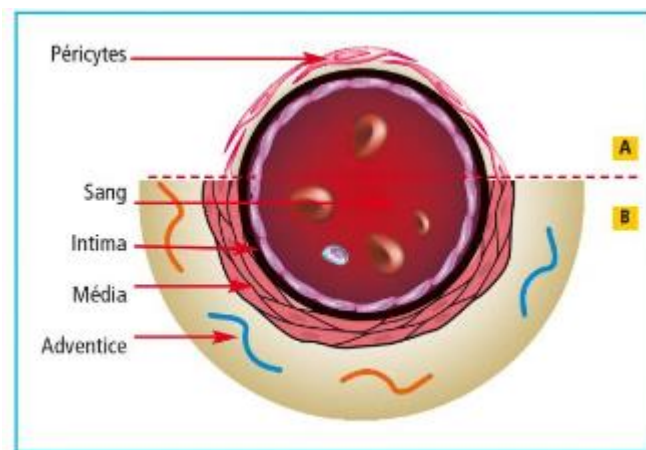


Figure 03 : Structure d'un vaisseau sanguin (Robert, 2009).

2. Lymphangiogenèse

Jusqu'à récemment, les vaisseaux lymphatiques étaient difficiles à étudier car ils ne pouvaient se distinguer des capillaires en utilisant l'histologie normale. Cela a changé depuis la découverte d'un marqueur spécifique de l'endothélium lymphatique, le LYVE-1 (un anticorps). Des investigations ont montré que le développement des lymphatiques est sous contrôle d'un système similaire au système VEGF régulant l'angiogenèse. Dans la lymphangiogenèse, deux membres de la famille du VEGF, le VEGF-C et le VEGF-D, agissent sur un récepteur VEGF-R3, qui est limité aux vaisseaux lymphatiques. Lorsque VEGF-C et VEGFD ont été surexprimés expérimentalement dans des tumeurs transplantées chez la souris, il y a eu une augmentation de la lymphangiogenèse et une augmentation des métastases (Rojer et *al*, 2006).

3. Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus complexe dans lequel les vaisseaux sanguins capillaires se développent dans une séquence ordonnée d'événements. Quand un nouveau capillaire pousse sur le côté d'une veinule, les cellules endothéliales dégradent la membrane basale, migrent vers une source angiogénique, prolifèrent, forment une lumière, joindre les extrémités de deux pousses pour générer un boucle capillaire et fabriquer une nouvelle membrane basale (Yuen et *al*, 1985). Autrement dit, le réseau vasculaire se développe à partir de vaisseaux sanguins préexistants, principalement par prolifération et bourgeonnement des cellules endothéliales (Azzi et Gavard, 2014).

II.4. Médiateurs de l'angiogenèse

Il apparaît maintenant que les cellules tumorales sont à la fois des stimulateurs et des inhibiteurs de l'angiogenèse et que l'équilibre entre ces facteurs dicte le degré d'angiogenèse à la fois localement et sur des sites distants (Bruce et Zetter, 1998).

4.1. Les activateurs de l'angiogenèse

L'angiogenèse tumorale est régulée par la production de stimulateurs angiogéniques comprenant des membres des familles des facteurs de croissance des fibroblastes et des facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (Bruce et Zetter, 1998).

- **VEGF**

Le VEGF est le principal facteur de croissance des cellules endothéliales, et la vasculogénèse est indispensable aux mécanismes de cicatrisation, notamment au niveau viscéral (Brosseau et *al*, 2015). Ce facteur est un polypeptide existant sous 4 isoformes principales : 121, 165, 189 et 206 acides aminés (Robinson et *al*, 2001).

- **FGF (fibroblastgrowth factor)**

Le FGF peut également être sécrété de façon anormale au sein de la tumeur, par la cellule transformée, mais également par le stroma tumoral, favorisant le développement tumoral, l'invasion et l'angiogenèse (Flippot et *al*, 2015). Le bFGF est présent dans les cellules nerveuses, les kératinocytes, les macrophages et les cellules endothéliales; en outre, des chercheurs l'ont détecté dans des tumeurs reliées au cancer du cerveau, du pancréas, de la vessie et de la prostate (Kerbel et Folkman, 2002).

- **PDGF (Facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes)**

La famille du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) a des effets angiogéniques *in vitro* et *in vivo*. Les quatre polypeptides PDGF (PDGF-A, -B, -C et -D) peuvent former des homodimères et des hétérodimères. Parmi ceux-ci, PDGF-BB joue un rôle clé dans l'angiogenèse et est exprimé dans un certain nombre de types cellulaires, notamment les cellules endothéliales et de nombreuses tumeurs. PDGF-BB agit via son récepteur PDGFRb pour améliorer la prolifération et la migration des péricytes. PDGF-BB régule également à l'expression du VEGF dans le muscle lisse vasculaire, favorisant la prolifération et la survie des cellules endothéliales (Raymond, 2007).

- **HGF (Facteur de croissance des hépatocytes)**

Ce facteur influe non seulement sur la croissance des hépatocytes mais aussi sur celle d'autres types de cellules, notamment les cellules endothéliales. Il existe encore peu de résultats publiés sur la relation entre le HGF et la formation de micro-vaisseaux dans les tissus des tumeurs (Hilberg et al, 2008).

4.2. Les inhibiteurs de l'angiogenèse

Les inhibiteurs de l'angiogenèse sont conçus pour empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Une telle action peut arrêter ou ralentir la croissance et la propagation des tumeurs. Cela peut ne pas éradiquer les tumeurs à moins que l'agent thérapeutique anti-angiogénique induise également la dissolution de l'existant vaisseau sanguin au service du cancer (Moussa et Davis, 2017).

4.2.1. Inhibiteur naturelles

En situation physiologique, les nouveaux lits capillaires régressent en fin de fonction, et ainsi on pourrait s'attendre à ce qu'il y ait d'autres facteurs de régulation concernés par ces modifications génétiques impliquées dans la dégénérescence métastatiques. En effet, plusieurs facteurs anti-angiogéniques, tels que l'angiostatine, l'endostatine et la thrombospondine, ont été identifiés (Rojer et al, 2006).

- **L'angiostatine**

L'angiostatine a été la première molécule spécifiquement isolée en tant qu'inhibiteur potentiel de l'angiogenèse d'origine tumorale (O'Reilly et al, 1994). Cette dernière a été signalée comme un inhibiteur spécifique endothélial de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales et peut agir comme un inhibiteur de l'angiogenèse circulante qui

supprime l'angiogenèse au niveau des sites en aval éloignés de la tumeur (Bruce et Zetter, 1998).

- **Endostatine**

L'endostatine est le deuxième exemple d'inhibiteur d'angiogenèse tumorale (O'Reilly et al, 1997). L'endostatine est considérée comme un inhibiteur spécifique de l'endothélium hautement actif qui inhibe la prolifération des cellules endothéliales microvasculaires à des doses de 100 à 500ng/ml (Bruce et Zetter, 1998). L'endostatine inhibe la croissance tumorale primaire ainsi que l'établissement et croissance des métastases. L'effet direct de l'endostatine sur l'angiogenèse se révèle par l'inhibition de l'activité des MMP-2, blocage de la fixation de VEGF165 et VEGF121 sur VEGFR2, et stabilisation cellule-cellule et adhésion cellule matrice extracellulaire (Ribatti, 2008).

Les combinaisons d'endostatine et d'angiostatine sont synergiques et peuvent entraîner une régression tumorale complète sans rechute après l'arrêt du traitement (J Folkman, 2003).

- **la thrombospondine**

De nombreuses recherches ont été menées sur les propriétés antiangiogénique de la molécule de la matrice extracellulaire, la thrombospondine. Cette dernière a rapidement été confirmée comme un inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales, de la motilité et de la morphogénèse (Bruce et Zetter, 1998).

- **Inhibiteurs de protéases**

Les événements invasifs nécessitent à la fois une migration cellulaire active et la capacité de provoquer une dégradation limitée du tissu conjonctif afin de permettre le passage des cellules tumorales à travers les tissus. Ceci est accompli, en partie, par l'activité des métalloprotéinases (MMP) qui sont séquestrées à la surface des cellules tumorales (Chen, 1996). Les inhibiteurs naturels de MMP, appelés TIMP (inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases), ont été trouvés dans une variété de cellules et de tissus (Johnson et al., 1996).

5. Etapes de l'angiogenèse.

- **5.1. La déstabilisation (désassemblage)**

Plusieurs étapes séquentielles sont requises pour une angiogenèse efficace. Le premier pas implique l'ouverture des capillaires existants et la dégradation partielle de la matrice extracellulaire (ECM) environnante, qui permet l'infiltration cellulaire (Chung et al, 2010).

Les métalloprotéines matricielles (MMP, matrix métalloprotéinase) sont activement impliquées dans la protéolyse de la matrice extracellulaire (Christophe et DeClerck, 2002).

5.2. La sélection

La première étape de l'angiogenèse, après la déstabilisation des vaisseaux pré-existants, correspond à l'activation et à la sélection de cellules endothéliales (Treppe et Gavard, 2015). Les signaux pro et anti-angiogéniques gouvernent le devenir des cellules endothéliales et les répartissent en cellules de front (tip cell) qui bourgeonnent à partir du vaisseau existant, se dirigent vers la source du signal angiogénique et guident le néo-vaisseau ; et en cellules de soutien (stalk cells) qui prolifèrent en arrière, permettant l'allongement du vaisseau (Azzi et Gavard, 2014).

5.3. La migration

A la suite de son activation et de sa sélection, la cellule de front bourgeonne à partir du vaisseau et acquiert de nombreuses protrusions membranaires de type filopodes qui sont hautement dynamiques (Azzi et Gavard, 2014). L'acquisition de cette capacité de migration repose sur un affaiblissement des interactions entre les cellules endothéliales et une dégradation de la matrice extracellulaire. L'adhérence cellulaire permet une migration collective en arrière (Azzi et Gavard, 2014). (Voir figure 4).

5.4. La fusion et la formation de la lumière

Sous l'impulsion de la prolifération des cellules de soutien, le néovaisseau s'allonge, guidé par la cellule de front. Lorsque deux cellules de front entrent en contact au travers de leurs filopodes, les deux bourgeons vasculaires fusionnent par anastomose et forment un vaisseau connecté (Wacker et al, 2011).

5.5. La maturation et le flux sanguin

La maturation du vaisseau nécessite le rétablissement de la barrière endothéliale et du flux sanguin. La voie de signalisation impliquant l'angiopoïétine 1 (Ang1) et son récepteur Tie2 s'oppose aux actions du VEGF. Elle induit le renforcement des jonctions entre les cellules endothéliales ainsi que leur quiescence (Gavard et al, 2008). Un gradient de PDGF-BB (platelet derived growth factor) et de TGF- β 1 (transforming growth factor) induit parallèlement le recrutement des pericytes¹ et des cellules musculaires lisses, ainsi que le

dépôt d'une nouvelle matrice extracellulaire à la surface des vaisseaux, assurant ainsi la maturation finale d'un vaisseau sanguin fonctionnel (Ricard et Simons, 2015).

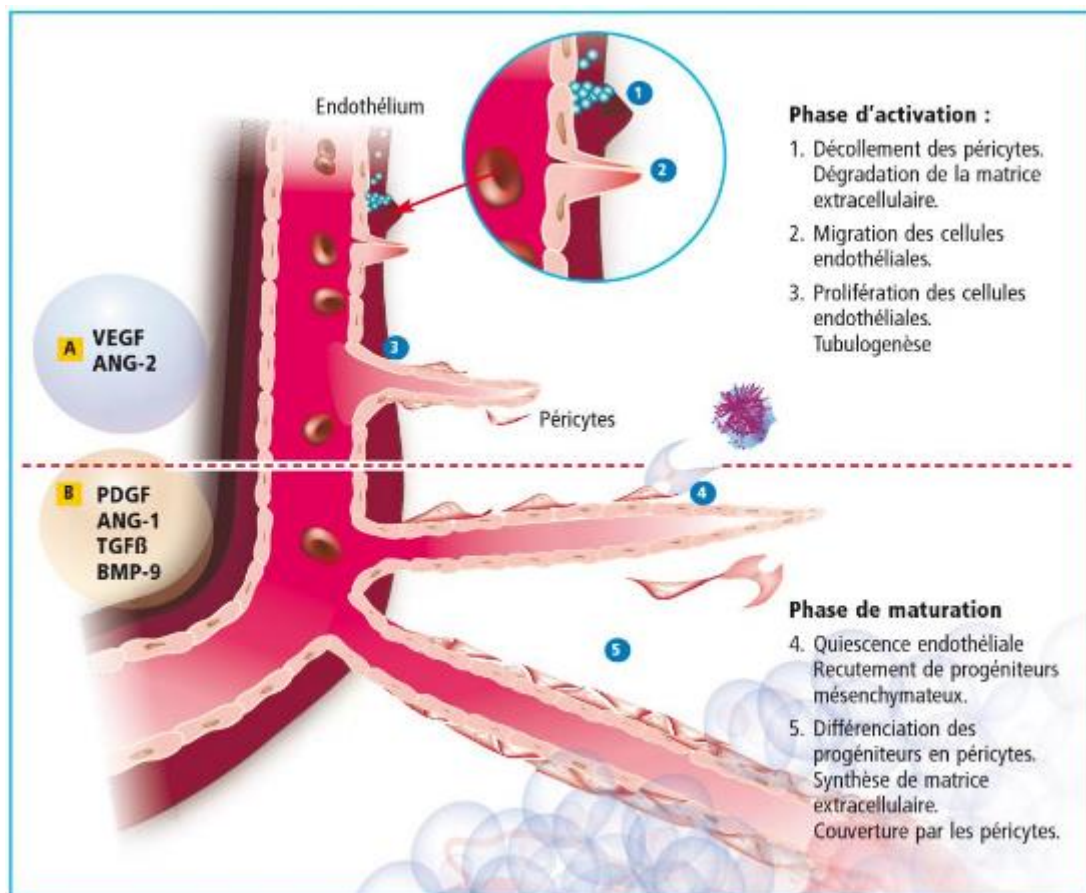


Figure 4 : Evènements cellulaires majeurs et acteurs moléculaires des deux phases de l'angiogenèse (Robert, 2009).

6. L'angiogenèse pathologique

L'angiogenèse pathologique est une caractéristique de divers états pathologiques tels que la rétinopathie diabétique, l'athérosclérose et le psoriasis. De plus, il est maintenant largement reconnu que la croissance tumorale et les métastases dépendent de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (examiné dans Hanahan et Folkman, 1996). Par conséquent, un effort considérable est en cours pour développer des inhibiteurs de l'angiogenèse à usage thérapeutique (Mohammadi et al, 1998).

6.1. L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale est un processus complexe résultant d'une interaction entre deux types tissulaires, la tumeur et le réseau vasculaire dans l'objectif de former des néovaisseaux (Folkman, 1990).

Le soutien angiogénique est essentiel à la croissance et à la propagation du cancer. La croissance de tumeurs localisées au-delà de quelques millimètres nécessite une angiogenèse locale. Les cellules tumorales génèrent un nouveau vaisseau sanguin en libérant des signaux chimiques pro-angiogéniques (Moussa et Davis, 2017).

6.2. Les étapes de l'angiogenèse tumorale

Le déroulement de l'angiogenèse tumorale est divisé en plusieurs étapes :

Au début de la prolifération tumorale, la tumeur, d'une taille inférieure à 1-2 mm³, est indépendante de l'angiogenèse et l'apport d'O₂ et des nutriments aux cellules tumorales est assuré par diffusion simple (Folkman, 1990). Sous l'effet de l'accumulation des altérations génétiques, la prolifération des cellules tumorales devient plus active et la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène ce qui génère un état hypoxique intratumoral. Cette hypoxie induit une surexpression de gènes angiogéniques (Kerbel et Folkman, 2002). Comme le gène HIF1 (Hypoxia Inductible Factor 1 α), qui va stimuler la production de VEGF. Les facteurs proangiogéniques sont alors en excès par rapport aux agents antiangiogéniques, et vont alors déclencher l'angiogenèse tumorale (Hanahan et Folkman, 1996).

Les cellules endothéliales acquièrent de nouvelles propriétés de prolifération et d'invasion tissulaire ; elles vont, dans un premier temps, synthétiser plusieurs types d'enzymes : les métalloprotéinases, les héparinases qui dégradent la matrice extracellulaire soutenant les vaisseaux (Kalluri, 2003).

Libérées de la matrice extracellulaire, les cellules endothéliales prolifèrent et migrent en direction de la source du stimulus angiogénique : la tumeur. Les principaux facteurs de croissance intervenant au cours de cette étape de l'angiogenèse sont le FGF, libéré par la dégradation de la matrice extra cellulaire, et le VEGF. Arrivées à proximité du stimulus, les cellules endothéliales se réorganisent et forment de nouveaux vaisseaux immatures mais fonctionnels.

Ayant mis en place sa propre vascularisation, la tumeur va croître de manière exponentielle et exprimer tout son potentiel agressif.

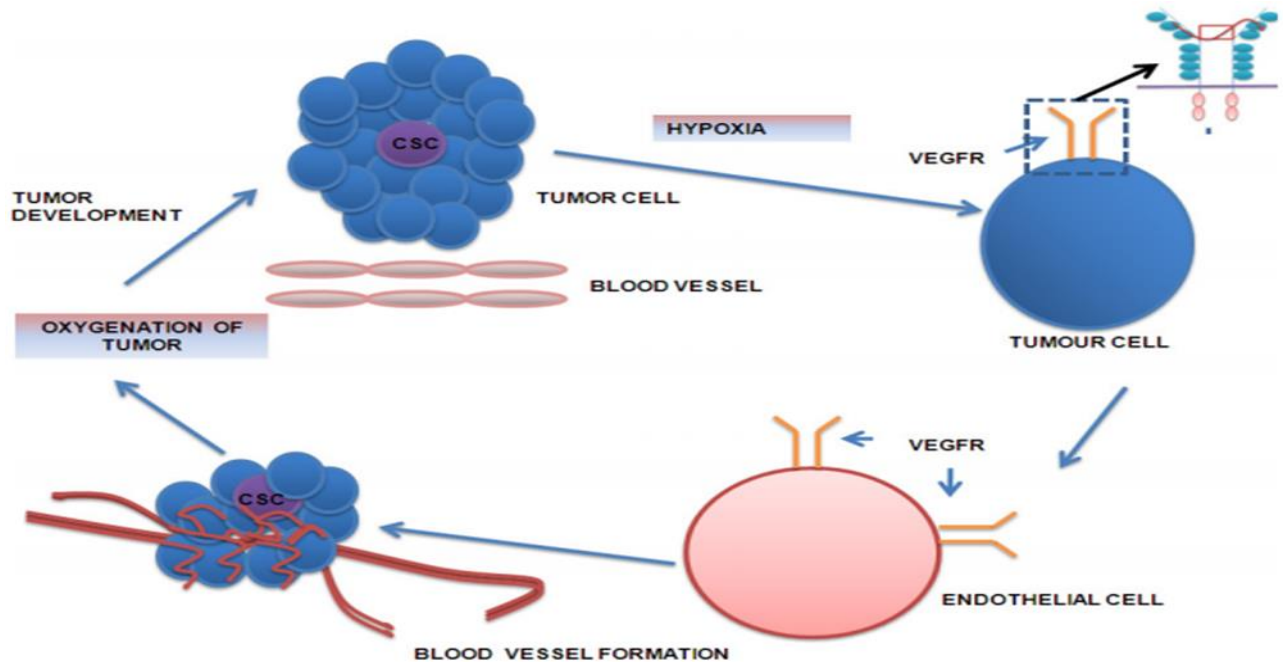


Figure 05 : Une voie régulant la croissance tumorale, c'est-à-dire que les cellules souches cancéreuses déclenchent la croissance tumorale en réponse à un état hypoxique et libère le signal VEGF. Le VEGF incite la cellule endothéliale à proliférer et à former des vaisseaux sanguins pour vasculariser la tumeur en croissance (Ambasta et *al* ,2011).

7. Rôle de l'angiogenèse dans la progression tumoral et la métastase

Comme dans les tissus normaux, le tissu tumoral est incapable de croître ou de métastaser localement ou de manière systémique sans support angiogénique. Les néovaissaux fournissent l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance (Mousa, 2000). L'hypoxique cellule tumorale, par exemple, au centre d'un cancer typiquement sphéroïde in situ, ne se divisera pas.

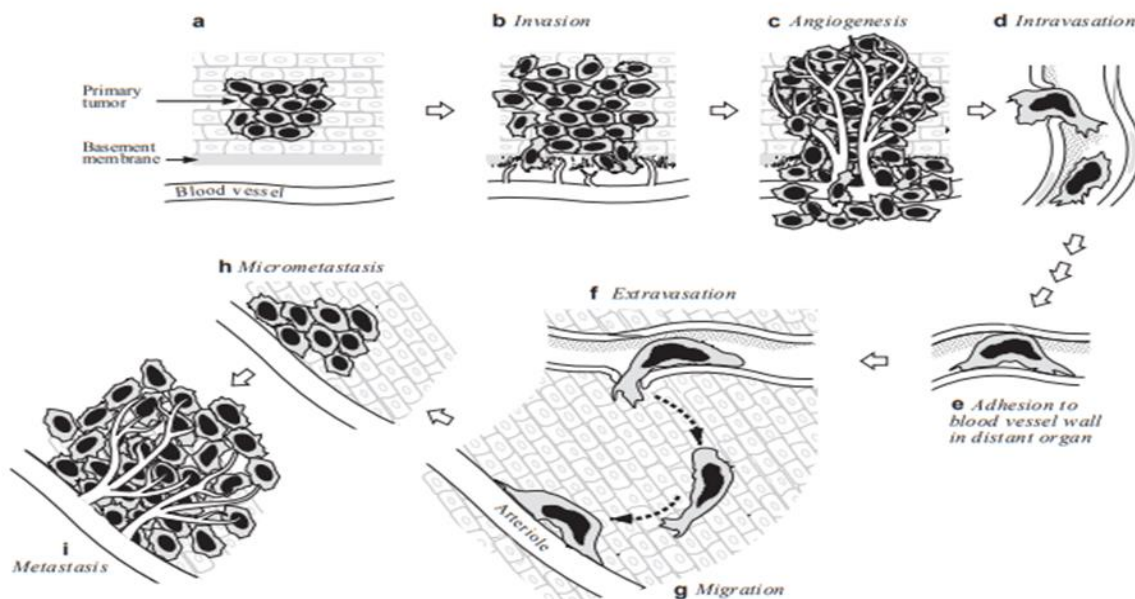


Figure 06 : Les composants vasculaires des métastases tumorales.

Les étapes de la voie métastatique qui impliquent des interactions avec les vaisseaux sanguins (figure 6) : (a) les petites tumeurs primitives (<2 mm) restent avasculaires jusqu'à ce que ils (b) envahissent la membrane basale épithéliale locale. Si les cellules tumorales produisent des facteurs angiogènes (c) l'angiogenèse se produira, permettant l'expansion de la tumeur primaire. (d) Les vaisseaux fournissent une voie d'entrée dans la circulation sanguine et les cellules tumorales circulent jusqu'à ce qu'elles meurent ou(e) se fixent spécifiquement aux cellules endothéliales dans les vaisseaux (généralement les veinules) des organes en aval. (f) Les cellules tumorales extravasent à travers la paroi du vaisseau puis (g) migrent vers des sites proximaux aux artérioles où leur croissance est améliorée. (h) Les micrométastases peuvent rester dormantes pendant une période prolongée, périodes pendant lesquelles l'angiogenèse est supprimée. (i) L'initiation de l'angiogenèse au site secondaire libère les colonies métastatiques de la dormance et permet une croissance rapide (Bruce et Zetter, 1998).

8. Thérapie anti-angiogénique

L'administration d'anti-angiogéniques pourrait avoir un effet anticancéreux indirect en provoquant une régression du sang apport à la tumeur (Rojer et al, 2006).

8.1. Inhibiteurs des VEGF

- **Le bevacizumab (Avastin)**

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF et constitue donc un puissant bloc de l'angiogenèse. Il est utilisé en association avec une chimiothérapie conventionnelle pour traiter le cancer colorectal. D'autres agents bloquent l'angiogenèse et les métastases indirectement en inhibant les MMP, qui sont essentiels à la migration cellulaire à travers les tissus. Ceux-ci incluent les antagonistes des protéinases tels que Neovastat et les antagonistes des intégrines tels que Vitaxin (Rojer et al, 2006).

- **Sunitinib (Nexavar)**

Le Sunitinib est un inhibiteur multi-cible des récepteurs tyrosine kinase avec effets sur la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. Il est un puissant inhibiteur des récepteurs du facteur de croissance endothélial dérivé des plaquettes (PDGFR- α), facteur de croissance endothélial vasculaire récepteurs (VEGFR-1, 2 et 3), récepteur de facteur de cellules souches (KIT) et la tyrosine kinase-3 de type Fms (FLT3) (Abdel-Rahman, Fouad, 2014). Utilisé pour le cancer du rein, la tumeur stromale gastro-intestinale (Moussa et Davis, 2017).

8.2. Inhibiteurs des récepteurs de VEGF

- **Inhibiteurs de la tyrosine kinase**

Les tyrosine kinases (TK) sont d'une grande importance dans les voies de transduction du signal, et il s'ensuit que les inhibiteurs de la TK sont des agents potentiellement importants à utiliser pour hors des sentiers actifs. L'un de ces agents, l'imatinib, cible les TK ABL (bcr/abl), c-Kit et PDGFR. L'imatinib a connu un succès remarquable dans le traitement de la leucémie myéloïde, qui exprime bcr-abl, et les tumeurs stromales gastro-intestinales, qui expriment c-Kit. L'imatinib a également été utilisé dans des essais avec d'autres tumeurs telle que le glioblastome multiforme, qui surexprime le PDGFR. D'autres inhibiteurs de TK, comme le géfitinib et l'ériotinib, sont évalués dans le cadre d'essais cliniques impliquant plusieurs cancers (Rojer et al, 2006).

9. Effets indésirables de la classe des antiangiogéniques

9.1. Toxicité cardiovasculaire

• HTA

L'HTA est une toxicité commune à tous les antiangiogéniques quelque soit leur classe (anticorps monoclonaux et inhibiteurs de tyrosine kinase du VEGFR [VEGFR-TKI] (Brosseau et al, 2015). Une méta-analyse a révélé une augmentation significative du risque relatif (RR) d'hypertension artérielle (HTA) chez les patients sous bevacizumab (Zhu et al, 2007).

• Thromboses veineuses et artérielles

Une augmentation du risque de thromboses a été attribué aux traitements antiangiogéniques quelque soit leur classe (anticorps monoclonaux et VEGFR-TKI). Néanmoins, les données actuelles sont contradictoires quant à la majoration du risque de thrombose veineuse sous traitement antiangiogénique (Scappaticci et al, 2007).

9.2. Toxicité rénale : protéinurie

Parmi les atteintes rénales observées chez les patients recevant un antiangiogénique, la protéinurie a été la plus fréquente (Bennis et al, 2010). Une protéinurie de grades 3-5 est notée chez 0 à 3 % des patients recevant le bévacyzumab. Néanmoins, une protéinurie non sévère est présente chez jusqu'à 60 % des malades sous bévacyzumab, avec un effet dose-dépendant (Brosseau et al, 2015).

9.3. Toxicité hématopoïétique

Les récepteurs du VEGF sont exprimés par les progéniteurs hématopoïétiques comme les cellules endothéliales (Kato et al, 1995). Cependant, en monothérapie, le bévacyzumab n'a pas de toxicité hématologique et c'est son association à la chimiothérapie (notamment à base de sel de platine) qui peut augmenter modérément la toxicité hématologique de cette dernière (Sandler et al, 2006).

9.4. Occlusions/perforations digestives

Les perforations intestinales sous bévacyzumab constituent un événement rare mais sévère essentiellement décrit dans le cadre du traitement du cancer colorectal, mais pouvant survenir chez des patients traités pour un autre type tumoral, présentant une pathologie intestinale parfois méconnue (diverticulose sigmoïdienne, bride post-chirurgie digestive,

polype colorectal volumineux, ulcère gastrique, ischémie mésentérique, etc.) (Brosseau et *al*, 2015).

CHAPITRE III.

Phytothérapie

III. Phytothérapie

Généralités

Les plantes représentent l'essentiel de la pharmacopée jusqu'à la fin du XIX^e siècle et l'avènement de la chimie moderne. Encore largement utilisées après la Seconde Guerre mondiale, elles furent ensuite supplantées par les médicaments de synthèse plus simples d'emploi (Pierre Willem, 2008).

La phytothérapie, étymologiquement, le traitement par les plantes est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales. On peut distinguer deux types de phytothérapie :

Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.

Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur, la circulation des phytomédicaments est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (AMM). On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique (Pierre Willem, 2008).

1. *Allium sativum* (ail)

1.1. Description de l'ail

L'Ail commun est une plante herbacée géophyte, c'est-à-dire qu'elle est capable de passer la mauvaise saison enfouie dans le sol grâce à la persistance souterraine de ses organes vitaux sous la forme d'un bulbe (Botineau, 2010).

Il s'agit en fait à sa base, d'une tige modifiée verticale très courte qui est feuillée : c'est le plateau du bulbe. Les feuilles de ce plateau sont réduites à la gaine et sont insérées dessus. Des bourgeons axillaires sont présents à l'aisselle de ces feuilles. Plus on s'éloigne de cette base et plus les feuilles sont desséchées, minces et âgées, elles ont un rôle protecteur, tandis que les autres, jeunes et charnues, fournissent les réserves nutritives. Ces feuilles sont

appelées des tunique du fait de leur type d'insertion sur le plateau (Dupont et Guignard, 2012). On parle donc d'un bulbe tunique (Botineau, 2010).

1.2. Classification de l'ail

Tableau 1. Classification d'*Allium sativum* (Integrated taxonomic information system - repart 2021).

Regne	Végétal
Sous Règne	Viridiplantae
Infra Règne	Streptophyte
Superdivision	Embryophyte
Division	Spermatophytes
Subdivision	Tracheophytes
Classe	Monocotyledons
Superorder	Liliana
Order	Asparagales
Famille	Amaryllidaceae
Genre	<i>Allium</i> L
Espèce	<i>Allium sativum</i> L
Variété	<i>Allium sativum</i> var <i>sativum</i>

1.3. Composition chimique

Le bulbe d'ail renferme de nombreux composés bénéfiques pour la santé : eau, minéraux, oligo-éléments, vitamines, fibres, acides aminés essentiels, glucides, mais aussi et surtout des composés soufrés, le tout pour un apport calorique faible (environ 138 kcal/100 g). On rappelle qu'une gousse d'ail pèse en moyenne 3 à 4 grammes (Senninger, 2009).

En plus, *Allium sativum* se caractérise par sa grande variété de composants y compris les sulfures comme l'allicine et les non-soufrés comme les saponines et les flavonoïdes (Hadriche-Jarraya, et al, 2021).

Tableau 2. Minéraux et oligo-élément identifiée dans 100g d'ail frais (Sendel, 1995).

Elément	Quantité dans 100g d'ail frais
Sodium (Na)	8.0 mg $\pm$ 2 %
Potassium (K)	373.0 mg $\pm$ 9 %
Calcium (Ca)	18.0 mg $\pm$ 3 %
Phosphore (P)	64.0 mg $\pm$ 3%
Fer (Fe)	2.2 mg $\pm$ 5%
Magnésium (Mg)	8.0 mg $\pm$ 4 %
Manganèse (Mn)	1.3 mg $\pm$ 2 %
Zinc (Zn)	0.9 mg $\pm$ 5 %
Cobalt (Co)	0.9 μ g $\pm$ 3 %
Sélénium (Se)	77.1 μ g $\pm$ 2 %
Iode (I)	94.0 μ g $\pm$ 4 %

1.4. Propriétés biologiques d'*Allium sativum*

Il est largement connu pour ses propriétés préventives et propriétés curatives des troubles cardiovasculaires en abaissant le cholestérol et les triglycérides sériques, inhibant la coagulation sanguine et l'agrégation des plaquettes et l'abaissement de la tension artérielle (Warshafsky et al., 1993; Silage et Neil, 1994 ; Reuters, 1995; Sendl, 1995). Des effets préventifs contre le cancer de préparations l'ail (Caragay, 1992). En effet, expérimentalement l'ail et ses composants sont signalés à supprimer le risque de cancer et modifier le comportement biologique des tumeurs du sein, du côlon, de la peau, de l'utérus, de l'œsophage et cancer du poumon (Hussain et al., 1990; Ipetal., 1992; Shukla et al., 1999; Sumiyoshi et Wargovich, 1990 ; Wargovitch et al., 1988). L'ail avait été décrit pour plusieurs autres propriétés médicinales, notamment antimicrobiennes, antiarthritiques, effets hypoglycémiants et antitumoraux (Rivlin, 2006 ; Wu et al., 2005 ; Matsuura et al., 2006 ; Bloc, 1955).

2. *Allium cepa* (oignon)

2.1 Description générale l'*Allium cepa* :

Allium cepa est une plante bisannuelle avec des racines adventives et fibreuses et 3–8 feuilles glauques, distiques. Le bulbe est constitué de bases de feuilles charnues concentriques et élargies. La base extérieure de la feuille sèche et devient mince et diversement colorées, formant la couche protectrice, tandis que les bases intérieures des feuilles s'épaississent

lorsque le bulbe se développe. Le bulbe mature peut être globuleux, ovoïde ou allongé et sa taille varie selon la variété (Marrelli, 2018).

2.2. Composition chimique de l'*Allium cepa*

L'oignon est riche en plusieurs phytonutriments reconnus comme des éléments importants du régime méditerranéen, mais il a également retenu l'attention pour ses propriétés biologiques et son potentiel application dans le traitement et la prévention d'un certain nombre de maladies. *A. cepa* contient de nombreuses vitamines et minéraux et est riche en acides aminés soufrés. De plus, une variété des métabolites secondaires ont été identifiés chez cette espèce, tels que les flavonoïdes (en particulier les flavonols et anthocyanine), phytostérols et saponines (Marrelli, 2018).

2.3. Les activités pharmacologique de l'*Allium cepa*

l'Allium cepa possède un large éventail de propriétés pharmacologiques, notamment des effets antimicrobiens, antioxydants, analgésiques, anti-inflammatoires, antidiabétiques, hypolipidémiants, antihypertenseurs et immunoprotecteurs, Les antioxydants alimentaires jouent un rôle crucial dans la suppression du stress oxydatif, qui peut provoquer l'initiation et la progression de plusieurs maladies, notamment le cancer, le diabète, l'inflammation et les maladies cardiovasculaires (Razavi-Azarkhiavi et al, 2014).

2.4. Classification

Tableau 3. Classification d'*allium cepa* (Integrated toxonomic information system - repar 2021).

Règne	Végétal
Sous Règne	Viridiplantae
Infra Règne	Streptophyte
Superdivision	Embryophyte
Division	Tracheophytes
Subdivision	Spermatophytes
Classe	Monocotyledons
Superorder	Lilianae
Order	Asparagales
Famille	Amaryllidacées A
Espèce	<i>Allium cepa</i> L

II. Etude Expérimentale



CHAPITRE IV.

Matériels et

Méthodes

IV. Matériels et méthodes :

En vue de déterminer l'effet sur l'angiogenèse de plusieurs médicaments, en l'occurrence la Dexaméthazone, Rhitene, spafon, et de certains extraits de plantes médicinales ou potagères, dans notre cas, de l'ail et de l'oignon, ainsi que pour explorer leur potentiel irritant sur les vaisseaux sanguins, nous avons opté pour un test, in ovo, et ex ovo qui consiste à évaluer la croissance des vaisseaux sanguins de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet, le «Test de CAM ».

La totalité des expérimentations effectuées ont été réalisées au niveau de l'animalerie du centre universitaire A.BOUSSOUF à Mila.

1. Collecte des œufs et incubation

Fraîchement fertilisés, trois cents (300) œufs d'une taille hétérogène ont été collectés dans une production locale (domestique) des fermes familiales au niveau de la wilaya de Mila

Pour diminuer la contamination à partir de la surface, les œufs ont été désinfectés avec de l'éthanol à 70%, puis ont été séchés dans l'air ambiant, noté par la date et l'heure de l'incubation (Figure 7).



Figure 7 : Désinfection et notation de la date et de l'heure. .

Puis incubés à 37.5 ° C et 65% d'humidité dans un incubateur d'œufs (WQ01) pour 72h. Les œufs sont balancés (tournés) de 60 ° chaque 2 heures pendant 3 jours (Figure 8).



Figure 8 : Incubation des œufs dans un incubateur d'œufs (WQ01).

2. Préparation des membranes chorioallantoïdiennes

Au 3^{ème} jour de l'incubation, et suivant le protocole (Ribatti et *al.* 2013). Une vérification minutieuse des œufs pour trier ceux qui sont effectivement fécondés de ceux qui ne le sont pas à l'aide d'une torche appliquée sur le pôle pointu de l'œuf. (Figure 9).

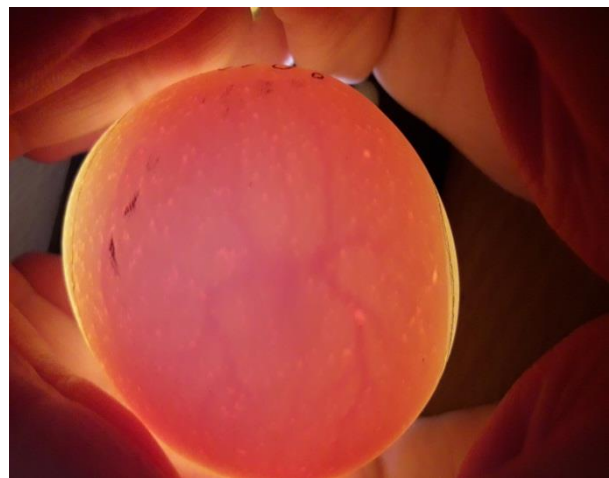


Figure 9 : Vérification de la fécondité des œufs.

Ensuite, on détermine la localisation de chambre d'air et du fœtus, puis les coquilles des œufs ont été percées au pôle le plus pointus à l'aide d'une aiguille (22Gx1 1/4" ; 0,70x30mm) et 7 ml d'albumen ont été prélevés délicatement pour ne pas toucher le jaune (Voir figure 10).

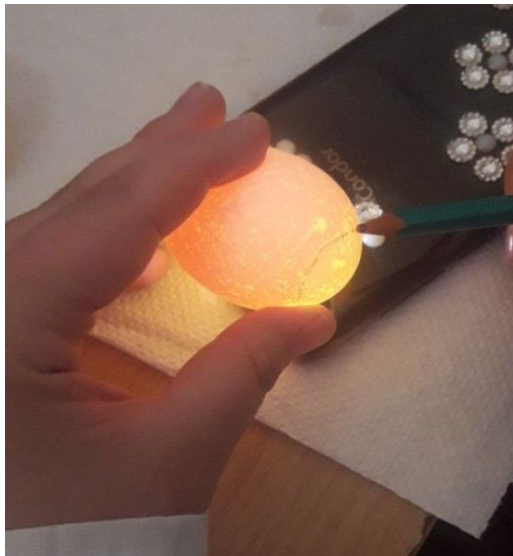


Figure 10 : Détection de la localisation de chambre d'air et prélèvement de l'albumine.

Le prélèvement provoque la formation d'un sac d'air artificiel qui provoque le décrochage de la CAM de la coquille de l'œuf.

Ensuite, environ 3cm² de surface de la coquille a été découpée et recouverte de ruban adhésif transparent (Figure 11).

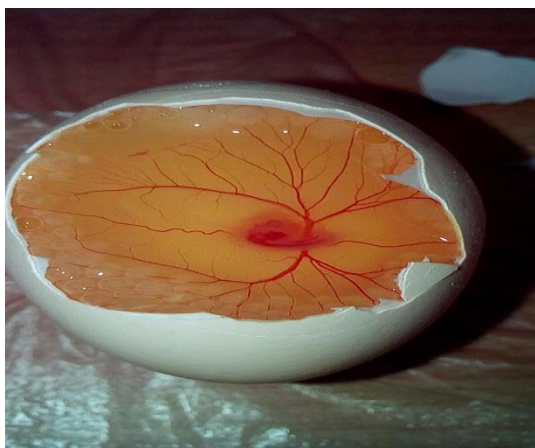


Figure 11 : Œuf découpé et recouverte de ruban adhésif transparent.

L'embryon sous-jacent le CAM et les vaisseaux sont révélés, et ensuite les œufs ont été retournés à l'incubateur (Voir figure 12).

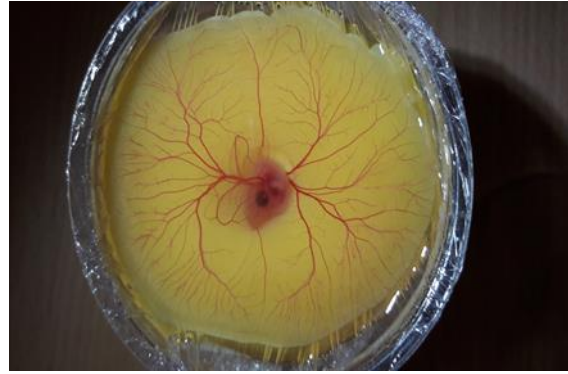


Figure 12 : Ré-incubation des œufs *in ovo* et *ex ovo*.

3. Préparation des substances testées

3.1. Origine de Dexasone ® 4mg /ml et préparation de solution

Une ampoule de 1ml du médicament stéroïde de synthèse utilisé pour son effet anti-inflammatoire, préparation injectable par voie intramusculaire ou intraveineuse ou localement (intra articulaire, intra-lésionnelle, tissus mous), Dexaméthasone phosphate ® sous le nom de marque Dexasone ® 1g, produit par la firme pharmaceutique SAIDAL, enregistré sous le numéro du lot 18/08/09H 021/003et a été acheté au près d'une officine locale à Ahmed Rachedi.

Dans un éppendorf, 10 µl de la solution de Déxasone 4 mg/ml a été dilué dans 90µl d'eau physiologique, puis agité pour homogénéiser la solution, à une température ambiante (Figure 13).



Figure 13 : Préparation de Dexasone® (Dexaméthasone phosphate 4mg/ml).

3.2. Origine de Spafon ® 1g et préparation de solution

Une quantité largement suffisante du médicament antispasmodique (préparation injectable voie intramusculaire ou intraveineuse), phloroglucinol sous le nom de marque spafon ® ampoule de 40mg/4ml, produit par la firme pharmaceutique HUR, enregistré sous le numéro du lot 16/99/13G043/003 et a été acheté auprès d'une officine locale à Ahmed Rachedi.

Dans un éppendorf, 5µl de la solution spafon a été dilué dans 45µl d'eau physiologique, puis agité pour homogénéiser la solution à une température ambiante (Figure 14).



Figure 14 : Préparation de Spafon® (phloroglucinol 40mg/4ml).

3.3. Origine de Rhitene ® 10mg /ml et préparation de solution

Un flacon de 15ml du médicament est utilisé pour son effet antihistaminique à usage systémique (R : système respiratoire ; D : système dermatologie), solution buvable en gouttes, voie orale, Dichlorohydrate de Cétirizine ® sous le nom de marque Rhitene ® 10mg/ml, produit par la firme pharmaceutique BIOGALENIC, enregistré sous le numéro du lot 14/01 A 041/235 et a été acheté au près d'une officine locale à Ahmed Rachedi.

Une quantité largement suffisante du Rhitene est mise dans un éppendorf, pour être appliquée ultérieurement sur le CAM (Figure 15).



Figure 15 : Préparation de Rhitene® (Dichlorohydrate de Cétirizine 10mg/ml).

3.4. Origine du Matériel biologique (Végétal) et préparation de l'extrait aqueux de l'*Allium cepa* (oignon)

L'extrait aqueux d'*Allium cepa* (oignon) a été obtenu par broyage d'une quantité suffisante d'oignon, puis filtration sur papier filtre pour obtenir l'extrait homogène (Figure 16).



Figure 16 : Préparation de l'extrait aqueux d'*Allium cepa*.

3.5 Origine du Matériel biologique (Végétal) et préparation de l'extrait aqueux d'ail (*Allium sativum*).

L'extrait aqueux d'*Allium sativum*, a été obtenue par broyage d'une quantité suffisante d'ail, puis filtration sur papier filtre pour obtenir l'extrait homogène (Figure 17).

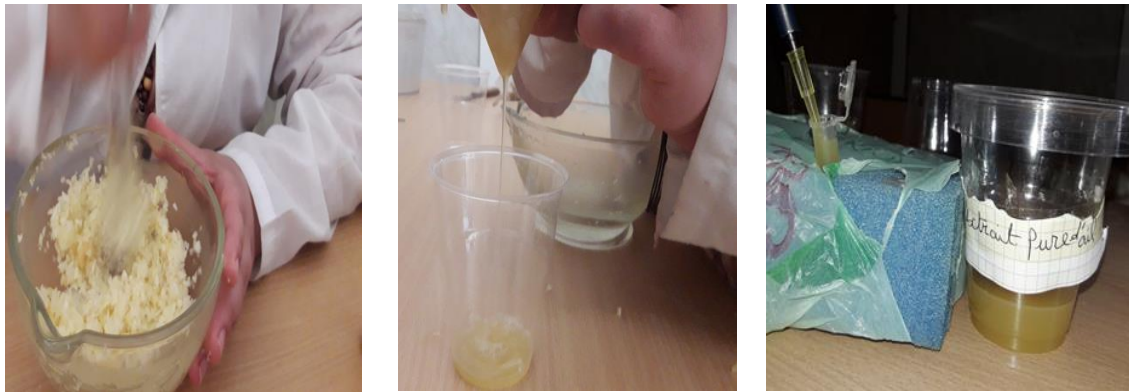


Figure 17 : Préparation de l'extrait aqueux d'ail (*Allium sativum*).

4. Déroulement du test CAM (in ovo)



Figure 18 : Application de 5ul de solutions préparées sur la CAM.

Au 8^{ème} jour de l'incubation, les fenêtres ont été rouvertes, Les œufs préalablement préparés ont été réparti en 5 groupes de nombre d'œufs varié, puis application par micropipette d'un volume de 5ul des solutions/suspensions médicamenteuses, Le premier sera traité par Dexaméthasone 4mg/ml comme un témoin positif, le deuxième par zomax 300mg /7.5ml, le troisième par lévophta 0.05%. Le quatrième est traité par une série de dilution de l'extrait aqueux d'*Allium sativum*, préparée précédemment et le dernier groupe représentera le témoin négatif traité par l'eau physiologie. Dans toutes les expérimentations on dépose le produit à tester directement sur la CAM. Les fenêtres ont été refermées avec du ruban adhésif transparent et les œufs ont été réincubés.

Au 12^{ème} jour, une grande ouverture a été réalisée sur la coquille des œufs, des images ont été prises pour un traitement informatisé ultérieur.

Un traitement préalable des images permet d'apporter des améliorations de la qualité des images et réduire les parasites ce qui faciliterait l'observation et l'évaluation quantitative. Ainsi, une série de manipulation, par les logiciels de traitement d'image suivants : photoshop express +Optika proview , permet de transformer une image brute en une image grise à 8bit.

Des observations sous stéréomicroscope (Figure 16), ont été alors effectuées pour évaluer la vascularisation par rapport à un contrôle de vascularisation normale. Puis, on a procédé au comptage des vaisseaux d'ordre secondaire et tertiaire dans la zone d'observation. Après, on a calculé le taux de réduction (diminution) de la vascularisation pour chaque groupe (Figure 18), suivant la formule :

$$\text{TRv}(\%) = [(V_c - V_t) / V_c] \times 100$$

D'où :

TRV : Taux de réduction des vaisseaux sanguins exprimé en pourcentage.

V_c : Nombre des vaisseaux sanguins du deuxième et troisième ordre chez les témoins.

V_t : Nombre des vaisseaux sanguins du deuxième et troisième ordre chez les groupes traités.

5. Déroulement du test CAM (*ex ovo*)

Au 8ème jour de l'incubation, on retire les gobelets. On a appliquée par une micropipette 5ul de l'extrait aqueux d'*Allium sativum*, on le répète plusieurs fois sur le même CAM avec une série de dilution (Figure 19). On observe immédiatement les réactions possibles. A la fin les gobelets de culture sont fermés par les boîtes de pétrie puis réincubés.

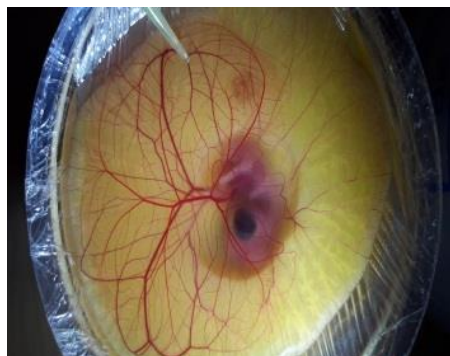


Figure 19 : Application de l'extrait aqueux d'*Allium sativum*.

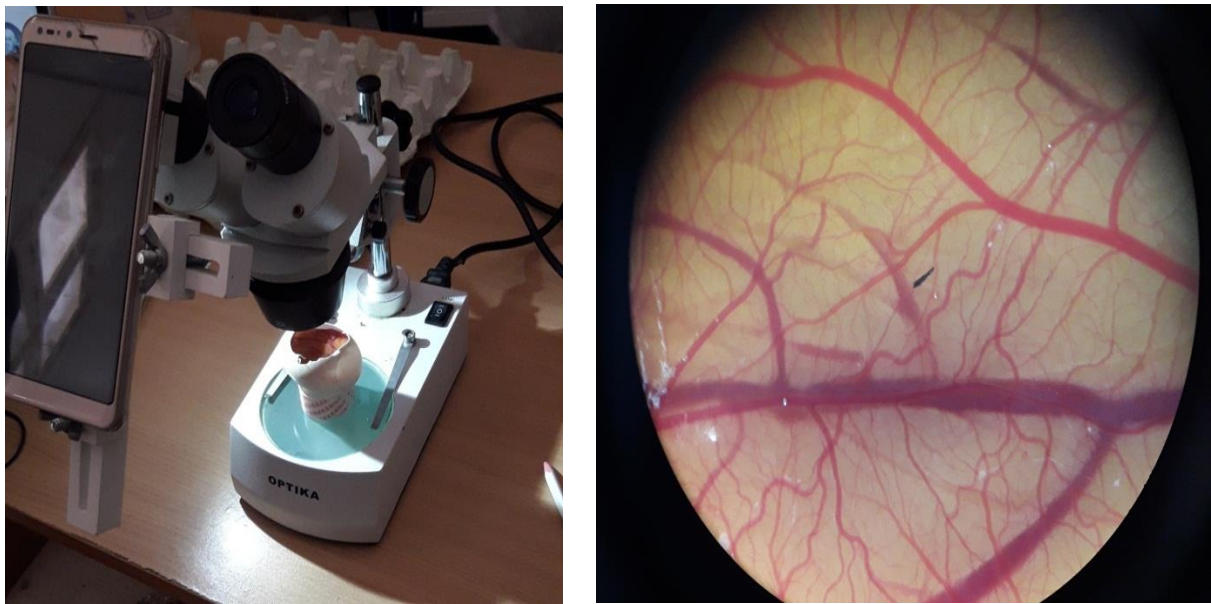


Figure 20 : Observations de la CAM sous stéréomicroscope.

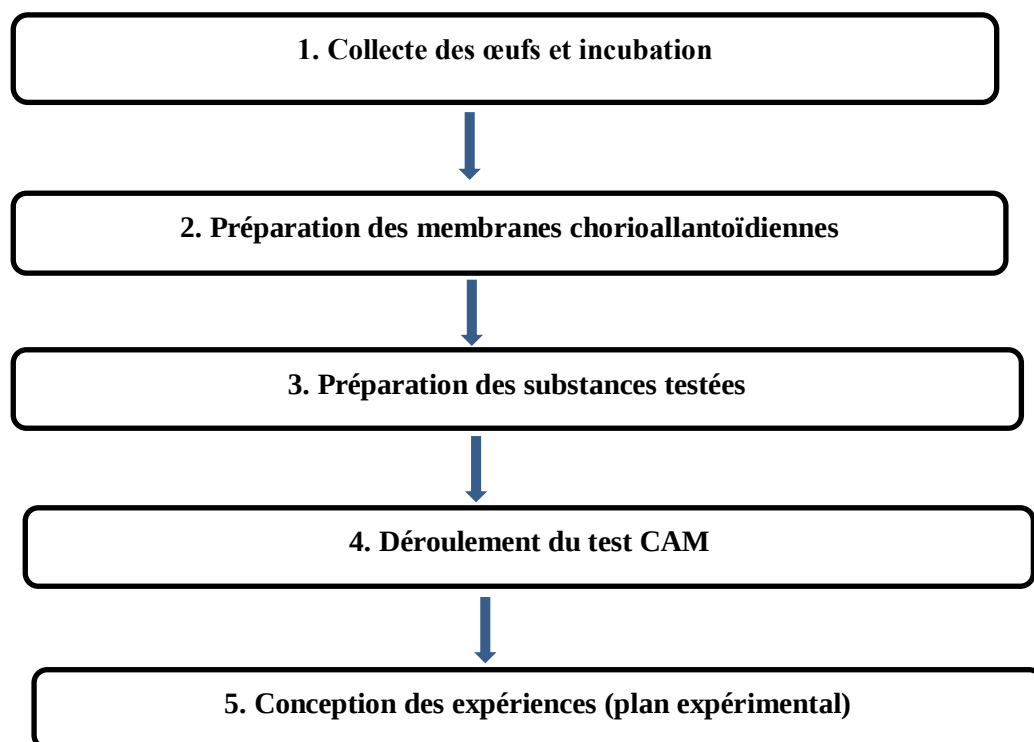


Figure 21 : Diagramme résumant les étapes de l'expérimentation.

Analyse statistique

Toutes les données de cette étude sont exprimées en moyenne $\pm$ Ecart type de la moyenne. La signification statistique a été analysée en utilisant le test-t de Student par la comparaison entre les groupes traités et le témoin. Durant l'analyse statistique on a eu recours au logiciel statistique GraphPad prism9.2.0(332) version essai gratuit. On note que pour *P* valeurs inférieures à 0.05, ont été considérées comme significatives.

CHAPITRE V.

Résultats et Discussions

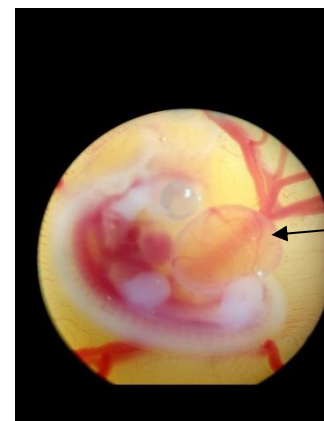
1. Evaluation qualitative

Le suivi quotidien, macroscopique et sous stéréomicroscope, du développement des embryons du poulet, que ce soit *in ovo* ou *ex ovo*, nous a permis de relever les constats suivants :

1- Le système circulatoire de l'embryon et de ses annexes devient fonctionnel en premier lieu vers le troisième jour de l'incubation, et que les vaisseaux du sac vitellin apparaissent bien avant ceux de la membrane chorioallantoïdienne (CAM), qui commencent à être visible à partir du quatrième jour d'incubation (Figures 22 et 23).



Figure 22 : Vaisseaux du sac vitellin.



la CAM

Figure 23 : Vaisseaux de la CAM.

2- La CAM présente une croissance très rapide, au point où, au huitième jour, elle recouvre toute la surface visible sous la fenêtre ouverte sur la coquille. Durant cette période, la croissance des vaisseaux sanguins du CAM prend une allure exponentielle (Figures 24 et 25). Au 14^{ème} jour, la CAM enveloppe la totalité de l'embryon et ses annexes (amnios, vésicule vitelline).

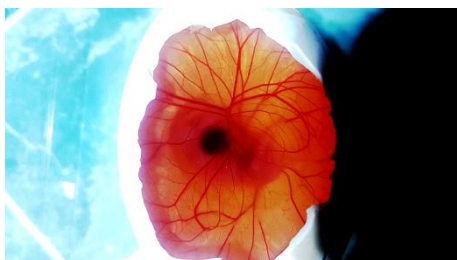


Figure 24 : CAM à J8

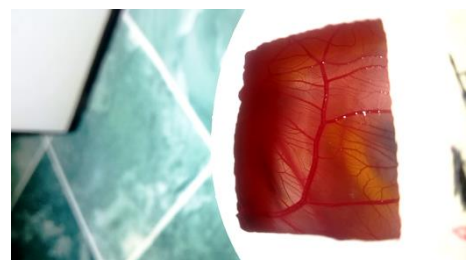


Figure 25 : CAM à J14

3- La vascularisation de la CAM, se projette dans le tissu mésenchymateux sous-jacent l'épithélium ectodermique suivant un modèle hiérarchisé. Ceci permet d'observer des aspects en "Y" dites primaires à partir de laquelle diverge des branches secondaires et tertiaires (Figure 26).

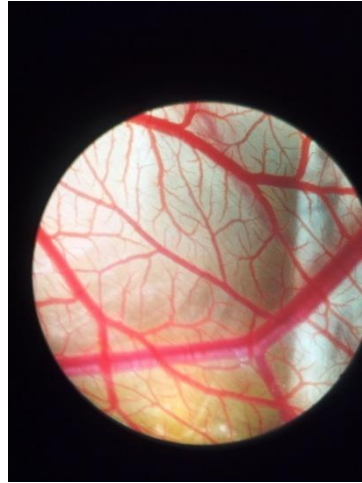


Figure 26 : Observation des vaisseaux primaire, secondaire et tertiaire sous stéréomicroscope.

4- Il est possible de distinguer différents niveaux d'action du traitement appliqué sur la vascularisation allantoïdienne comme cela sont présenté dans les figures suivantes :



Figure 27 : Vascularisation normale de la CAM.



Figure 28 : Résorption des vaisseaux sanguins dexta à J12.

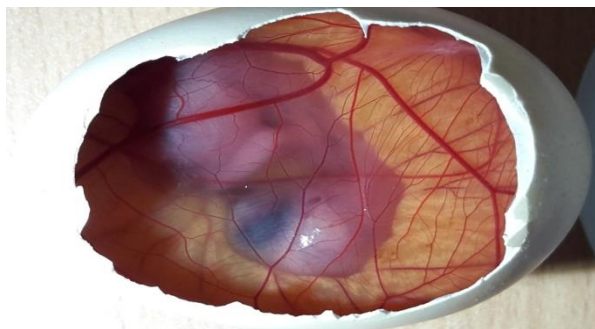


Figure 29 : Œuf traité par l'eau physiologique, observation à J12



Figure 30 : Œuf traité par Rhitene®10mg /ml, observation à J12.

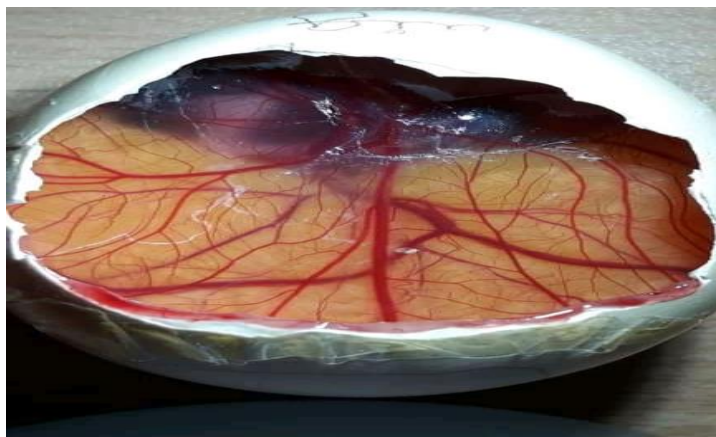


Figure 31 : Traitement des CAM par l'extrait brut de l'oignon *Allium cepa L.*, *in ovo*, observation à J12.



Figure 32 : Œuf traité par spafon®40mg/4ml, observation à J12.

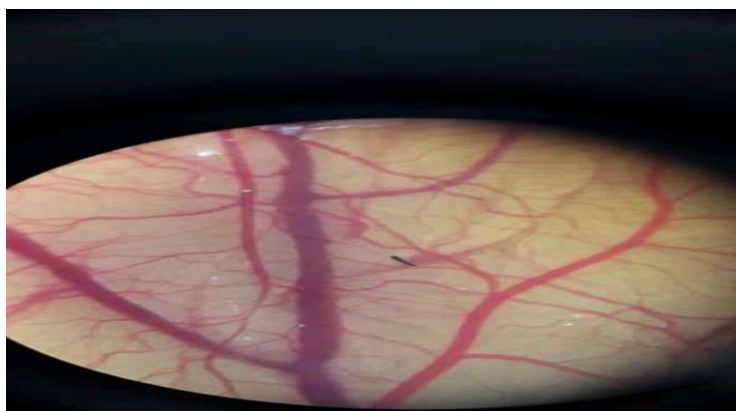


Figure 33 : Œuf traité par spafon®40mg/4ml, observation à J12, sous stéréomicroscope.

- Traitement des CAM par l'extrait brut de l'ail *Allium sativum* in ovo et ex ovo



Figure 34 : Aspect d'un embryon et ses CAM, amnios et sac vitellin ex ovo à J8.

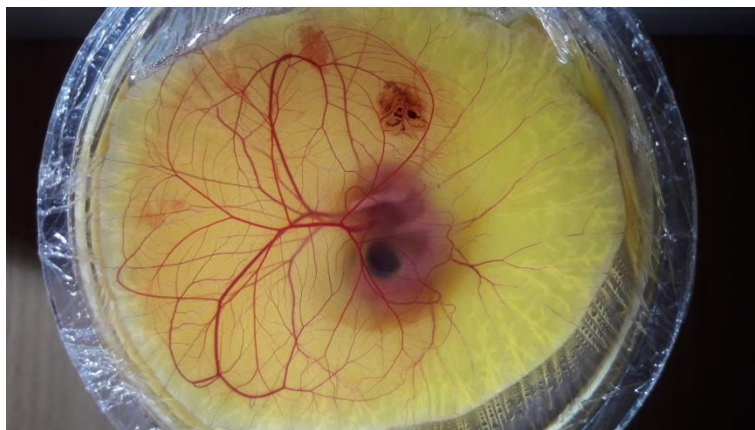


Figure 35 : Effet de l'extrait brut de l'ail sur la CAM appliqué *ex ovo*, à J8.



Figure 36 : Effet de l'extrait brut de l'ail sur la CAM appliqué *in ovo*, à J8.

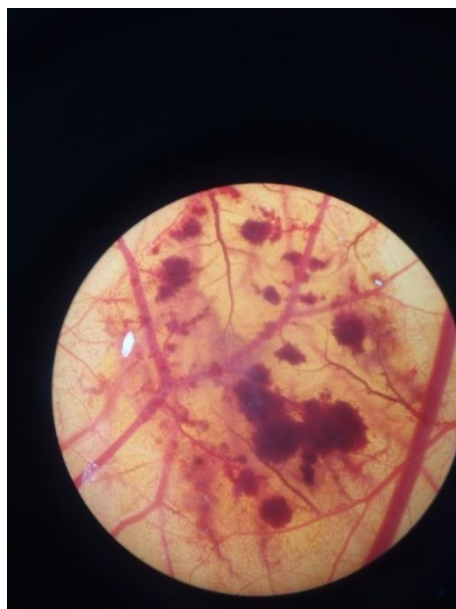
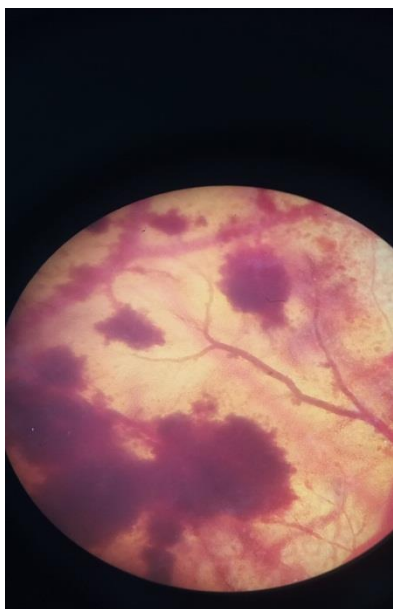


Figure 37 : Effet de l'extrait brut de l'ail sur la CAM appliqué, *in ovo*, à J8, observation sous stéréomicroscope.

5- Un taux de mortalité considérable dans tous les groupes. Ceci peut être dû à des facteurs externe à l'expérimentation (infections, conditions climatiques,...), donc difficile à contrôler.

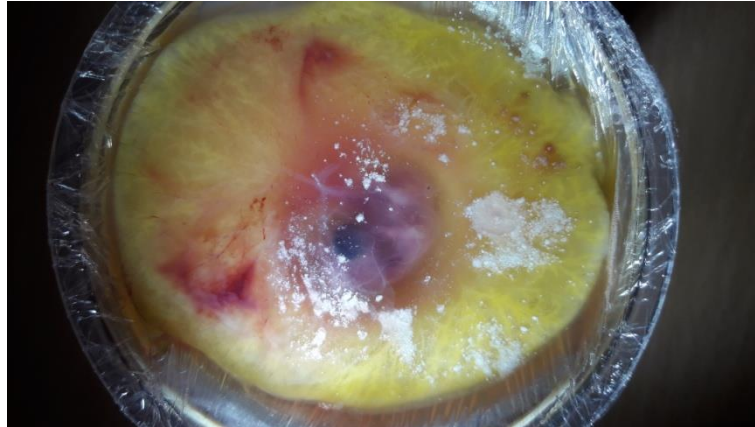


Figure 38 : Embryon mort *ex ovo*.

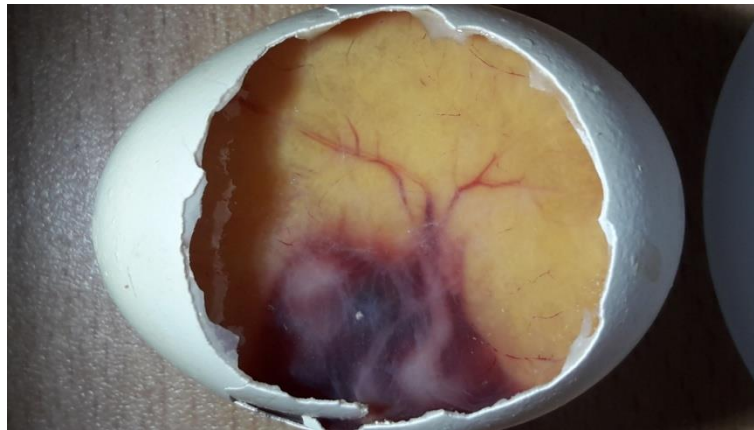


Figure 39 : Embryon mort *in ovo*.

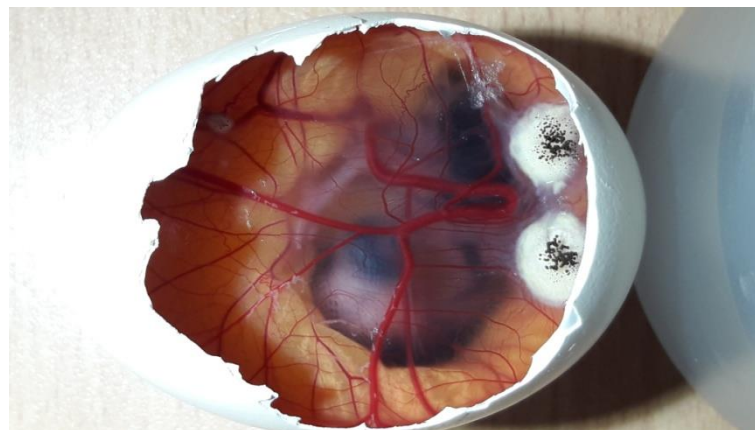


Figure 3 : Embryon (CAM) infecté.

L'observation nous mène à croire que les traitements appliqués (Rhitene®10mg /ml; spafon®40mg/4ml; l'extrait brut de l'ail ; l'extrait brut de l'oignon) ne présentent aucune toxicité sur l'embryon, en fait, tous les embryons survivent suite au traitement.

2. Evaluation quantitative

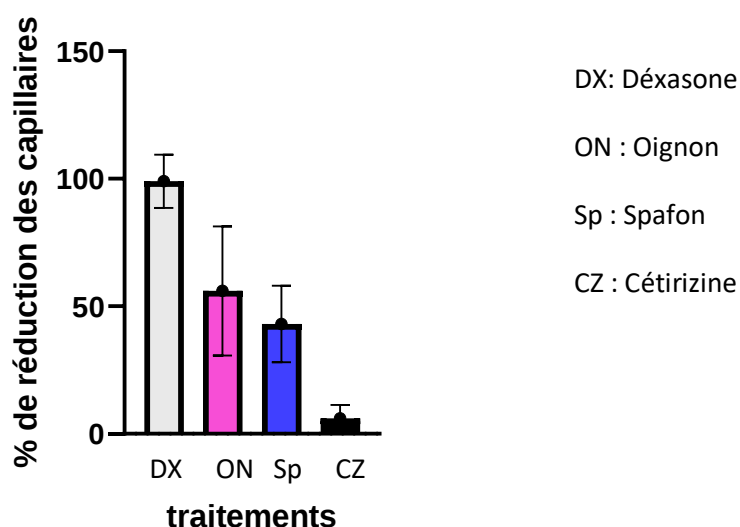


Figure 41 : Histogramme représentant l'action des traitements sur la vascularisation des CAM.

D'après les données présentées sur la figure 41, il ressort que la Dexaméthasone, administrée à une dose de 2µg, réduit de 99% la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon du poulet par rapport au témoin négatif (recevant uniquement de l'eau physiologique). L'action de la Dexaméthasone semble être claire, puissante et du point de vue statistique elle est très hautement significative ($p < 0.0001$). La Dexaméthasone est un corticostéroïde surrénalien synthétique doté de puissantes propriétés anti-inflammatoires. En plus de se lier à des récepteurs stéroïdiens nucléaires spécifiques, la Dexaméthasone interfère également avec l'activation du NF-kB et les voies apoptotiques (NCI04, 2020).

En clinique, La Dexaméthasone a fait l'objet d'études en vue de son emploi comme traitement antiangiogénique en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques (Glode et al, 2003).

En ophtalmologie, ce corticoïde constitue toujours un standard dans le traitement des affections ophtalmiques en relation avec l'angiogenèse (Nehmé et Edelman, 2008).

Nos résultats, bien que préliminaires, ont permis d'une part, des observations concourant avec ce qui est déjà établie. En fait, nous nous sommes basés sur les résultats de l'équipe de Folkman (1987) pour adopter la dose testée. D'après ces auteurs, la Dexaméthasone exerce son pouvoir angiostatique à des doses très faibles ($1/25^{\text{ème}}$) comparées à celles de l'hydrocortisone. Ainsi, ils démontrent que l'effet antiangiogénique est indépendant de l'effet anti-inflammatoire.

On croit que l'inhibition de la néovascularisation due à la Dexaméthasone passe par la répression de l'expression de VEGF (Fischer et *al.*, 2001).

Des travaux récents propose l'augmentation de la voie de la gluconéogenèse dans un modèle cellulaire murin pour expliquer l'action antiangiogénique de la Dexaméthasone (fang et *al.*, 2016).

D'autre part on constate que l'application de spafon permet d'obtenir une diminution de la vascularisation des CAM à une moyenne de 43% par rapport au témoin négatif (eau physiologique), ce qui correspond à moins de la moitié de l'effet de la Dexaméthasone (témoin positif). Ces observations concours avec les résultats obtenus par plusieurs équipes (know et *al.*, 2012).

Cependant il serait utile de rappeler que ces derniers ont eu recours à des modèles expérimentaux différents du CAM que nous avons employée. Par ailleurs, Il semble que spafon exerce son action en inhibant la différentiation des cellules CD34+ en progénitrice endothéliales.

Cétérizine apparait sans action sur la vascularisation de la CAM. La bibliographie consultée nous mène à croire que notre travail constitue la première étude consacrée à ce sujet.

L'extrait brut de l'oignon, *Allium cepa*, affiche un potentiel anti-angiogénique considérable, il inhibe 56% de la vascularisation du CAM par rapport au témoin négatif (eau physiologique), ce qui correspond à plus de la moitié de l'effet de la Dexaméthasone (témoin positif). Ces observations concours avec les résultats obtenus par plusieurs équipes (Caster et *al.*).

En fait, *Allium cepa* est riche en phytochimiques douées de plusieurs propriétés biologiques ce qui peut expliquer les observations obtenues (Boukeria et *al.*, 2016).

Revenant à l'action de l'ail, celui-ci montre une action puissante et assez particulière. Son action, à l'opposé des médicaments sus-cités qui bloquent la formation de nouveaux vaisseaux à partir de ceux pré-existant, présente un autre mode d'action sur les vaisseaux sanguins en l'occurrence l'effet destructeur des vaisseaux sanguins de l'anglais, vascular disrupting agents (Lippert, 2007). Donc, l'application de l'extrait brute de l'ail se traduit par une irritation des CAM, des saignements et des thromboses. Cet effet, clair puissant, reproductible et confirmé, présente une cinétique dose-dépendante. En outre, il est clair qu'au fur et à mesure que la dose augmente le temps nécessaire pour observer les séquelles diminuent radicalement (à l'ordre de secondes pour l'extrait non dilué). Une équipe tunisienne obtint les mêmes résultats que les nôtres ce qui confirme l'idée que l'extrait de l'ail possède un effet perturbateur des vaisseaux sanguins (hadriche-jarraya et *al.*, 2021).

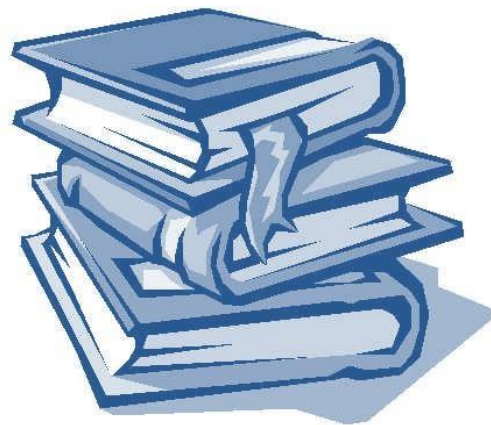
Cette étude préliminaire vise, principalement, l'évaluation du potentiel antiangiogénique des médicaments spafon, rhiten et des l'extrait brut de l'oignon (*Allium cepa*) et l'ail (*Allium sativum*). Elle s'inscrit, d'une part, dans la logique de la réorientation des médicaments actuellement en utilisation clinique, ou reprofilage. Et d'autre part, elle recherche de nouvelles biomolécules d'origine biologique qui peuvent être douées de propriétés antiangiogéniques.

Le modèle expérimental choisi pour mener ce travail consiste en les vaisseaux sanguins de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon du poulet. Ceci est utilisé couramment dans l'étude *in vivo* de l'angiogenèse et de l'anti-angiogenèse vue la simplicité, le cout modeste et la reproductibilité des résultats (Ribatti et *al.*, 2001).

Enfin, ce travail reste incomplet et des remarques sur des incohérences du dispositif expérimental méritent d'être soulignées. Entre autres, la taille des groupes reste excessivement réduite ce qui influence sur la qualité des analyses statistiques et par la suite sur les conclusions en tirées. En fait, dans des travaux précédents les chercheurs ont eu recours à plus de 600 œufs pour arriver à des résultats convaincants (Knighton et *al.*, 1977).

En plus le recours à des œufs d'origines hétérogènes influence sur pertinence des observations.

Conclusion et perspectives



Conclusion

Afin d'explorer l'effet anti-angiogénique des médicaments et des petites molécules des plantes, nous avons opté pour un test, *in ovo et ex ovo*. Bien que préliminaire, les résultats obtenus suggèrent la présence d'un effet anti-angiogénique pour la Dexaméthasone qui réduit de 99% la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon du poulet. De même, alors que Spafon affiche un potentiel modéré, Cétérizine (rhiten) semble être dépourvu de toute interaction avec la vascularisation du CAM. L'extrait aqueux de l'oignon, *Allium cepa*, réduit de façon significative la vascularisation du CAM par rapport au témoin. Pour l'ail, on constate un autre mode d'action sur les vaisseaux sanguins, en l'occurrence l'effet destructeur des vaisseaux sanguins (vascular disrupting agents).

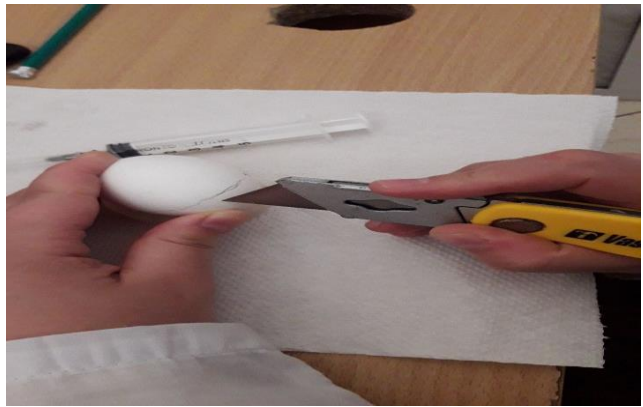
De cette étude, il ressort que spafon et oignon douée de propriétés antiangiogénique et l'ail destructeur de l'endothélium, pourrait constituer une source de biomolécules prometteurs dans la pharmacothérapie antiangiogénique anticancéreuse, de même que pour le traitement de toutes pathologies liées à la vascularisation anormale.

Des recherches plus approfondies sur d'autres modèles permettront d'élucider les mécanismes à l'origine de ces constatations et peuvent ouvrir la voie à des essais cliniques dédiés. Donc, on propose de :

- Revérifier les données recueillies sur des échantillons plus larges.
- Recourir à des modèles expérimentaux plus performants, culture cellulaire, Matrigèle, modèle murin...
- Elargir la liste des médicaments à tester;
- Compléter l'étude par des analyses histologiques.
- Tester des molécules pures au lieu d'utiliser des produits formulés pour éviter toutes interférences.

Annexes

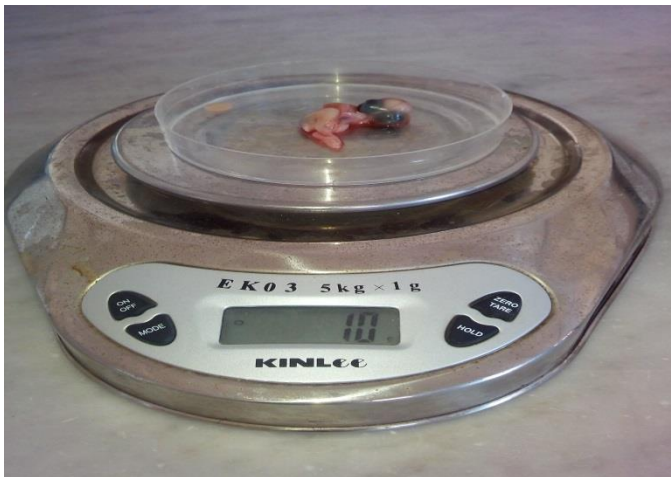
Annexe 1 : Les étapes principale d'application.



Annexe 2 : Application de médicament.



Annexe 3 : Poids de l'embryon en j12.



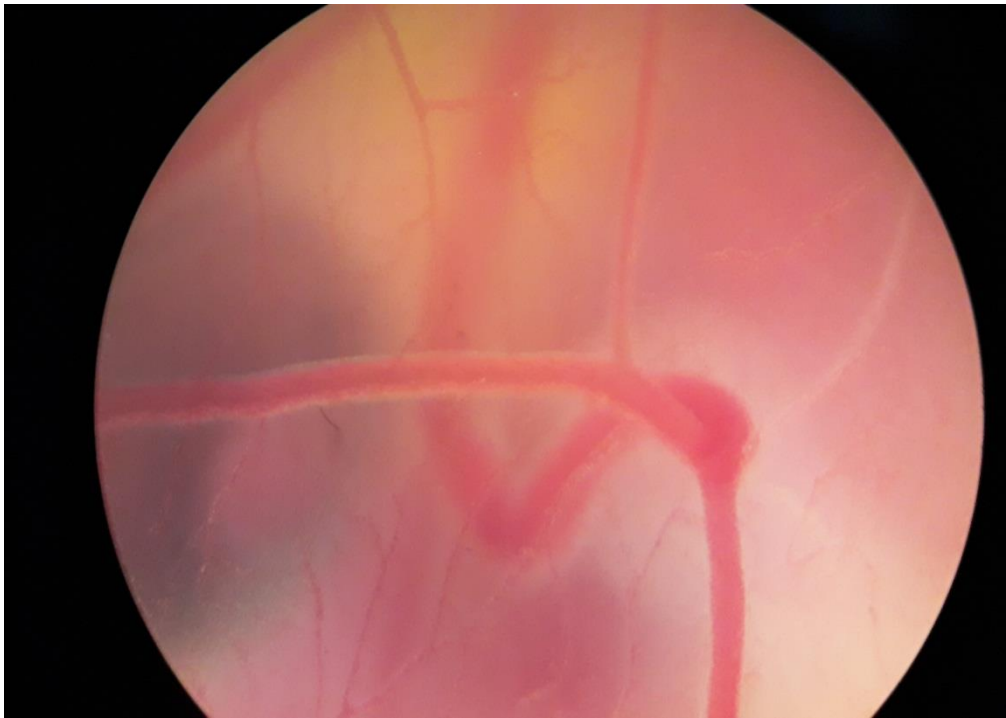
Annexe 4 : Poids d'un œuf.



Annexe 5 : Le modèle ex ovo.



Annex 6 : Observation microscopique d'un vaisseau sanguin d'un embryon de j6 x40.



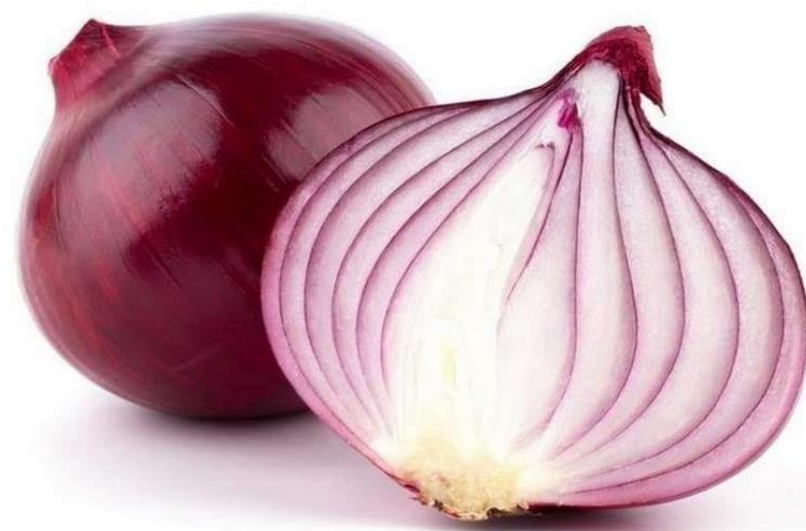
Annexe 7 : Broyage d'une coque d'œuf.



Annexe 8 : Bulbe d'ail.



Annexe 9 : Bulbe d'oignon.



Références

Bibliographiques

Références bibliographique

1. Abd el-Rahman, O, & Fouad, M. (2014). Risk of cardiovascular toxicities in patients with solid tumors treated with sunitinib, axitinib, cediranib or regorafenib: an updated systematic review and comparative meta-analysis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 92(3), 194- 207.
2. Abel E., Angel J., Kiguchi K et DiGiovanni J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nature protocols*, 4 (9): 1350.
3. Ambasta, R. K., Sharma, A., & Kumar, P. (2011). Nanoparticle mediated targeting of VEGFR and cancer stem cells for cancer therapy. *Vascular cell*, 3(1), 26.
4. Azzi, S., & Gavard, J. (2014). Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l'art du dialogue. *médecine/sciences*, 30(4), 408-414.
5. Belk, C. M., & Borden, V. (2004). *Biology: science for life*. Pearson Prentice Hall.
6. Bennis Y., Guillet B., Christophe Curti et Pascale Pisano. (2010). Intérêts thérapeutiques des médicaments antiangiogéniques disponibles en cancérologie. *Thérapie*, 65 (2): 95-105.
7. Bièche I. (2004). Molecular and cancer, *Immuno-analyse and biologie spécialisée* (19):13-22.
8. Botineau M. *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Paris: Éd. Tec & Doc; 2010, 1335p.
9. Boukeria, S., Kadi, K., Kalleb, R., Benbott, A., Bendjedou, D. and Yahia, A., 2016. Phytochemical and physicochemical characterization of *Allium sativum* L. and *Allium cepa* L. Essential oils. *J. Mater. Environ. Sci*, 7(7), pp.2362-2368.
10. Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2018). Les huiles essentielles comme agents anticancéreux: actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*, 16(5), 254-267.
11. Brosseau, S., Naltet, C., Gounant, V., & Zalcman, G. (2015). Antiangiogéniques en cancérologie thoracique: critères de prescription et gestion des effets indésirables. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 7(4), 414-422
12. Brunnberg, M., Klopffleisch, R., & Wergin, M. (2016). Basic Principles of Cancer Therapy. In *Veterinary Oncology* (pp. 37-57). Springer, Cham.
13. C.M.D., Cabanela, R.A. and Dumaoal, O.S.R., Anti-angiogenic effect of flavonoid Castor, A.C.A., Aldovino, R.A.M., Dimaano, G.A., Fernandez, M.C.S., Magno, content of *Allium cepa* L. var. *ascalonicum* Backer (onion) skin on chick chorioallantoic membrane.
14. Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons?. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 339-349.
15. Cao, Y. (2004, April). Antiangiogenic cancer therapy. In *Seminars in cancer biology* 14(2), 139-145. Academic Press.
16. Chabner, B.A., Roberts, T.G.Jr., 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews of Cancer* 5, 65-72.
17. Cheeseman, K., Certad, G., & Weitzman, J. B. (2016). Parasites et cancer: existe-t-il un lien?. *médecine/sciences*, 32(10), 867-873.
18. Chen WT. 1996. Proteases associated with invadopodia, and their role in degradation of extracellular matrix. *Enz. Prot.* 49:59-71
19. Chodez, M., Fiard, G., Arnoux, V., Descotes, J. L., & Long, J. A. (2015). Ablative treatments in localized renal cancer: literature review for 2014. *Progres en urologie*:

- journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie, 25(9), 499-509.
20. Christophe Chantrain., Yves., DeClerck A. (2002). Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *medecine/sciences*, (18):565-75.
 21. Chung A.S., Lee J., Ferrara N. (2010). Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, (10): 505-514.
 22. Coon, J. T., M. Hoyle, et al. (2010). Bevacizumab, sorafenib, sunitinib and temsirolimus for renal cell carcinoma: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment* 14(2): 1-+
 23. Couch, D. B. (1996). Carcinogenesis: basic principles. *Drug and chemical toxicology*, 19(3), 133-148.
 24. Dupont F, Guignard J-L. *Botanique : les familles de plantes*. 15ème éd. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2012, 300p.
 25. Eng, C. (1999). RET proto-oncogene in the development of human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17(1), 380-380.
 26. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. *Observatoire mondial du cancer : « Cancer Today »*. Lyon : Centre international de recherche sur le cancer, 2020
 27. Fidler I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, (3): 453-8.
 28. Fischer, S., Renz, D., Schaper, W., & Karliczek, G. F. (2001). In vitro effects of dexamethasone on hypoxia-induced hyperpermeability and expression of vascular endothelial growth factor. *European journal of pharmacology*, 411(3), 231-243.
 29. Flippot, R., Kone, M., Magné, N., & Vignot, S. (2015). La signalisation FGF/FGFR: implication dans l'oncogenèse et perspectives thérapeutiques. *Bulletin du Cancer*, 102(6), 516-526.
 30. Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England journal of medicine*, 285(21), 1182-1186
 31. Folkman, J. (1990). Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. *Introduction. Cancer Metastasis Rev.* 9 (3): 171-4. Review.
 32. Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82(1), 4-7.
 33. Folkman, J. (2003, April). Angiogenesis and apoptosis. In *Seminars in cancer biology* (Vol.13, No. 2, pp. 159-167). Academic Press.
 34. Folkman, J. U. D. A. H., & Ingber, D. E. (1987). Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action. *Annals of surgery*, 206(3), 374.
 35. Fridman, W. H., & Sautès-Fridman, C. (2014). Le microenvironnement tumoral- Matrice nourricière, champ de bataille et cible thérapeutique des cancers. *médecine/sciences*, 30(4), 359-365.
 36. Gavard J., Patel V et Gutkind S. (2008). Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell*, (14): 25-36.

37. Glode, L.M., Barqawi, A., Crichton, F., Crawford, E.D. and Kerbel, R., 2003. Metronomic therapy with cyclophosphamide and dexamethasone for prostate carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 98(8), pp.1643-1648.
38. Grossman, H. B., Lamm, D. L., Kamat, A. M., Keefe, S., Taylor III, J. A., & Ingersoll, M. A.(2016). Innovation in bladder cancer immunotherapy. *Journal of Immunotherapy*, 39(8), 291-297.
39. Hadriche-Jarraya, H., Limam, F., Aouani, E., Amri, M. and Mokni, M., 2021. Vasomodulatory effects of semi-purified fractions of garlic aqueous extract on chick chorioallantoic membrane. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(3).
40. Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*, 86(3), 353-364.
41. Hejmadi, M. (2009). How cancer arises. *Introduction to cancer biology*, 2, 7-16.
42. Hellmann, M. D., Friedman, C. F., & Wolchok, J. D. (2016). Combinatorial cancer immunotherapies. In *Advances in immunology* (Vol. 130, pp. 251-277). Academic Press.
43. Heyfa Hadriche-jarraya, Ferid liman, Azzedine aouani, Mohamed amri, Meherzia mokni; May 2021; vasomodulatory effects of semi-purified fractions of garlic aqueous extract on Chick chorioallantoic membrane; laboratoire de substances bioactives, centre de biotechnologie, technopole borj-cedria, hamam lif, Tunisie; vol:34; pp943-949.
44. Hilberg F., Roth J., Krssak M., Kautschitsch S., Sommergruber W., Tontsch-Grunt U., Garin-Chesa P., Bader G., Zoephel A., Quant J., Heckel A., Rettig J., (2008). BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res*, (68): 4774-4782.
45. https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C422
46. <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt/search> topic=TSN&search value=4265 null ,consulte le 10/09/2021.
47. <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt/search> topic=TSN&search value=4265 null ,consulte le 10/09/2021.
48. Itis , *Alliumcepa L* , Taxonomic Hierarchy ,
49. Itis , *Allium sativum L* , Taxonomic Hierarchy ,
50. Jean-Pierre Willem ,2008 Les huiles essentielles, une médecine d'avenir
51. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, et al. 1994. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J. Cell. Physiol.* 160:194–202
52. Johnson, M. D., Johnson, M. D., Volpert, O. V., Ward, W. F., Linggen, M. W., Chesler, L., Solt, D. B.,... & Bouck, N. P. (1996). Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *The Journal of clinical investigation*, 98(3), 671-679.

53. Kahn, A. (1987). Mutation, régulation, prédisposition et correction... la génétique" super-star"
54. Kalluri R (2003). Angiogenesis: Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* 3(6): 422.
55. Kalluri, R. (2002). Discovery of type IV collagen non-collagenous domains as novel integrin ligands and endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 67:255-66.
56. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of vegf on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995;55:5687-92.
57. Kerbel R, Folkman J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2: 727-739.
58. King, R.J.B., *Cancer biology*. Edition Harlow, Essex (England), 1996, 227p.
59. Kirtonia, A., Gala, K., Fernandes, S.G., Pandya, G., Pandey, A.K., Sethi, G., Khattar, E. and Garg, M., 2021, January. Repurposing of drugs: an attractive pharmacological strategy for cancer therapeutics. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 68, pp. 258-278). Academic Press.
60. Klopffleisch, R. (2016). Basic Principles of Carcinogenesis. In *Veterinary Oncology* (pp. 1-17). Springer, Cham.
61. Kwon, Y.H., Jung, S.Y., Kim, J.W., Lee, S.H., Lee, J.H., Lee, B.Y. and Kwon, S.M., 2012. Phloroglucinol inhibits the bioactivities of endothelial progenitor cells and suppresses tumor angiogenesis in LLC-tumor-bearing mice. *PLoS One*, 7(4), p.e33618.
62. Lemaire, C., Liu, H. E., Vuppalapaty, M., Wilkerson, C., Renier, C., Chiu, M.,... & Sollier, E. (2020). Detection of EGFR mutations in cfDNA and CTCs, and comparison to tumor tissue in non-small-cell-lung-cancer (NSCLC) patients. *Frontiers in oncology*, 10, 2030.
63. Liotta, L. A., Kleinerman, J., & Saidel, G. M. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer research*, 34(5), 997-1004.
64. Liotta, L.A., 1992. Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific American* 266, 54-59
65. Lippert III, J.W., 2007. Vascular disrupting agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(2), pp.605-615.
66. Lowy, I. (2001). Dr. Folkman's War. *Science*, 293(5533), 1261-1261.
67. MariAngela marelli, valantina amodio, statti Anderson fellomena conforti; december2018; biological properties and bioactive components of allium cepa.L. focus on potentiel benifits on the treatment of obesity and related comorbidities
68. MariAngela marelli, valantina amodio, statti Anderson fellomena conforti; december2018; biological properties and bioactive components of allium cepa.L. focus on potentiel benifits on the treatment of obesity and related comorbidities.

69. Markel, H. (2001). Supply-Side Oncology. Review of Dr. Folkman's War: Angiogenesis and the Struggle to Defeat Cancer.
70. Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W., & Thompson, C. B. (2014). The Molecular Basis of Cancer E-Book. Elsevier Health Sciences.
71. Meyer, J.L., Verhey, J. Xia P. Wong, J., 2007. New technologies in the radiotherapy clinic. *Frontiers in Radiation Oncology* 40, 1-17.
72. Mohammadi, M., Froum, S., Hamby, J. M., Schroeder, M. C., Panek, R. L., Lu, G. H., ... & Hubbard, S. R. (1998). Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *The EMBO journal*, 17(20), 5896-5904.
73. Monier R. (2000). Aspects fondamentaux : mécanismes de cancérogenèse et relation dose–effet. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences* 323 : 603–610
74. Monier, R., & Tubiana, M. (2008). Cancérogenèse. Accroissement des connaissances et évolution des concepts. *Oncologie*, 10(5), 319-347.
75. Mousa SA, editor. *Angiogenesis Inhibitors and Stimulators: Potential Therapeutic Implications*. 1st ed. Georgetown: Eurekah.com/Landes Bioscience; 2000. p. 1–12.
76. Mousa, S. A., & Davis, P. J. (2017). Angiogenesis and anti-angiogenesis strategies in cancer. In *Anti-angiogenesis strategies in cancer therapeutics* (pp. 1-19). Academic Press.
77. Mucke, H. A. (2015). Drug Repurposing Patent Applications July–September 2015. *Assay and drug development technologies*, 13(10), 661-666.
78. NCI04, 2020,
79. Nehmé, A. and Edelman, J., 2008. Dexamethasone inhibits high glucose–, TNF- α –, and IL-1 β –induced secretion of inflammatory and angiogenic mediators from retinal microvascular pericytes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(5), pp.2030-2038.
80. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:1–20
81. O'Reilly MS, Homgren L, Shing Y, et al. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315–28
82. Organization mondiale de santé ,2020.
83. Parimi, S., & Chi, K. N. (2016). Chemotherapy for metastatic castration-sensitive prostate cancer. *International Journal of Urology*, 23(9), 726-733.
84. Powell WC, Matrisian LM. 1996. Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213:1–21
85. Raymond W. (2007). *CANCER BIOLOGY FOURTH EDITION* University of Michigan Medical School Ann Arbor, Michigan.110-153.
86. Razavi-Azarkhiavi, K., J. Behravan, F. Mosaffa, S. Sehatbakhsh, K. Shirani, and G. Karimi. 2014. Protective effects of aqueous and ethanol extracts of rosemary on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes by comet assay. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 11:27–33.
87. Ribatti, D. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *International review of cell and molecular biology*, 270, 181-224.
88. Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P. H., & Djonov, V. (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and

- anti-angiogenesis in vivo. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 264(4), 317-324.
89. Ricard N., Simons M. (2015). When it is better to regress: dynamics of vascular pruning. *PLoS Biol*; 13: e1002148.
 90. Robert, J. (2009). Angiogenesis.
 91. Robinson, B. A., Gunningham, S. P., Currie, M. J., Han, C., Scott, P. A., Harris, A. L., & Fox, S. B. (2001). VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *The Journal of pathology*, 193(3), 325-332.
 92. ROGER J B KING, MIKE W ROBINS, 2006. *CANCER BIOLOGY* Third Edition 224-259.
 93. Ruddon, Raymond W. *Cancer biology*. Oxford University Press, 2007.
 94. Sandler AB, Schiller JH, Gray R, Dimery I, Brahmer J, Samant M, et al. Retrospective evaluation of the clinical and radiographic risk factors associated with severe pulmonary hemorrhage in first-line advanced, unresectable non-small-cell lung cancer treated with Carboplatin and Paclitaxel plus bevacizumab. *J Clin Oncol* 2009;27:1405-12
 95. Sandler, A., Herbst, R., & Vokes, E. (2006). Angiogenesis inhibition in the treatment of lung cancer. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*, 4(11 Suppl 23), 1-10.
 96. Scappaticci F, Skillings J, Holden S, Gerber H, Miller K, Kabbinavar F, et al. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1232-9.
 97. Ségala S. (2012) .Cancer : les mécanismes biologiques
 98. Sendl A. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 1 Chemistry, analysis, history, botany. *Phytomedicine*. 1995;1(4):323 39
 99. Senninger F. *L'ail et ses bienfaits*. Saint-Julien-en-Genevois; Genève-Bernex: Editions Jouvence; 2009, 94p.
 100. Senninger, 2009. *L'ail: saveurs et vertus*. Paris: Grancher; 2008, 170p.
 101. Shang, F., Liu, M., Li, B., Zhang, X., Sheng, Y., Liu, S., ... & Xiu, R. (2016). The anti-angiogenic effect of dexamethasone in a murine hepatocellular carcinoma model by augmentation of gluconeogenesis pathway in malignant cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 77(5), 1087-1096.
 102. Struhl K. (2007). Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nature Structural and Molecular Biology* 14(2): 103.
 103. Treps L. et Gavard J. (2015). L'angiogenèse tumorale-Quand l'arbre de vie tourne mal. *médecine/sciences*, 31 (11): 989-995
 104. Tubiana, M. (2008). Généralités sur la cancérogenèse☆. *Comptes rendus biologies*, 331(2), 114-125.
 105. Vordermark, D. (2016). Radiotherapy of cervical cancer. *Oncology research and treatment*, 39(9), 516-520.

106. Wacker A. et Gerhardet H. (2011). Endothelial development taking shape. *Current opinion in cell biology*, 23 (6): 676-685.
107. Y. H., Lee, J. H., Jung, S. Y., Kim, J. W., Lee, S. H., Lee, D. H., Lee, K. S., Lee, B. Y., & Kwon, S. M. (2012). Phloroglucinol Inhibits the in vitro Differentiation Potential of CD34Positive Cells into Endothelial Progenitor Cells. *Biomolecules & therapeutics*, 20(2), 158–164.
108. Young, C. W., & Burchenal, J. H. (1971). Cancer chemotherapy. *Annual review of pharmacology*, 11(1), 369-386.
109. Yuen Shing, ., Folkman, J., Haudenschild, C., Lund, D., Crum, R., & Klagsbrun, M. (1985). Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *Journal of cellular biochemistry*, 29(4), 275-287.
110. Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual review of medicine*, 49(1), 407-424.
111. Zhu X, Wu S, Dahut W, Parikh C. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2007;49:186-93.

