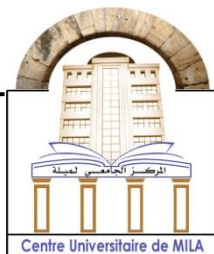


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N° Ref :.....

Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF- Mila

Institut des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques et Agricoles

**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 :

***Criblage de composés antivasculaires par le test sur la
membrane chorioallantoïque (CAM)***

Présenté par :

- Kacir Feryal
- Chouarfa Mouna

Devant le jury :

Benayache. F
Harrieche. O
Moussaoui. B

MCB
MAA
MAA

Présidente
Examinatrice
Promoteur

Année Universitaire : 2024/2025

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Avant tout, nous adressons notre profonde gratitude à *Allah*, le Tout-Puissant, qui nous a accordé la force, la volonté et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous exprimons ensuite notre sincère reconnaissance à notre encadrant, Monsieur Bilal MOUSSAOUI, pour sa présence constante, sa disponibilité, ses conseils avisés et son soutien précieux. Ses idées ont été indispensables à la réussite de cette étude expérimentale.

Nos remerciements les plus distingués vont aux membres du jury, pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer notre travail.

À nos chers parents, nous adressons toute notre gratitude pour leur soutien indéfectible, leurs encouragements inestimables et leur amour, piliers de notre persévérance. Nous espérons être un jour à la hauteur de leurs attentes.

Nous remercions chaleureusement les techniciens de laboratoire pour leur aide précieuse, ainsi que l'ensemble des enseignants du département des Sciences de la Nature et de la Vie, qui ont contribué à notre formation académique.

Enfin, nous n'oublions pas toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont participé directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. À chacun, un grand merci du fond du cœur.

Mouna et faryel





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents AMMAR ET SOUAD. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

À mes chers frères ALAA et WALID et à ma chère sœur DOUA

A mon mari MOHAMMED Pour tes soutiens, tes encouragements, pour te dire que tu as ta part dans la réussite de ce travail, toute ma gratitude à ton égare.

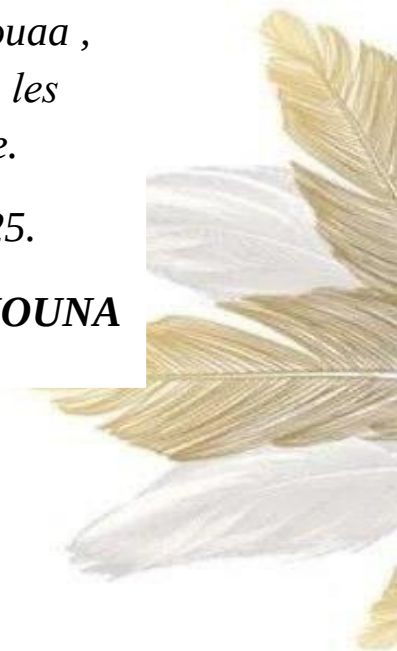
À ma douce pièce et à ma belle surprise, mon cher et précieux fils SANED

A Ma belle famille OMAR et ZAHIA.

A ma belle binôm feryal et tous mes amis: douaa , lamis pour l'amitié et les souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble.

A tous mes collègues de la promotion 2025.

MOUNA



Dédicaces



Avant tout je tiens à remercier Allah le tout puissant pour m'avoir donnée la force , la volonté , la santé et la patience pour mener à terme ce modeste travail que je dédie

A mes chère parents mon père Ferhat et ma mère Salima aussi A mon Mon grand-père Ahmed et ma grand-mère Akila qui m'ont encouragé pour que je réussisse dans mes études , pour leur sacrifice , soutien , et leur patience.

A mes chers frères Sami, Mohammed et ma petite soeur Chayma Pour leurs encouragements et pour leur soutien moral et physique

A ma belle binôme Mouna Chouarfa et à toutes mes précieuses amies qui m'ont toujours ouvert les portes de l'espoir: Silya, Sawsen, Rahma et Roumaissa.

Feryal

Résumé

La lutte contre le cancer par inhibition de la vascularisation tumorale s'appuie sur deux approches complémentaires : freiner la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (anti-angiogenèse) et perturber les vaisseaux existants (thérapie de destruction vasculaire). Dans cette étude, les effets antivasculaires de l'extrait brut de *Ginkgo biloba* ont été examinés à l'aide du modèle de la membrane chorioallantoïdienne (CAM). Dès le 3^e jour d'incubation, des cultures *in ovo* ont été préparées. Au 8^e jour, la préparation végétale a été appliquée directement sur la CAM. Une solution saline a servi de contrôle négatif, tandis que la dexaméthasone et le jus d'ail ont servi de témoins positifs. Des photographies ont été prises, ce qui permet de suivre les altérations vasculaires induites.

Le *Ginkgo biloba* a démontré une action anti-angiogénique notable en bloquant la néovascularisation sans altérer les vaisseaux existants. Il se distingue par l'absence d'effets indésirables majeurs (tels que l'irritation, les saignements ou les thromboses) sur la CAM. Toutefois, il induit une kératinisation de la membrane, une vasoconstriction vasculaire, un arrêt du flux sanguin et une diminution de la densité vasculaire, le tout sans provoquer la mort embryonnaire.

Mots-clés : Activité Anti-Vasculaire (AAV), Angiogenèse, Cancer, Perturbation vasculaire, Effet Anti-Angiogénique, Membrane Chorioallantoïdienne (CAM), *Ginkgo biloba*

Abstract

The fight against cancer by inhibiting tumor vascularization is based on two complementary approaches: preventing the formation of new blood vessels (anti-angiogenesis) and disrupting existing vessels (vascular disruption therapy). In this study, the antivasculare effects of crude *Ginkgo biloba* extract were investigated using the chorioallantoic membrane (CAM) model. On the 3^o day of incubation, *in ovo* cultures were prepared. On the 8^o day, the plant preparation was applied directly to the CAM. A saline solution served as the negative control, while dexamethasone and garlic juice served as the positive controls. Photographs were taken, allowing for the monitoring of the induced vascular alterations.

Ginkgo biloba demonstrated a notable anti-angiogenic action by blocking neovascularization without altering existing vessels. It is distinguished by the absence of major adverse effects (such as irritation, bleeding, or thrombosis) on the CAM. However, it induces membrane keratinization, vascular vasoconstriction, a cessation of blood flow, and a decrease in vascular density, all without causing embryonic death.

Keywords: Anti-Vascular Activity (AVA), Angiogenesis, Cancer, Vascular disruption, Anti-Angiogenic Effect, Chorioallantoic Membrane (CAM), *Ginkgo biloba*

الملخص :

تعتمد مكافحة السرطان المضادة للأوعية الدموية على منهجين متكاملين: منع تخليق أوعية دموية جديدة (Antiangiogenic) وتدمير الأوعية المكتملة (Vascular Disrupting Activity). في هذه الدراسة، تم فحص قدرة المستخلص الخام لنبذة الجنكة (*Ginkgo biloba*) باستخدام النموذج التجريبي المتمثل في الغشاء المشيميالسقائي (Chorioallantoic membrane CAM) ابتداءً من اليوم الثالث من فترة الحضانة، تم إعداد عينات داخل البيضة. وفي اليوم الثامن، تم تطبيق التحضير النباتي مباشرة على الغشاء. تم استخدام محلول فزيولوجي كشاهد سالب، بينما استُخدمت الديكساميثازون وعصير الثوم كشاهد إيجابي. وتم التقاط صور لنتيج التغيرات الوعائية الطارئة.

أظهر مستخلص نبات الجنكة تأثيراً مضاداً للتكوّن الوعائي (Antiangiogenic) ملحوظاً من خلال منع تكون أوعية دموية جديدة دون التأثير على الأوعية المكتملة. كما يتميز بعدم حدوث تأثيرات سلبية كبيرة (مثل التهيج، النزيف أو التخثر) على الغشاء. ومع ذلك، فإنه يُحدث تقرن الغشاء، وانقباضاً للأوعية الدموية، وتوقفاً في تدفق الدم، وانخفاضاً في كثافة الأوعية الدموية، وكل ذلك دون التسبب في وفاة الجنين.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للأوعية (Antivascular activity)، التكوّن (التخليق) الوعائي، السرطان، تعطيل الأوعية الدموية (Vascular Disrupting Activity)، التأثير المضاد للتكوّن الوعائي (Antiangiogenic)، الغشاء المشيمي السقائي (CAM)، الجنكة.

Tables des matières

Résumé

المُلخَص:

Tables des matières

List des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures :

Introduction 1

Chapitre I : Système vasculaire et progression tumorale

I.1. Le système vasculaire..... 5

I.1.1. Structure et fonction des vaisseaux sanguins 5

I.1.2. Système lymphatique..... 7

I.2. La formation du système vasculaire 8

I.2.1. Vasculogénèse 8

I.2.2. L'angiogénèse..... 10

I.2.3. Les principaux acteurs moléculaires impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux 13

I.2.4. Angiogénèse tumorale : 19

I.2.5. Le rôle de l'angiogénèse dans la progression tumoral et le métastase 21

I.2.6. Interaction tumeurs microenvironnement..... 22

I.2.7. Thérapie anti angiogénique. 23

Chapitre II : L'expérimentation sur la membrane chorioallantoïdienne(CAM Assay)

II.1. Historique de l'expérimentation sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM) 26

II.2. Structure et composition de l'œuf..... 26

II.3. Structure de CAM..... 30

II.4. Le principe du test CAM 31

II.5. Les fonctions biologiques 31

II.6. Les applications du test CAM..... 32

II.7. Les avantages et les inconvénients de l'expérimentation sur la CAM..... 33

Chapitre III : Phytothérapie et activité anti-vasculaire des produits dérivés de plantes

III.1. Définition.....	36
III.2. Les niveaux de la phytothérapie	36
III.2.1. Le niveau traditionnel	36
III.2.2. Le niveau pharmacologique	36
III.2.3. Le niveau clinique.....	37
III.3. L'intérêt de la phytothérapie.....	37
III.4. Les composés bioactifs d'origine végétale : prévention et traitement des cancers	37
III.5. Ginkgo biloba	37
III.5.1. Description.....	37
III.5.2. Composition chimique	38
III.5.3. Classification.....	39
III.5.4. Les propriétés pharmacologiques.	39

Etudes expérimentales

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. Matériel et Méthodes.....	43
IV.1.1. Test <i>in ovo</i>	43
IV.1.2. Préparation des substances testées.....	45
IV.1.3. Origine du Matériel biologique (Végétal)	46
IV.1.4. Déroulement du test CAM (<i>in ovo</i>)	48

Chapitre V : Résultats et discussions

V.1. Résultats et discussions	51
Conclusion.....	61

Références bibliographiques

List des abréviations

VTAs:	agents ciblant les vaisseaux
VDAs:	agents perturbateurs vasculaires
DMXAA:	acide 5,6-diméthylxanthénone-4-acétique
CE :	cellule endothéliale
Epc:	cellule endothéliale progénitrice
VEGF :	Vascular Endothelial growth factor
VEGFR-1:	Vascular Endothelial growth factor receptor -1
VEGFR -2 :	Vascular Endothelial growth factor receptor -2
VEGFR -3:	Vascular Endothelial growth factor receptor -3
CMLV:	cellules musculaires lisses vasculaires
NO:	l'oxyde nitrique
PGI2 :	prostacycline I2
HIF-α :	Hypoxia inducible factor- α
HIF-β :	Hypoxia inducible factor- β
HIF-1 :	Hypoxia inducible factor-1
HIF-2 :	Hypoxia inducible factor-2
FGF:	Facteur de croissance des fibroblastes
KGF:	Facteur de croissance des kératinocytes
PDGF:	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PF4 :	Platelet factor 4
TIMP :	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TSP1:	Thrombospondine 1

TGF-β :	Transforming growth factor-β
CAF:	Fibroblastes associés aux carcinomes
TAM:	Macrophages associés aux tumeurs
CAM :	Membrane chorioallantoïdienne
CaCO3:	Carbonate de calcium
MV:	Membrane vitelline
MVI:	Membrane vitelline interne
MVE:	Membrane vitelline externe
ECM:	Matrice extracellulaire
MMP-2:	Matrice métalloprotéinase-2
CO2 :	Carbon dioxide
O2:	Oxygène
3R:	Remplacement, réduction, raffinement
IRM:	L'imagerie par résonance magnétique
CT:	Le scanner

Liste des tableaux

Tableau 01: les grandes étapes de l'angiogenèse

Tableau 02 : classification de Ginkgo biloba

Liste des figures :

Figure 01: structure des vaisseaux sanguins

Figure 02: structure des vaisseaux lymphatiques

Figure 03: La vasculogenèse

Figure 04: Schéma et localisations des différents types d'endothélium

Figure 05: les mécanismes de l'angiogenèse

Figure 06: angiogenèse intussusceptive

Figure 07 : la régulation de HIF-1 α dans les conditions d'hypoxie et de

Figure 08 : famille des protéines VEGFs et leurs récepteurs

Figure 09 : Le modèle structurel de la molécule de FGF-1, facteur de croissance des fibroblastes

Figure 10 : facteur de croissance dérivé des plaquettes

Figure 11: mechanisms of action of PF-4 and derived molecules.

Figure 12: activité anti-angiogénique de la thrombospondine-1

Figure 13: la balance angiogénique

Figure 14 : la progression du cancer par angiogenèse

Figure 15 : cytokines et facteurs de croissance cellulaire sécrétés dans le microenvironnement tumoral

Figure16 : blocage des voies de signalisation du VEGF par les anticorps ciblant le ligand

Figure17 : Schéma représentatif des différents compartiments de l'œuf

Figure 18: Représentation schématique de la coquille d'œuf de

Figure 19: les principaux protéines de blanc de l'œuf

Figure 20: La membrane chorioallantoïdienne

Figure 21 : ginkgo biloba feuilles

Figure 22: la structure chimique de certains composés de Ginkgo biloba

Figure 23: Désinfection des œufs

Figure 24: Marquage des œufs

Figure 25: Incubation des œufs

Figure 26 : Mirage pour vérifier la fécondité des œufs

Figure 27 : Détermination de la chambre à air

Figure 28 : Prélèvement de l'Albumen

Figure 29: réincubation des œufs *in ovo*

Figure 30 : recouvrir les œufs

Figure 31: dexaméthasone

Figure 32 : préparation de Dexasone 4mg/ml

Figure 33 : Préparation du jus de l'ail (*Allium sativum*)

Figure 34 : Application de 5µl des solutions préparées sur la CAM

Figure 35 : Vaisseaux du sac vitellin sous stéréomicroscope à 20X

Figure 36 : Vaisseaux sanguins de la CAM sous stéréomicroscope 40X

Figure 37 : CAM Témoin à J8, culture *in ovo*.

Figure 38 : CAM Témoin à J14, *in ovo*

Figure 39: observation des vaisseaux primaires, secondaires et tertiaires sous stéréomicroscope 20X.

Figure 40 : effet Anti-angiogénique de la Dexamethasone (témoin positif)

Figure 41: témoin interne à J8. (A) : sous caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD ; (B) : sous stéréomicroscope X20 ; (C) : sous stéréomicroscope X20 à l'échelle gris.

Figure 42 : Application de Gingo biloba après 5 minutes. (D) : sous caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD ; (E) : sous stéréomicroscope X20 ; (F) : sous stéréomicroscope X20 à l'échelle gris.

Figure 43 : Application de Gingo biloba après 12h. (G) : sous caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD ; (H) : sous stéréomicroscope X20 ; (I) : sous stéréomicroscope X20 à l'échelle gris.

Figure 44 : Application de Gingo biloba après 30h. (J) : sous caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD ; (K) : sous stéréomicroscope X20 ; (L) : sous stéréomicroscope X20 à l'échelle gris ; (M) : témoin interne.

Figure 45 : embryon mort, *in ovo*

Figure 46: embryon (CAM) infect

Introduction

Introduction

Le cancer constitue aujourd'hui l'une des principales causes de décès chez les adultes dans le monde, avec près d'un décès sur dix qui en découle. Bien qu'il ait longtemps été associé aux pays industrialisés, il s'affirme désormais comme un défi sanitaire de taille dans les pays en développement, où les diagnostics souvent tardifs rendent les traitements plus complexes (Ndahindwa et al., 2013). Cette réalité résulte d'une interaction de facteurs d'origines physique, chimique et biologique, renforcée par les susceptibilités génétiques et le vieillissement naturel du corps humain (Mazeron et al., 2005).

En 2020, environ 19,3 millions de nouveaux cas ont été enregistrés dans le monde, accompagnés de plus de 10 millions de décès. Si aucune mesure efficace n'est prise, les projections indiquent une hausse de 49 % des cas et de 62 % des décès liés au cancer d'ici 2040 (Zingué et al., 2024).

Pour combattre le cancer, plusieurs approches thérapeutiques sont disponibles, telles que l'intervention chirurgicale (Wyld et al., 2015), la chimiothérapie (Hassan et al., 2025), la radiothérapie (Zhao et al., 2025), ainsi que les traitements ciblés (Gupta et Murtaza, 2025), l'immunothérapie (Sareen et al., 2025) et la thérapie antivasculaire (Chen et al., 2025 ; Yang et al., 2025 ;).

Le système vasculaire joue un rôle essentiel dans la promotion et le soutien de la croissance tumorale, et constitue une cible thérapeutique importante. Différents traitements antivasculaires ont été développés pour améliorer le contrôle tumoral par le biais d'agents ciblant les vaisseaux (VTA). Les VTA se divisent en deux groupes : les agents antiangiogéniques et les agents perturbateurs de vaisseaux (Delmonte et Sessa, 2009).

La lutte contre le cancer par thérapie anti-angiogénique repose sur une stratégie ancienne visant à priver les cellules tumorales de leur approvisionnement en oxygène et en nutriments. Cela est réalisé en réduisant le développement du réseau vasculaire et en empêchant la création de nouveaux vaisseaux sanguins. La plupart des médicaments homologués dans ce domaine agissent en ciblant le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), un élément clé dans le processus de formation des vaisseaux. Par ailleurs, en plus de limiter l'angiogenèse, ces traitements peuvent optimiser les réponses immunitaires, car le VEGF joue également un rôle dans l'immunosuppression. Bien que cette approche repose sur une base

scientifique solide, les résultats cliniques se sont révélés décevants dans de nombreux cas (Lopes-Coelho et al., 2021).

Les agents perturbateurs vasculaires de faible poids moléculaire (VDAs) provoquent une interruption marquée du flux sanguin vers les tumeurs solides, entraînant une nécrose étendue des cellules tumorales, tout en laissant relativement intacte la circulation sanguine dans les tissus normaux (Tozer et al., 2005). Ces VDAs peuvent être constitués soit de composés d'origine biologique, soit de petites molécules (Pallatt et al., 2025).

Les VDAs biologiques reposent sur l'utilisation de ligands spécifiques tels que des anticorps, des peptides ou des facteurs de croissance, permettant l'acheminement ciblé de substances toxiques, de déclencheurs de coagulation ou d'agents pro-apoptotiques vers l'endothélium des vaisseaux tumoraux. D'un autre côté, certaines petites molécules agissent sans ciblage spécifique mais exploitent les caractéristiques distinctives des vaisseaux tumoraux par rapport aux vaisseaux normaux. Elles provoquent ainsi une coupure rapide et sélective de l'apport sanguin à la tumeur (Thorpe et al., 2003). Parmi ces composés, on retrouve les combretastatines, qui se fixent sur la tubuline, plusieurs d'entre elles étant actuellement à l'étude dans des essais cliniques. Le DMXAA (acide 5,6-diméthylxanthénone-4-acétique), qui appartient à une classe différente de molécules, fait également l'objet de recherches cliniques (Tozer et al., 2005).

La recherche de composés nouveaux et efficaces d'origine naturelle constitue depuis longtemps un enjeu majeur dans le domaine des sciences pharmaceutiques. Les plantes ont démontré leur potentiel en tant que structures de base prometteuses pouvant servir de fondement à des le cancer. De nombreux médicaments anticancéreux actuellement utilisés, ou leurs analogues, sont issus des plantes, et beaucoup d'autres sont encore en phase d'essais cliniques (Khazir et al., 2014).

Certaines recherches indiquent que les plantes peuvent jouer un rôle prometteur dans la lutte contre le cancer tel que *Ginkgo biloba*. Notamment grâce à leur capacité à inhiber l'angiogenèse qui est essentiel à la croissance tumorale. Cette propriété antiangiogéniques pourrait en partie expliquer son efficacité observée dans divers modèles biologiques (Omar et Al-Wabel, 2010; Boateng, 2023). Toutefois, peu d'études ont eu recours jusqu'à présent au modèle de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) du poulet pour évaluer les effets de *Ginkgo biloba*. Dans ce contexte, l'introduction de cette plante en tant que candidat

perturbateur vasculaire (VDA) dans ce modèle représente une démarche novatrice, susceptible d'ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques contre le cancer.

L'objectif de cette étude est d'examiner, *in ovo*, l'effet anti-vasculaire de *Ginkgo biloba*, notamment ses propriétés anti-angiogéniques et sa capacité à perturber le réseau vasculaire, à l'aide du modèle CAM (membrane chorioallantoïdienne) de l'embryon de poulet.

Cette étude se décline en deux volets complémentaires:

1. Le premier propose une synthèse des données scientifiques actuelles relatives à la biologie de l'angiogenèse, aux stratégies thérapeutiques antiangiogéniques, à l'anatomie et aux fonctions de la membrane chorioallantoïdienne du poulet (CAM), ainsi qu'à ses applications expérimentales. Une attention particulière est également portée au rôle de la phytothérapie dans ce domaine.

2. Le second volet s'inscrit dans une approche expérimentale *in ovo*, visant à évaluer le pouvoir antivasculaire de l'extrait *Ginkgo biloba*.

Chapitre I :
Système vasculaire et progression
tumorale

I.1. Le système vasculaire

Le système vasculaire, composé des vaisseaux sanguins artères, capillaires et veines et du cœur, constitue l'ensemble du système cardiovasculaire. Il fonctionne comme un réseau de transport dans lequel le sang, servant de moyen d'échange, est propulsé grâce à l'action du cœur au sein d'un circuit fermé formé par des conduits flexibles. Cette circulation continue de liquide dans l'organisme joue un rôle essentiel dans l'approvisionnement des cellules en oxygène et nutriments indispensables à leur fonctionnement. Elle contribue également à l'élimination des déchets métaboliques tels que le dioxyde de carbone et d'autres substances. Toutefois, ces échanges ne s'effectuent pas directement via le sang, mais passent par un tissu qui facilite le transfert entre les cellules et le système vasculaire. De nombreuses autres fonctions viennent compléter ce processus circulatoire (Witzleb, 1989).

I.1.1. Structure et fonction des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins jouent un rôle essentiel dans le transport du sang à travers l'organisme. Ils assurent la distribution des nutriments et de l'oxygène depuis le cœur vers les tissus, tout en récupérant les déchets métaboliques pour les acheminer vers les organes responsables de leur élimination. On distingue trois types principaux de vaisseaux : les artères, qui transportent le sang du cœur vers les organes, les veines, qui le ramènent vers le cœur, et les capillaires, qui facilitent les échanges de substances entre le sang et les cellules (figure 01). Au fil du réseau vasculaire, la structure et le diamètre de ces vaisseaux varient en fonction de leur rôle spécifique, bien que certaines caractéristiques restent communes (Lindop et al., 1995; Pugsley et Tabrizchi, 2000; Arribas et al., 2006).

I.1.1.1. Les artères

Les artères sont classifiées en deux types principaux en fonction de leurs différences histologiques : les artères élastiques, riches en protéines élastiques, et les artères musculaires, avec leurs parois essentiellement musculaires qui assurent une distribution rapide et efficace du sang (Rahodin, 1967).

I.1.1.2. Les veines

Les parois des veines sont fines et extensibles. Contrairement aux artères, elles contiennent peu de cellules musculaires lisses. De plus, les veines possèdent des valves constituées de tissu conjonctif et tapissées de cellules endothéliales, ce qui permet de diriger

le flux sanguin et de faciliter le retour du sang des organes vers le cœur (Cleaver et Melton, 2003).

I.1.1.3. Les capillaires

Les capillaires se caractérisent par l'absence de muscles lisses et sont composés d'une seule couche de cellules endothéliales d'environ 0,25 mm d'épaisseur, une membrane basale, et une population de péricytes ou cellules de Rouget (Hirschi et D'Amore, 1996; Taylor et al., 1994).

Les capillaires peuvent être classés en trois types : continus, fenêtrés et discontinus.

I.1.1.3.1. Les capillaires continus

Largement présents dans le corps humain, constituent le type de capillaires le plus fréquent (Taylor et Granger, 1985).

I.1.1.3.2. Les capillaires fenêtrés

sont moins courants et se localisent principalement dans les organes endocriniens et les glomérules rénaux.

I.1.1.3.3. Les capillaires discontinus.

également appelés sinusoides, ils sont exclusivement présents dans des tissus hautement spécialisés comme le foie et les organes hématopoïétiques tels que la moelle osseuse et la rate (Taylor et al., 1994).

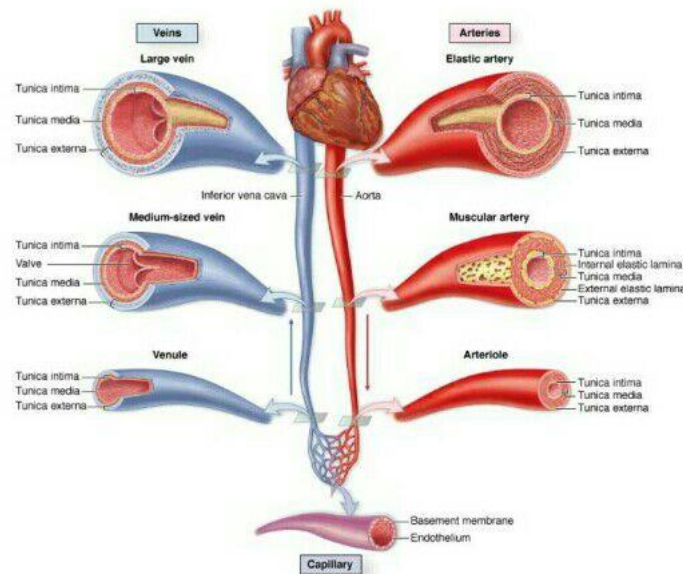


Figure 01: structure des vaisseaux sanguins(Mescher, 2010).

I.1.2. Système lymphatique

Ce réseau vasculaire organisé permet d'évacuer les liquides interstitiels de tout le corps et de les renvoyer vers la circulation veineuse. Les capillaires lymphatiques sont reliés au système sanguin par des vaisseaux pré-collecteurs, puis des vaisseaux collecteurs qui s'unissent aux canaux thoraciques (figure 02). Ce système, fermé et à sens unique, assure principalement un rôle de purification. Il joue également un rôle clé dans la défense immunitaire en permettant aux antigènes d'interagir avec les cellules immunitaires au niveau des ganglions lymphatiques, renforçant ainsi les défenses de l'organisme. Lors de la progression des tumeurs, le système lymphatique intervient activement dans la propagation des cancers solides. La présence de cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques est souvent associée à un pronostic défavorable pour les patients atteints de cancer (Vittet et Feige, 2007).

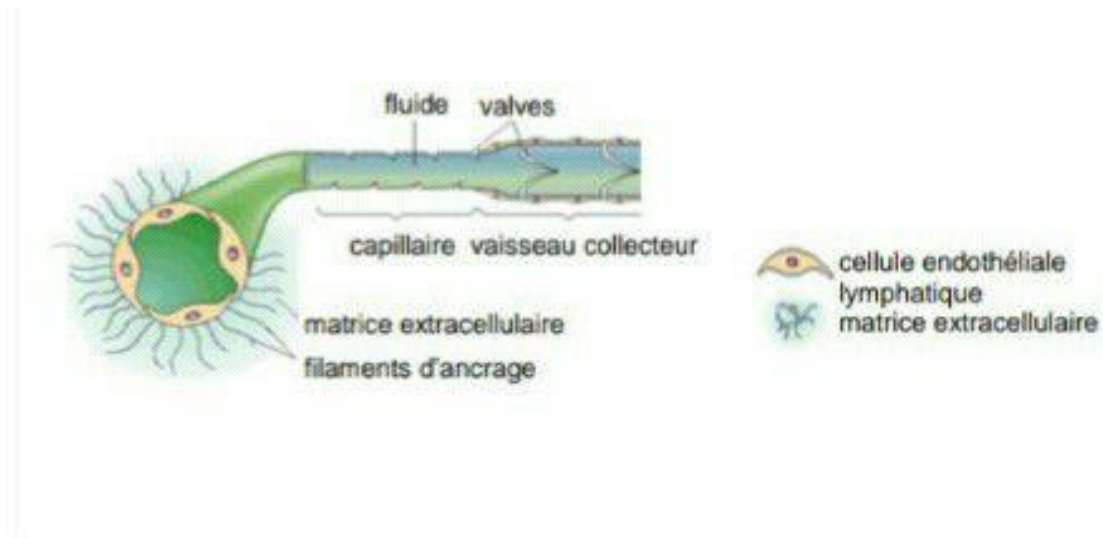


Figure 02: structure des vaisseaux lymphatiques (Jain, 2003).

I.2. La formation du système vasculaire

Le système vasculaire est un réseau complexe spécialisé, vital pour le transport de l'oxygène et des nutriments et des hormones à travers les tissus, ainsi que pour l'élimination des déchets (Patel-Hett et D'Amore, 2011). Les vaisseaux sanguins sont principalement constitués de cellules endothéliales qui se connectent entre elles pour former les conduits responsables du flux sanguin et de la perfusion des tissus. Pendant l'embryogenèse, les vaisseaux sanguins se forment par deux mécanismes distincts : la vasculogenèse, où les cellules endothéliales émergent à partir de cellules progénitrices; où l'angiogenèse, où de nouveaux capillaires se développent à partir de vaisseaux déjà existants (Hanahan et Folkman, 1996).

I.2.1. Vasculogenèse

Un terme introduit par Risau et ses collaborateurs en 1988 (Risau et Lemmon, 1988). C'est la première étape dans l'établissement du réseau vasculaire, immédiatement suivie par l'angiogenèse (Patan, 2004; Penn, 2008). La vasculogenèse est le mécanisme à l'origine des premiers réseaux vasculaires dans l'embryon. processus aboutit à la formation d'un arbre vasculaire primitif. Ce processus débute à partir des hémangioblastes, précurseurs issus du mésoderme. Ces cellules pluripotentes subissent une différenciation et s'associent pour donner naissance à des îlots sanguins, composés d'angioblastes entourant des cellules souches hématopoïétiques (figure 03). Ensuite, les angioblastes évoluent en cellules endothéliales,

tandis que les îlots sanguins se combinent et se creusent pour former une lumière, conduisant à la création d'un plexus vasculaire primaire (Risau et Flamme, 1995).

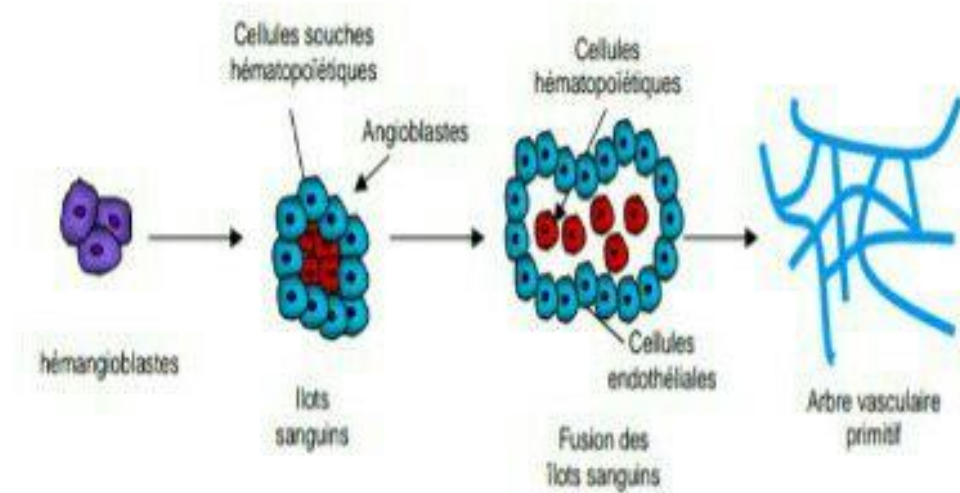


Figure 03: La vasculogénèse (Risau et Flamme, 1995).

La vasculogénèse est principalement limitée aux étapes précoces du développement embryonnaire. Cependant, chez l'adulte, on peut observer la formation de nouveaux vaisseaux par un phénomène de vasculogénèse, à partir de progéniteurs endothéliaux ou EPC. Ces EPC auraient pour origine la moelle osseuse et comporteraient des caractéristiques similaires aux angioblastes embryonnaires (Luttun et al., 2002; Rafii et al., 2002).

Le développement de la vascularisation embryonnaire organisée repose entièrement sur l'action du VEGF. Dans les modèles "knock-out", l'absence des gènes VEGF A et B ou de leurs récepteurs VEGFR1/VEGFR2 conduit à une issue fatale, car aucun autre facteur ne peut remplacer leur rôle fondamental. Sans VEGF ou une expression du récepteur VEGFR2/flk1/KDR, il est impossible de réaliser la première étape essentielle à la formation des îlots primaires des cellules précurseurs endothéliales pluripotentes. Cependant, l'absence du récepteur VEGFR1/flt-1 permet de franchir cette première phase, mais elle empêche le développement ultérieur des structures différenciées en précurseurs endothéliaux, nécessaires pour établir une vascularisation organisée (Martin et Ouafik, 2012).

I.2.2. L'angiogenèse**I.2.2.1. Les cellules endothéliales****I.2.2.1.1. Histologie**

Les cellules endothéliales (CE) sont des structures aplaties et polygonales, issues du mésoderme. Leurs membranes latérales établissent des interactions complexes avec celles des cellules voisines, formant ainsi une couche homogène de cellules interconnectées. Ces cellules tapissent la surface interne des parois vasculaires dans tout le réseau circulatoire. Elles constituent une monocouche semi-perméable, connue sous le nom d'endothélium, qui sépare la lumière du vaisseau du reste de sa paroi tout en étant directement en contact avec le sang. Leur orientation suit le flux sanguin (Lacolley et al., 2008).

I.2.2.1.2. Fonctions des cellules endothéliales :

Le flux sanguin génère une contrainte de cisaillement à travers une force de friction exercée sur les cellules endothéliales. Cette stimulation déclenche la production de diverses molécules par ces cellules, contribuant à des processus tels que l'inhibition de la coagulation, la migration des leucocytes, et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), comme mentionné par Michiels en 2003. En outre, ces cellules interviennent dans les mécanismes de vasodilatation et vasoconstriction (Lacolley et al., 2008).

I.2.2.2. L'endothélium

L'endothélium, en tant que barrière entre le flux sanguin et les couches internes de la paroi vasculaire, participe activement à diverses fonctions vasculaires essentielles (Abdu et al., 2001). Il joue notamment un rôle dans la régulation des échanges entre le sang et les tissus, le déclenchement de l'angiogenèse, et la modulation de l'hémostase. Par ailleurs, il est responsable de la libération de substances vasoactives telles que l'oxyde nitrique (NO), la prostacycline (PGI₂) et l'endothéline. On peut identifier trois catégories distinctes d'endothélium (figure 04) en fonction du type de vaisseau sanguin, chacune se différenciant par la présence ou l'absence de fenestrations : l'endothélium continu, l'endothélium fenêtré et l'endothélium discontinu (également appelé sinusoïdal)(Aird, 2007).

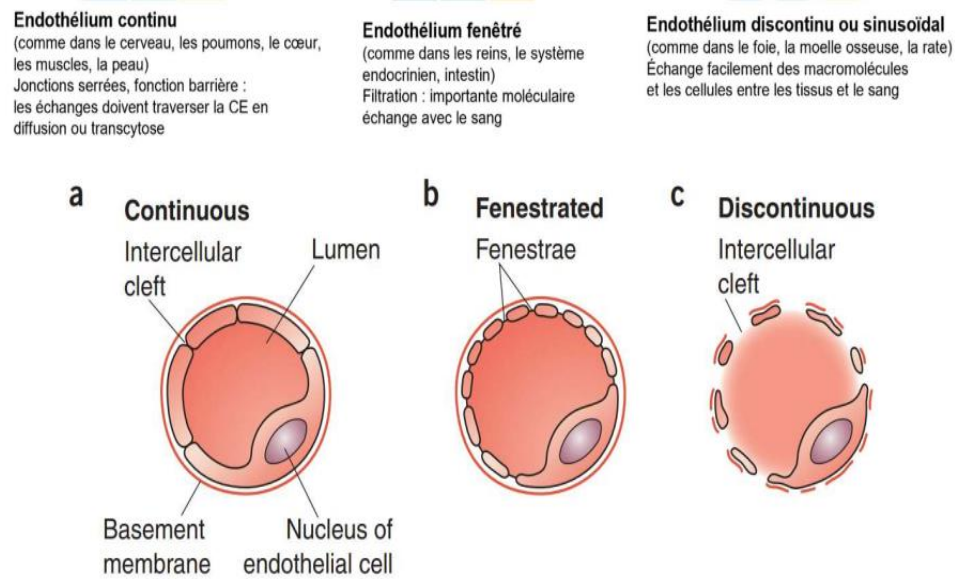


Figure 04: Schéma et localisations des différents types d'endothélium (Ricard et al., 2021; cleaver et Melton, 2003).

I.2.2.3. Les mécanismes de l'angiogenèse

L'angiogenèse joue un rôle fondamental dans la création des vaisseaux sanguins. Bien qu'elle favorise la croissance et la réparation des tissus, ce processus est également impliqué dans diverses pathologies telles que le cancer, la rétinopathie diabétique et la polyarthrite rhumatoïde (Janani et al., 2019).

L'angiogenèse désigne le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se développent à partir de la structure vasculaire déjà existante. Ce processus se déroule pendant l'embryogenèse, en complément de la vasculogenèse ou indépendamment, selon les différents tissus (Martin et Ouafik, 2012).

La régulation de ce processus repose sur un équilibre entre des molécules qui stimulent l'angiogenèse, désignées comme pro-angiogéniques (telles que le VEGF, PDGF, FGF), et des molécules qui freinent cette activité, appelées anti-angiogéniques (comme l'angiostatine, la thrombospondine) (Méjean et Lebret, 2008).

L'angiogenèse n'est normalement observée que dans des conditions ou au sein de mécanismes physiologiques strictement régulés comme la réparation tissulaire, le cycle menstruel, la grossesse ou pour répondre à des besoins particuliers en oxygène et en nutriments. Une altération de ces processus peut engendrer des anomalies de l'homéostasie

vasculaire et du tissu irrigué avec, souvent, des conséquences sur les grandes fonctions organiques (Azzi et Gavard, 2014).

On distingue trois principaux mécanismes à l'origine de l'angiogenèse : le bourgeonnement, l'intussusception et la co-optation (Auguste et al., 2005). Les processus moléculaires impliqués dans ces différentes formes d'angiogenèse sont particulièrement complexes (figure 05). car ils font intervenir des signaux autocrines et paracrines (Pettersson et al., 2000).

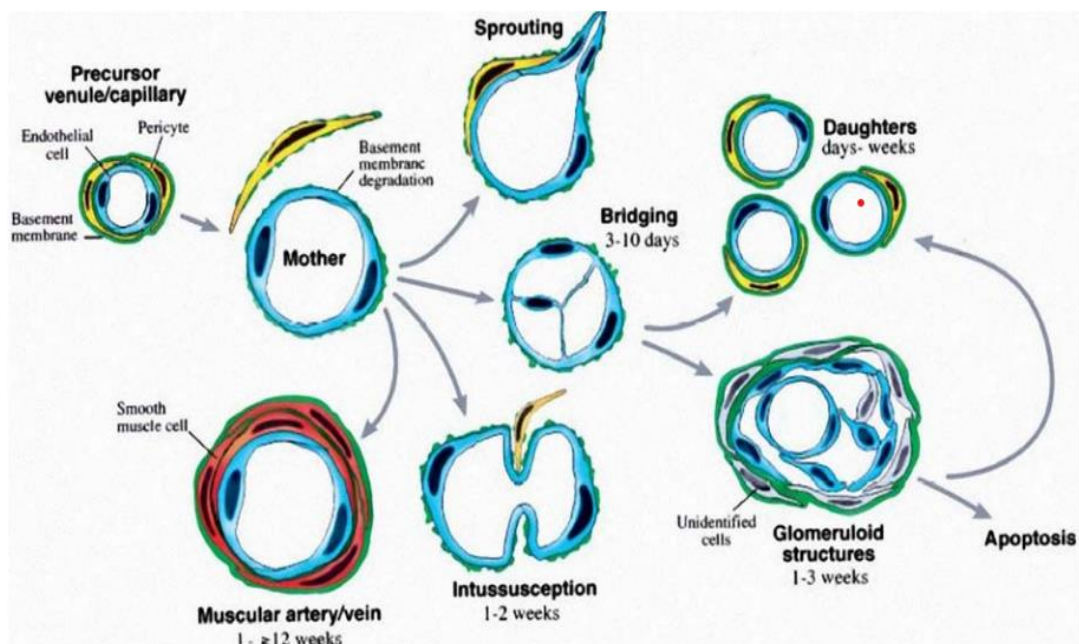


Figure 05: les mécanismes de l'angiogenèse (Pettersson et al., 2000)

I.2.2.3.1. L'angiogenèse par bourgeonnement

Pendant le processus d'angiogenèse par bourgeonnement (sprouting), les cellules endothéliales s'activent, entraînant la destruction du support basal et de la matrice extracellulaire environnante. Ce phénomène est suivi par une migration ciblée des cellules endothéliales, une phase de prolifération, et enfin une différenciation en structures capillaires. Ce mécanisme se manifeste aussi bien durant la formation des organes que dans les étapes avancées du développement embryonnaire et après la naissance (Jain, 2003).

I.2.2.3.2. Angiogenèse par co-optation

Dans le cas de la co-optation vasculaire (bridging), les cellules endothéliales se multiplient à l'intérieur des vaisseaux existants pour générer de nouveaux canaux vasculaires

indépendants. Bien que cette technique ait été initialement identifiée comme spécifique aux premières phases du développement, elle a également été observée dans des contextes variés tels que les tumeurs primaires ou les métastases (Auguste et al., 2005).

I.2.2.3.3. L'Angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse intussusceptive désigne le processus par lequel un réseau vasculaire se forme grâce à l'intégration de tissu conjonctif, créant des cloisons au sein d'un vaisseau (figure 06). Cette méthode permet de générer rapidement des vaisseaux tout en préservant la matrice extracellulaire intacte. Ce mécanisme joue un rôle clé dans le développement embryonnaire, notamment pour la constitution de la microvascularisation (Djonov et al., 2003).

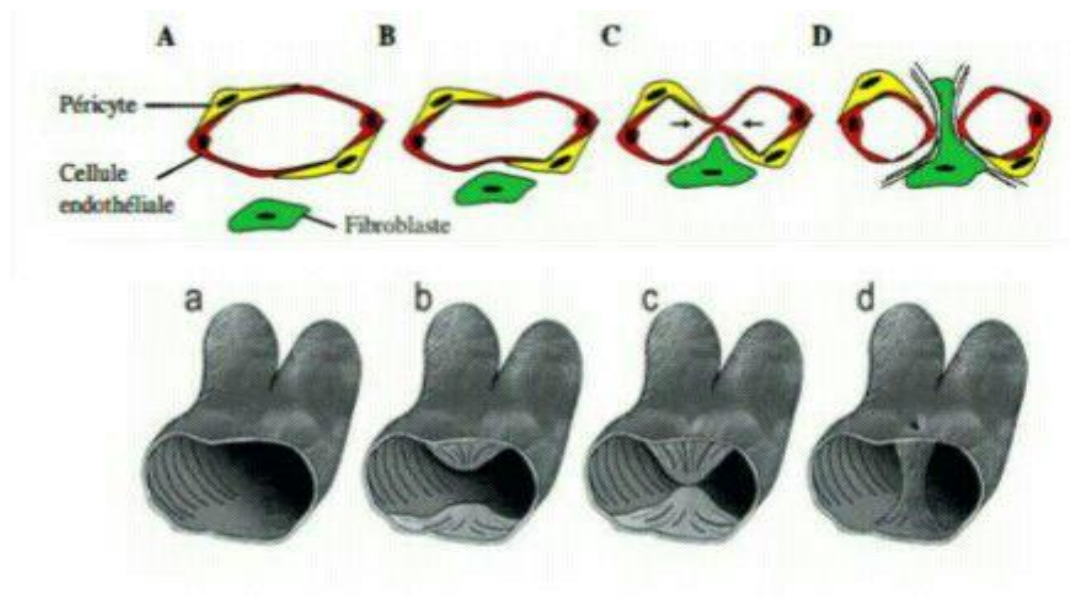


Figure 06: angiogenèse intussusceptive (Djonov et al., 2003). a, b : protrusion des parois des capillaires ; c, d : contact et formation d'une colonne

I.2.3. Les principaux acteurs moléculaires impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux

I.2.3.1. Activateur de l'angiogenèse

- Le système HIF (Hypoxia Inducible Factor)

Dans le contexte du cancer, la croissance rapide des cellules tumorales provoque une diminution de l'oxygène au sein de la tumeur connu sous le nom d'hypoxie. Cette condition est interprétée par les cellules environnantes comme un signal déclencheur pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La réponse cellulaire à l'hypoxie repose principalement sur le facteur HIF-1, qui active des gènes essentiels pour permettre aux cellules de s'adapter et de survivre (Gatenby et Gillies, 2004; Semenza, 2003).

Le HIF est un facteur de transcription qui, en absence d'oxygène, échappe à la dégradation et forme un complexe avec HIF-1 β (figure 07). Le complexe active les éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) sur les promoteurs de gènes cibles. Par la suite, HIF-1 α stimule l'expression de molécules pro-angiogéniques, telles que le VEGF et ses récepteurs, ce qui favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins indispensables à l'apport de nutriments aux tumeurs (Deng et al., 2020).

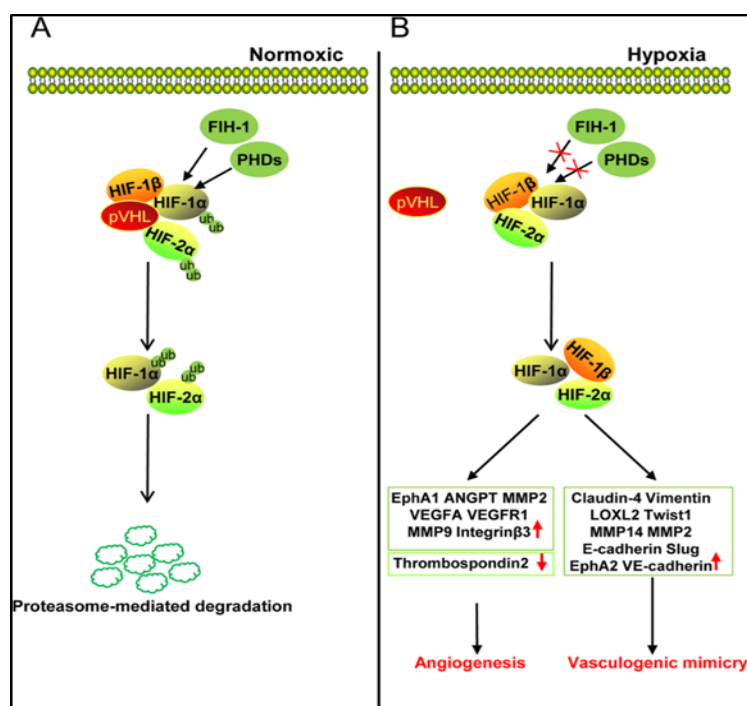


Figure 07 : la régulation de HIF-1 α dans les conditions d'hypoxie et de normoxie (Deng et al., 2020).

- **Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)**

Le VEGF, ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, est une famille de 5 glycoprotéines clés : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance

placentaire (PlGF). Parmi eux, VEGF-A est le plus étudié et initialement décrit comme un facteur de perméabilité vasculaire. Il existe sous 6 isoformes (VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A183, VEGF-A189 et VEGF-A206) (Robinson et Stringer, 2001), générées par épissage alternatif d'un seul ARNm, et qui diffèrent selon leurs séquences exoniques. Ces VEGF se lient à trois récepteurs spécifiques dotés d'une activité tyrosine kinase : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. La liaison du VEGF à ces récepteurs provoque leur homo- ou hétérodimérisation, changeant leur conformation et activant les domaines kinases intracellulaires. Cela entraîne des phosphorylations successives sur les résidus tyrosine, déclenchant des cascades de signalisation intracellulaire. Ces mécanismes soutiennent divers processus biologiques, notamment l'angiogenèse, essentielle pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, et plusieurs fonctions cellulaires liées au développement et à la progression des tumeurs (Ramos, 2011).

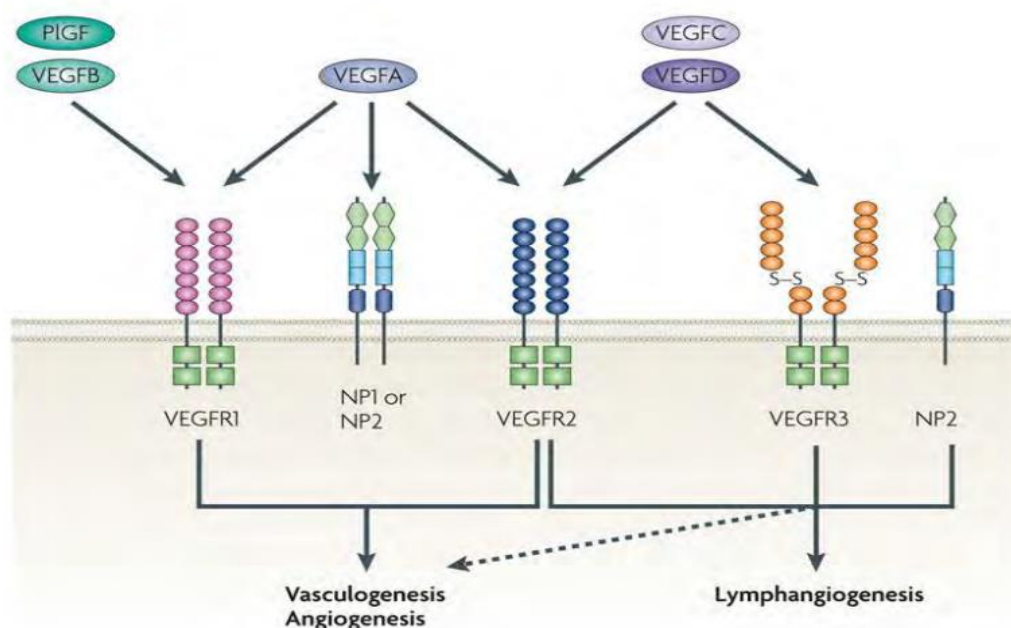


Figure 08 : famille des protéines VEGFs et leurs récepteurs (Tenet, 2016).

- **Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) :**

Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) sont des protéines régulant la prolifération, la différenciation et la réparation cellulaires. Ils jouent un rôle essentiel dans le

développement, la cicatrisation et certaines maladies comme le cancer. La famille comprend neuf membres, présentant une homologie de séquence et conservant deux résidus cystéine. Certains, comme FGF-1 et FGF-2, sont aussi appelés FGF acide et FGF basique, tandis que FGF-7 est connu sous le nom de facteur de croissance des kératinocytes (KGF). Plusieurs FGF sont impliqués dans l'oncogenèse, notamment FGF-3, FGF-4, FGF-5 et FGF-6, et FGF-8 et FGF-9 jouent des rôles spécifiques dans la signalisation cellulaire (Galzie et al., 1997).

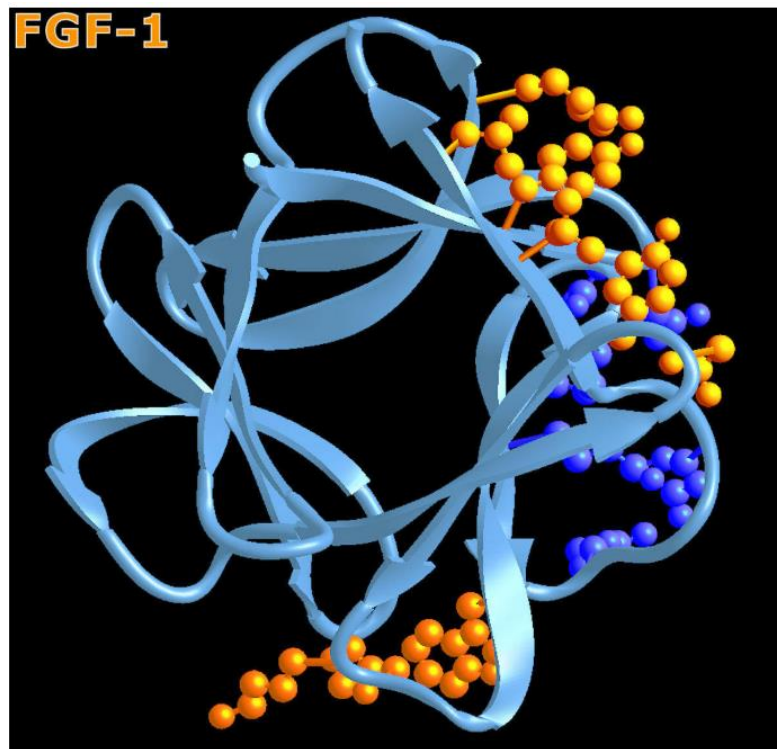


Figure 09 : Le modèle structurel de la molécule de FGF-1, facteur de croissance des fibroblastes (Aquaportail, n.d.).

• **Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)**

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) est une protéine produite par divers types cellulaires, notamment les plaquettes, fibroblastes et macrophages. Il se présente sous forme de dimères et se lie à des récepteurs spécifiques (PDGFR) présents sur les cellules cibles (Papetti et Herman, 2002). Sa fonction principale est de stimuler la prolifération et la migration des péricytes et des cellules musculaires lisses, soutenant ainsi la stabilité des parois vasculaires. Le PDGF joue un rôle clé dans l'angiogenèse, favorisant la formation, la maturation et le maintien des capillaires, en particulier dans les contextes où une vascularisation est nécessaire, comme la cicatrisation et les tumeurs (Papetti et Herman, 2002).

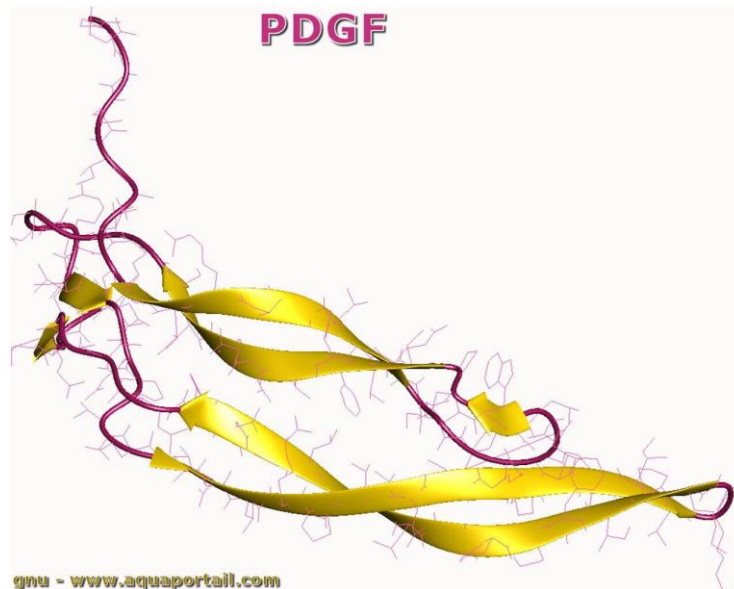


Figure 10 : facteur de croissance dérivé des plaquettes(Aquaportail, n.d.).

I.2.3.2. Inhibiteur de l'angiogenèse:

Les facteurs anti-angiogéniques inhibent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en bloquant la prolifération et la migration des cellules endothéliales et en induisant leur apoptose. Ils jouent un rôle clé dans la régulation de l'angiogenèse excessive, notamment en empêchant l'apport en nutriments aux cellules tumorales et en limitant l'inflammation pathologique. Certains sont naturellement présents, comme le PF4 (Platelet factor 4) et le TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), tandis que d'autres, comme l'Endostatine et l'Angiostatine, résultent du clivage de protéines. Leur potentiel thérapeutique est exploité dans le traitement du cancer et des maladies vasculaires (Tenet, 2016).

✓ Platelet factor 4 (PF4)

Le facteur plaquettaire 4 (PF-4) est une protéine composée de quatre sous-unités, chacune contenant une région essentielle à la liaison avec l'héparine. Sa structure forme un anneau chargé positivement, et son cœur est constitué de feuillets β . Le PF-4 joue un rôle important dans l'inhibition de l'angiogenèse, il freine la prolifération et la migration des cellules endothéliales, bloque la formation de structures vasculaires en culture, et inhibe la formation de vaisseaux sanguins chez la souris. Ces effets antiangiogéniques lui confèrent également une action antitumorale in vivo, en diminuant la densité vasculaire des tumeurs, sans affecter la multiplication des cellules cancéreuses (Bikfalvi, 2004).

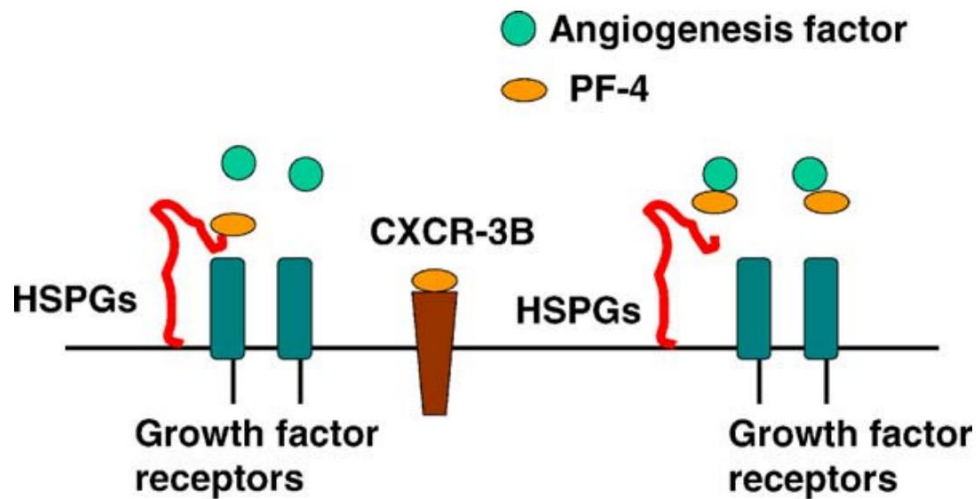


Figure 11: mechanisms of action of PF-4 and derived molecules.

✓ **La Thrombospondine 1**

(TSP1) joue un rôle clé dans la cicatrisation et la régénération tissulaire en modulant la formation des vaisseaux sanguins. Elle interagit avec des récepteurs cellulaires et des protéines extracellulaires pour limiter une néovascularisation excessive, assurant ainsi une réparation efficace des tissus endommagés. En inhibant la migration des cellules endothéliales et en induisant leur apoptose (Tenet, 2016).

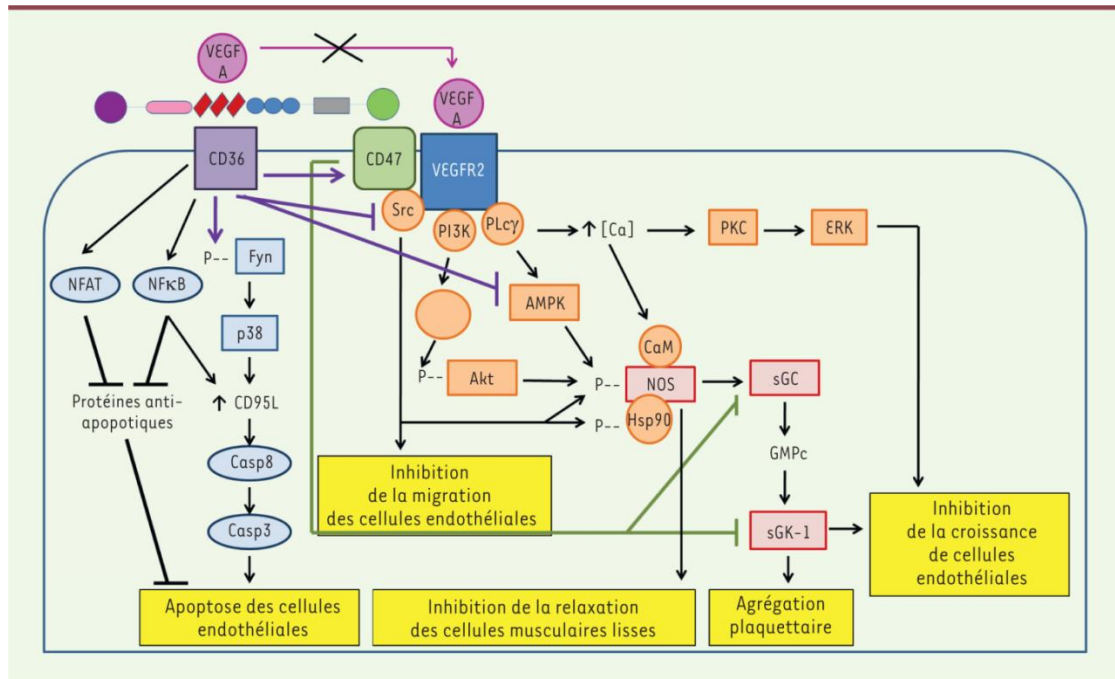


Figure 12:activité anti-angiogénique de la thrombospondine-1(Bigé et al., 2013).

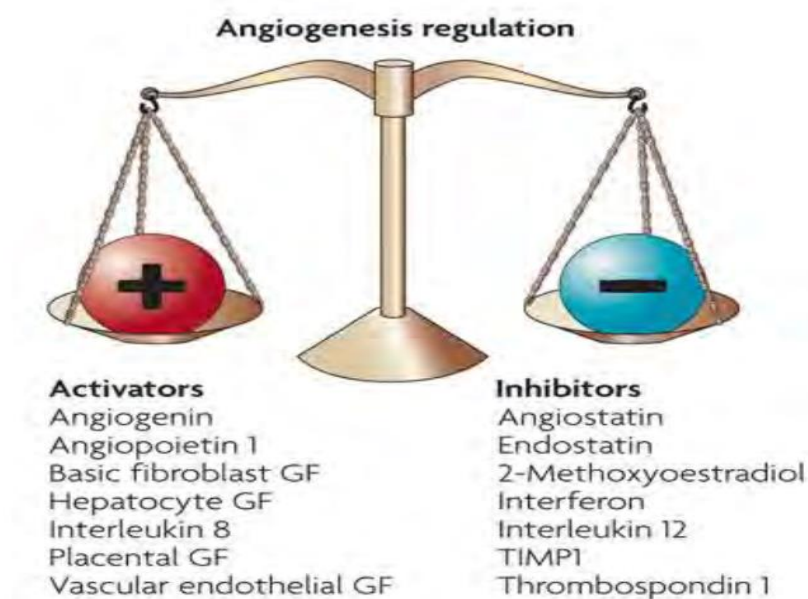


Figure 13: la balance angiogénique (Tenet, 2016).

I.2.4. Angiogenèse tumorale :

L'angiogenèse tumorale désigne le processus par lequel une tumeur induit la formation d'un nouveau réseau vasculaire qui lui est propre, permettant ainsi la fourniture d'oxygène et

de nutriments nécessaires à sa croissance. Les travaux pionniers de Folkman (1963) ont montré que l'implantation de cellules tumorales dans un environnement capable de développer une vascularisation (tel que chez les souris syngéniques) permettait aux tumeurs de croître rapidement, contrairement à un environnement ex vivo dépourvu de vaisseaux sanguins, qui limite leur développement à de très petites dimensions (1 à 2 mm de diamètre) (Folkman, 2006).

Chez l'adulte, la plupart des vaisseaux sanguins restent stables. De nouveaux vaisseaux se forment uniquement pendant la cicatrisation, lors des changements cycliques de l'utérus et des ovaires ou pendant le développement du placenta. Ce processus est régulé par des gènes qui maintiennent un équilibre entre les signaux favorables et défavorables à la formation de vaisseaux. Si cet équilibre est perturbé (par exemple par un manque d'oxygène, une inflammation ou des mutations dans les cellules tumorales), de nouveaux vaisseaux peuvent alors apparaître (Bergers et Benjamin, 2003).

La progression et la dissémination des tumeurs reposent sur l'activation d'un processus angiogénique, souvent désigné comme le « switch angiogénique ». Ce mécanisme déclenche un tournant décisif dans le développement tumoral, permettant à une tumeur initialement localisée de passer d'une phase latente à une phase de croissance rapide et d'expansion, grâce à la formation accélérée de nouveaux vaisseaux sanguins. (Papetti et Herman, 2002)

La formation des vaisseaux dans le tissu tumoral s'organise en quatre phases distinctes. Chacune de ces étapes est régulée par des mécanismes précis, où interviennent simultanément divers acteurs cellulaires et moléculaires, jouant un rôle essentiel dans l'établissement et la progression du réseau vasculaire au sein des tumeurs :

Tableau 01: les grandes étapes de l'angiogenèse

Activation	Les facteurs angiogéniques stimulent les cellules endothéliales, entraînant la dégradation localisée de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante (la phase 1 à 4 de la figure 01) (Folkman, 1971)(Folkman et Hanahan, 1991) (Holoch et al ;1999)
Prolifération et migration orientée	Les cellules endothéliales se multiplient et migrent de manière dirigée dans la matrice extracellulaire altérée.
Différenciation et formation de structures tubulaires	Les premières cellules se différencient et s'organisent en structures tubulaires dotées d'une lumière et recouvertes d'une nouvelle lame basale.
Maturation des vaisseaux	Le recrutement des cellules périendothéliales, telles que les cellules musculaires lisses et les péricytes, stabilise et complète la formation d'un réseau vasculaire tumoral fonctionnel (Kalluri, 2003) (Denis)

I.2.5. Le rôle de l'angiogenèse dans la progression tumoral et le métastase

Les tumeurs ont une limite de croissance d'environ 1 à 2 mm sans apport sanguin supplémentaire. L'angiogenèse joue un rôle vital en créant de nouveaux vaisseaux sanguins qui fournissent oxygène et nutriments nécessaires à la survie et à la croissance des cellules tumorales. Lorsque les tumeurs grandissent, les cellules internes souffrent d'hypoxie (manque d'oxygène), ce qui active la libération de facteurs de croissance angiogéniques, tels que VEGF et FGF, attirant les cellules endothéliales vers la tumeur. Ces cellules migrent, prolifèrent et forment des capillaires néovasculaires, facilitant ainsi l'expansion continue de la masse tumorale. (Bielenberg et Zetter, 2015).

Cependant, les vaisseaux sanguins formés dans le microenvironnement tumoral présentent des caractéristiques anormales : ils sont souvent immatures, perméables et tortueux, ce qui accroît la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine et favorise les métastases. Le microenvironnement tumoral contribue également à l'angiogenèse grâce à l'activité des fibroblastes associés aux carcinomes (CAF) et des macrophages associés aux tumeurs (TAM). Ces derniers libèrent des enzymes comme MMP9 et des facteurs angiogéniques qui intensifient la formation de vaisseaux sanguins, soutenant le développement et l'agressivité de la tumeur (Bielenberg et Zetter, 2015).

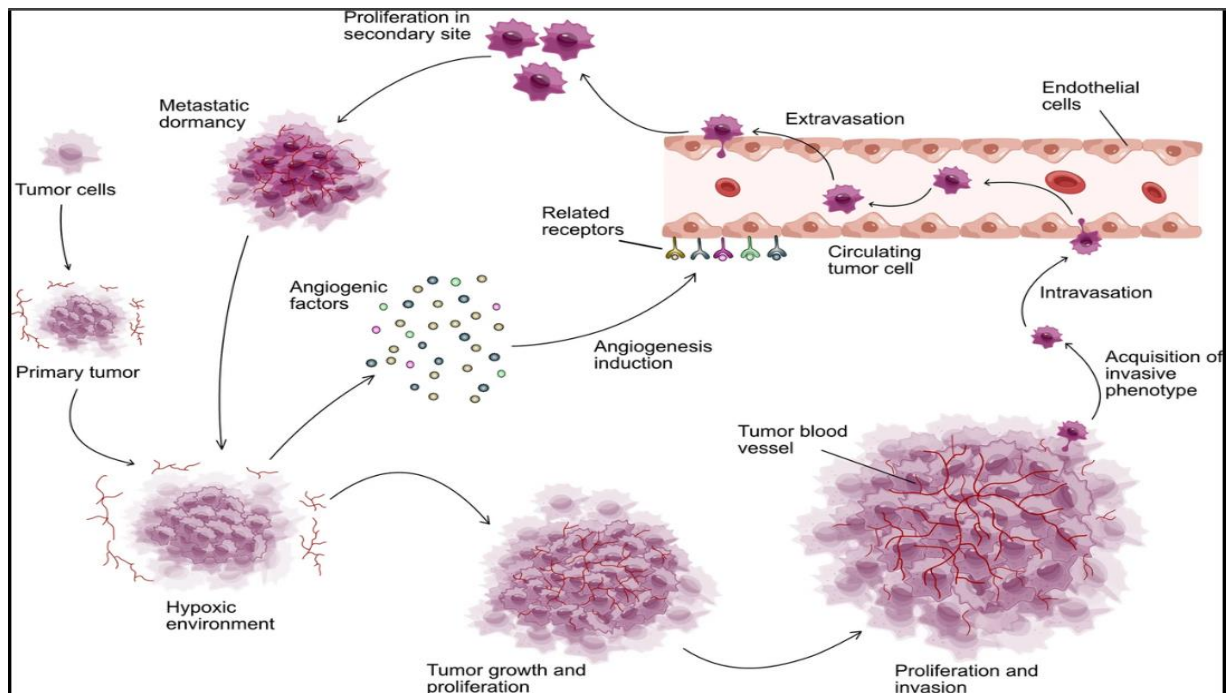


Figure 14 : la progression du cancer par angiogénèse(Wikipedia (n.d.)

I.2.6. Interaction tumeurs microenvironnement

Le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans le développement des tumeurs et leur progression. Il est constitué de cellules tumorales et de cellules normales comme les fibroblastes, macrophages et cellules immunitaires, ainsi que de substances solubles et de la matrice extracellulaire. Ce milieu complexe soutient directement la croissance tumorale et la formation des métastases, les cellules malignes recrutent des fibroblastes, macrophages et autres cellules pour créer un microenvironnement qui soutient leur croissance. Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs exercent une défense antitumorale, mais leur effet est affaibli par des cellules immunosuppressives. Les macrophages M1 combattent les tumeurs, tandis que les M2 favorisent leur progression via des facteurs comme TGF- β . Enfin, les neutrophiles et fibroblastes stimulent l'angiogénèse et l'invasion tumorale grâce à des enzymes et des facteurs comme VEGF.(Deng et al., 2020) , voir figure15, le microenvironnement tumoral joue un rôle dynamique et complexe dans la progression des tumeurs. Il soutient non seulement la croissance cellulaire et l'angiogénèse, mais facilite également l'évasion immunitaire et les métastases, en faisant une cible clé pour les traitements anti-cancéreux (Deng et al., 2020).

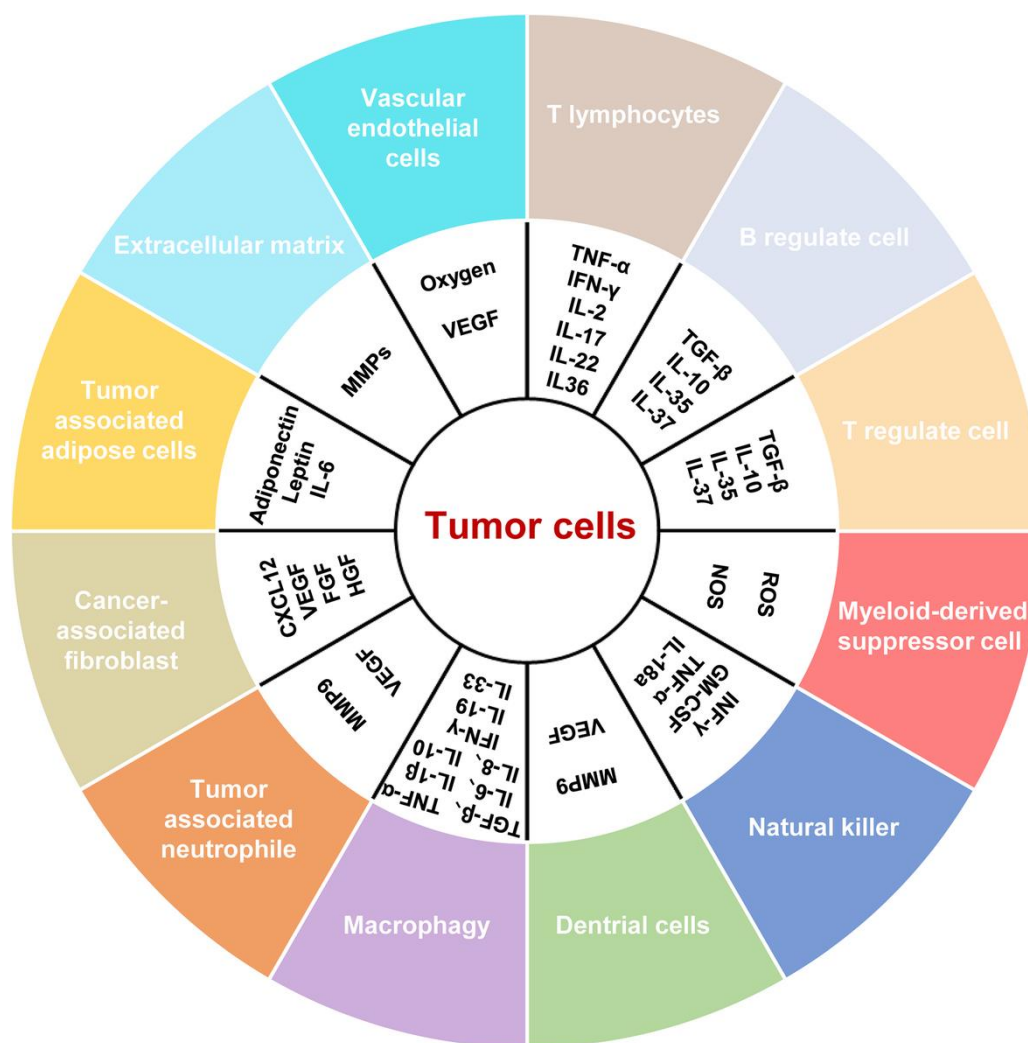


Figure15 : cytokines et facteurs de croissance cellulaire sécrétés dans le microenvironnement tumoral (Deng et al., 2020).

I.2.7. Thérapie anti angiogénique.

Les thérapies anti-angiogéniques visent à inhiber la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, un processus essentiel à la croissance tumorale, à certaines maladies inflammatoires et à des troubles vasculaires. En bloquant des facteurs clés comme le VEGF, elles réduisent l'apport en nutriments et en oxygène aux tissus pathologiques, limitant ainsi leur progression. Cependant, leur efficacité peut être influencée par des effets secondaires et des résistances cellulaires. Elles sont souvent combinées avec d'autres traitements, comme la chimiothérapie ou la radiothérapie, pour maximiser leur impact thérapeutique (Rüegg, 2002).

I.2.7.1. Inhibiteurs de la signalisation VEGF/VEGFR

Les inhibiteurs peptidiques jouent un rôle clé dans la régulation de l'angiogenèse, notamment en ciblant le VEGF ou son récepteur VEGFR. Certains médicaments, comme

l'Avastin® et le Zaltrap®, exploitent cette interaction pour limiter la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Tandis que les inhibiteurs du VEGF se lient directement à ce facteur de croissance pour empêcher son activation, ceux ciblant le VEGFR interviennent en bloquant la liaison du VEGF à son récepteur, empêchant ainsi la signalisation pro-angiogénique. L'analyse cristallographique du VEGF avec VEGFR1 et VEGFR2 a permis une meilleure compréhension de ces interactions et la conception de nouveaux inhibiteurs peptidiques ciblés. Ces avancées offrent des perspectives thérapeutiques pour contrôler l'angiogenèse dans diverses pathologies, notamment les cancers et les maladies vasculaires (Wang, 2016).

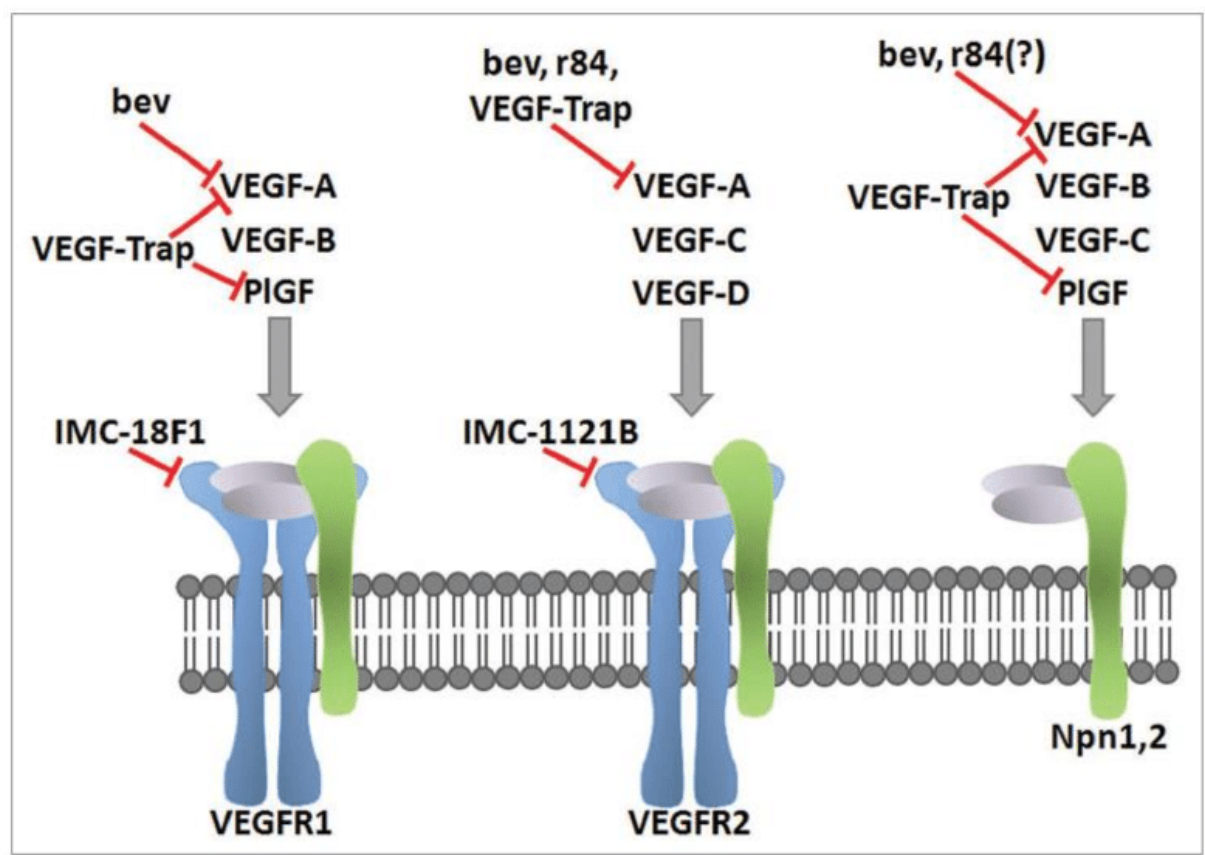


Figure16 : blocage des voies de signalisation du VEGF par les anticorps ciblant le ligand(ResearchGate, n.d.).

I.2.7.2. Inhibiteurs de Tyrosine Kinase

✓ Le sorafénib :

Est une petite molécule largement étudiée en pharmacologie pour son action inhibitrice sur plusieurs kinases clés impliquées dans la régulation cellulaire. Il est utilisé comme outil expérimental pour analyser les mécanismes de signalisation liés aux protéines Raf, VEGFR et

au récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes. Les études pharmacodynamiques ont mis en évidence son efficacité *in vivo* dans la modulation de ces voies, ouvrant la voie à des recherches approfondies sur son potentiel en biotechnologie et en développement de nouveaux inhibiteurs ciblés (Rini, 2006).

✓ **Le sunitinib :**

Est une molécule largement étudiée en biotechnologie pour ses propriétés inhibitrices des tyrosine kinases. Il cible plusieurs récepteurs clés, tels que VEGFR-1, VEGFR-2, FLT3, KIT et PDGFR, modulant ainsi divers processus biologiques liés à la signalisation cellulaire. Grâce à son action sur les voies de croissance et de différenciation, le sunitinib est utilisé comme outil expérimental pour comprendre les interactions entre les facteurs de croissance et leurs récepteurs. Des études *in vitro* ont montré sa capacité à inhiber la prolifération cellulaire et à induire l'apoptose des cellules endothéliales, ouvrant la voie à de nouvelles applications en ingénierie moléculaire et en développement de thérapies ciblées (Le Tourneuet al., 2007).

✓ **Le pazopanib :**

Est une molécule étudiée pour son action sur plusieurs tyrosine kinases impliquées dans la régulation cellulaire. Il cible les récepteurs VEGFR, PDGFR, et les facteurs de croissance fibroblastiques, influençant des mécanismes clés de signalisation. Son inhibition des kinases spécifiques permet d'explorer ses effets sur la prolifération cellulaire et les interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes. Utilisé comme outil expérimental, il offre une meilleure compréhension des voies moléculaires et ouvre des perspectives pour le développement de nouvelles thérapies ciblées (LaPlant et Louzon, 2010).

Chapitre II :
L'expérimentation sur la membrane
chorioallantoïdienne(CAM Assay)

II.1. Historique de l'expérimentation sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM)

L'utilisation de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) d'embryons de poulet a permis de grandes avancées en recherche oncologique. Dès le début du XX^e siècle, James B. Murphy et Francis P. Rous, travaillant à l'Institut Rockefeller, ont réussi à développer des tumeurs solides dans des tissus conjonctifs (sarcomes) de poulets sains en utilisant un extrait non cellulaire d'une tumeur aviaire (Sola et Caillot, 2022).

Dès 1958, des échantillons de carcinome épidermoïde humain, de sarcome, d'adénocarcinome et de carcinome bronchogène ont été transplantés sur la membrane CAM. Cette technique a permis d'étudier la formation de métastases dans l'embryon de poulet ainsi que l'impact des traitements chimiothérapeutiques sur leur développement (Harris, 1958). Plus tôt, en 1956, Kaufman et ses collaborateurs ont observé et décrit les changements dans la membrane CAM au niveau des zones où les tumeurs avaient été injectées (Kaufman et al., 1956). Cette même année, Daggs et ses collègues ont utilisé le test CAM pour analyser les métastases issues du carcinome épidermoïde humain, du sarcome et du rhabdomyosarcome embryonnaire, non seulement sur la membrane CAM mais aussi directement dans l'embryon de poulet (Daggs et al., 1956).

Ce modèle a été redécouvert dans les années 1980 pour des études sur le développement des vaisseaux sanguins, permettant de tester les effets pro- et anti-angiogéniques de différentes substances. Son usage s'est par la suite élargi à des domaines tels que l'ingénierie tissulaire, les matériaux biomédicaux, les maladies vasculaires, ainsi qu'en pharmacologie (études de pharmacocinétique, de biodistribution, de pénétration) et en infectiologie. Plus récemment, cette technique a pris une nouvelle importance dans la recherche sur le cancer. Elle est désormais employée comme modèle préclinique pour évaluer l'efficacité des traitements anticancéreux, qu'ils soient administrés de façon classique ou sous forme de vecteurs spécialisés (Sola et Caillot, 2022).

II.2. Structure et composition de l'œuf

L'œuf se compose, de l'extérieur vers l'intérieur, d'une coquille entourant deux membranes coquillières (figure17). Ces membranes enveloppent l'albumen, qui lui-même renferme le vitellus. Une membrane cellulaire, appelée membrane vitelline, sépare l'albumen du vitellus (Nys, 2010).

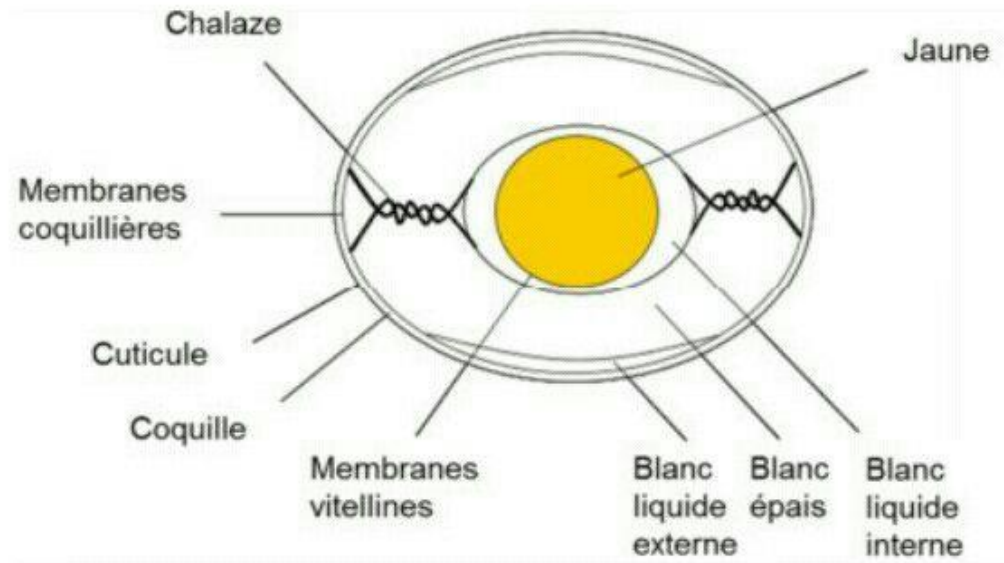


Figure17 : Schéma représentatif des différents compartiments de l'œuf (Réhault-Godbert et al., 2017).

La cuticule

La couche externe de l'œuf, formée environ deux heures avant l'oviposition, recouvre la coquille. Elle est constituée d'environ 90 % de protéines et de glycoprotéines, 5 % de glucides et environ 3 % de matières minérales (Dennis et al., 1996). Sa fonction principale est de bloquer les pores de la coquille, empêchant ainsi les agents pathogènes de pénétrer à l'intérieur de l'œuf (Musabimana Kagaju, 2005).

La coquille

La coquille d'œuf (figure) se développe dans l'utérus de la poule et est composée principalement de carbonate de calcium (CaCO_3), et enrichie d'une petite fraction de matrice organique (Jonchère, 2010).

Cette structure ingénieuse assure plusieurs fonctions cruciales pour la reproduction des oiseaux. Elle protège le contenu de l'œuf des agressions physiques et des microbes, permet les échanges d'eau et de gaz essentiels au développement de l'embryon, et fournit le calcium nécessaire à la formation des os de celui-ci (Nys et al., 2010).

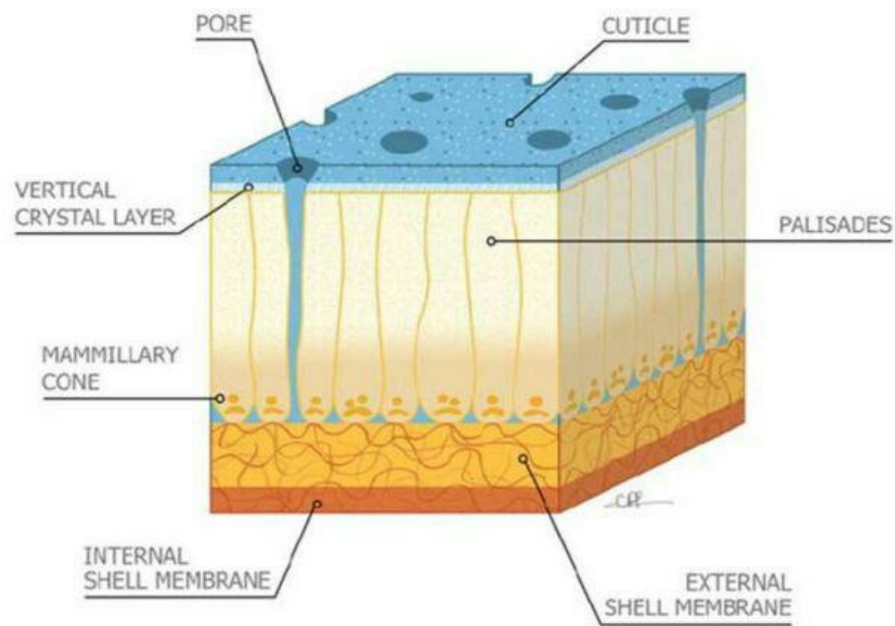


Figure 18: Représentation schématique de la coquille d'œuf de poule (Hincke et al., 2012).

Les membranes coquillières

Les membranes coquillières, situées entre l'albumen et la surface interne de la coquille, sont constituées de deux couches distinctes : une interne et une externe. La couche interne se compose de trois sous-couches de fibres alignées parallèlement à la coquille, tandis que la couche externe est formée de six couches de fibres disposées de manière alternée dans différentes directions (Arias et al., 1993; Nys et al., 2004). Les fibres qui les composent sont principalement constituées de collagène X, qui jouerait un rôle dans la prévention et de la minéralisation à l'intérieur de l'œuf (Arias et Fernandez, 2001; Dominguez-Vera et al., 2000).

L'albumen ou blanc de l'œuf

L'albumen, fortement hydraté, est constitué de 88 % d'eau. Sa matière sèche se compose majoritairement de protéines, représentant environ 90 %, suivies par 6 % de minéraux et 3,5 % de glucose libre. Par ailleurs, il est dépourvu de lipides (Burley et Vadehra, 1989).

Le blanc d'œuf se compose principalement de différentes protéines (figure 19), parmi lesquelles l'ovalbumine domine, représentant environ 54 % du total. Viennent ensuite l'ovotransferrine (13 %), l'ovomucoïde (11 %), le lysozyme (3,5 %) et enfin l'ovomucine, dont la proportion varie entre 1,5 et 3,5 % (Li-Chan et Nakai, 1989).

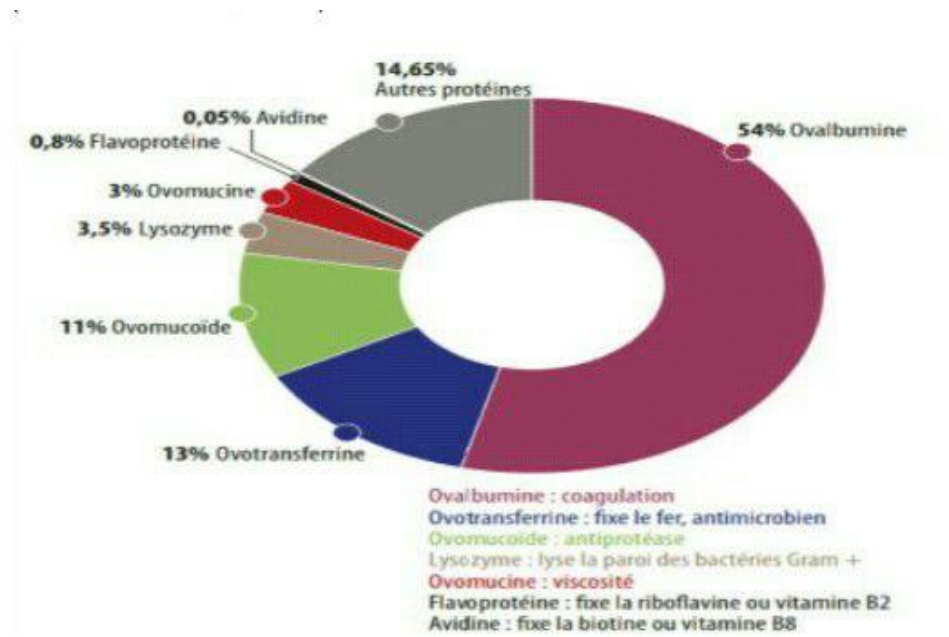


Figure 19: les principaux protéines de blanc de l'œuf (Nau et al., 2013).

La membrane vitelline

La membrane vitelline (MV) de l'œuf de poule est une délicate couche extracellulaire composée de protéines. Elle entoure le jaune d'œuf et joue un rôle essentiel dans la reproduction, notamment en matière de fertilisation, de développement embryonnaire et de défense immunitaire innée. Cette membrane se divise en deux couches distinctes et étroitement connectées : une membrane vitelline interne (MVI), qui s'apparente à la zone pellucide chez les mammifères, et une membrane vitelline externe (MVE), caractéristique des oiseaux (Brégeon, 2020).

Vitellus ou jaune de l'œuf

Le jaune d'œuf, formé dans l'ovaire de la femelle oiseau, contient des particules de lipoprotéines et de lipides provenant du foie, ainsi que des protéines issues du plasma. Ces éléments sont enfermés dans membrane vitelline. Il constitue environ 30 % du poids total de l'œuf et se caractérise par une forte teneur en matière sèche. Composé principalement de lipides, (65 % de sa matière sèche) , qui se divise en triglycérides (65 %), phospholipides (31 %) et cholestérol (Li- Chan et Kim, 2008).

Chambre à air de l'œuf

À sa ponte, un œuf est à une température de 39 °C. En refroidissant, ses composants internes se contractent, permettant à l'air de s'infiltrer à travers la coquille. Cette entrée d'air crée une cavité, appelée chambre à air, située à l'extrémité la plus large de l'œuf, où les deux membranes de la coquille se détachent légèrement. Avec le temps, à mesure que l'eau s'échappe progressivement de l'œuf durant sa conservation, cette chambre d'air s'agrandit.

II.3. Structure de CAM

La CAM, un tissu extra-embryonnaire entourant l'embryon en développement, est très vascularisée (figure20). Cela lui permet de fournir des nutriments et d'assurer les échanges gazeux pour l'embryon (Romanoff,1960). Elle est composée d'un épithélium multicouche ; l'ectoderme (l'épithélium chorionique) à l'interface aérienne, le mésoderme (le mésenchyme ou le stroma) et l'endoderme (l'épithélium allantoïque) à l'interface avec le sac allantoïde (Valdes et al., 2002).

Chez l'embryon de poulet, la formation de la CAM débute entre les jours 4 et 5 du développement, lorsque la couche externe mésodermique de l'allantoïde fusionne avec la couche mésodermique du chorion. Un réseau de vaisseaux sanguins se développe alors progressivement entre ces deux couches. Entre les jours 8 et 10, la partie centrale de la CAM atteint un stade de développement complet. Ses régions périphériques continuent de croître et s'étendent jusqu'à ce que la CAM recouvre entièrement l'embryon vers le jour 12 d'incubation (figure20). Par ailleurs, cette membrane contient des protéines de la matrice extracellulaire, notamment la fibronectine, la laminine, le collagène, l'intégrine $\alpha(v)\beta3$ et la MMP-2(Matrice métalloprotéinase-2). Ces caractéristiques en font un modèle de choix pour explorer des processus tels que l'angiogenèse (Richardson et Singh , 2003), ainsi que l'invasion tumorale et les métastases (Lokman, N. et al., 2012).

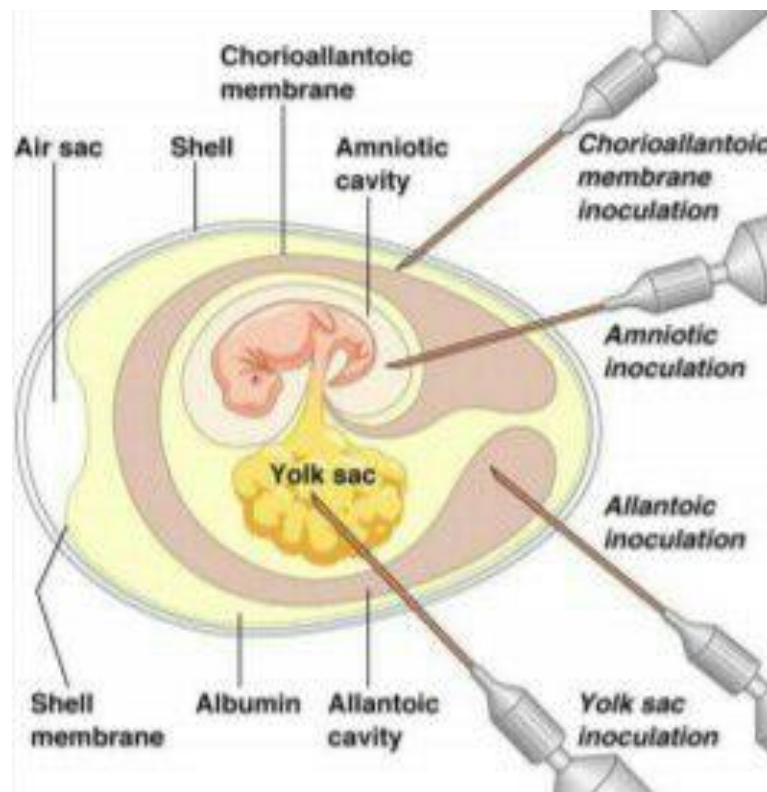


Figure 20: La membrane chorioallantoïdienne (CAM).

II.4. Le principe du test CAM

Ce test consiste à déposer une quantité définie de la substance étudiée sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM) d'un œuf de poulet en incubation. L'évaluation du potentiel irritant de la substance est réalisée en examinant les effets produits sur la CAM, tels que la dilatation des capillaires sanguins, des lésions nécrotiques ou encore des saignements (Steiling et al., 1999). Les réactions observées, ou leur absence, permettent d'estimer la capacité irritante de la substance testée. Les résultats sont ensuite consignés et analysés à l'aide d'un système de notation standardisé (Yan et al., 2007).

II.5. Les fonctions biologiques

Au niveau de la couche chorionique, des capillaires sanguins ainsi que des sinus sont présents entre les cellules épithéliales, permettant un contact étroit (moins de 0,2 μm) avec l'air passant à travers les pores de la membrane coquillière de l'œuf (Fancsi et Fher, 1979). Ainsi, la CAM joue un rôle essentiel dans l'échange de gaz, comme l'oxygène, et aussi la défense immunitaire innée entre l'embryon en développement et son environnement, le maintien de l'équilibre acido-basique. Elle intervient également dans la dissolution des minéraux présents dans la coquille et leur transfert vers l'embryon, nécessaire à la formation

de son squelette. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces processus physiologiques restent encore mal compris (Halgrain et Sophie, 2023).

II.6. Les applications du test CAM

Le test CAM, grâce à ses caractéristiques distinctives, se prête à une grande variété d'applications biologiques.

Dans un environnement clos, l'embryon contient tous les organes nécessaires pour mener des analyses pharmacologiques (Chen et al., 2021), permettant ainsi d'effectuer des tests de toxicité, de pharmacocinétique et de pharmacodynamique en utilisant une quantité de médicaments bien moindre que dans les modèles animaux traditionnels (Nowak-Sliwinska, Segura et Iruela-Arispe, 2014; Schneider-Stock et Ribatti, 2021).

En outre, le test CAM est particulièrement adapté à l'étude de l'angiogenèse et du développement vasculaire, puisqu'il offre une possibilité d'imagerie facilitée pour analyser et mesurer les vaisseaux sanguins (Simons et al., 2015 ; Chen et al., 2021 ; Fischer et al., 2022). Cela en fait un outil précieux pour examiner les molécules aux propriétés angiogéniques ou anti-angiogéniques, en particulier dans des champs comme l'ophtalmologie (Hill et al., 1983 ; Huang et al., 2023) ou la recherche sur les maladies vasculaires (Dell'Era et al., 2001 ; Jedelská et al., 2013).

Ce modèle a également été étudié dans d'autres contextes, tels que l'infectiologie (Wang et al., 2008 ; Song, Jin et Choi, 2010), l'évaluation de la biocompatibilité des biomatériaux (Checchi et al., 2020 ; Demcisakova et al., 2022) ou encore l'ingénierie des tissus (Borges et al., 2003).

La membrane chorioallantoïdienne (CAM) s'est révélée être un outil précieux dans les études sur le cancer, notamment en raison de son adéquation avec les expérimentations de xénogreffes. Ces recherches permettent de mieux comprendre différents aspects clés du cancer, tels que le développement des tumeurs, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ainsi que l'invasion tumorale (El Hasasna et al., 2016; Schneider-Stock et Ribatti, 2020; Fischer et al., 2022).

De plus, le modèle CAM offre un moyen efficace d'évaluer la tolérance aux médicaments et leur efficacité, constituant ainsi un outil de choix pour tester différentes thérapies

anticancéreuses et obtenir des résultats accessibles (Kardamakis et al., 2004; Mesas et al.,2024).

Par ailleurs, des greffes réalisées directement dans les somites des embryons de poulet à des phases précoces de développement ont produit des résultats prometteurs dans les recherches en oncologie, avec une assimilation tumorale élevée, oscillant entre 70 % et 100 %, ainsi que des réponses fiables aux traitements (Delloye-Bourgeois et al., 2017; Jarrosson et al., 2021; Zala et al.,2024).

II.7. Les avantages et les inconvénients de l'expérimentation sur la CAM

L'utilisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet gagne en popularité dans le milieu scientifique en raison de ses nombreux atouts : facilité d'utilisation, fiabilité et coût réduit (Schneider-Stock et Ribatti, 2020).

Ce modèle respecte les principes des 3R (remplacement, réduction, raffinement) souvent adoptés pour les recherches sur les animaux. De plus, étant donné que la CAM est généralement considérée comme non innervée (Ribatti, 2016 ; Eckrich et al., 2020 ; Merlos Rodrigo et al., 2021), les expériences réalisées précocement n'impliqueraient pas de douleur pour l'embryon et échappent ainsi à l'exigence d'approbation éthique pour les tests animaux en Europe (Parlement européen et Conseil de l'Union européenne, 2010).

Grâce à un système circulatoire facilement accessible, il est possible d'administrer des molécules de manière pratique et d'en observer les effets en temps réel. Les outils d'analyse varient de la microscopie simple (Balke et al., 2010), à des technologies d'imagerie avancées comme la bioluminescence, le scanner (CT) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Kim et al., 2011 ; Zuo et al., 2015 ; Jefferies et al., 2017).

Les connaissances approfondies sur la biologie et la physiologie de l'embryon (Hamburger et Hamilton, 1992) offrent une grande flexibilité dans la conception des expériences, rendue encore plus pratique par le fait que le développement embryonnaire ne démarre qu'à l'incubation, idéalement à 37,5°C avec 50 % d'humidité relative (Noiva, Menezes et Peleteiro, 2014). Enfin, ce modèle s'avère plus rapide que les approches animales traditionnelles. Ce concept peut être perçu comme un atout tout autant qu'un inconvénient, car il implique une durée limitée pour mener les expériences (Fischer et al., 2022).

Néanmoins, ce modèle présente d'autres limites, notamment la disponibilité restreinte des réactifs, les complications liées à l'administration des médicaments non solubles, ainsi que les disparités dans le métabolisme des médicaments comparativement aux mammifères (Schneider-Stock et Ribatti, 2020).

Par ailleurs, la petite taille de l'embryon constitue une contrainte supplémentaire, réduisant la quantité de matériel pouvant être collecté (Schneider-Stock et Ribatti, 2020 ; Fischer et al., 2022).

Chapitre III :
Phytothérapie et activité anti-
vasculaire des produits dérivés de
plantes

III.1. Définition

La phytothérapie, reconnue comme l'une des plus anciennes et des plus répandues des méthodes thérapeutiques (Ma et al., 2011). Elle se repose sur l'exploitation des propriétés naturelles des plantes (Bruneton, 1999). Elle se base sur le principe du soin par les végétaux et constitue une alternative aux traitements médicamenteux d'origine chimique. Ses applications s'appuient sur un savoir traditionnel qui valorise différentes formes galéniques des plantes. En général, une grande partie des médicaments trouvent leur origine dans les végétaux, grâce à l'extraction de parties spécifiques (racines, feuilles, écorce, fruits) contenant des substances actives. Aujourd'hui, de nombreux produits qualifiés de synthétiques sont en réalité inspirés des composés naturels, notamment ceux issus des plantes, et sont utilisés dans divers domaines tels que la médecine interne, la dermatologie, la cosmétologie et même la balnéothérapie (Volak et Stodola, 1983).

III.2. Les niveaux de la phytothérapie

Il existe plusieurs façons de recourir à la phytothérapie, classées en trois principaux niveaux : traditionnel, pharmacologique et clinique.

III.2.1. Le niveau traditionnel

Depuis les débuts de l'humanité, les plantes médicinales ont représenté un recours naturel pour traiter divers maux. Présentes dans toutes les civilisations anciennes, leur usage reposait sur l'observation des effets globaux qu'elles produisaient sur le corps, sans analyse scientifique poussée. Cette méthode empirique, enrichie par des siècles d'expérience, a permis d'accumuler des connaissances issues d'un vaste champ d'applications. Cependant, l'absence de bases scientifiques solides limite aujourd'hui l'exploitation rigoureuse de ce savoir (Carillon, 2009).

III.2.2. Le niveau pharmacologique

Grâce à l'évolution des sciences et des techniques, il est désormais possible d'analyser en profondeur les principes actifs des plantes. Des recherches menées en laboratoire, sur cellules ou sur organismes vivants, permettent de valider leurs effets avec des critères pharmacologiques définis. Toutefois, cette approche peut se heurter à la complexité même des plantes, qui contiennent parfois des centaines de composés, comme c'est le cas pour certaines huiles essentielles, rendant leur étude parfois ardue (Carillon, 2009).

III.2.3. Le niveau clinique

Ce niveau englobe les apports des traditions, des résultats pharmacologiques, mais aussi des observations cliniques sur des patients. L'approche de la phytothérapie clinique intégrative repose sur une vision globale du soin : elle considère le soutien des mécanismes naturels d'adaptation de l'organisme comme essentiel, et s'appuie sur les réponses biologiques et physiologiques observées chez le patient (Carillon, 2009).

III.3. L'intérêt de la phytothérapie

La phytothérapie occupe une place significative dans le traitement de nombreuses affections grâce à son efficacité potentielle et à son acceptation par les patients atteints de diverses complications de santé (Barkat et al., 2021). Elle constitue une méthode simple, sûre, efficace et économique pour soigner un large éventail de maladies, qu'elles soient aiguës ou chroniques, et elle s'inscrit pleinement dans la prise en charge quotidienne des pathologies. Dans cette optique, de nombreux patients se tournent vers l'automédication à base de plantes. L'usage de produits issus, en totalité ou en partie, de plantes est ancré dans toutes les cultures à travers le monde. Par ailleurs, diverses études ont mis en évidence les motivations qui poussent les individus à recourir à ces traitements phytothérapeutiques (Rossi et al., 2014).

III.4. Les composés bioactifs d'origine végétale : prévention et traitement des cancers

Depuis l'Antiquité, les plantes ont été utilisées pour leurs propriétés médicinales. De nos jours, l'importance de nombreux composés phytochimiques bioactifs dans la lutte contre l'apparition et le développement du cancer est prouvée. Alors que certains de ces composés peuvent être utilisés pour traiter les cancers avancés, d'autres jouent un rôle préventif en agissant comme inhibiteurs lors des premières phases de la formation du cancer (Kintzios, 2006). Parmi les médicaments anticancéreux d'origine végétale, on trouve : La vincristine ; le vinblastine ; le paclitaxel (Barone et al., 2017).

III.5. Ginkgo biloba

III.5.1. Description

Le *Ginkgo biloba* est un arbre originaire d'Asie, remarquable par son extrême ancienneté. Seul représentant actuel d'une lignée végétale très ancienne, il peut atteindre jusqu'à 40 mètres de hauteur et vivre plusieurs millénaires. C'est une espèce dioïque : les individus sont soit mâles, soit femelles. Ses feuilles, d'un vert clair caractéristique, ont une forme en éventail facilement reconnaissable. Elles mesurent généralement entre 6 et 8 cm de long et jusqu'à 12 cm de large. Les arbres femelles produisent des ovules fécondés qui, en mûrissant, dégagent

une odeur forte et désagréable à cause de la présence d'acides organiques comme l'acide butyrique (Vican, 2024).



Figure 21 : *ginkgo biloba* feuilles (Alamy Images, n.d.).

III.5.2. Composition chimique

Le *Ginkgo biloba* est riche en divers nutriments et composés, y compris les Flavonoïdes, Diterpènes (ginkgolides), Tanins (proanthocyanidols), Lactones sesquiterpéniques (bilobalide) et Stérols. De plus, Le *Ginkgo biloba* est une source d'acides aminés (Vican, 2024).

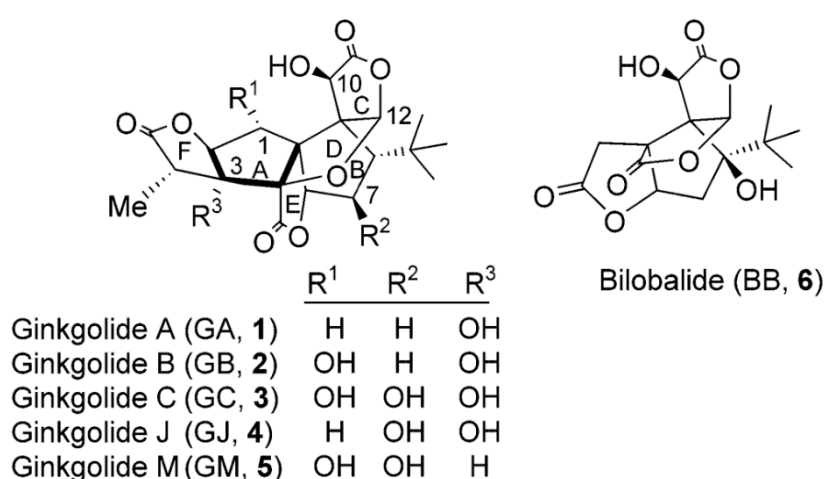


Figure 22: la structure chimique de certains composés de *Ginkgo biloba* (Nakanishi, 2004).

III.5.3. Classification.

Tableau 02 : classification de *Ginkgo biloba* (Cadet, 2017).

Classe	Gymnospermes
Ordre	Ginkgoales
Famille	Ginkgoaceae,
Genre	Ginkgo
Espèce	biloba L

III.5.4. Les propriétés pharmacologiques.

L'extrait de feuilles de *Ginkgo biloba* constitue la phytomédecine la plus commercialisée en Europe, utilisée notamment pour soulager les symptômes précoces de la maladie d'Alzheimer, la démence vasculaire, la claudication intermittente ainsi que les acouphènes d'origine vasculaire. Aux États-Unis, il figure parmi les dix médicaments à base de plantes les plus vendus. Plus de 120 études cliniques publiées, majoritairement européennes, ont été consacrées à cette plante médicinale. La forme standardisée la plus connue est EGb 761. Classé comme complément alimentaire aux États-Unis, le ginkgo est représenté par plusieurs marques (Ginkgold, Ginkoba, Ginkai) ayant également été soumises à des essais cliniques. Les préparations normalisées contiennent 24 % de glycosides flavonoïdes, 6 % de lactones terpéniques, et ne dépassent pas 5 ppm d'acides ginkgoliques. Le mécanisme d'action de cet extrait repose sur plusieurs effets biologiques : neuroprotection, activité antioxydante, piégeage des radicaux libres, stabilisation membranaire et inhibition du facteur d'activation plaquettaire (PAF) via le ginkgolide B. Parmi ses effets pharmacologiques supplémentaires figurent la relaxation de l'endothélium induite par l'inhibition de la phosphodiesterase du GMP cyclique (3',5'-GMP), la prévention de la perte liée à l'âge des récepteurs cholinergiques muscariniques et α -adrénergiques, ainsi que la stimulation de la captation de choline dans l'hippocampe. De plus, l'extrait de *Ginkgo biloba* a montré une capacité à inhiber le dépôt de bêta-amyloïde, impliqué dans la pathogénie d'Alzheimer. (Blumenthal et al., 2003).

Le *Ginkgo biloba* est riche en substances aidant à réguler la pression artérielle et à réduire les lipides sanguins, offrant ainsi des applications prometteuses en médecine. Grâce à ces nombreux composants, il trouve sa place dans des domaines variés tels que la biomédecine, les soins médicaux, les matières premières chimiques et même les produits de santé et

cosmétiques. Son potentiel thérapeutique en fait un sujet d'étude et de développement continu. Il possède des propriétés pharmacologiques variées, issues de ses nombreux composants actifs. Son extrait contient des substances aux effets antibactériens, telles que l'acide ginkgolique, bien qu'il présente des risques de sensibilisation, de mutagenèse et de cytotoxicité. La ginkgolide B, quant à elle, est un puissant antagoniste du facteur d'activation plaquettaire, lui conférant un rôle majeur dans le traitement de la thrombose, des maladies cardiovasculaires et de la pancréatite aiguë. De plus, elle offre des bienfaits neuroprotecteurs et est utilisée dans la prise en charge du cancer métastatique, tout en aidant à protéger les neurones endommagés (Gao, 2020)

L'extrait de *Ginkgo biloba* est reconnu pour ses effets thérapeutiques dans le traitement de la cardiopathie coronarienne, de l'angine de poitrine, de l'artériosclérose cérébrale, de la démence sénile et de l'hypertension. Son action antioxydante contribue à ralentir le vieillissement cellulaire et pourrait avoir un impact positif sur la préservation des fonctions cognitives. Le bilobol et plusieurs autres composés tels que le sophoflavescenol, l'alantolactone et la bavachinine confèrent à cette plante des propriétés antibactériennes, antiparasitaires et antitumorales. Le protopanaxatriol, lui, agit en inhibant la croissance et l'activité des cellules cancéreuses (Gao, 2020).

Etudes expérimentales

Chapitre IV :
Matériel et méthodes

Cette recherche a été menée au sein de l'animalerie de l'Institut des Sciences de la Nature et de la Vie, qui est affilié au Centre Universitaire Abd El Hafidh BOUSSOUF à Mila.

Notre étude s'est concentrée sur l'évaluation de l'effet anti-vasculaire de l'extrait de *Ginkgo biloba*. Nous avons choisi d'utiliser un test *in ovo*, qui consiste à évaluer la croissance des vaisseaux sanguins dans la membrane chorioallantoïque (CAM) de l'embryon de poulet, également connu sous le nom de test CAM (CAM Assay).

IV.1. Matériel et Méthodes

IV.1.1. Test *in ovo*

IV.1.1.1. Collecte des œufs et incubation

Fraîchement fertilisés, Le plus grand nombre possible d'œufs d'une taille hétérogène sauvages ont été collectés dans une production locale (domestique) des fermes familiales au niveau de la wilaya de Mila. Pour réduire la contamination provenant de la surface, les œufs ont été soigneusement désinfectés à l'aide d'éthanol à 70%. Ils ont ensuite été séchés à l'air libre. Par la suite, chaque œuf a été marqué avec un numéro distinct, ainsi que la date et l'heure précises de l'incubation.



Figure 23: Désinfection des œufs Figure 24: Marquage des œufs

Nous avons placé les œufs dans un incubateur (WQ01) préalablement réglé à une température de 37,5 °C et une humidité relative de 65%. Il est crucial de maintenir ces conditions constantes pendant toute la durée de l'expérimentation. Il est également recommandé d'éviter de manipuler ou de tourner les œufs pendant les premières 48 heures. Pour assurer le maintien de ces conditions optimales, une surveillance régulière et rigoureuse de la quantité d'eau présente dans l'incubateur ainsi que de la température ambiante est impérative.



Figure 25: Incubation des œufs

IV.1.1.2. Préparation des membranes chorioallantoïdiennes

Au troisième jour d'incubation (E3), nous avons procédé à un mirage des œufs. Le mirage est une technique avicole qui permet à la fois de localiser la chambre à air et d'identifier les œufs non viables afin de les éliminer. Cette méthode consiste à examiner un œuf de quelques jours placé devant une source lumineuse intense. Cela permet de distinguer les signes distinctifs du développement embryonnaire, tels que les filaments, communément appelés « araignées », qui constituent le futur réseau veineux. Si ces filaments ne sont pas visibles, cela indique que l'œuf n'est pas viable et doit être retiré de l'incubateur.

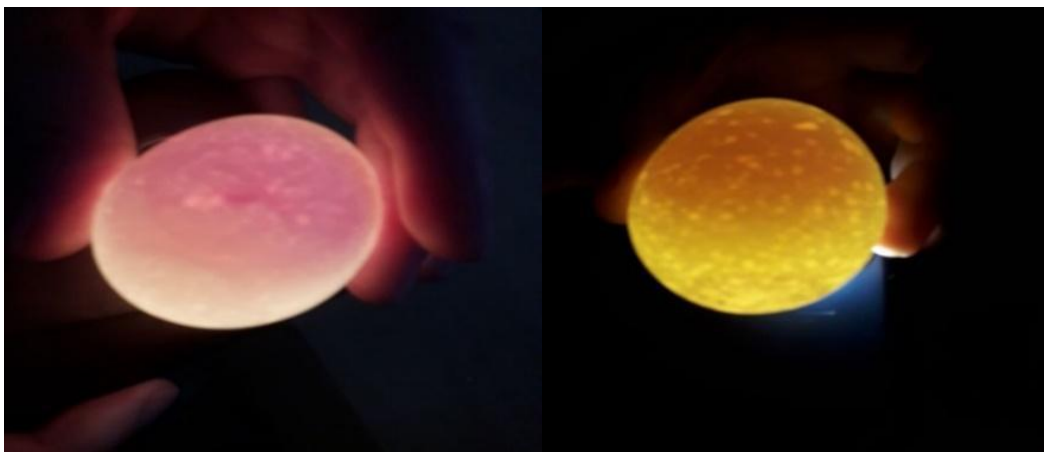


Figure 26 : Mirage pour vérifier la fécondité des œufs

Par la suite, nous localisons précisément l'emplacement de la chambre à air et du fœtus. Ensuite, nous perçons délicatement les coquilles des œufs au point le plus pointu à l'aide d'une aiguille de calibre 22G x 1 1/4" (0,70x30mm). Nous prélevons ensuite avec soin 7 ml d'albumen, en veillant à ne pas toucher le jaune d'œuf.

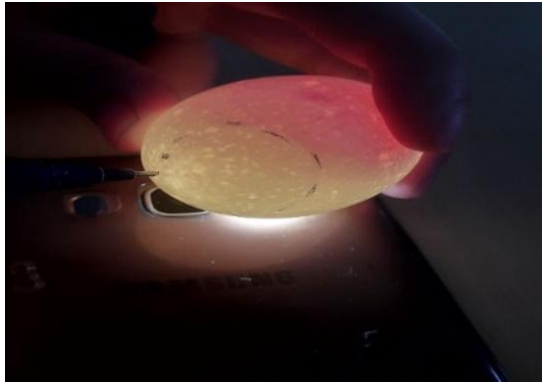


Figure 27 : Détermination de la chambre à air Figure 28 : Prélèvement de l'albumen

Le prélèvement de l'albumen entraîne la création d'un sac d'air artificiel. Ce phénomène provoque la séparation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de la coquille de l'œuf. Par la suite, une portion d'environ 3 cm de la surface de la coquille est soigneusement découpée, puis recouverte avec du ruban adhésif transparent pour prévenir toute contamination et la deshydratation. L'embryon sous-jacent, la CAM et les vaisseaux sont alors révélés. Les œufs sont ensuite remis dans l'incubateur jusqu'au jour choisi pour l'application des traitements ou du témoin.



Figure 29: réincubation des œufs *in ovo*

Figure 30 : recouvrir les œufs

IV.1.2. Préparation des substances testées

IV.1.2.1. Préparation de la Dexasone® 4mg/ml

L'anti-inflammatoire corticostéroïde Dexaméthasone (Dexaméthasone Phosphate Sodique) présenté sous le nom de marque Dexasone® 4mg/ml ; solution injectable par voie intramusculaire intraveineuse ou locale ; Produit par le groupe pharmaceutique SAIDAL.

spa Algérie, a été acheté auprès d'une officine locale à Ahmed Rachedi. Le numéro du lot était 403/1, affichant une date de péremption de 11/2026.



Figure 31:dexaméthasone

Dans un Eppendorf, un volume 10 μ l de Dexasone 4mg/ml diluée dans 90 μ l de l'éau physiologique, a été agité manuellement pour l'obtention d'une solution homogène.



Figure 32 :préparation de Dexasone 4mg/ml

IV.1.3. Origine du Matériel biologique (Végétal)

L'ail (*Allium sativum*) a été acheté auprès du marché des fruits et des légumes à l'état frais. et le *Ginkgo biloba* a été acheté chez un herboriste.

IV.1.3.1. Préparation du jus brut de l'ail (*Allium sativum*)

Juste avant l'application sur la CAM, le jus de l'ail (*Allium sativum*) a été obtenu par broyage d'une quantité suffisante d'ail. Ensuite, on procède à la filtration du broyat à travers

le papier filtre pour obtenir un suc homogène. Ce dernier qui représente le jus brut (solution mère). Une série de dilution a été préparée selon les facteurs de dilution suivants : (préparation mère), $\frac{1}{2}$; $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{6}$; $\frac{1}{8}$; $\frac{1}{10}$.



Figure 33 : Préparation du jus de l'ail (*Allium sativum*)

IV.1.3.2. Préparation du l'extrait de Ginkgo biloba

L'extrait de *Ginkgo biloba* a été obtenu en broyant 6g. Ensuite, le broyat a été versé dans un bécher contenant de 60ml d'eau distillé. Puis, il a été chauffé à l'aide d'une plaque chauffante à 45°C pendant 30 min et filtré à travers un papier filtre pour obtenir un liquide homogène.

IV.1.4. Déroulement du test CAM (*in ovo*)



Figure 34 :Application de 5µl des solutions préparées sur la CAM

Au huitième jour d'incubation (E8), les œufs préparés préalablement ont été répartis en six groupes distincts. Le premier groupe est un groupe témoin qui n'a reçu aucun traitement. Le deuxième groupe, un autre témoin négatif, a reçu 15µl d'eau physiologique et le troisième groupe témoin positif recevant 2µg de Dexaméthasone (pour comparer l'activité anti-angiogénique). Le quatrième groupe reçoit 15µl du jus de l'ail en guise d'un deuxième témoin positif (pour comparer l'effet perturbateur des vaisseaux sanguins). Un cinquième groupe expérimental reçoit, à l'aide d'une micropipette, 15µl de différentes solutions de solutions de *Ginkgo biloba* (solution mère). Il est important de noter qu'un lot supplémentaire a été incubé dès le premier jour (J0), mais a été laissé intact, c'est-à-dire sans ouvrir la coquille. Ce lot nous permet de vérifier le bon fonctionnement de l'incubateur, comme en témoigne l'éclosion des œufs supplémentaires. Dans toutes les expérimentations, le produit à tester est déposé directement sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM). Les réactions possibles sont ensuite observées et photographiées, soit immédiatement sur une période de 5 minutes, soit tardivement pour une période de 72 heures. Toute apparition d'hémorragie, coagulation, déformation des vaisseaux sanguins, mort de l'embryon, etc., est soigneusement notée. De plus, il est crucial d'enregistrer le temps écoulé avant l'apparition de toute réaction.

Enfin un score d'irritabilité a été établi selon la méthode Luepke (1985). Cette approche a pour but d'évaluer le potentiel irritant (qui reflète un effet perturbateur) des substances chimiques en utilisant la membrane chorioallantoïque (MCA) des œufs fécondés de poule comme modèle *in ovo*. La substance test est directement appliquée sur la surface de la CAM et la méthode consiste à surveiller et enregistrer l'apparition de réactions vasculaires clés servant d'indicateurs d'irritation. Plus précisément, les points suivants sont évalués :

- Hémorragie : le temps écoulé entre l'application de la substance et l'apparition d'un saignement visible sur la CAM.
- Lyse des vaisseaux sanguins : le délai avant l'observation de la dégradation ou de la désintégration des petits vaisseaux.
- Coagulation : le temps nécessaire jusqu'à la formation de caillots ou de zones coagulées sur la membrane.

Chaque réaction est notée selon le temps d'apparition, des temps plus courts indiquant un potentiel irritant plus important. Ces mesures sont ensuite combinées pour produire un score d'irritation reflétant l'effet global de la substance sur la membrane.

Chapitre V : Résultats et discussions

V.1. Résultats et discussions

Nous avons étudié le développement embryonnaire du poulet, *in ovo*, en utilisant des méthodes d'observation macroscopiques (à l'œil nu et avec la caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD) et microscopiques (à l'intermédiaire d'un stéréomicroscope OPTIKA 20X et 40X).

Ces observations ont abouti aux constatations suivantes :

1- Le système circulatoire des structures annexes extra-embryonnaires s'active dès le troisième jour d'incubation (ED3). Peu après, les premiers réseaux vasculaires émergent dans le sac vitellin. Rapidement, entre le quatrième et le cinquième jour (ED4-ED5), la membrane chorioallantoïdienne (CAM) initie sa vascularisation et devient nettement discernable dès ED4.

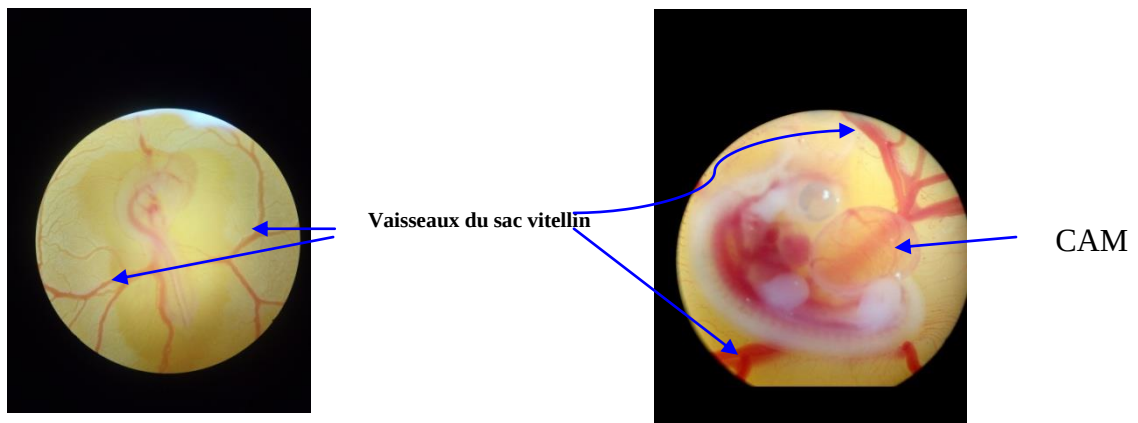


Figure35 : Vaisseaux du sac vitellin sous stéréomicroscope à 20X

Figure36 : Vaisseaux sanguins de la CAM sous stéréomicroscope 40X

2- La membrane chorioallantoïdienne (CAM) est une structure extra-embryonnaire d'une vascularisation exceptionnelle, caractérisée par une croissance fulgurante. Dès le huitième jour d'incubation (ED8), elle s'étend pour ôter toute lacune, recouvrant ainsi entièrement la surface interne visible à travers la fenêtre ouverte sur la coquille. Au cours de cette étape, le développement de son réseau vasculaire s'accélère de manière exponentielle.

Vers le quatorzième jour (ED14), la CAM se déploie intégralement pour envelopper l'embryon ainsi que ses structures annexes, notamment l'amnios et la vésicule vitelline, consolidant ainsi l'organisation du système circulatoire extra-embryonnaire.



Figure 37 :CAM Témoin à J8, culture *in ovo*.



Figure 38 : CAM Témoin à J14, *in ovo*

3- La vascularisation de la membrane chorioallantoïque (CAM) se manifeste de manière impressionnante au sein du tissu mésenchymateux, situé juste en dessous de l'épithélium ectodermique. Cette organisation suit un schéma hiérarchique distinct, où l'on peut observer des vaisseaux primaires formant des configurations en 'Y'. Ces derniers constituent le point de départ pour la divergence des vaisseaux sanguins secondaires et tertiaires, permettant ainsi une étude détaillée de l'angiogenèse et du développement vasculaire (figure39).

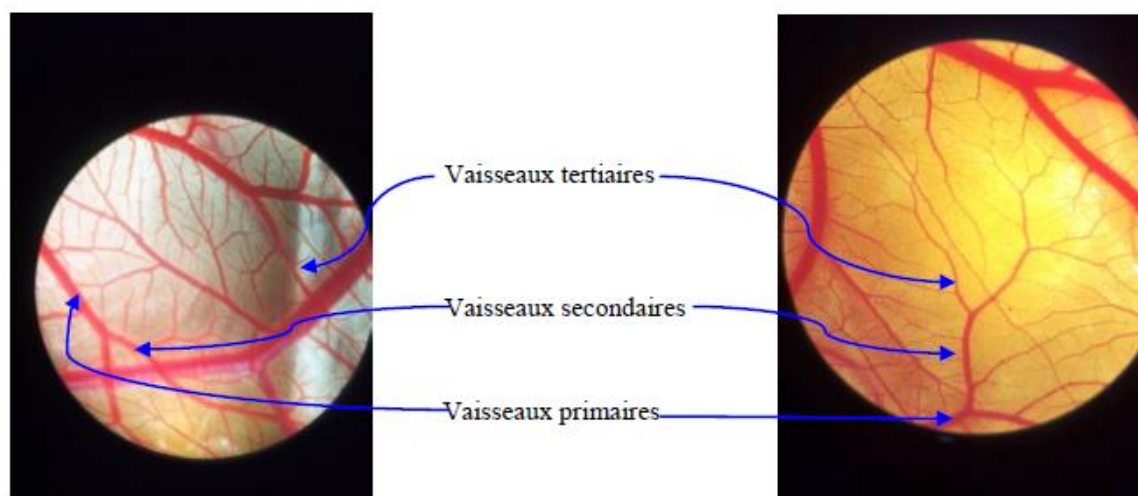


Figure 39: observation des vaisseaux primaires, secondaires et tertiaires sous stéréomicroscope 20X.

4- Il est possible de distinguer différents niveaux d'action des traitements appliqués sur la vascularisation allantoïdienne qu'on classe d'une manière sommaire en :

➤ **Effet Anti-angiogénique de la Dexamethasone (témoin positif)**

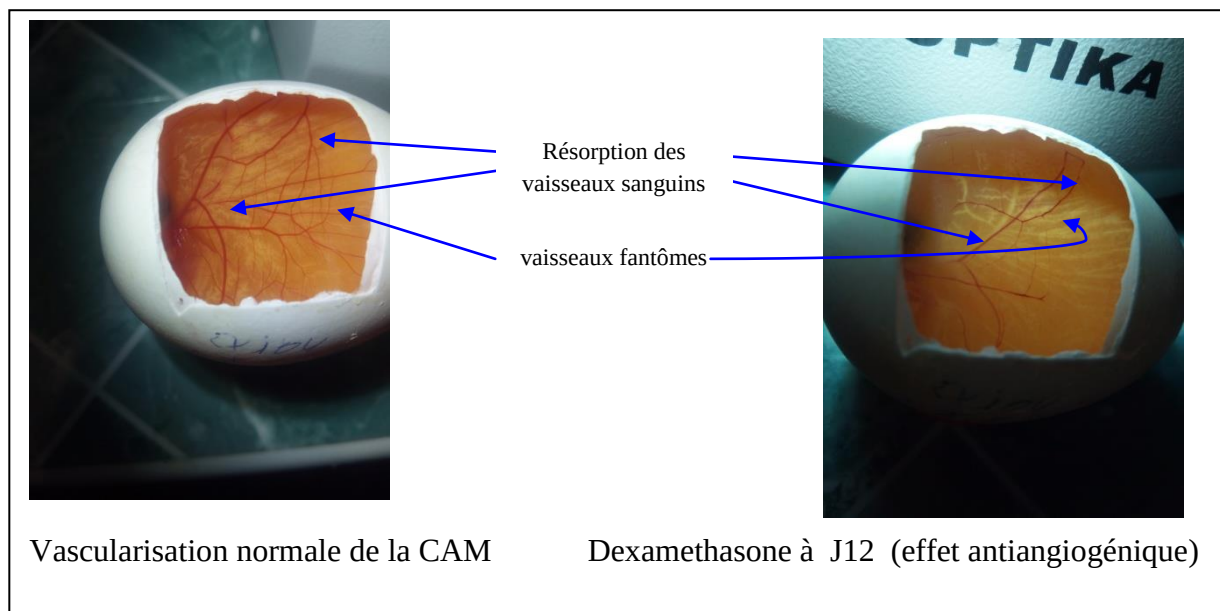


Figure40 : effet Anti-angiogénique de la Dexamethasone (témoin positif)

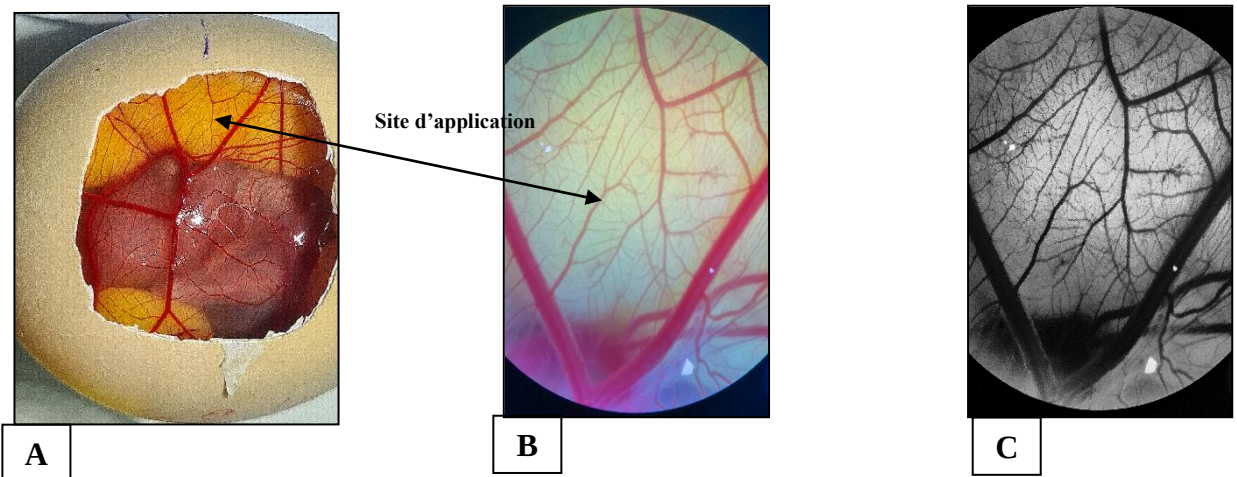
➤ exploration de l'action de l'extrait brut de la plante *Ginkgo biloba*

Figure 41: témoin interne à J8. (A) : sous caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD ; (B) : sous stéréomicroscope X20 ; (C) : sous stéréomicroscope X20 en niveaux de gris.

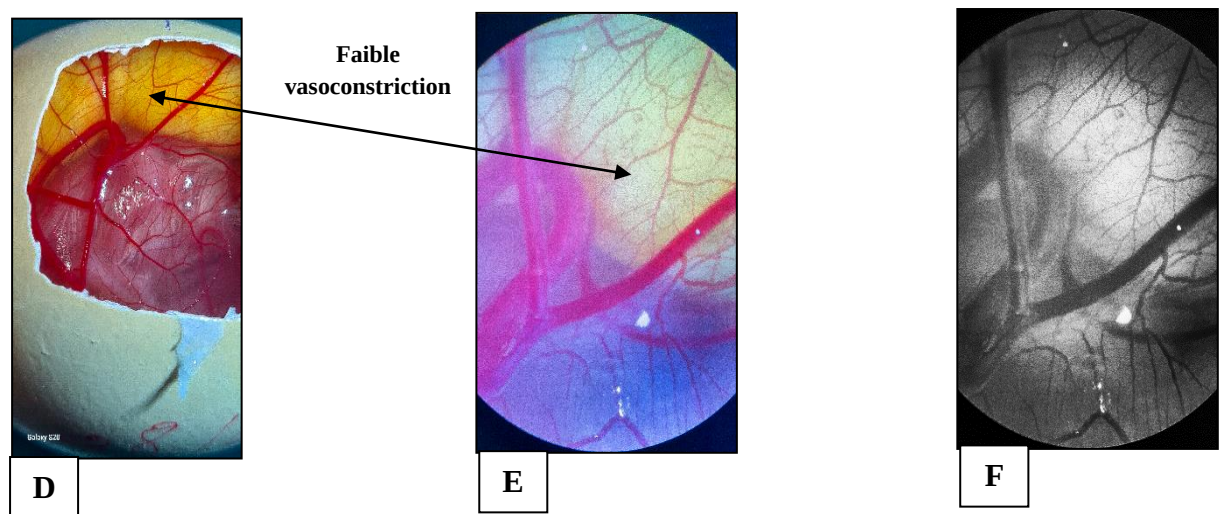


Figure 42 : Application de *Ginkgo biloba* après 5 minutes. (D) : sous caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD ; (E) : sous stéréomicroscope X20 ; (F) : sous stéréomicroscope X20 à l'échelle gris.

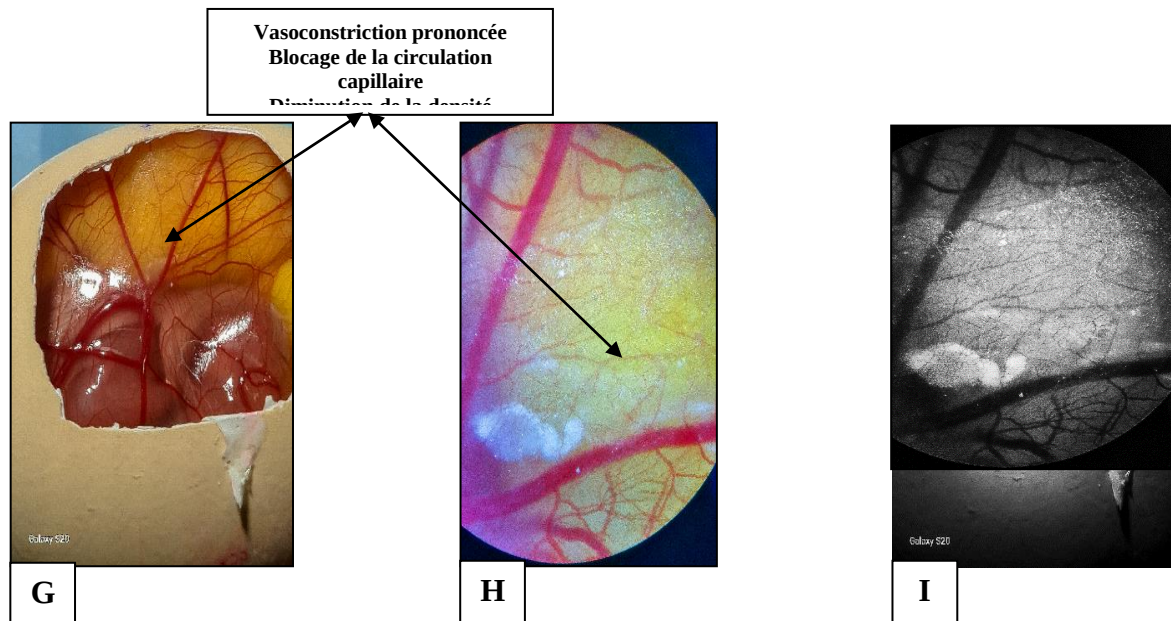


Figure 43 : Application de *Gingo biloba* après 12h. (G) : sous caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD ; (H) : sous stéréomicroscope X20 ; (I) : sous stéréomicroscope X20 à l'échelle gris.

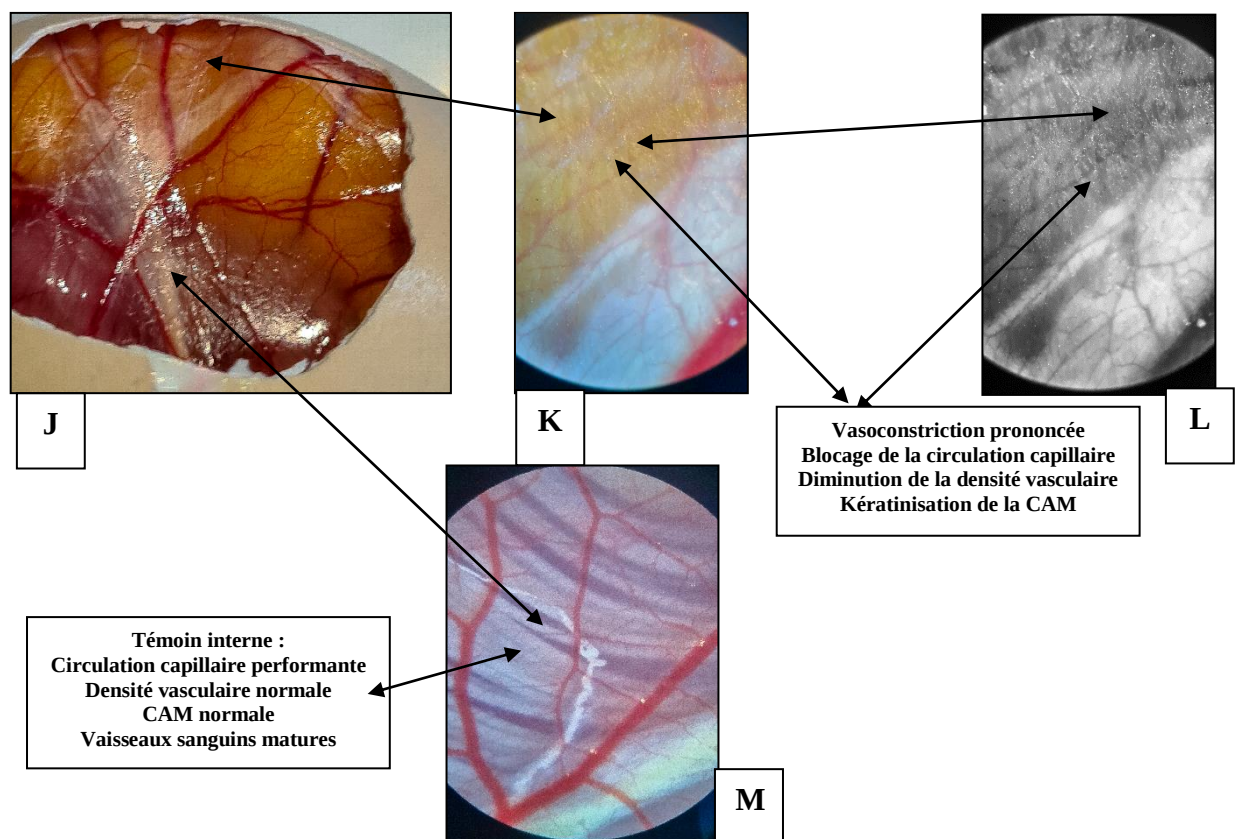


Figure 44 : Application de *Gingo biloba* après 30h. (J) : sous caméra du smartphone Samsung S20 G5 Full HD ; (K) : sous stéréomicroscope X20 ; (L) : sous stéréomicroscope X20 à l'échelle gris ; (M) : témoin interne.

-le calcul du score d'irritabilité selon le système d'évaluation de Luepke (1985) donne une valeur de 0, ce qui signifie une absence d'hyperhémie, d'hémorragie et de coagulation.

-Cinq minutes après l'application, on enregistre une faible vasoconstriction (figure42).

-Après 12 heures, on note une vasoconstriction prononcée, un blocage de la circulation capillaire et une diminution de la densité vasculaire (figure43).

-Après 30 heures, on commence à détecter une kératinisation de la CAM, en plus de la vasoconstriction prononcée, blocage de la circulation capillaire et la diminution de la densité vasculaire (figure44).

-les autres régions de la CAM (témoin interne) montrent une croissance normale (figure44).

-Après 60 heures, on constate que l'embryon se porte bien, ce qui traduit l'absence d'une quelconque toxicité sur l'embryon.

5 On a enregistré une mortalité considérable dans tous les groupes (témoin négatif, témoin positif1, témoin positif 2, groupe expérimental,...). Ceci peut être dû à des facteurs externes à l'expérimentation (infections, conditions climatiques,...), donc difficile à contrôler (voir figure45).

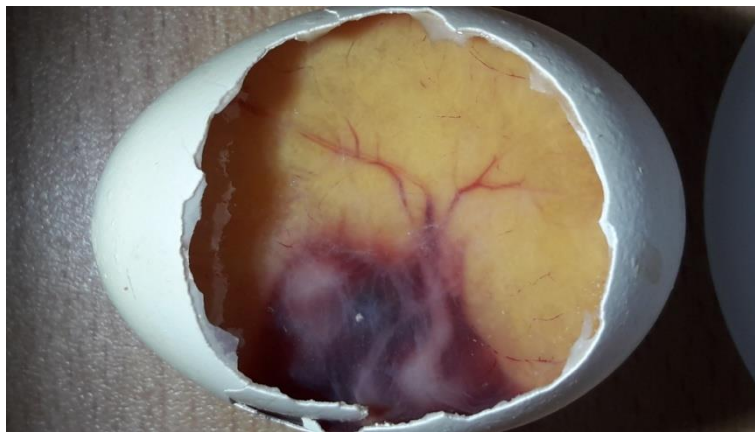


Figure45 : embryon mort, *in ovo*

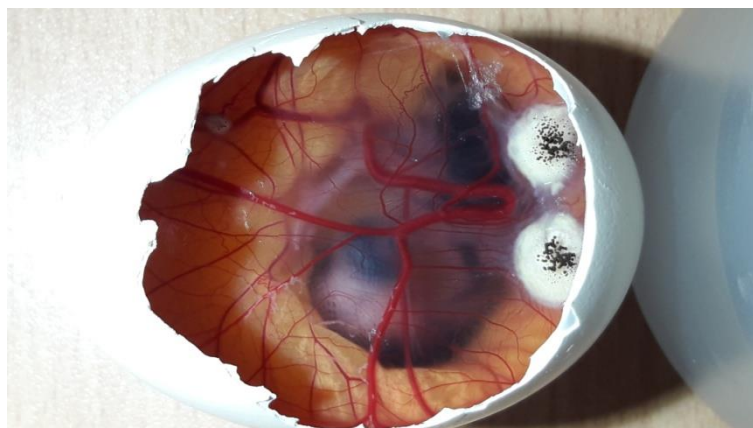


Figure 46:embryon (CAM) infecté

6- Les données expérimentales indiquent que l'application de l'extrait brut de *Ginkgo biloba* n'affecte pas la viabilité des embryons, dont la survie est de 100 %.

De nombreuses études montrent clairement que les préparations de la plante *Ginkgo biloba* possèdent une activité antiangiogénique (Bačkorová et al., 2025; Han et al., 2016). Cependant, il n'existe actuellement aucune étude publiée explorant son effet irritant ou de l'une de ses différentes molécules bioactives. De même, il n'y a pas d'études sur l'exploitation de cet effet dans le traitement antitumoral sous forme de perturbateur vasculaire (VDA). Ceci constitue l'originalité de notre travail.

Le *Ginkgo biloba*, plante médicinale ancestrale, renferme plusieurs composés bioactifs aux propriétés anti-angiogéniques démontrées (Shao et al., 2025). Parmi les constituants les plus puissants figurent les flavonoïdes (Tao et al., 2022) tels que la quercétine et le kaempférol, ainsi que les terpénoïdes, notamment les ginkgolides et le bilobalide (Zonouz et al., 2024). Ces molécules exercent leurs effets par différents mécanismes inhibant l'angiogenèse, processus essentiel à la croissance tumorale et à la formation de métastases.

Une étude marquante de Koltermann et al. (2009) a montré que l'extrait standardisé de *Ginkgo biloba*, EGb 761, inhibe l'angiogenèse aussi bien *in vitro* que *in vivo* (modèle CAM). L'extrait a diminué la prolifération, la migration et la formation de structures tubulaires par les cellules endothéliales, via l'activation de phosphatases tyrosine, qui bloquent ensuite la voie de signalisation Raf-MEK-ERK, centrale dans le contrôle de l'angiogenèse (Koltermann et al., 2009).

Par ailleurs, Ye et al. (2024), dans une revue récente, soulignent le potentiel des dérivés de *Ginkgo biloba* comme agents perturbateurs vasculaires dans des stratégies de vectorisation ciblée du traitement tumoral. Ces composés semblent agir en perturbant l'intégrité vasculaire et les voies de signalisation angiogéniques (Ye et al., 2024).

En effet, selon Chin et al. (2018), le kaempférol inhibe l'angiogenèse dans des cellules endothéliales stimulées par le VEGF en ciblant spécifiquement le récepteur VEGFR-2 et en réduisant l'activation des voies de signalisation en aval (PI3K/AKT, MEK et ERK). Ce blocage aboutit à une diminution de l'expression de métalloprotéinases, telles que MMP-2 et MMP-9, ce qui contribue à limiter la formation des nouveaux vaisseaux dans le microenvironnement tumoral.

Cette étude préliminaire vise, principalement, l'évaluation du potentiel irritant de l'extrait brut de *Ginkgo biloba*. Elle s'inscrit dans une logique de recherche de nouvelles biomolécules d'origine biologique qui peuvent être douées de propriétés antivasculaires.

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 vu la simplicité, le coût modeste et la reproductibilité des résultats, ne pose aucune contrainte éthique, immaturité immunitaire (Ribatti et al., 2001).

Ginkgo biloba se montre comme une plante sûre qui semble bloquer la formation de nouveaux vaisseaux à partir de ceux pré-existants (anti-angiogénique). Alors il est clair que celle-ci est dépourvue de toute action perturbatrice sur les vaisseaux sanguins matures, en l'occurrence l'effet destructeur des vaisseaux sanguins de l'anglais, vascular disrupting agents, VDAs, (Ye et al., 2024). Donc, l'application de l'extrait brut de cette plante se traduit par l'absence de toute irritation des CAM, des saignements, des thromboses. Par ailleurs, on enregistre une kératinisation de la CAM, en plus de la vasoconstriction prononcée, blocage de la circulation capillaire, diminution de la densité vasculaire 30 heures après l'application.

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 et crée une variabilité entre les observations du même groupe.

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de cette étude, nous avons mené une série d'expérimentations *in ovo* sur la vascularisation de la membrane chorioallantoïque (CAM) afin d'évaluer les effets biologiques de l'extrait de *Ginkgo biloba*, reconnu pour son potentiel thérapeutique. Ces tests avaient pour objectif d'observer les modifications morphologiques et fonctionnelles induites par cet extrait sur le développement des vaisseaux sanguins. L'enjeu était de déterminer s'il possède une activité anti-angiogénique et/ou s'il perturbe la vascularisation, dans une optique de mise en œuvre d'approches anticancéreuses.

Les premières observations indiquent que *Ginkgo biloba* se révèle être une plante sûre, capable d'inhiber la formation de nouveaux vaisseaux à partir des réseaux vasculaires préexistants (propriété anti-angiogénique). Il est ainsi évident que l'extrait brut de cette plante ne présente aucune action destructrice sur les vaisseaux sanguins matures, contrairement aux agents perturbant la vascularisation. L'application de cet extrait ne se traduit par aucune irritation de la membrane chorioallantoïque (CAM), ni par des saignements ou des thromboses. Par ailleurs, on observe une kératinisation progressive de la CAM, accompagnée d'une vasoconstriction prononcée, d'un blocage de la circulation capillaire et d'une diminution de la densité vasculaire, effet mesuré 30 heures après l'application et qui suggère une action antiangiogénique. De plus, dans les conditions expérimentales définies, la plante en question n'entraîne aucune mortalité des embryons.

Références bibliographiques

- (n.d.). Alamy. Consulté le 03 juin 2025, à l'adresse <https://www.alamyimages.fr/photos-images/ginkgo-biloba.html?sortBy=relevant>
- Abdu, T. A., T. Elhadd, M. Pfeifer and R. N. Clayton (2001). "Endothelial dysfunction in endocrine disease." *Trends Endocrinol Metab* 12(6): 257-265.
- Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation Research*, 100(2), 158-173.
- Aquaportail. (n.d.). Facteur de croissance dérivé des plaquettes. Retrieved July 3, 2025, from <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/9722/facteur-de-croissance-derive-des-plaquettes>
- Aquaportail. (n.d.). Facteur de croissance des fibroblastes. Retrieved May 31, 2025, from <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/9932/facteur-de-croissance-des-fibroblastes>
- Arias, J. L., & Fernandez, M. S. (2001). Role of extracellular matrix molecules in shell formation and structure. *World's Poultry Science Journal*, 57(4), 349-357.
- Arias, JL, Fink, DJ, Xiao, SQ, Heuer, AH, et Caplan, AI (1993). Biominéralisation et coquilles d'œufs : compartiments acellulaires à médiation cellulaire de la matrice extracellulaire minéralisée. *Revue internationale de cytologie* , 145 , 217-250.
- Arribas, S. M., A. Hinek and M. C. Gonzalez (2006). "Elastic fibres and vascular structure in hypertension." *Pharmacol Ther* 111(3): 771-791.
- Auguste, P., Lemiere, S., Larrieu-Lahargue, F., & Bikfalvi, A. (2005). Mécanismes moléculaires de la vascularisation tumorale. *Revue critique en oncologie/hématologie* , 54 (1), 53-61.
- Azzi, S., & Gavard, J. (2014). Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l'art du dialogue. *médecine/sciences*, 30(4), 408-414.
- Balke, M., Neumann, A., Kersting, C., Agelopoulos, K., Gebert, C., Gosheger, G., ... & Hagedorn, M. (2010). Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC research notes*, 3, 1-8.

- Barkat, M. A., Goyal, A., Barkat, H. A., Salauddin, M., Pottoo, F. H., & Anwer, E. T. (2021). Herbal medicine: Clinical perspective and regulatory status. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 24(10), 1573-1582.
- Barone, A., Chi, D. C., Theoret, M. R., Chen, H., He, K., Kufrin, D., ... & Pazdur, R. (2017). FDA approval summary: trabectedin for unresectable or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma following an anthracycline-containing regimen. *Clinical cancer research*, 23(24), 7448-7453.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*, 3(6), 401-410.
- Bielenberg, D. R., & Zetter, B. R. (2015). The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *The Cancer Journal*, 21(4), 267-273.
- Bigé, N., Boffa, J. J., Lepeyre, F., & Shweke, N. (2013). Rôle de la thrombospondine-1 dans le développement des maladies rénales. *médecine/sciences*, 29(12), 1131-1137.
- Bikfalvi, A. (2004). Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1017-1021.
- Boateng, I. D. (2023). Ginkgols and bilobols in Ginkgo biloba L. A review of their extraction and bioactivities. *Phytotherapy Research*, 37(8), 3211-3223.
- Borges, J., Tegtmeier, F. T., Padron, N. T., Mueller, M. C., Lang, E. M., & Stark, G. B. (2003). Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue engineering*, 9(3), 441-450.
- Brégeon, M. (2020). Physiologie des couches interne et externe de la membrane vitelline de l'œuf de poule: apports des études protéomiques et structurales (Doctoral dissertation, Université de Tours (UT), Tours, FRA).
- BRUNETON J., 1999 _ Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales, 1120 p. (ISBN 2- 7430-0315-4).

- Burley, R. W., and D. V. Vadehra. 1989. *The avian Egg: Chemistry and Biology*. Toronto: Wiley & sons, 1989, 276.
- Cadet, E. (2017). *Etude phytochimique et emplois de plantes veinotoniques* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Carillon, A. (2009, March). **Place de la phytothérapie dans les systèmes de santé au XXI^e siècle**. Séminaire International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales, Djerba.
- Checchi, M., Bertacchini, J., Cavani, F., Magarò, M. S., Bonetti, L. R., Pugliese, G. R., ... & Palumbo, C. (2020). Scleral ossicles: angiogenic scaffolds, a novel biomaterial for regenerative medicine applications. *Biomaterials Science*, 8(1), 413-425.
- Chen, J., Xu, J., Wang, Q., Lin, F., Zhang, X., Tang, L., ... & Li, J. (2025). A dual-targeted small-molecule photosensitizer with enhanced dual antitumor and anti-vascular effect for metastatic advanced prostate cancer photodynamic therapy. *Dyes and Pigments*, 232, 112476.
- Chen, L., Wang, S., Feng, Y., Zhang, J., Du, Y., Zhang, J., ... & Li, Y. (2021). Utilisation of chick embryo chorioallantoic membrane as a model platform for imaging-navigated biomedical research. *Cells*, 10(2), 463.
- Cleaver, O., et Melton, DA (2003). Signalisation endothéliale au cours du développement. *Nature medicine* , 9 (6), 661-668
- Dagg, CP, Karnofsky, DA, et Roddy, J. (1956). Croissance de tumeurs humaines transplantables chez l'embryon de poulet et le poussin éclos. *Cancer research* , 16 (7), 589-594. Nys, y., 2010. Structure et formation de l'oeuf. In : F. Nau, C. Guérin-Dubiard, F. Baron, J L.
- Dell'Era, P., Belleri, M., Stabile, H., Massardi, M. L., Ribatti, D., & Presta, M. (2001). Paracrine and autocrine effects of fibroblast growth factor-4 in endothelial cells. *Oncogene*, 20(21), 2655-2663.
- Delloye-Bourgeois, C., Bertin, L., Thoinet, K., Jarroson, L., Kindbeiter, K., Buffet, T., ... & Castellani, V. (2017). Microenvironment-driven shift of cohesion/detachment balance

- within tumors induces a switch toward metastasis in neuroblastoma. *Cancer Cell*, 32(4), 427-443
- Delmonte, A., & Sessa, C. (2009). AVE8062: a new combretastatin derivative vascular disrupting agent. *Expert opinion on investigational drugs*, 18(10), 1541-1548.
 - Demcisakova, Z., Luptakova, L., Tirpakova, Z., Kvasilova, A., Medvecký, L., De Spiegelaere, W., & Petrovova, E. (2022). Evaluation of angiogenesis in an acellular porous biomaterial based on polyhydroxybutyrate and chitosan using the chicken ex ovo chorioallantoic membrane model. *Cancers*, 14(17), 4194.
 - Dennis, J.E., Xiao, S-Q., Agarwal, M., Fink, D.J., Heuer, A.H. et Caplan, A.I., 1996. Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from white leghorn chickens (*Gallus gallus*). *Journal of Morphology*, 228(3), pp.287-306.
 - Djonov, V., Baum, O., et Burri, PH (2003). Remodelage vasculaire par angiogenèse intussusceptive. *Recherche cellulaire et tissulaire* , 314 (1), 107-117.
 - Dominguez-Vera, J. M., Garcia-Ruiz, J. M., Gautron, J., & Nys, Y. (2000). The effect of avian uterine fluid on the growth behavior of calcite crystals. *Poultry Science*, 79(6), 901-907.
 - Eckrich, J., Kugler, P., Buhr, C. R., Ernst, B. P., Mendler, S., Baumgart, J., ... & Wiesmann, N. (2020). Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. *Scientific reports*, 10(1), 18585.
 - El Hasasna, H., Saleh, A., Samri, H. A., Athamneh, K., Attoub, S., Arafat, K., ... & Iratni, R. (2016). Rhus coriaria suppresses angiogenesis, metastasis and tumor growth of breast cancer through inhibition of STAT3, NFκB and nitric oxide pathways. *Scientific reports*, 6(1), 21144.
 - Fancsi, T., & Fehér, G. (1979). Études ultrastructurales de la membrane chorioallantoïdienne d'embryons de poulet pendant l'incubation. *Anatomia, histologia, embryologia* , 8 (2), 151-159.

- Fischer, D., Fluegen, G., Garcia, P., Ghaffari-Tabrizi-Wizsy, N., Gribaldo, L., Huang, R. Y. J., ... & Schneider-Stock, R. (2022). The CAM model—Q&A with experts. *Cancers*, 15(1), 191.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl j Med*, 285(21), 1182-1186.
- Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.*, 57(1), 1-18.
- Folkman, J., & Hanahan, D. (1991, January). Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. In *Princess Takamatsu Symposia* (Vol. 22, pp. 339-347).
- Galzie, Z., Kinsella, A. R., & Smith, J. A. (1997). Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochemistry and Cell Biology*, 75(6), 669-685.
- Gao, X., Jiao, Q., Zhou, B., Liu, Q., & Zhang, D. (2020). Diverse bioactive components from Ginkgo biloba fruit. *Thermal Science*, 24(3 Part A), 1753-1760.
- Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature reviews cancer*, 4(11), 891-899.
- Gerwins, P., Sköldenberg, E., & Claesson-Welsh, L. (2000). Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 34(3), 185-194.
- Gonzalez-Fierro, A., & Dueñas-González, A. (2021, January). Drug repurposing for cancer therapy, easier said than done. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 68, pp. 123-131). Academic Press.
- Gupta, T., & Murtaza, M. (2025). Advancing Targeted Therapies in Pancreatic Cancer: Leveraging Molecular Aberrations for Therapeutic Success. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
- Halgrain, M. et Sophie, RG (2023). La membrane chorioallantoïque au cours du développement embryonnaire chez le poulet : physiologie et variabilité génétique.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental dynamics*, 195(4), 231-272.

- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*, 86(3), 353-364.
- Harris, J.J., 1958. The human tumor grown in the egg. *Annals of the New York Academy of Sciences* 76, 764–774.
- Hassan, B. A. R., Mohammed, A. H., Hallit, S., Malaeb, D., & Hosseini, H. (2025). Exploring the role of artificial intelligence in chemotherapy development, cancer diagnosis, and treatment: present achievements and future outlook. *Frontiers in Oncology*, 15, 1475893.
- Hill, C. R., Kissun, R. D., Weiss, J. B., & Garner, A. (1983). Angiogenic factor in vitreous from diabetic retinopathy. *Experientia*, 39, 583-585.
- Hirschi, K. K., & D'Amore, P. A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research*, 32 (4), 687 _ 698.
- Holash, J., Wiegand, S. J., & Yancopoulos, G. D. (1999). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, 18(38), 5356-5362..
- Huang, W., Huang, L., Wen, Z., Honkanen, R. A., & Rigas, B. (2023). The Antiangiogenic Effect and Ocular Pharmacology of Novel Modified Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Treatment of Oxygen-Induced Retinopathy. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 39(4), 279-289.
- Jain, RK (2003). Régulation moléculaire de la maturation vasculaire. *Nature medicine* , 9 (6), 685-693.
- Janani, R., Madan Kumar, P., et Baskaran, V. (2019). Revue critique des propriétés antiangiogéniques des composés phytochimiques. *Journal of Nutritional Biochemistry*.
- Jarrosson, L., Costechareyre, C., Gallix, F., Ciré, S., Gay, F., Imbaud, O., ... & Castellani, V. (2021). An avian embryo patient-derived xenograft model for preclinical studies of human breast cancers. *Iscience*, 24(12).

- Jedelska, J., Strehlow, B., Bakowsky, U., Aigner, A., Hoebel, S., Bette, M., ... & Mandic, R. (2013). The chorioallantoic membrane assay is a promising ex vivo model system for the study of vascular anomalies. *in vivo*, 27(6), 701-705.
- Jefferies, B., Lenze, F., Sathe, A., Truong, N., Anton, M., von Eisenhart-Rothe, R., ... & Mayer-Kuckuk, P. (2017). Non-invasive imaging of engineered human tumors in the living chicken embryo. *Scientific Reports*, 7(1), 4991.
- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Zhang, S., Gong, Z., ... & Xiong, W. (2020). The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39, 1-19.
- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Zhang, S., Gong, Z., ... & Xiong, W. (2020). The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39, 1-19.
- Jonchère, V. (2010). Identification de gènes et de protéines de l'utérus impliqués dans le transfert minéral, la calcification de la coquille et la protection antimicrobienne de l'oeuf de poule (Doctoral dissertation, Université François Rabelais (Tours)).
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 422-433.
- Kardamakis, D., Hadjimichael, C., Ginopoulos, P., & Papaioannou, S. (2004). Effects of paclitaxel in combination with ionizing radiation on angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. A radiobiological study. *Strahlentherapie und Onkologie*, 180(3), 152-156.
- Kaufman, N., Kinney, TD, Mason, EJ, et Prieto Jr, LC (1956). Maintien d'un néoplasme humain sur la membrane chorioallantoïdienne du poulet. *The American Journal of Pathology*, 32 (2), 271.
- Khazir, J., Mir, B. A., Pilcher, L., & Riley, D. L. (2014). Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry letters*, 7, 173-181.
- Kim, J. S., Min, J., Recknagel, A. K., Riccio, M., & Butcher, J. T. (2011). Quantitative three-dimensional analysis of embryonic chick morphogenesis via microcomputed

- tomography. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 294(1), 1-10.
- Kintzios, S. E. (2006). Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Critical reviews in plant sciences*, 25(2), 79-113.
 - Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), a006502.
 - Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., & Samuel, J.-L. (2008). *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux*. John Libbey.
 - LaPlant, K. D., & Louzon, P. D. (2010). Pazopanib: an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor for use in renal cell carcinoma. *Annals of Pharmacotherapy*, 44(6), 1054-1060.
 - Le Tourneau, C., Raymond, E., & Faivre, S. (2007). Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Therapeutics and clinical risk management*, 3(2), 341-348.
 - Li-Chan, E. C. Y., & Kim, H.-O. (2007). Structure and chemical compositions of eggs. In Y. Mine (Ed.), *Egg bioscience and technology* (pp. 1–27). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470181249.ch1>
 - Li-Chan, E. et Nakai, S., 1989. Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2(1), 21-57.
 - Lindop, G. B., J. J. Boyle, P. McEwan and C. J. Kenyon (1995). "Vascular structure, smooth muscle cell phenotype and growth in hypertension." *J Hum Hypertens* 9(6): 475-478.
 - Lokman, N. A., Elder, A. S., Ricciardelli, C., & Oehler, M. K. (2012). Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *International journal of molecular sciences*, 13 (8), 9959-9970.

- Lopes-Coelho, F., Martins, F., Pereira, S. A., & Serpa, J. (2021). Anti-angiogenic therapy: current challenges and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3765.
- Ma, H., Carpenter, C. L., Sullivan-Halley, J., & Bernstein, L. (2011). The roles of herbal remedies in survival and quality of life among long-term breast cancer survivors-results of a prospective study. *BMC cancer*, 11(1), 1-10.
- Martin, P. M., & Ouafik, L. H. (2012). Angiogenesis: return to the fundamental. *Oncologie*, 14, 199-215.
- Martin, P. M., & Ouafik, L. H. (2012). Angiogenesis: return to the fundamental. *Oncologie*, 14, 199-215. Méjean, A., & Lebreton, T. (2008). La cascade métastatique : angiogénèse et nouveaux concepts. *Progrès en Urologie*, 18, S156-S166.
- Mazon, J. J., Barret, C., & Maugis, A. (2005). Techniques d'irradiation des cancers: la radiothérapie conformationnelle. Maloine.
- Merlos Rodrigo, M. A., Casar, B., Michalkova, H., Jimenez Jimenez, A. M., Heger, Z., & Adam, V. (2021). Extending the applicability of *in ovo* and *ex ovo* chicken chorioallantoic membrane assays to study cytostatic activity in neuroblastoma cells. *Frontiers in Oncology*, 11, 707366.
- Mesas Hernández, C., Chico Lozano, M. Á., Doello, K., Lara, P., Moreno Pérez, J., Melguizo Alonso, C., ... & Prados Salazar, J. C. (2024). Experimental Tumor Induction and Evaluation of Its Treatment in the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Model: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 837.
- Musabimana Kagaju F; (2005) Consommation et commercialisation des œufs à Dakar (Sénégal) Th : Méd. Vét. : Dakar; 36.
- Ndashindwa, V., Ngendahayo, L., & Vyankandondera, J. (2013). Aspects épidémiologiques et anatomopathologiques des cancers dans les centres hospitaliers universitaires (chu) du Rwanda.

- Noiva, R. M., Menezes, A. C., & Peleteiro, M. C. (2014). Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. *BMC Veterinary Research*, 10, 1-10.
- Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 17, 779-804.
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., & Hincke, M. T. (2004). Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*, 3(6-7), 549-562.
- Nys, Y., Hincke, M. T., Hernandez-Hernandez, A., Rodriguez-Navarro, A. B., Gomez-Morales, J., Jonchère, V., ... & Gautron, J. (2010). Structure, propriétés et minéralisation de la coquille de l'œuf: rôle de la matrice organique dans le contrôle de sa fabrication. *Productions animales*, 23(2), 143.
- Okoro, B. C., Dokunmu, T. M., Okafor, E., Sokoya, I. A., Israel, E. N., Olusegun, D. O., ... & Iweala, E. E. J. (2023). The ethnobotanical, bioactive compounds, pharmacological activities and toxicological evaluation of garlic (*Allium sativum*): A review. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 8, 100273.
- Omar, SH, et Al-Wabel, NA (2010). Composés organosulfurés et mécanisme possible de l'ail dans le cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal* , 18 (1), 51-58.
- Pallatt, S., Shibili P, A., Das, D., Nambidi, S., Banerjee, A., & Pathak, S. (2025). Small Molecules and Peptides Targeting Tumour Microenvironment. In *Small Molecules for Cancer Treatment* (pp. 253-269). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(5), C947-C970.
- Patan, S. (2004). Vasculogenèse et angiogenèse. *Angiogenèse dans les tumeurs cérébrales* , 3-32.

- Patel-Hett, S., et D'Amore, PA (2011). Transduction du signal dans la vasculogenèse et l'angiogenèse développementale. *Revue internationale de biologie du développement* , 55 , 353.
- Penn, J. (éd.). (2008). *Angiogenèse rétinienne et choroïdienne* . Springer Science & Business Media.
- Pettersson, A., Nagy, JA, Brown, LF, Sundberg, C., Morgan, E., Jungles, S., ... & Dvorak, HF (2000). Hétérogénéité de la réponse angiogénique induite dans différents tissus adultes normaux par le facteur de perméabilité vasculaire/facteur de croissance endothéliale vasculaire. *Investigation en laboratoire* , 80 (1), 99-115.
- Pugsley, M. K. and R. Tabrizchi (2000). "The vascular system. An overview of structure and function." *J Pharmacol Toxicol Methods* 44(2): 333-340.
- Rafii, S., D. Lyden, R. Benezra, K. Hattori and B. Heissig (2002). "Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?" *Nat Rev Cancer* 2(11): 826-35
- Luttun, A., G. Carmeliet and P. Carmeliet (2002). "Vascular progenitors: from biology to treatment." *Trends Cardiovasc Med* 12(2): 88-96.
- Ramos Gueto, R. (2011). Modulation de la signalisation du récepteur de type 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR-2) par l'ubiquitination.
- ResearchGate. (n.d.). Blocage des voies de signalisation du VEGF par les anticorps ciblant le ligand. Consulté le 3 juin 2025, à l'adresse https://www.researchgate.net/figure/Blocage-des-voies-de-signalisation-du-VEGF-par-les-anticorps-ciblant-le-ligand_fig9_324436226
- Rhodin, J. A. (1967). The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. *Journal of ultrastructure research*, 18(1-2), 181-223.
- Ribatti, D. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of development*, 141, 70-77.
- Richardson, M., & Singh, G. (2003). Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. *Current Drug Targets- Cardiovascular & Hematological Disorders*, 3 (2), 155-185.

- Rini, B. I. (2006). Sorafenib. Expert opinion on pharmacotherapy, 7(4), 453-461.
- Risau W and Flamme I. (1995). Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 11: 73-91.
- Risau, W., & Lemmon, V. (1988). Modifications de la matrice extracellulaire vasculaire au cours de la vasculogénèse et de l'angiogénèse embryonnaires. Biologie du développement , 125 (2), 441-450.
- Robinson, C. J., & Stringer, S. E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. Journal of cell science, 114(5), 853-865.
- Romanoff, A. L. (1960). The avian embryo. Structural and functional development. The avian embryo. Structural and functional development.
- Rossi, R. E., Pericleous, M., Mandair, D., Whyand, T., & Caplin, M. E. (2014). The role of dietary factors in prevention and progression of breast cancer. Anticancer research, 34(12), 6861-6875.
- Rüegg, C. (2002). Une nouvelle cible pour la thérapeutique anticancéreuse: la vascularisation tumorale.
- Sareen, G., Mohan, M., Mannan, A., Dua, K., & Singh, T. G. (2025). A new era of cancer immunotherapy: vaccines and miRNAs. Cancer Immunology, Immunotherapy, 74(5), 163.
- Schneider-Stock, R., & Ribatti, D. (2021). The CAM assay as an alternative in vivo model for drug testing. Organotypic Models in Drug Development, 303-323.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nature reviews cancer, 3(10), 721-732.
- Sierpina, V. S., Wollschlaeger, B., & Blumenthal, M. (2003). Ginkgo biloba. American family physician, 68(5), 923-926.
- Simons, M., Alitalo, K., Annex, B. H., Augustin, H. G., Beam, C., Berk, B. C., ... & Dimmeler, S. (2015). State-of-the-art methods for evaluation of angiogenesis and tissue vascularization: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation research, 116(11), e99-e132.

- Sola, B., & Caillot, M. (2022). L'embryon de poule-Un modèle préclinique alternatif en cancérologie. *médecine/sciences*, 38(10), 795-799
- Song, J. S., Jin, E. J., & Choi, K. H. (2010). Characterization of the Pathogenesis Mechanism after *Pseudomonas aeruginosa* Infection through Food Consumption Using Chick Embryo Model. *Food Science of Animal Resources*, 30(4), 568-574.
- Steiling, W., Bracher, M., Courtellemont, P., & De Silva, O. (1999). Le test HET-CAM, un test in vitro utile pour évaluer les propriétés d'irritation oculaire des formulations et ingrédients cosmétiques. *Toxicologie in vitro* , 13 (2), 375-384.
- Strømgaard, K., & Nakanishi, K. (2004). Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(13), 1640-1658.
- Taylor, A. E., & Granger, D. N. (1985). Exchange of macromolecules across the microcirculation. In: E. M. Renkin, & C. C. Michel (Eds.), *Micro- circulation. Handbook of physiology* (pp. 462 _ 481). Bethesda, MD:American Physiological Society.
- Taylor, A. E., Moore, T., & Khimenko, P. (1994). Microcirculatory ex-change of fluid and protein and development of the third space. In: B. A. Zikria, M. O. Oz, & R. W. Carlson (Eds.), *Reperfusion injuries and clinical capillary leak syndrome* (pp. 59 _ 92). Armonk, NY: Futura Publishing.
- Taylor, A. E., Moore, T., & Khimenko, P. (1994). Microcirculatory ex-change of fluid and protein and development of the third space. In: B. A. Zikria, M. O. Oz, & R. W. Carlson (Eds.), *Reperfusion injuries and clinical capillary leak syndrome* (pp. 59 _ 92). Armonk, NY: Futura Publishing.
- Tenet, J. (2016). Rôle de la thrombospondine 1 dans la progression et la dissémination du cancer du sein (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Thorpe, P. E., Chaplin, D. J., & Blakey, D. C. (2003). The first international conference on vascular targeting: meeting overview.
- Tozer, G. M., Kanthou, C., & Baguley, B. C. (2005). Disrupting tumour blood vessels. *Nature Reviews Cancer*, 5(6), 423-435.

- Ucuzian, A. A., Gassman, A. A., East, A. T., & Greisler, H. P. (2010). Molecular mediators of angiogenesis. *Journal of Burn Care & Research*, 31(1), 158-175.
- University of Lucknow. (n.d.). Egg structure. University of Lucknow. [https://www.lkouniv.ac.in/site/writereaddata/siteContent/202004080636590834shailie_Egg_Structure.pdf](https://www.lkouniv.ac.in/site/writereaddata/siteContent/202004080636590834shailie_Egg_Structure.pdf)
- Vican, V. (2024). La phytothérapie dans la prise en charge de troubles circulatoires à l'officine.
- Vittet, D., & Feige, J. J. (2007). Lymphangiogenèse et progression tumorale. *Bulletin du cancer*, 94(10), 881-6.
- Volak J., Stodola J. (1983). *Plantes médicinales* : Ed Artia Prague, P 2, 3,12.
- Wang, L. (2016). Inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR: conception, synthèse et études structurales de peptides et peptidomimétiques mimes de structures secondaires (Doctoral dissertation, Université Sorbonne Paris Cité).
- Wang, X., Carmichael, D. W., Cady, E. B., Gearing, O., Bainbridge, A., Ordidge, R. J., ... & Peebles, D. M. (2008). Greater hypoxia-induced cell death in prenatal brain after bacterial-endotoxin pretreatment is not because of enhanced cerebral energy depletion: a chicken embryo model of the intrapartum response to hypoxia and infection. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(5), 948-960.
- Wikipedia contributors. (n.d.). Angiogenèse tumorale. Wikipedia. Retrieved May 31, 2025, from https://fr.wikipedia.org/wiki/Angiogen%C3%A8se_tumorale
- Witzleb, E. (1989). Fonctions du système vasculaire. Dans *Physiologie humaine* (pp. 480-542). Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg.
- Wyld, L., Audisio, R. A., & Poston, G. J. (2015). The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nature reviews Clinical oncology*, 12(2), 115-124.

- Yan, X., Pitserski, C. et Nitka, S. (2007). Évaluation du test de l'œuf de poule et de la membrane chorioallantonique (CAM) pour la prédiction du potentiel d'irritation oculaire des produits de toilette personnelle formulés. *Toxicologie cutanée et oculaire*, 26(1), 25-36.
- Yang, S., Fang, Y., Ma, Y., Wang, F., Wang, Y., Jia, J., ... & Li, Z. (2025). Angiogenesis and targeted therapy in the tumour microenvironment: From basic to clinical practice. *Clinical and Translational Medicine*, 15(4), e70313.
- Zala, M., Lipinski, B., Costechareyre, C., Jarrosson, L., Teinturier, R., Julia, E., ... & Sujobert, P. (2024). Functional precision oncology for follicular lymphoma with patient-derived xenograft in avian embryos. *Leukemia*, 38(2), 430-434.
- Zhao, Y., Tan, F., Zhao, J., Zhou, S., Luo, Y., & Gong, C. (2025). Targeting the Enhanced Sensitivity of Radiotherapy in Cancer: Mechanisms, Applications, and Challenges. *MedComm*, 6(6), e70202.
- Zingué, S., Tchoupan, E. N., Madji, L. T., Pehue Fomat, B. H., Mafogang, B., Njamen, D., & Mendimi, J. M. N. (2024). Ricinodendron heudelotii (Euphorbiaceae) seed oil prevents DMBA-induced breast cancer under menopause-like conditions in Wistar rats. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1389976.
- Zuo, Z., Syrovets, T., Genze, F., Abaei, A., Ma, G., Simmet, T., & Rasche, V. (2015). High-resolution MRI analysis of breast cancer xenograft on the chick chorioallantoic membrane. *NMR in biomedicine*, 28(4), 440-447.

