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 :……

Université El Moudjahid Abdelhafid BOUSSOUF- Mila

Faculté 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 :

Effets des composés chimiques sur les vaisseaux sanguins de la membrane chorioallantoïdienne

Présenté par :

- **Barkat chaima**
- **Makhneche ikram**

Devant le jury :

AMIMOUR Mouna	**MCB**	**Président**
BOUCHERIT Hanane	**MCA**	**Examinateur**
MOUSSAOUI Bilal	**MAA**	**Promoteur**
KHIDHOUR Aziza	**MSC**	**Invité**

Année Universitaire : 2025/2026


بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciement

Au préalable, nous adressons nos profonds remerciements à Allah, le Tout-Puissant, qui nous a accordé la force, la patience et la volonté nécessaires pour mener à bien ce travail, et qui nous a guidés tout au long de ce parcours vers la réussite.

Nous exprimons ensuite notre sincère gratitude à notre encadrant, Monsieur Bilal Moussaoui, pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité constante, ses conseils scientifiques pertinents ainsi que son suivi rigoureux, qui ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Nous tenons également à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer et de juger ce travail.

Nos plus vifs remerciements s'adressent également à nos chers parents pour leur soutien indéfectible, leurs encouragements permanents et leurs sacrifices, qui ont constitué le pilier essentiel de notre réussite. Qu'Allah les récompense pour tout ce qu'ils nous ont apporté.

Nous remercions également les techniciens de laboratoire pour leur aide précieuse et leur collaboration, ainsi que l'ensemble des enseignants du département des Sciences de la Nature et de la Vie pour la qualité de la formation qu'ils nous ont dispensée.

Enfin, nous adressons nos remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, par leur soutien, leurs conseils ou leurs encouragements

Chaima et ikram

Dédicace

Je dédie le fruit de ce travail à la mémoire de mon cher père, Saad, qu'Allah lui fasse miséricorde. Il a toujours été un exemple de générosité et de bienveillance. Qu'Allah lui accorde le Paradis et illumine sa tombe de Sa miséricorde.

À ma chère mère, Fadila, qui a toujours été et demeure ma source de force et mon soutien dans cette vie. Qu'Allah la protège et la garde toujours à mes côtés.

À mes chers frères, Abdelraouf, Haroun et Fouad, ainsi qu'à mon petit frère Abdessamad, qui m'écoute toujours. Merci pour votre soutien moral et matériel, vos encouragements constants et votre présence à mes côtés tout au long de ce parcours.

À ma chère amie Ikram, qui est comme une sœur pour moi, ainsi qu'à sa famille, pour leur affection, leur soutien et leur présence dans les moments importants.

À ma belle-sœur ainsi qu'à ma chère nièce Souar, que Dieu vous préserve et vous accorde bonheur et réussite.

J'adresse également mes sincères remerciements à la chercheuse KHIDHOUR Aziza pour son aide précieuse, ses conseils avisés et son accompagnement tout au long de la réalisation de ce mémoire. Sa disponibilité et son soutien ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont soutenue et encouragée, de près ou de loin, je dédie ce travail avec toute ma gratitude et mon affection.

CHAIMA



Dédicace

Je dédie le fruit de ce travail à mon cher père Ahmed, qu'Allah le protège, qui a été et demeure un modèle de générosité, de bienveillance et de nobles valeurs. Je prie Dieu de lui accorder santé, bien-être et une longue vie bénie.

À ma chère mère, Masouda, source de tendresse et de douceur, mon soutien à chaque étape de ma vie, qui ne m'a jamais privé(e) de ses prières, de ses encouragements et de ses sacrifices. Je prie Allah de la préserver, de lui accorder une bonne santé durable et de la récompenser pleinement pour tout ce qu'elle a fait pour moi.

À mes chers frères : Abdelhalim, Aziz et Badis, je vous remercie pour votre soutien moral et matériel, pour vos encouragements constants et pour votre présence à mes côtés tout au long de ce parcours.

À mes chères sœurs : Soulef, Nora, Fawzia, Nadia, Malika et Djahida, ainsi qu'à l'épouse de mon frère, et à tous les enfants de mes frères et sœurs, que j'estime profondément et dont je suis fier/fière, je vous exprime toute ma gratitude. Vous avez été pour moi un véritable soutien, une source d'amour et de chaleur inestimable. Qu'Allah vous préserve et vous accorde bonheur et réussite dans ce monde et dans l'au-delà.

À ma chère amie Chaima, qui a été pour moi comme une sœur et une amie sincère, toujours présente et bienveillante, je te remercie pour ton soutien fidèle et ton affection sincère, qui ont accompagné mon parcours.

J'adresse également mes sincères remerciements à la chercheuse KHIDHOUR Aziza pour son aide précieuse, ses conseils pertinents et son accompagnement tout au long de la réalisation de ce travail, dont le soutien a été déterminant pour l'aboutissement de cette recherche.

Enfin, à toute personne qui m'a soutenu(e) et encouragé(e) de près ou de loin, je dédie ce travail avec toute ma gratitude, mon affection et ma reconnaissance.



IKRAM

resumé

Ce travail évalue le potentiel perturbateur vasculaire (VDA) *in ovo* d'extraits hydroéthanoliques standardisés (10 mg/mL) de ***Thymus vulgaris L***., ***Mentha spicata L***. et ***Bunium incrassatum*** **(Batt.)** Batt. &Trab.. Via le modèle de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) validé par le témoin positif fosbrétabuline (CA4P), l'application topique directe (200 µg/œuf à ED8) révèle des propriétés de rupture vasculaire aiguës, distinctes des cinétiques anti-angiogéniques classiques.

Bunium incrassatum et ***Thymus vulgaris L***. provoquent un effondrement microvasculaire précoce (3 heures post-exposition), caractérisé par un élagage capillaire (*microvascularpruning*) et des occlusions luminales thrombotiques évoquant un ciblage direct du cytosquelette endothélial. ***Mentha spicata L***. induit un blanchiment (*blanching*) et une stase circulatoire totale (*vascularshutdown*) après 7 heures. L'acquisition morphométrique à haute résolution a été standardisée par un système de couplage optique smartphone-stéréomicroscope sur mesure.

Ces évidences phénotypiques valident le potentiel de ces extraits en oncologie translationnelle et ouvrent la voie à un fractionnement bio-guidé ainsi qu'à des validations précliniques *in vivo* sur modèles tumoraux.

Mots-clés :

Membrane chorioallantoïdienne (CAM) ,Modèle*in ovo*, Angiogenèse,Agents de rupture vasculaire (VDA – *VascularDisrupting Agents*) , *Buniumincrassatum*,

Thymus vulgaris L. ***Mentha spicata*** **L**. , Extraits hydroéthanoliques, Morphométrie numérique

Abstract

This study evaluated the vascular disrupting activity (VDA) of standardized hydroethanolic extracts (10 mg/mL) from ***Thymus vulgaris L***., ***Mentha spicata L***., and ***Buniumincrassatum*** (Batt.) Batt. &Trab. utilizing the *in ovo* chorioallantoic membrane (CAM) assay. Pharmacological sensitivity was validated using fosbretabulin (CA4P) as a positive control. Topical application (200 µg/egg at ED8) revealed acute, distinct disruptive phenotypes contrasting with typical transcription-dependent anti-angiogenic kinetics.

Buniumincrassatum and ***Thymus vulgaris L***. induced rapid microvascular collapse within 3 hours post-exposure. ***Thymus vulgaris L***. triggered critical luminal occlusion and thrombotic stasis via blood column fragmentation, suggesting cytoskeletal targeting and endothelial cell rounding. Concurrently, ***Buniumincrassatum*** caused selective microvascular pruning, obliterating ~80% of immature capillaries. Conversely, ***Mentha spicata L***. exhibited delayed kinetics at 7 hours, characterized by generalized microvascular blanching and ghost vessel formation. Structural alterations were quantified using a custom smartphone-stereomicroscope optical coupling system.

These phenotypic evidences confirm the VDA potential of these botanical matrices, establishing a framework for bio-guided fractionation and translation to *in vivo*tumorxenograft models.

Key words:

Vascular Disrupting Agents (VDA) Chorioallantoic , Membrane (CAM) Assay ,***Thymus vulgaris L*** ,*Buniumincrassatum*,***Mentha spicata L***,*In Ovo* Translational Pharmacology,

Hydroalcoholic extract.

الملخص

تقيّم الدراسة الحالية النشاط المخرّب للأوعية الدموية (VDA) للمستخلصات المائية الإيثانولية القياسية (10 مغ/مل) لنباتات ***Thymus vulgaris L***، و***Mentha spicataL***، و***Buniumincrassatum*** باستخدام نموذج غشاء الكوريولانتويك (CAM) لـ*جنين الدجاج*، و بالمقارنة مع استخدام الفوسبريتادولين (CA4P) كشاهد إيجابي.

كشف التطبيق الموضعي المباشر (200 ميكروغرام/بيضة عند المرحلة التطورية في اليوم الثامن من الحضن) عن أنماط مظهرية حادة للتخريب الوعائي تختلف عن التأثيرات المثبطة لتخليق الأوعية، حيث تسبب مستخلصا *B incrassatum.* و*T. vulgaris* انهياراً سريعاً للشعيرات الدموية خلال 3 ساعات من التعرض للمادة النباتية، وتسبب نبات *T. vulgaris*في انسداد الأوعية وتخثر الدم، مما يشير إلى استهداف الهيكل الخلوي وحدوث التكور الخلوي البطاني (*cellrounding*)، بينما تسبب *B. incrassatum* في تقليم انتقائي (*microvascularpruning*) للأوعية الدقيقة أدى إلى طمس حوالي 80% من الشعيرات الدموية غير الناضجة.

في المقابل، أظهر نبات *M. spicata* L فعلا متأخرا تجلى بعد 7 ساعات، إذ تميز بابيضاض الأوعية الدقيقة وتشكيل أوعية شبحية (*ghostvessels*).

وفي سياق علم الأورام، تؤكد هذه الأدلة المظهرية أن المستحضرات النباتية تعمل على تخريب للأوعية الدموية. كل ذلك يؤسس لإجراء تجزئة المستخلصات معتمدين على تأثيرها على أوعية الدم (*bio-guidedfractionation*) والتحول نحو نماذج تعتمد على زرع عينات ورمية أجنبية (xenografts) على غشاء الكوريولانتويك (CAM).

الكلمات المفتاحية: العوامل المخرّبة للأوعية الدموية(VDAs) ، المستخلصات المائية الإيثانولية القياسية، النعناع، التلغودة، الزعتر، تخليق الأوعية الدموية.

Table des matiéres :

Résumé .....

الملخص.....

Tables des matiéres .....

Liste des abréviations .....

Liste des tableaux .....

Liste des figures .....

Introduction 1

Chapitre I : Système vasculaire : fonctions physiologiques et implications pathologiques

I.1. Généralités sur Le système vasculaire 4

I.1.1. Structure et fonction des vaisseaux sanguins.....5

I.1.1.1. Les artères 5

I.1.1.2. Les veines..... 5

I.1.1.3. Les capillaires 5

I.1.2. Le système lymphatique 6

I.2. Ontogenèse et dynamique du développement vasculaire 7

I.2.1. Vasculogenèse embryonnaire et post-natale.....7

I.2.2. L'angiogenèse 9

I.2.3. L'endothélium vasculaire : structure, fonctions et hétérogénéité 9

I.2.2.3. Les mécanismes de l'angiogenèse 10

I.2.3.1. L'angiogenèse par bourgeonnement (*Sprouting*).....11

I.2.3.2. L'angiogenèse par intussusception (*Splitting*) 12

I.2.3.3. La co-optation vasculaire 12

I.2.4. Les principaux acteurs moléculaires de la morphogenèse vasculaire 13

I.2.4.1. L'hypoxie et le système HIF 13

I.2.4.2. Les principaux systèmes activateurs (Pro-angiogéniques) 14

I.2.4.3. Les principaux systèmes inhibiteurs (Anti-angiogéniques) 16

I.2.5. Angiogenèse tumorale et cascade métastatique 17

I.2.5.1. Le « switch » angiogénique et la croissance tumorale 17

I.2.5.2. Anomalies structurales et dissémination métastatique 18

I.2.6. Interactions dynamiques avec le microenvironnement tumoral.....18

I.2.7. L'approche antivasculaire globale : Stratégies anti-angiogéniques et agents de rupture (VDA) 19

I.2.7.1. Les thérapies anti-angiogéniques : blocage des voies de signalisation 20

I.2.7.2. Les agents de rupture vasculaire (VDA) : une destruction ciblée 21

I.2.7.3. Limites cliniques et approches combinées.....22

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

II.1. Historique du modèle expérimental de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) 24

II.2. Structure et composition anatomo-physiologique de l'œuf.....24

II.3. Structure histologique de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) 26

II.4.Cinétique de développement et chronologie ontogénique de la CAM 27

II.5. Fonctions biologiques et homéostasiques de la CAM 28

II.6. Applications translationnelles du modèle CAM 29

II.7. Avantages et limites méthodologiques du modèle CAM 30

I.3.7.1. Avantages majeurs du modèle 30

I.3.7.2. Limites intrinsèques et verrous techniques 31

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

III.1. Évolution Historique : de l'Empirisme Phytothérapique à la Phytopharmacologie Moléculaire 34

III.2. Concepts fondamentaux et régulation de la phytothérapie 35

III.3. Description des plantes étudiées 36

III.3.1. Thym (*Thymus vulgaris L.*) 36

III.3.1.1. Description botanique et contextuelle 36

III.3.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle 37

III.3.1.3. Classification 38

III.3.1.4. Les propriétés pharmacologiques 38

III.3.2.Mentha spicata 39

III.3.2.1.Description 39

III.3.2. ***Mentha spicata L***. (Menthe verte) 39

III.3.2.1. Description botanique et contextuelle 40

III.3.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle 40

III.3.2.3. Classification taxonomique 41

III.3.2.4. Propriétés pharmacologiques 42

III.3.3. *Bunium incrassatum* (Talghouda).....43

III.3.3.1. Description botanique et contextuelle.....43

III.3.3.2. Compositions chimiques 44

III.3.3.3. Classification taxonomique 45

III.3.3.4. Propriétés pharmacologiques et potentiel thérapeutique.....46

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV .1.Matières végétales 49

IV .1.2-Estimation du rendement et de la concentration des extraits 53

IV .1.3-Préparation des solutions mères et des dilutions.....54

IV .1.4.Préparation des solutions témoins (négatif et positif).....54

IV .2.Test in ovo.....55

IV .2.1. Approvisionnement et traçabilité des œufs.....55

IV .2.2. Conditions d'incubation.....55

IV .2.3. Fenestration de la coquille et détachement de la membrane chorioallantoïdienne (CAM).....56

Chapitre V :Résultats et discussion

V.1. Résultats et discussion 62

V.1.1. Rendements d'extraction et standardisation des concentrations 62

V.1.1. 1. Influence de la polarité du solvant sur l'efficacité d'élution 63

V.1.2. Caractérisation macroscopique : Caractères organoleptiques et stabilité physique de la phase liquide 64

V.2. Exploration des effets des trois extraits sur les vaisseaux sanguins de la membrane chorioallantoidenne (CAM Assay).....67

V.2. 1. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de la fosbrétabuline (témoin positif).....69

V.2. 2. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de la PBS/Eau physiologique (témoin négatif).....70

V.2. 3. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de l'extrait hydroalcoolique de *Mentha spicata L.*.....71

V.2. 4. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de l'extrait hydroalcoolique de *Thymus vulgaris L.* 72

V.2. 5. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de l'extrait hydroalcoolique de *Buniumincrassatum (Batt.) Batt. &Trab.* 74

Conclusion 78

Références bibliographiques..... 83

Liste des abréviations

AVT : Anti-Vascular Therapy

CA4P :Combretastatin A-4 Phosphate (Fosbretabulin)

CAF : Cancer-Associated Fibroblast

CAM Assay : Chorioallantoic Membrane Assay

CD36 : Cluster of Differentiation 36

CME : Concentration Minimale Efficace

Df : Dimension Fractale

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

FAK : Focal Adhesion Kinase

FAK : Focal Adhesion Kinase

HGF/c-Met : Hepatocyte Growth Factor / Mesenchymal-Epithelial Transition Factor

IC50 : Inhibitory Concentration 50%

IFN-α : Interféron Alpha

IFN-β : Interféron Bêta

IL-8 : Interleukine 8

ITK : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase

MMP-2 : Matrix Metalloproteinase-2

NK : Natural Killer Cell

PBS : Phosphate Buffered Saline

PDGFR-α : Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha

PDGFR-β : Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta

PDX : Patient-Derived Xenograft

PDX : Patient-Derived Xenografts

ROCK : Rho-associated Protein Kinase

TSP-1 : Thrombospondine-1

VDA : Vascular Disrupting Agent

VE-cadhérine : Vascular Endothelial Cadherin

VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor A

VLD : Vascular Length Density

Votrient® : Pazopanib

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Composition moyenne de l'œuf(en % poids) (Gilbert, 1971).....26

Tableau 02: Classification taxonomique de *Thymus vulgaris L*. (Djedir, 2018). 38

Tableau 03 : Composition chimique majeure de l'huile essentielle de *Mentha spicata L*. (Boukhebti et al., 2011). 41

Tableau 04 : Classification taxonomique de *Mentha spicata L*. (Mahendran et al., 2021) .42

Tableau 05 : Classification taxonomique de *Bunium incrassatum* (Quézel & Santa, 1963). 45

Tableau 06 :Rendements d'extraction et concentrations des solutions mères des extraits végétaux 62

Tableau 07 : Caractéristiques organoleptiques et physiques des extraits hydroéthanoliques de Thymus vulgaris, Mentha spicata et Bunium incrassatum. 66

Liste des figures :

Figure 01 : Représentation schématique de la structure du système vasculaire (Castan, 2014). 4

Figure 02: structure des vaisseaux sanguins (Mescher, 2010). 6

Figure 03: Vaisseau lymphatique mature (Phil, 2014). 7

Figure 04: La vasculogenèse (Risau et Flamme, 1995). 8

Figure 05: Les trois types d'endothélium: continu, fenêtré et discontinu. La largeur des flèches vertes indique schématiquement le flux de solutés et de molécules (Aird, 2007). . 10

Figure 06: les mécanismes de l'angiogenèse (Pettersson et al., 2000) 11

Figure 07: La régulation de HIF-1a dans les conditions d'hypoxie et de normoxie (Zhou et al,2019). 14

Figure 08: famille des protéines VEGFs et leurs récepteurs (Tenet, 2016).....14

Figure 09: facteur de croissance dérivé des plaquettes (Aquaportail, n.d.). 15

Figure 10: Le modèle structurel de la molécule de FGF-1, facteur de croissance des fibroblastes (Aquaportail, n.d.). 15

Figure 11: Structure et fonction biologique de HGF((Nakamura &Mizumo, 2010). 16

Figure 12 : Comparaison de la vasculature normale et tumorale(Azzi & Gavard, 2014). .18

Figure 13: Interactions entre la tumeur et son environnement (Fridman&Sautès-Fridman, 2014). 19

Figure 14: Approche antivasculaire globale 19

Figure 15: blocage des voies de signalisation du VEGF par les anticorps ciblant le ligand(ResearchGate, n.d.) 21

Figure 16: Coupe longitudinale dans un œuf de poule (DELARUE, 2005).....25

Figure 17: Développement de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) (lignes rouges) à différents stades: (A) ED 5, couverture initiale; (B) ED 8, demi-couverture; (C) ED 12 et (D) ED 18, couverture complète de l'embryon de poulet.(Chen et al., 2021).....28

Figure 18 : *Thymus vulgaris L* (Echappées sauvages, 2011) 37

Figure 19 : Structures chimiques du carvacrol et du thymol (Noman et al., 2025). 38

Figure 20 : Morphologie macroscopique de *Mentha spicata L*. (Source : Cliché personnel / Prise de vue expérimentale). 41

Figure 21 : Les fleurs et les tubercules de *Bunium incrassatum* « Talghouda» (Chentouh, et al, 2018). 44

Figure 22 : Poudres des trois plantes 49

Figure 23 : Différentes étapes de préparation de l'extrait hydroalcoolique de *Bunium incrassatum , Mentha spicata L ,* ***Thymus vulgaris L*** 51

Figure 24 : Différentes étapes de préparation de l'extrait aqueux de menthe.....52

Figure 25: Désinfection des œufs 55

Figure 26 : Marquage des œufs 55

Figure 27 :Incubation des œufs 56

Figure 28 :Mirage pour vérifier la fécondité des œufs 56

Figure 29 :Détermination de la chambre d'air 57

Figure 30 : Prélèvement de l'Albumenair.....57

Figure 31: Ouverture d'une fenêtre 58

Figure 32: recouvrir les œufs 58

Figure 33:Réincubation des oufes in ovo 58

Figure 34 :Application sur la membrane chorioallantoïque (CAM) au centre de l'anneau polymérique 59

Figure 35: Pourcentage de rendement d'extraction des extrait aqueux et hydroéthanolique 70% de Thymus vulgaris *Mentha spicata L et Bunium incrassatum* L.....63

Figure 36 : Extraits hydroalcooliques ; a) *Thymus vulgaris L.* ;b)*Mentha spicata L.* ;c)*Bunium incrassatum* (Batt.) Batt. &Trab.....65

Figure 37 : Vaisseaux du sac vitellin sous stéréomicroscope à 20X.....67

Figure 38:Vaisseaux sanguins de la CAM sous stéréomicroscope 40X 67

Figure 39:CAM Témoin à J8, culture in ovo. 68

Figure 40 : CAM Témoin à J14, in ovo.....68

Figure 41: observation des vaisseaux primaires, secondaires et tertiaires sous stéréomicroscope 20X. 69

Figure42 : Effet antivasculaire de la fosbrétabuline (témoin positif).....69

Figure 43 : Neutralité parfaite du sérum salé tamponné au phosphate (PBS). A)avant d'appliquer le PBS ; B) 3 heures après.....71

Figure 44: Action de l'extrait hydroalcoolique de *Mentha spicata L.* ; A) avant l'application de 20µL à 10mg/mL ; B) 7 heures après l'application.....72

Figure 45: Action de l'extrait hydroalcoolique de Thymus vulgarisL. ; A) avant l'application de 20µL à 10mg/mL ; B) 3 heures après l'application.....73

Figure 46: Action de l'extrait hydroalcoolique de Bunium incrassatum (Batt.) Batt. & Trab.; A) avant l'application de 20µL à 10mg/mL ; B) 8 heures après l'application. 75

Introduction

La vascularisation tumorale demeure l'un des piliers fondamentaux de la progression néoplasique, de la transition métastatique et de l'échappement thérapeutique (Folkman, 1971 ; Hanahan & Weinberg, 2011). Alors que les stratégies anti-angiogéniques conventionnelles ciblent principalement la formation de nouveaux bourgeons capillaires via l'inhibition de la voie du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Sherazi et al., 2026), les Agents Perturbateurs Vasculaires (VDA - Vascular Disrupting Agents) visent l'occlusion et la destruction sélective du réseau microvasculaire tumoral préexistant (Dong et al., 2026). Ce mécanisme d'action repose fréquemment sur la dépolymérisation des microtubules endothéliaux au niveau du site de liaison de la colchicine, induisant un effondrement cytosquelettique rapide, une augmentation drastique de la perméabilité vasculaire, et une cascade thrombotique menant à la nécrose centrale de la masse tumorale (Kamal et al., 2026).

Dans cette optique, La recherche de nouvelles entités chimiothérapeutiques, issues de matrices végétales et qui sont capables de reproduire les effets des VDA, constitue un axe majeur de la pharmacognosie moléculaire et de l'oncologie translationnelle. Parmi les substance qui sont considérées des VDAs, la Fosbretabuline (Combretastatin A-4 Phosphate, CA4P) sert de molécule de référence internationale pour valider l'activité de désorganisation vasculaire pour les nouvelles molécules (Kitowski et al., 2026).

L'évaluation phénotypique à haute fidélité d'extraits végétaux complexes nécessite des modèles biologiques validés respectant les contraintes éthiques de la pharmacologie moderne (López, 2026). Le modèle *in ovo* de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet (*Gallus gallus*) s'impose comme une alternative translationnelle majeure entre les essais cellulaires *in vitro* et les modèles mammifères *in vivo*. La CAM offre une architecture vasculaire extra-embryonnaire dense, hautement perméable, permettant le criblage non invasif de molécules vasoactives (Cymer et al., 2026).

La biodiversité de la flore algérienne recèle des chimiotypes riches en métabolites secondaires doués de propriétés biologiques hétérogènes (Bousetla et al., 2015). Cette étude se focalise sur trois matrices végétales distinctes sélectionnées pour leur potentiel phytochimique :

- ***Thymus vulgaris L.*** (Lamiaceae), reconnu pour sa richesse en phénols monotérpéniques doués de propriétés cytotoxiques sélectives et d'impacts directs sur l'intégrité membranaire endothéliale (Asadian, 2026 ; Ammari et al., 2026).
- ***Mentha spicata L.*** (Lamiaceae), caractérisée par une fraction polyphénolique et terpénique capable d'interférer avec les voies de signalisation de la survie cellulaire (Tafrihi et al., 2021).
- ***Bunium incrassatum* (Batt.) Batt. & Trab.** (Apiaceae), localement désignée sous le nom de **Talghouda**, dont les tubercules renferment des coumarines, des stérols et des composés phénoliques à forte activité anti-inflammatoire et antioxydante (Amraoui et al., 2024; Bousetla et al., 2015).

L'objectif central de ce mémoire est de caractériser, de comparer et de quantifier les effets vasculaires macroscopiques et microscopiques de ces trois extraits hydroalcooliques vis-à-vis du réseau vasculaire de la CAM, en utilisant la Fosbretabuline (CA4P, pureté à 98%) comme témoin positif d'effondrement endothélial.

Ainsi, 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 antivasculaires, 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 des l'extraits des trois plantes sélectionnées.

Chapitre I :

Système vasculaire : fonctions physiologiques et implications pathologiques

I.1. Généralités sur Le système vasculaire

Le système vasculaire humain est un réseau complexe d'artères, de capillaires et de veines, dont la fonction primordiale est d'assurer le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Ce réseau vasculaire assure le transport des nutriments essentiels et des micro-éléments (tels que les vitamines et les minéraux), soutient la croissance ainsi que le développement tissulaire, et prend en charge l'épuration des déchets métaboliques cellulaires. Au sens large, l'appareil circulatoire se subdivise en deux composantes interconnectées : le système cardiovasculaire — constitué du cœur, des vaisseaux sanguins et du sang — et le système lymphatique.

pour accomplir leurs rôles physiologiques variés, les vaisseaux partagent une organisation histologique commune articulée autour de trois couches distinctes appelées « tuniques » (*tunica intima, tunica media* et *tunica adventitia*). Ils présentent néanmoins des divergences cellulaires et fonctionnelles subtiles mais marquées, adaptées aux exigences spécifiques des organes qu'ils irriguent (Pugsley & Tabrizchi, 2000).

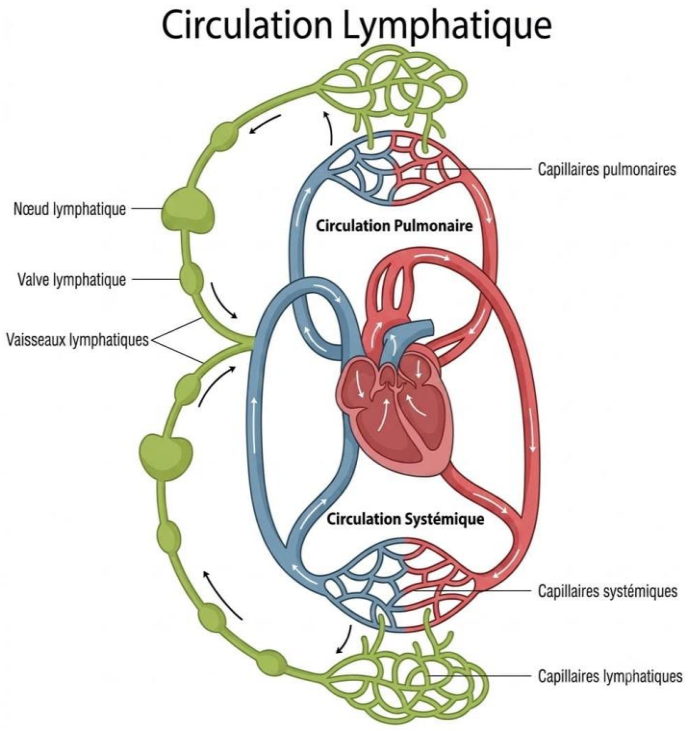


Figure 01 : Représentation schématique de la structure du système vasculaire (Castan, 2014).

I.1.1. Structure et fonction des vaisseaux sanguins

I.1.1.1. Les artères

Les artères sont des vaisseaux sanguins qui transportent le sang du cœur vers les organes périphériques. Elles participent activement à la distribution de l'oxygène et au maintien de la pression artérielle systémique par le biais des mécanismes de vasoconstriction et de vasodilatation (Standring, 2021 ; Hall, 2021). Leur paroi, à la fois épaisse et élastique, est structurellement adaptée pour résister à des régimes de pression hydrostatique élevés ; elle se compose de trois tuniques concentriques : l'*intima*, la *média* et l'*adventice* (Waugh & Grant, 2010). Sur le plan morphologique, on distingue classiquement les artères élastiques, les artères musculaires et les artérioles, ces dernières régulant la distribution progressive du flux sanguin vers le lit capillaire (Marieb & Hoehn, 2007).

I.1.1.2. Les veines

À l'inverse des artères, les veines se caractérisent par une paroi plus mince et hautement distensible, une propriété structurelle liée à une proportion réduite de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques au niveau de leur média. Leur lumière est jalonnée de valvules conjonctivo-endothéliales antiretour qui orientent le flux de manière unidirectionnelle, orchestrant ainsi efficacement le retour du sang désoxygéné des différents tissus vers le compartiment cardiaque droit (Silverthorn, 2010)

I.1.1.3. Les capillaires

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins et assurent les échanges entre le sang et les tissus. Leur répartition varie selon l'activité métabolique des organes : les muscles, le foie et les reins possèdent un réseau capillaire dense, contrairement aux tissus moins actifs. Le flux sanguin capillaire est régulé par les artérioles grâce aux cellules musculaires lisses (Hall & Hall, 2021).

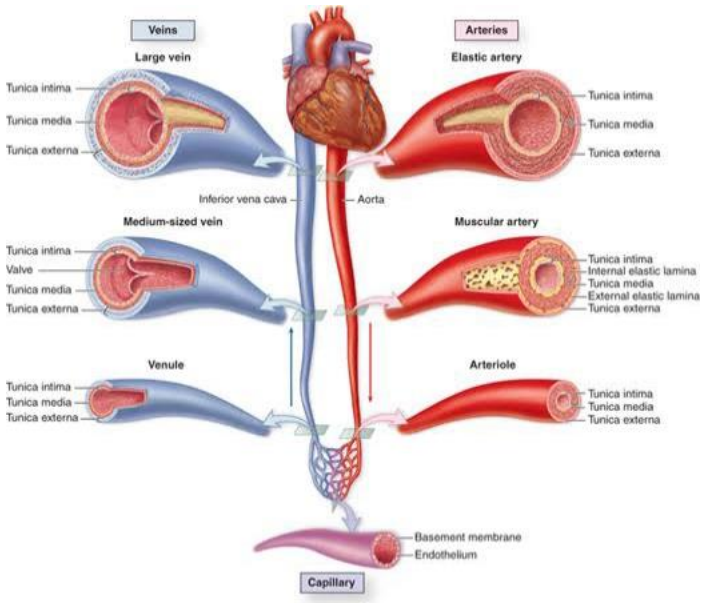


Figure 02: structure des vaisseaux sanguins (Mescher, 2010).

I.1.2. Le système lymphatique

Le système lymphatique joue un rôle fondamental dans le maintien de l'équilibre hydrique et de l'immunité à travers un réseau dense de capillaires borgnes et de vaisseaux fins. Sa fonction première est de drainer le surplus de liquide interstitiel ainsi que les protéines intercellulaires afin de les restituer au compartiment vasculaire, prévenant ainsi activement la formation d'œdèmes. Ce flux lymphatique s'effectue de façon strictement unidirectionnelle, transitant par les ganglions (ou nœuds) lymphatiques avant de rejoindre la circulation veineuse systémique (Guyton & Hall, 2016).

En tant qu'acteur clé de l'homéostasie liquidienne et tissulaire, le réseau lymphatique se distingue par une haute perméabilité structurelle. Cette porosité, nettement supérieure à celle des capillaires sanguins, facilite le transport des macromolécules et le trafic des cellules immunitaires vers les ganglions pour y orchestrer la réponse adaptative. Néanmoins, cette barrière hautement permissive est fréquemment détournée en oncologie : le réseau lymphatique devient alors une voie préférentielle de dissémination pour les cellules tumorales, favorisant ainsi le développement des métastases ganglionnaires et à distance (Swartz & Lund, 2012).

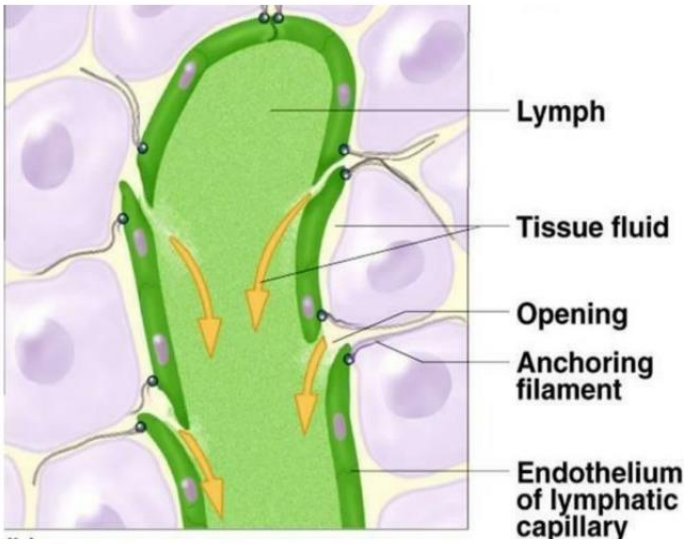


Figure 03: Vaisseau lymphatique mature (Phil, 2014).

I.2. Ontogenèse et dynamique du développement vasculaire

Au cours de l'embryogenèse, l'appareil vasculaire constitue le tout premier système d'organes à devenir fonctionnel. Il remplit d'emblée une fonction vitale en assurant la distribution de l'oxygène, l'apport des éléments nutritifs essentiels et la régulation homéostatique des tissus en pleine croissance (Carmeliet, 2005).

Ce vaste réseau de conduits est structurellement tapissé par une assise monocellulaire de cellules endothéliales. Le déploiement de cette arborescence se déroule selon une séquence chronologique hautement orchestrée, combinant deux processus biologiques distincts et complémentaires : la vasculogenèse, caractérisée par la différenciation initiale et *de novo* de progéniteurs (angioblastes) en cellules endothéliales, et l'angiogenèse, qui prend le relais en assurant l'expansion et la complexification du réseau primitif par le biais du bourgeonnement ou de la division (intussusception) de vaisseaux préexistants (Potente et al., 2011).

I.2.1. Vasculogenèse embryonnaire et post-natale

Le concept de « vasculogenèse », introduit par Risau et ses collaborateurs, définit la formation *de novo* du réseau vasculaire primitif chez l'embryon (Risau & Lemmon, 1988 ; Patan, 2004). Ce processus s'amorce précocement après la gastrulation, lorsque des cellules souches mésodermiques bipotentes — les hémangioblastes — s'agrègent pour former les îlots sanguins de Wolff et Pander (Risau & Lemmon, 1988). Au sein de ces structures, une

ségrégation cellulaire stricte s'opère en deux lignées distinctes : les cellules souches hématopoïétiques se regroupent au centre, tandis que les angioblastes se positionnent à la périphérie. Ces derniers se différencient ensuite en cellules endothéliales matures qui s'organisent pour délimiter la lumière des premiers vaisseaux (Risau & Flamme, 1995).

Sur le plan moléculaire, ce programme morphogénétique est finement orchestré par le facteur de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et ses récepteurs tyrosines kinases (Shalaby et al., 1995). Les études d'invalidation génique (*knock-out*) ont mis en évidence la complémentarité de ces récepteurs : l'absence de VEGFR2 (Flk-1) bloque précocement la différenciation initiale des îlots primaires, tandis que l'invalidation de VEGFR1 (Flt-1) permet cette différenciation mais perturbe l'assemblage structural et l'organisation fonctionnelle du réseau vasculaire ((Shalaby et al., 1995).

Bien que longtemps considérée comme exclusivement embryonnaire, la vasculogenèse persiste chez l'adulte sous une forme dite post-natale, soutenue par les cellules progénitrices endothéliales (EPC, *Endothelial Progenitor Cells*) résidant dans la moelle osseuse (Asahara et al., 1997 ; (Rafii & Lyden, 2003). En contexte pathologique, notamment tumoral, la sécrétion locale de cytokines et de chimiokines telles que le VEGF et le SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor-1*) induit la mobilisation et le recrutement de ces EPC circulantes. Ces progéniteurs migrent alors vers le site tumoral et s'intègrent directement à la paroi des néovaisseaux, contribuant ainsi activement à la néovascularisation et à la progression tumorale (Janic & Arbab, 2010).

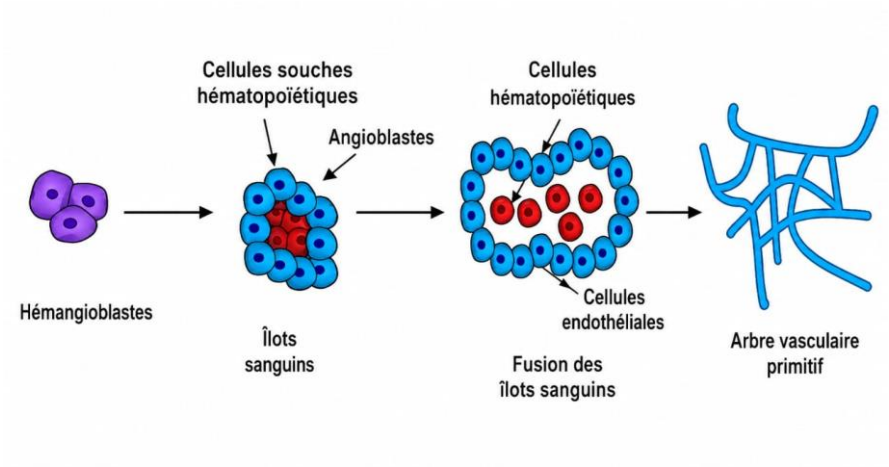


Figure 04: La vasculogenèse (Risau et Flamme, 1995).

I.2.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse se définit comme le processus biologique par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment exclusivement à partir d'un réseau vasculaire préexistant, principalement par bourgeonnement (*sprouting*) ou division par intussusception(Risau, 1997). En somme, alors que la vasculogenèse pose les fondations du système circulatoire primitif, l'angiogenèse prend le relais pour assurer l'expansion, le remodelage et la complexification de cette arborescence initiale (Augustin & Koh2024).

I.2.3. L'endothélium vasculaire : structure, fonctions et hétérogénéité

Les cellules endothéliales (CE), d'origine mésodermique, sont des cellules aplaties et polygonales qui tapissent l'intérieur de l'ensemble de l'arbre vasculaire, des vaisseaux lymphatiques ainsi que des cavités cardiaques (Aird, 2007). Elles s'organisent en une monocouche cohésive — l'endothélium — qui constitue une interface dynamique majeure entre le compartiment circulant (sang ou lymphe) et les tissus sous-jacents.

Au niveau de la microcirculation, et plus particulièrement des capillaires, ces cellules s'amincissent considérablement pour optimiser les échanges gazeux et métaboliques. Cet endothélium agit comme une barrière semi-perméable hautement sélective, dont la cohésion et la perméabilité paracellulaire sont rigoureusement contrôlées par des complexes jonctionnels spécialisés, notamment les jonctions serrées (*tight junctions*) et les jonctions d'ancrage ou adhérentes (Bazzoni & Dejana, 2004 ; Lacolley et al., 2007). De plus, les CE sont douées d'une grande plasticité mécanosensible : soumises aux forces de cisaillement du flux sanguin (*shear stress*), elles se remodèlent, s'allongent et s'alignent dynamiquement dans le sens de la circulation (Lacolley et al., 2007).

Selon les contraintes physiologiques des organes irrigués et le degré de perméabilité requis, l'endothélium adopte trois phénotypes structuraux distincts (Aird, 2007) :

- L'endothélium continu : caractérisé par des jonctions étanches et une lame basale ininterrompue, limitant strictement le passage des macromolécules (ex. : système nerveux central, peau, poumons).
- L'endothélium fenêtré : perforé de pores microscopiques (fenestrations) facilitant des flux d'échange élevés (ex. : glomérules rénaux, glandes endocrines, villosités intestinales).

- L'endothélium discontinu ou sinusoïdal : présentant de larges ouvertures intercellulaires et une lame basale discontinue, permettant le passage direct de cellules et de grosses protéines (ex. : foie, rate, moelle osseuse).

Loin d'être une simple barrière passive, l'endothélium se comporte comme un véritable organe endocrine et paracrine, indispensable au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Il régule activement la perfusion sanguine, la balance thrombose/fibrinolyse et le recrutement leucocytaire lors des réactions inflammatoires (Lerman & Burnett, 1992 ; Esper et al., 2006).

Pour ajuster le tonus vasculaire, il sécrète de nombreux facteurs vasoactifs. Il produit notamment des agents vasodilatateurs majeurs tels que l'oxyde nitrique endothélial (NO ou eNO), la prostacycline (PGI_2) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Godo & Shimokawa, 2017). qui s'opposent aux facteurs vasoconstricteurs. Enfin, cette plasticité métabolique et sécrétoire confère à la cellule endothéliale un rôle pivot lors de l'angiogenèse : en réponse à des stimuli hypoxiques ou angiogéniques, l'endothélium quiescent transite vers un phénotype activé, amorçant la dégradation de sa matrice et le bourgeonnement de nouveaux conduits vasculaires.

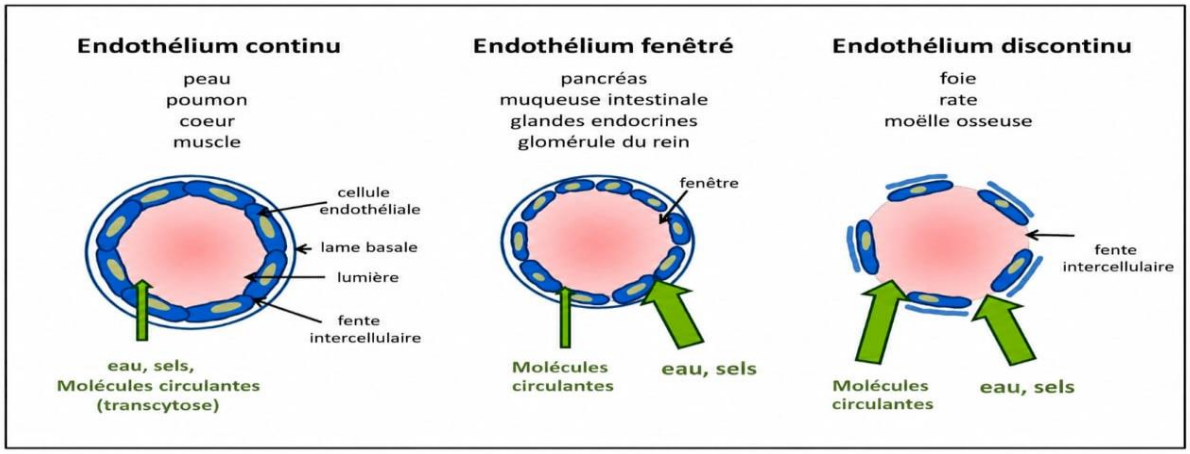


Figure 05: Les trois types d'endothélium: continu, fenêtré et discontinu. La largeur des flèches vertes indique schématiquement le flux de solutés et de molécules (Aird, 2007).

I.2.2.3. Les mécanismes de l'angiogenèse

Le contrôle de la dynamique angiogénique repose sur un équilibre biochimique rigoureux, communément appelé « balance angiogénique ». En conditions physiologiques normales, ce phénomène est transitoire, hautement localisé et coordonné (cicatrisation, angiogenèse ovarienne ou placentaire) (Olsson et al., 2006). Il est régulé par l'équilibre strict

entre des facteurs pro-angiogéniques (tels que le FGF, le PlGF ou l'Angiopoïétine-2) qui stimulent l'activation endothéliale, et des inhibiteurs endogènes anti-angiogéniques (comme l'endostatine ou l'interféron-alpha) qui maintiennent la quiescence vasculaire (Folkman, 2007).

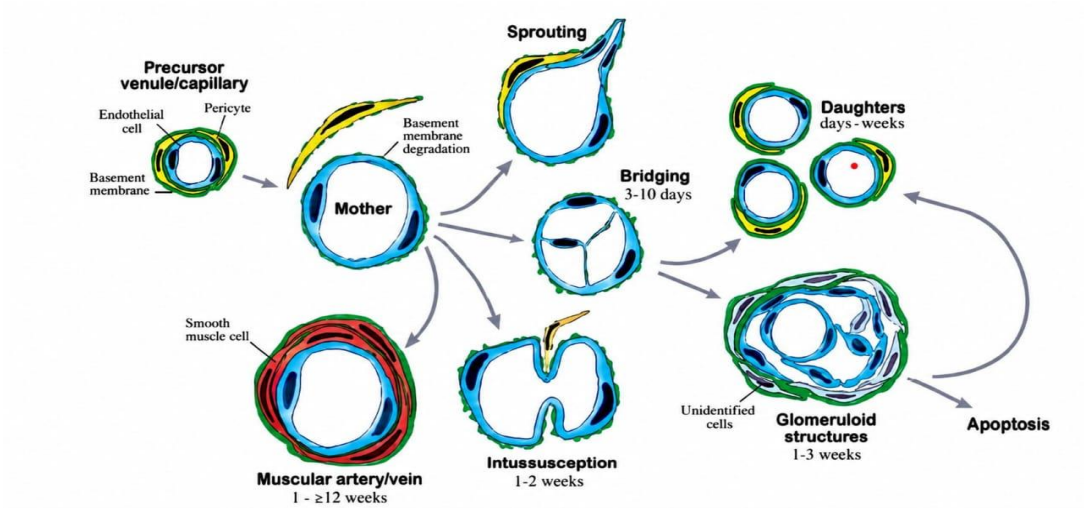


Figure 06: les mécanismes de l'angiogenèse (Pettersson et al., 2000) .

Lorsque les signaux pro-angiogéniques prédominent, l'expansion et la complexification du réseau vasculaire s'opèrent selon trois modalités cellulaires distinctes et interconnectées (Potente et al., 2011) :

I.2.3.1. L'angiogenèse par bourgeonnement (*Sprouting*)

Le bourgeonnement est le mécanisme classique de formation capillaire par migration dirigée. Il se déroule selon une séquence chronologique hautement stéréotypée :

- **Activation et déstabilisation :** Sous l'action d'un gradient du facteur de croissance VEGF, les cellules endothéliales (CE) sortent de leur état quiescent. La matrice extracellulaire et la membrane basale sont localement dégradées, tandis que les péricytes se détachent pour libérer la paroi (Gerhardt et al., 2003 ; Carmeliet & Jain,2011).

- **Ségrégation phénotypique (Tip/Stalk) :** La croissance du nouveau vaisseau est menée par une cellule de front unique, la cellule de tête (*tip cell*). Non prolifération et dotée de nombreux filopodes, elle capte les gradients de chimioattraction et guide le bourgeon. En arrière, les cellules de soutien (*stalk cells*) prolifèrent activement sous le contrôle de la voie Notch pour allonger le néovaisseau et initier la formation de la

lumière vasculaire (Gerhardt et al., 2003 ; Adams & Alitalo, 2007 ; Siekmann et al., 2008).

- **Anastomose et maturation :** Lorsque deux bourgeons adjacents se rencontrent, ils fusionnent par anastomose pour établir une continuité luminale et initier la perfusion sanguine (Carmeliet & Jain,2011). Le nouveau vaisseau se stabilise ensuite par l'arrêt de la prolifération, la reformation de la membrane basale et le recrutement de péricytes matures (Carmeliet, 2000 ; Jain,2003).

I.2.3.2. L'angiogenèse par intussusception (*Splitting*)

Contrairement au bourgeonnement, l'angiogenèse par intussusception consiste en un clivage longitudinal interne d'un vaisseau existant, un processus rapide qui ne requiert qu'une prolifération endothéliale minimale (Mentzer & Konerding, 2014).

- **Formation du pilier :** Le mécanisme s'amorce par la protrusion des parois endothéliales opposées à l'intérieur de la lumière vasculaire, créant une zone de contact qui fusionne pour former un pilier transluminal central.

- **Consolidation matricielle :** Ce cœur cellulaire est rapidement envahi et renforcé par des myofibroblastes, des péricytes et des composants de la matrice extracellulaire (Gianni-Barrera et al., 2013).

- **Clivage et expansion :** Sous l'influence des forces hydrodynamiques du flux sanguin, ce pilier perforant s'allonge et s'amincit progressivement jusqu'à scinder le vaisseau d'origine en deux conduits vasculaires fonctionnels et distincts (Kurz et al., 2003). Ce mode est particulièrement exploité pour l'expansion vasculaire rapide au sein des tumeurs solides.

I.2.3.3. La co-optation vasculaire

La co-optation constitue un mécanisme d'échappement et d'adaptation non angiogénique, principalement observé en contexte oncologique.

- **Détournement du réseau de l'hôte :** Au lieu d'induire la formation de *néovaisseaux,* les cellules tumorales hautement invasives migrent le long des structures vasculaires préexistantes de l'organe hôte pour s'en approprier la perfusion (Voutouri et al., 2019).

- **Infiltration parenchymateuse** : Ce mode de progression prédomine dans les tissus physiologiquement très vascularisés tels que le parenchyme cérébral, hépatique ou pulmonaire. Il permet à la tumeur de proliférer à bas bruit en s'affranchissant des contraintes de la néovascularisation classique, favorisant une infiltration agressive et l'émergence précoce de processus métastatiques (Donnem et al., 2013 ; Delgado-Bellido et al., 2023).

I.2.4. Les principaux acteurs moléculaires de la morphogenèse vasculaire

La balance angiogénique est contrôlée par une cascade de signaux moléculaires, activée en amont par des stimuli environnementaux et relayée par des systèmes de ligands/récepteurs spécifiques.

I.2.4.1. L'hypoxie et le système HIF

L'hypoxie — déséquilibre entre l'apport et la demande tissulaire en oxygène — est le principal déclencheur de l'angiogenèse (Bracken et al., 2006). La réponse cellulaire adaptative repose sur le facteur de transcription hétérodimerique HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*), composé d'une sous-unité constitutive (HIF-1β) et d'une sous-unité sensible à l'oxygène (HIF-1α) (Semenza, 2003).

- **En normoxie :** HIF-1α est continuellement hydroxylée et rapidement dégradée par la voie du protéasome.
- **En hypoxie :** HIF-1α se stabilise, s'associe à HIF-1β et translocque dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles pro-angiogéniques, un mécanisme capital lors du remodelage tissulaire physiologique ou de la croissance tumorale ((Jaakkola et al., 2001) ; Bracken et al., 2006).

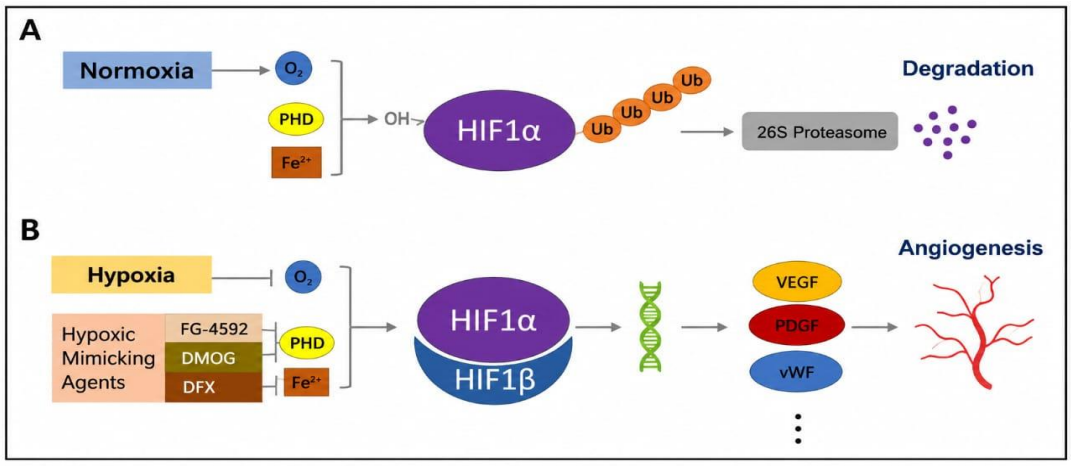


Figure 07: La régulation de HIF-1a dans les conditions d'hypoxie et de normoxie (Zhou et al,2019).

I.2.4.2. Les principaux systèmes activateurs (Pro-angiogéniques)

- **Le système VEGF/VEGFR :** Chef de file de la néovascularisation et de la lymphangiogenèse (Shibuya, 2011). Le VEGF-A est le ligand majeur induisant la prolifération, la migration endothéliale et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Ses signaux sont principalement relayés par le récepteur à activité tyrosine kinase VEGFR-2, tandis que le VEGFR-1 module les réponses inflammatoires et tumorales. En oncologie, son activation excessive en fait la cible prioritaire des thérapies anti-angiogéniques (ex. : Bevacizumab, inhibiteurs de tyrosine kinase).

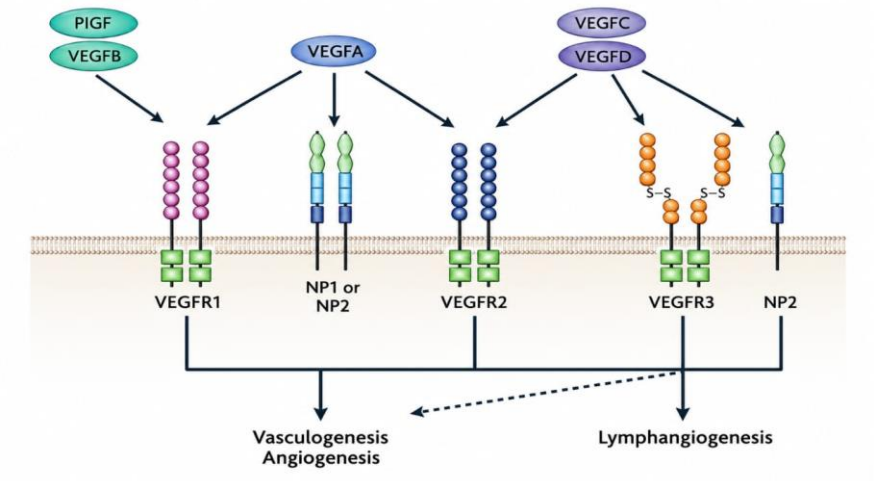


Figure 08: famille des protéines VEGFs et leurs récepteurs (Tenet, 2016).

- **Le système PDGF/PDGFR :** Acteur essentiel de la maturation et de la stabilisation des néovaisseaux (Raica & Cimpean, 2010). Les isoformes de PDGF (A, B, C, D) se

lient à leurs récepteurs tyrosines kinases (PDGFR-α et β) pour orchestrer le recrutement des péricytes et des cellules stromales périvasculaires. En contexte malin, l'axe PDGF/PDGFR favorise l'invasion tumorale par des boucles autocrines/paracrines, constituant une cible pour les inhibiteurs de tyrosines kinases comme l'imatinib, le sunitinib ou le sorafénib.

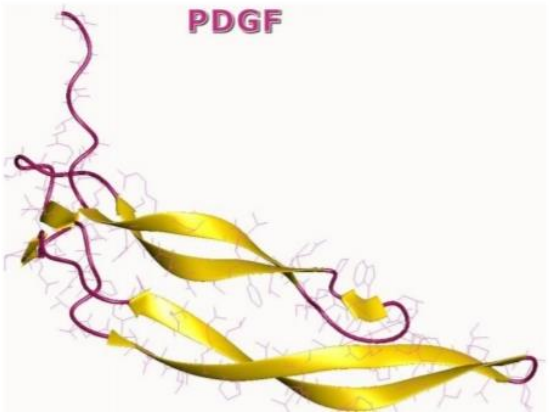


Figure 09: facteur de croissance dérivé des plaquettes (Aquaportail, n.d.).

- **Le système FGF/FGFR :** Une famille de plus de vingt protéines pléiotropes ayant une forte affinité pour l'héparine (Ornitz & Itoh, 2015). Le b-FGF (FGF2), synthétisé par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages, se distingue comme un puissant mitogène et médiateur de la néovascularisation (Presta et al., 2005). Ses signaux sont relayés par les récepteurs FGFR à architecture tripartite (domaines extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique catalytique) (Turner & Grose, 2010 ; Babina & Turner, 2017).

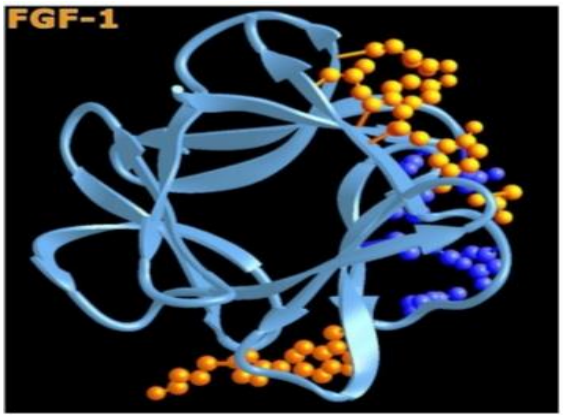


Figure 10: Le modèle structurel de la molécule de FGF-1, facteur de croissance des fibroblastes (Aquaportail, n.d.).

- **Le système HGF/c-Met :** Sécrété par les cellules stromales, le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) stimule la prolifération, la motilité, la morphogenèse et l'angiogenèse (Nakamura & Mizuno, 2010). Bien qu'initialement décrit comme un mitogène hépatique, l'HGF exerce paradoxalement un effet cytotoxique sur certaines lignées tumorales spécifiques, notamment l'hépatome.

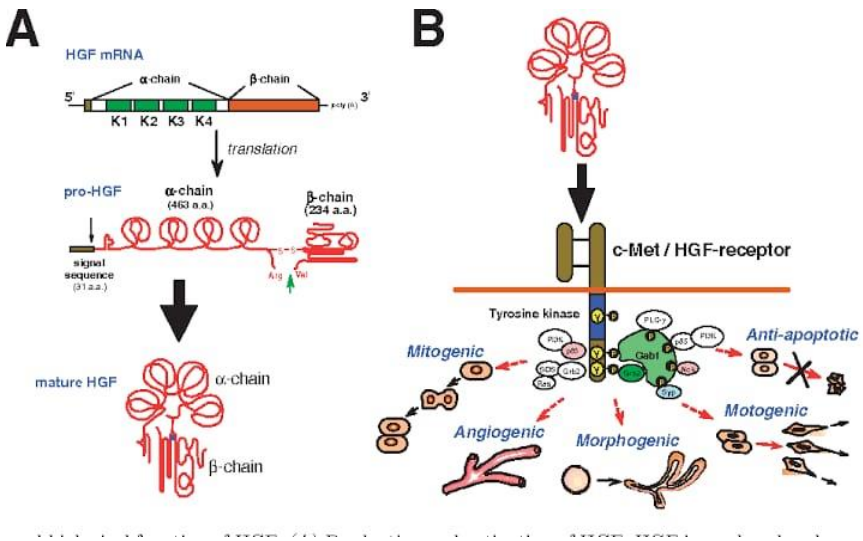


Figure 11: Structure et fonction biologique de HGF((Nakamura &Mizumo, 2010).

I.2.4.3. Les principaux systèmes inhibiteurs (Anti-angiogéniques)

Les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse sont des molécules chargées de maintenir la quiescence vasculaire en conditions physiologiques ou de freiner activement la néovascularisation lors du rétablissement de l'homéostasie. Ils agissent en bloquant les voies de signalisation des facteurs pro-angiogéniques ou en induisant directement l'apoptose des cellules endothéliales activées.

- **L'endostatine :** Fragment protéolytique de 20kDa issu du clivage du collagène XVIII de la membrane basale (O'Reilly et al., 1997). C'est l'un des inhibiteurs les plus puissants du stroma. Elle bloque la migration et la prolifération des cellules endothéliales induites par le VEGF et le b-FGF, favorise leur apoptose et inhibe les métalloprotéases de la matrice (MMP), empêchant ainsi la dégradation matricielle nécessaire au bourgeonnement (Kalluri, 2003).

- **L'angiostatine :** Fragment interne issu du clivage enzymatique du plasminogène, composé des quatre premiers domaines "kringle" (O'Reilly et al., 1994). L'angiostatine inhibe de manière ciblée la prolifération des cellules endothéliales et bloque leur

migration en perturbant l'organisation de leur cytosquelette de fentine. Elle interagit également avec l'ATP synthase de surface des cellules endothéliales pour induire un stress métabolique (Moser et al., 1999).

- **La thrombospondine-1 (TSP-1) :** Glycoprotéine de la matrice extracellulaire et premier inhibiteur endogène de l'angiogenèse découvert (Good et al., 1990). La TSP-1 se lie au récepteur CD36 exprimé par les cellules endothéliales activées, ce qui déclenche une cascade de signalisation menant à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. De plus, elle séquestre directement le VEGF-A, le rendant indisponible pour le VEGFR-2 (Jimenez et al., 2000).

- **Les interférons (IFN-α et IFN-β) :** Cytokines pléiotropes principalement connues pour leurs fonctions antivirales et immunomodulatrices, mais douées de puissantes propriétés angiostatiques (Folkman, 2007). L'**IFN-α et IFN-β**régule négativement l'expression de facteurs de croissance majeurs comme le b-FGF et l'interleukine-8 (IL-8) par les cellules tumorales, et ralentit le cycle réplicatif des cellules endothéliales en phase de mitose (Slaton et al., 1999).

I.2.5. Angiogenèse tumorale et cascade métastatique

I.2.5.1. Le « switch » angiogénique et la croissance tumorale

Initialement, une masse tumorale en développement est dépourvue de vascularisation propre et dépend exclusivement de la diffusion passive des gaz et des nutriments. Sa croissance reste alors limitée à un volume critique de 1 à 2 mm^3 (Hanahan & Weinberg, 2011 ; Folkman, 1971). Au-delà de ce seuil, le cœur de la tumeur entre en hypoxie sévère, ce qui stabilise le facteur de transcription HIF-1α et déclenche l'expression massive de médiateurs pro-angiogéniques, principalement le VEGF (Semenza, 2003 ; Carmeliet & Jain, 2000). Ce basculement métabolique, appelé « switch angiogénique », rompt l'équilibre de la balance vasculaire et active l'angiogenèse tumorale (Hanahan & Weinberg, 2011).

La néovascularisation s'opère alors selon une séquence stéréotypée : les métalloprotéinases matricielles (MMPs) dégradent localement la membrane basale des vaisseaux de l'hôte, permettant l'activation, la prolifération et la migration des cellules endothéliales vers le gradient tumoral afin de structurer de nouveaux capillaires (Carmeliet, 2005).

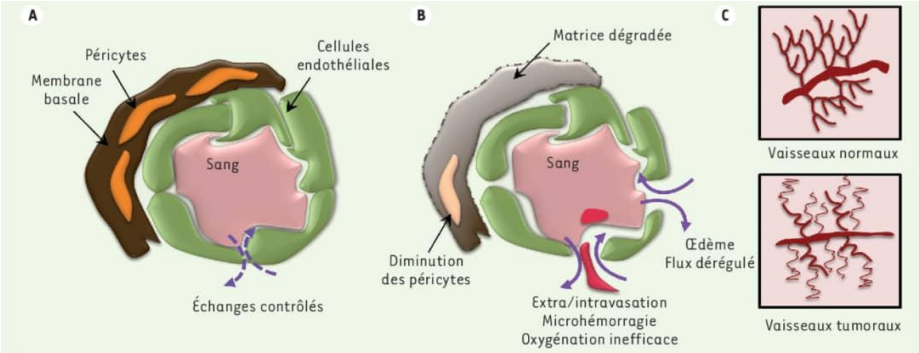


Figure 12 : Comparaison de la vasculature normale et tumorale(Azzi & Gavard, 2014).

I.2.5.2. Anomalies structurales et dissémination métastatique

Contrairement aux réseaux physiologiques, l'arbre vasculaire tumoral est entretenu par une sécrétion anarchique et continue de VEGF. Les néovaisseaux ainsi formés présentent d'importantes anomalies morphologiques et fonctionnelles (Jain, 2005) **:**

- **Une architecture aberrante :** les vaisseaux sont sinueux, dilatés, interconnectés de manière chaotique et dépourvus de la couverture continue en péricytes qui assure normalement leur stabilité.
- **Une hyperperméabilité marquée :** l'endothélium présente des jonctions lâches et de larges fenestrations, ce qui entraîne des fuites plasmatiques massives, augmente la pression interstitielle tumorale et perturbe localement le flux sanguin.

Cette porosité structurale extrême lève la barrière endothéliale et crée des brèches que les cellules malignes exploitent pour s'intravaser directement dans la circulation sanguine (Jain, 2005 ; Kerbel, 2008). Portées par le flux vers des organes distants, ces cellules tumorales circulantes s'extravasent, s'implantent et colonisent de nouveaux parenchymes pour former des métastases (Hanahan & Weinberg, 2011). L'angiogenèse constitue ainsi le pivot central liant la croissance de la tumeur primaire à sa dissémination systémique (Kerbel, 2008).

I.2.6. Interactions dynamiques avec le microenvironnement tumoral

La progression tumorale et le succès de la cascade métastatique ne dépendent pas uniquement des mutations intrinsèques des cellules cancéreuses, mais sont profondément dictés par un dialogue réciproque avec le microenvironnement tumoral (MET) (Hanahan, 2022).

Les cellules malignes altèrent et reprogramment activement le stroma environnant pour le convertir en un complexe de soutien histologique (Gabrilovich et al., 2012 ; Lin et al., 2019) :

- **Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) :** les cellules myéloïdes suppressives (G-MDSC) et les macrophages associés aux tumeurs (TAM) infiltrent la lésion et sécrètent des facteurs solubles de croissance et de motilité (TGF-β, HGF, EGF). Ces signaux induisent la TEM, conférant aux cellules tumorales un phénotype invasif et migratoire (Gabrilovich et al., 2012 ; Lin et al., 2019) .

- **Échappement immunitaire et angiogenèse :** bien que les lymphocytes T infiltrants tentent initialement d'orchestrer une réponse cytotoxique, leur action est neutralisée par un climat immunosuppresseur. Au sein de ce stroma, les macrophages de phénotype M2, les neutrophiles et les fibroblastes associés au cancer (CAF) coopèrent pour stimuler l'invasion locale et pérenniser l'angiogenèse via la libération entretenue de VEGF (De Palma et al., 2017).

Ce soutien se prolonge au-delà de la tumeur primaire. Dans le compartiment vasculaire, les plaquettes s'agrègent autour des cellules tumorales circulantes, formant un bouclier biologique qui les protège des forces de cisaillement hydrodynamiques et des cellules NK (Lambert et al., 2017). Parallèlement, la sécrétion systémique de facteurs pro-inflammatoires et de vésicules extracellulaires par la tumeur primitive modifie à distance le stroma d'organes cibles (poumons, os), préparant des « niches pré-métastatiques » propices à leur future colonisation (Lambert et al., 2017).

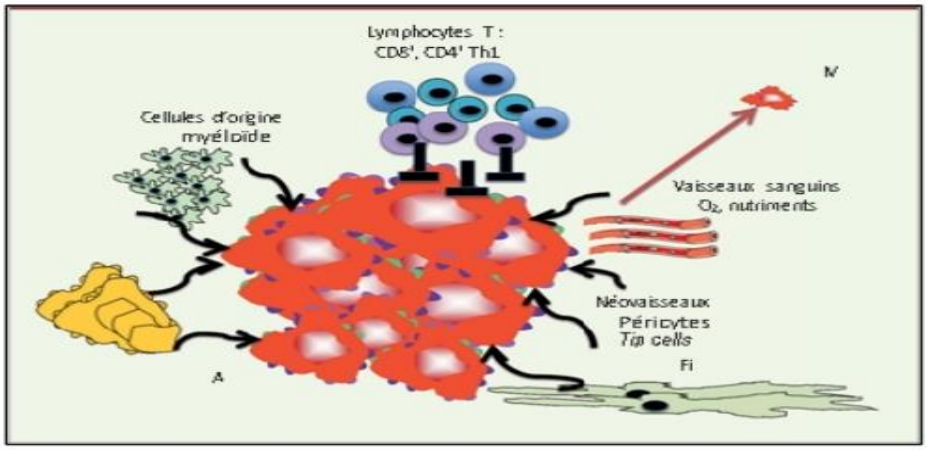


Figure 13: Interactions entre la tumeur et son environnement (Fridman&Sautès-Fridman, 2014).

I.2.7. L'approche antivasculaire globale : Stratégies anti-angiogéniques et agents de rupture (VDA)

Les stratégies thérapeutiques ciblant le réseau sanguin tumoral se divisent aujourd'hui en deux axes complémentaires : les thérapies anti-angiogéniques, qui préviennent la formation de nouveaux capillaires, et les agents de rupture vasculaire (VDA, *Vascular Disrupting Agents*), qui ciblent et détruisent la néovascularisation tumorale déjà établie. L'objectif commun reste de priver la tumeur d'oxygène et de nutriments afin d'induire l'apoptose et la nécrose des cellules cancéreuses (Rüegg, 2002 ; Bennis et al., 2010).

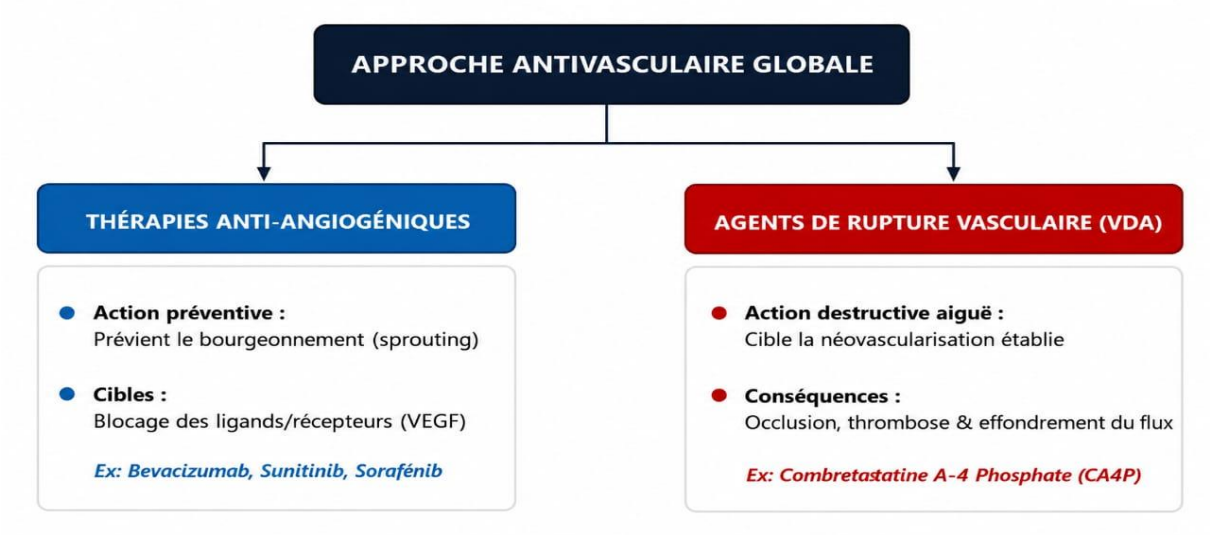


Figure 14: Approche antivasculaire globale

I.2.7.1. Les thérapies anti-angiogéniques : blocage des voies de signalisation

Cette approche s'appuie sur un large éventail de molécules, d'origine naturelle ou synthétique, destinées à inhiber les facteurs de croissance du microenvironnement (Szekanecz et al., 2010).

- **Inhibiteurs directs de la voie VEGF/VEGFR :** L'axe VEGF/VEGFR constitue la cible prioritaire pour freiner la vascularisation anormale (Yadav et al., 2015). Le **Bevacizumab** (Avastin®) agit comme un anticorps monoclonal qui séquestre le VEGF-A circulant, l'empêchant de se lier à ses récepteurs (Ferrara et al., 2004). D'autres molécules pièges, à l'instar du **Zaltrap®** (Aflibercept), ciblent également cette signalisation pour réduire l'irrigation tumorale et optimiser l'efficacité des chimiothérapies cytotoxiques associées (Yadav et al., 2015).

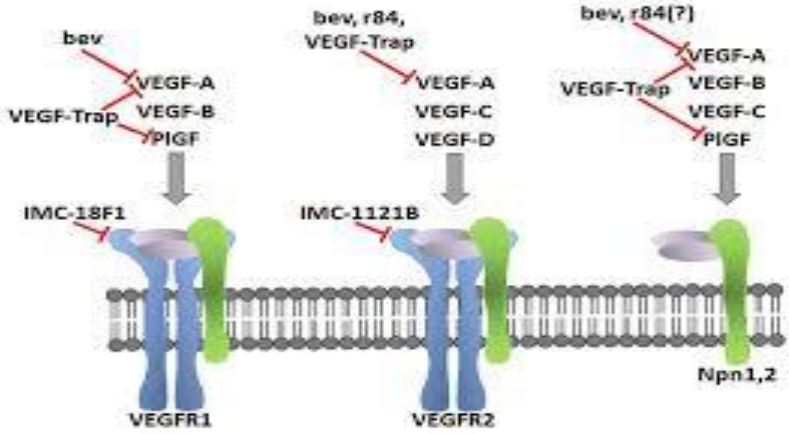


Figure 15: blocage des voies de signalisation du VEGF par les anticorps ciblant le ligand(ResearchGate, n.d.) .

- **Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK) multi-cibles :** Plutôt que de bloquer un seul ligand, ces petites molécules orales s'infiltrent dans le domaine catalytique cytoplasmique de plusieurs récepteurs simultanément pour paralyser la néoangiogenèse et la survie cellulaire :

    - **Le Sorafénib :** Inhibiteur multikinase bloquant VEGFR et PDGFR, ainsi que les kinases de la lignée Raf. Il réprime en outre FLT3, c-KIT et RET, freinant de concert la prolifération maligne et la formation des vaisseaux (Wilhelm et al., 2008).

    - **Le Sunitinib :** Cible préférentiellement VEGFR, PDGFR et c-Kit, bloquant l'expansion endothéliale et le recrutement périvasculaire. Son usage est particulièrement validé dans le carcinome rénal métastatique et les GIST (Heng & Kollmannsberger, 2009).

    - **Le Pazopanib (Votrient®) :** ITK à large spectre ciblant VEGFR, PDGFR et c-Kit. Il altère profondément la viabilité du microenvironnement tumoral, asphyxiant la masse tumorale en bloquant l'apport logistique en nutriments (Sleijfer et al., 2009).

I.2.7.2. Les agents de rupture vasculaire (VDA) : une destruction ciblée

Contrairement aux anti-angiogéniques qui exigent un traitement chronique pour maintenir la quiescence vasculaire, les **VDA** se caractérisent par une action aiguë et rapide. En ciblant la fragilité structurelle intrinsèque des néovaisseaux tumoraux (endothélium

désorganisé, jonctions lâches, absence de péricytes matures), les VDA provoquent un remodelage brutal du cytosquelette des cellules endothéliales (souvent via la dépolymérisation des microtubules). (Tozer et al., 2005).

Cette altération morphologique entraîne un gonflement cellulaire, l'occlusion instantanée de la lumière du vaisseau, la formation de thrombi locaux et un effondrement complet du flux sanguin intratumoral en quelques heures, conduisant à une nécrose massive du cœur de la tumeur. (Siemann, 2011; Kanthou & Tozer, .2002).

I.2.7.3. Limites cliniques et approches combinées

Bien que l'efficacité initiale de l'arsenal antivasculaire soit démontrée, l'utilisation exclusive d'anti-angiogéniques se heurte fréquemment à des résistances adaptatives (upregulation d'autres voies comme le FGF ou l'HGF) ou à une hypoxie accrue favorisant le rebond métastatique (Rüegg, 2002). C'est pourquoi l'avenir thérapeutique réside dans la **combinaison synergique** : l'administration conjointe d'anti-angiogéniques (qui normalisent transitoirement le réseau pour améliorer la perfusion des molécules thérapeutiques) ou de VDA avec les chimiothérapies et radiothérapies conventionnelles (Rüegg, 2002 ; Yadav et al., 2015).

Chapitre II :

L'expérimentation sur la membrane chorioallantoïdienne(CAM Assay)

II.1. Historique du modèle expérimental de la membrane chorioallantoïdienne (CAM)

L'utilisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) comme modèle expérimental *in vivo* remonte au début du XXe siècle. En 1911, Rous et Murphy ont démontré pour la première fois la faisabilité de greffer des tissus tumoraux sur la CAM, posant ainsi les jalons de l'oncologie expérimentale sur modèle aviaire.

Au cours des années 1930, le modèle a été principalement exploité comme milieu de culture et d'étude pour les agents viraux, contribuant de manière significative à l'essor de la virologie quantitative. C'est à partir des années 1970, sous l'impulsion des travaux sur la biologie vasculaire, que la CAM est devenue un outil incontournable dans l'étude de l'angiogenèse. La densité et la croissance rapide de son réseau capillaire superficiel offraient en effet un lit vasculaire idéal pour observer et quantifier directement la néovascularisation.

Aujourd'hui, l'essai CAM est largement standardisé et appliqué en biologie cellulaire, en oncologie et en bio-ingénierie (Nowak-Sliwinska et al., 2014). Il constitue un modèle de choix pour évaluer l'interaction des biomatériaux avec les tissus vivants, caractériser le potentiel invasif des xénogreffes tumorales, et screener des molécules à activité pro-angiogénique ou anti-angiogénique / antivasculaire (Nowak-Sliwinska et al., 2014).

II.2. Structure et composition anatomo-physiologique de l'œuf

L'œuf de poule (*Gallus gallus*) est une structure biologique hautement spécialisée, constituée de cinq compartiments histologiques et fonctionnels distincts. Leur compartimentation s'organise de manière concentrique, reflétant la chronologie de leur dépôt successif le long du tractus oviductal, de l'intérieur vers l'extérieur **(Figure 15)** :

- Le vitellus (ou jaune d'œuf) : Correspondant initialement à l'ovocyte proprement dit, il constitue une réserve énergétique majeure, riche en lipoprotéines, en lécithines et en facteurs de croissance indispensables au développement embryonnaire précoce.
- L'albumen (ou blanc d'œuf) : Compartiment aqueux principalement synthétisé dans le magnum. Divisé en fractions fluides et denses (chalcazifères), il est composé à plus de 10% de protéines fonctionnelles (telles que l'ovalbumine, l'ovotransferrine et le lysozyme) qui assurent une double fonction : une protection antimicrobienne mécanique/chimique et un apport hydrique et azoté à l'embryon.

- La membrane coquillière interne : Fine couche glycoprotéique acellulaire déposée dans l'isthme, limitant directement l'albumen et jouant un rôle de barrière physique contre les invasions pathogènes.

- La membrane coquillière externe : Accolée à la paroi interne de la coquille calcaire, elle délimite avec la membrane interne — au niveau du gros pôle de l'œuf — la chambre à air (ou cellule à air) qui se forme par choc thermique après la ponte et participe aux premiers échanges gazeux lors du déclenchement de la respiration pulmonaire de l'embryon.

- La coquille calcaire : Structure minérale rigide poreuse, biocomposite et hautement vascularisée en périphérie lors du développement de la CAM. Principalement composée de carbonate de calcium ($CaCO_3$) sous forme de cristaux de calcite ancrés sur une matrice organique, elle assure la protection mécanique de l'œuf tout en régulant les flux de vapeur d'eau et d'échanges gazeux (O_2 / CO_2) indispensables à l'homéostasie de l'embryon.

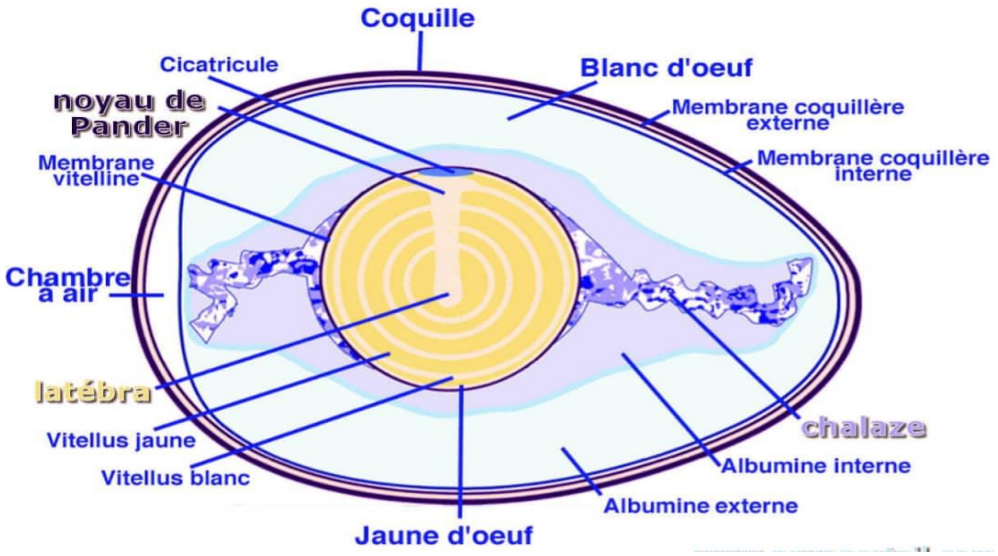


Figure 16: Coupe longitudinale dans un œuf de poule (DELARUE, 2005).

L'œuf renferme une importante diversité de nutriments essentiels. Il est composé principalement d'eau, ainsi que de protéines, de lipides, de vitamines et de minéraux. La répartition moyenne de ces constituants en pourcentage(%) du poids est présentée dans le tableau ci-dessous (Gilbert, 1971).

Tableau 01 : Composition moyenne de l'œuf(en % poids) (Gilbert, 1971).

	Coquille	**Albumen**	**Vitellus**
Eau	**1**	**88.5**	**47 .5**
Protéines	**4**	**10.5**	**17 .5**
Lipides	**/**	**/**	**33.0**
Glucides	**/**	**0.5**	**0.2**
Minéraux	**95**	**0.5**	**1.1**
Autres	**/**	**/**	**0.8**

II.3. Structure histologique de la membrane chorioallantoïdienne (CAM)

La membrane chorioallantoïdienne (CAM) présente une organisation histologique trilaminaire spécifique, stabilisée au cours du développement embryonnaire après la fusion des feuillets mésodermiques du chorion et de l'allantoïde (Romanoff, 1960). De l'extérieur vers l'intérieur, sa structure se décompose en trois compartiments distincts (Romanoff, 1960) :

- L’épithélium chorionique (ectoderme) : Constituant la barrière externe de la CAM, cette assise cellulaire est située au contact direct de la membrane coquillière interne. Elle joue un rôle physiologique majeur dans le transport actif du calcium provenant de la coquille calcaire pour assurer la minéralisation du squelette embryonnaire, ainsi que dans la régulation des échanges gazeux respiratoires.

- Le mésenchyme intermédiaire (mésoderme) : Zone centrale particulièrement épaisse, elle est composée d'un tissu conjonctif lâche qui abrite un réseau vasculaire et lymphatique extrêmement dense et complexe (Ausprunk et al., 1974 ; Ribatti, 2025). C'est au sein de ce compartiment stroma-vasculaire que se déploie la cascade angiogénique, caractérisée par une différenciation et une maturation rapide des artérioles, des veinules et d'un plexus capillaire superficiel interconnecté.

- L’épithélium allantoïque (endoderme) : Bordant la face interne de la CAM, cette fine couche de cellules monostratifiées délimite la cavité allantoïque (Halgrain, 2023). Elle

participe activement à l'homéostasie hydro-électrolytique de l'embryon et au stockage des déchets azotés (acide urique) au cours de l'incubation.

II.4.Cinétique de développement et chronologie ontogénique de la CAM

Le développement de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) est un processus ontogénique hautement coordonné et rapide, s'étendant sur les deux tiers de l'incubation embryonnaire. Sa mise en place s'articule selon une chronologie rigoureuse, traditionnellement segmentée en plusieurs phases clés (Romanoff, 1960) :

- Initiation et fusion (EDD 4 - EDD 5) : L'ontogenèse de la CAM s'amorce dès le 4ème jour d'incubation embryonné (*Embryonic Development Day 4*, EDD 4). Elle est initiée par l'évagination de la vésicule allantoïdienne à partir de l'intestin postérieur, qui progresse dans l'espace extra-embryonnaire jusqu'à entrer en contact avec le chorion ectodermique (Romanoff, 1960).

- Expansion et colonisation spatiale (EDD 5 - EDD 10) : Entre le 5ème et le 10ème jour, la fusion des mésodermes respectifs de ces deux feuillets fonctionnels permet l'extension latérale de la CAM. Animée par une pression interne croissante, la membrane progresse de manière centrifuge pour finir par tapisser la quasi-totalité de la surface interne de la membrane coquillière (Vargas et al., 2007).

- Paroxysme angiogénique (EDD 10 - EDD 14) : Cette phase est caractérisée par une prolifération vasculaire d'une intensité exceptionnelle. L'angiogenèse active, initialement dominée par le bourgeonnement endothélial (*sprouting*), bascule progressivement vers un mode d'angiogenèse non-bourgeonnante ou par intussusception (clivage luminal), atteignant son paroxysme entre le 10ème et le 14ème jour (Ausprunk et al., 1974 ; Ribatti, 2025). C'est durant cette fenêtre temporelle que le réseau devient le plus sensible aux stimuli pro- ou anti-angiogéniques externes.

- Maturation et différenciation (EDD 15 - EDD 21) : Aux alentours du 15ème jour, la prolifération endothéliale s'atténue fortement au profit d'une phase de remodelage et de maturation structurelle. La densité du plexus capillaire se stabilise, les vaisseaux acquièrent leur couverture périvasculaire (péricytes et cellules musculaires lisses) et le réseau reste fonctionnel et mature jusqu'aux phases finales de l'embryogenèse, précédant immédiatement l'éclosion (Halgrain, 2023).

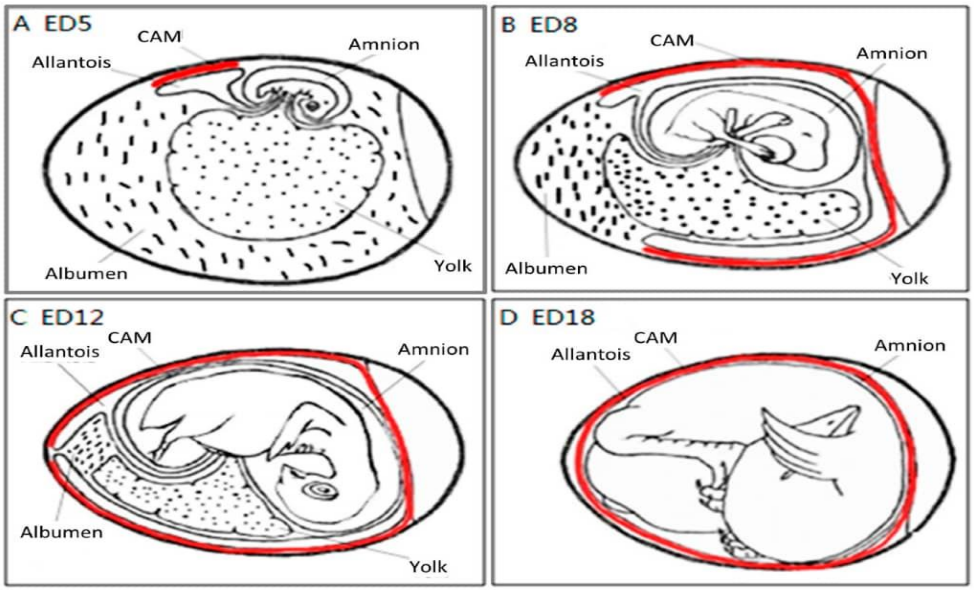


Figure 17: Développement de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) (lignes rouges) à différents stades: (A) ED 5, couverture initiale; (B) ED 8, demi-couverture; (C) ED 12 et (D) ED 18, couverture complète de l'embryon de poulet.(Chen et al., 2021).

II.5. Fonctions biologiques et homéostasiques de la CAM

La membrane chorioallantoïdienne (CAM) constitue une structure extra-embryonnaire temporaire hautement vascularisée, indispensable à la survie et au développement métabolique des amniotes ovipares, en particulier chez les oiseaux et les reptiles (Ribatti, 2016 ; Gabrielli & Accili, 2010). Outre son architecture vasculaire unique, la CAM déploie une activité plurifonctionnelle complexe structurée autour de quatre axes physiologiques majeurs :

- La fonction respiratoire et d'échanges gazeux : Morphologiquement accolée à la face interne de la membrane coquillière, la CAM s'établit dès le 5ème jour d'incubation embryonnaire (EDD 5) comme le poumon d'élection de l'embryon. Elle prend en charge l'intégralité des flux d'oxygène (O_2) et de dioxyde de carbone (CO2) par diffusion passive à travers les pores de la coquille calcaire, maintenant ce rôle respiratoire vital jusqu'au déclenchement de la respiration pulmonaire active au 19ème jour (EDD 19) (Nowak-Sliwinska et al., 2014).

- Le métabolisme phosphocalcique et la minéralisation osseuse : L'épithélium chorionique externe induit une dégradation enzymatique ménagée et un transport actif du calcium structurel issu de la coquille calcaire. Ce flux dynamique, hautement performant, atteint environ 100 nmol . $h^{-1}.cm^{-2}$ de surface membranaire, fournissant

ainsi plus de 80 % des ions calcium requis pour la minéralisation et l'ostéogenèse du squelette embryonnaire (Ribatti, 2016).

- La régulation hydro-électrolytique et l'équilibre acido-basique : La CAM intervient activement dans le transport ionique transépithélial du sodium (Na^+) et du chlorure (Cl^-) à partir du compartiment allantoïque, qui fait office de réservoir pour les déchets urinaires. Parallèlement, la densité et la disposition de son réseau capillaire mésodermique lui permettent de moduler finement la pression partielle des gaz sanguins, régulant ainsi de manière dynamique l'homéostasie acido-basique systémique de l'embryon (Ribatti, 2016).

- La fonction de barrière sélective et d'excrétion : L'épithélium allantoïque d'origine endodermique agit comme une interface sélective étanche. Il assure un contrôle rigoureux de la réabsorption de l'eau et des électrolytes essentiels, participant à la gestion des déchets azotés (principalement l'acide urique) tout en protégeant l'embryon contre l'exposition ou la diffusion systémique de substances potentiellement délétères ou xénobiotiques (Gabrielli & Accili, 2010).

II.6. Applications translationnelles du modèle CAM

En raison de sa versatilité, de son accessibilité et de ses propriétés biologiques uniques, le modèle de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) est intensément exploité à travers plusieurs axes majeurs de la recherche biomédicale et translationnelle :

- Évaluation préclinique de la dynamique vasculaire (Angiogenèse et VDA) : La CAM constitue une plateforme de screening préclinique *in vivo* d'élection pour caractériser et quantifier l'activité de molécules pro-angiogéniques, anti-angiogéniques ou d'agents de rupture vasculaire (VDA). Sa topographie bidimensionnelle se prête idéalement à la stéréomicroscopie à haute résolution, à l'analyse morphométrique du réseau par segmentation computationnelle et au suivi dynamique de la perfusion capillaire après exposition à des xénobiotiques, des principes actifs ou des extraits naturels complexes (Kennedy et al., 2022).

- Oncologie translationnelle et modélisation tumorale (Xénogreffes) : L'immunodéficience naturelle de l'embryon de poulet durant les deux premières semaines d'incubation permet la transplantation et la xénogreffe directe de lignées cellulaires cancéreuses ou de fragments biopsiques tumoraux (modèles PDX –

Patient-Derived Xenografts). Ce système d'une grande plasticité facilite le monitoring en temps réel de la tumorigenèse, du pouvoir invasif stroma-vasculaire, de la cascade métastatique (intra- et extravasation) ainsi que le criblage à haut débit de molécules chimiothérapeutiques et de thérapies ciblées (Deryugina & Quigley, 2008; Ribatti, 2023).

- Bio-ingénierie et biocompatibilité des biomatériaux : Le stroma mésodermique est largement utilisé pour étudier la biocompatibilité, l'intégration tissulaire et le potentiel inducteur (ou inhibiteur) de néovascularisation de divers dispositifs médicaux et biomatériaux innovants (hydrogels, matrices poreuses synthétiques ou polymères biosourcés) avant leur transfert sur des modèles mammifères plus lourds (Ribatti, 2017).

- Applications émergentes en oncologie et médecine vétérinaire comparée : Bien que l'essai CAM demeure historiquement centré sur la recherche humaine, son application s'étend désormais avec succès à la médecine vétérinaire. Le modèle est de plus en plus documenté pour l'étude des tumeurs spontanées félines et canines, s'affirmant notamment comme une alternative cruciale, rapide et éthique (respectant les principes des 3R) pour modéliser le microenvironnement tumoral et tester de nouvelles approches thérapeutiques ciblées contre des pathologies hautement agressives telles que l'ostéosarcome chez le chien (Walewska et al., 2017).

II.7. Avantages et limites méthodologiques du modèle CAM

L'évaluation critique du modèle de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) met en évidence un équilibre entre de solides atouts opérationnels et des contraintes biologiques intrinsèques qu'il convient de rationaliser pour garantir la transposabilité des résultats précliniques.

I.3.7.1. Avantages majeurs du modèle

- Accessibilité et cinétique de croissance : La CAM offre un réseau vasculaire bidimensionnel superficiel d'une densité exceptionnelle, caractérisé par une angiogenèse active et rapide. Cette configuration géométrique unique permet une observation stéréomicroscopique directe, non invasive et dynamique des remaniements microvasculaires (Ribatti, 2016).

- Immunodéficience naturelle transitoire : Durant les deux premières semaines du développement embryonnaire (jusqu'à EDD 12–14), le système immunitaire adaptatif de l'embryon de poulet est immature (absence de lymphocytes T et B fonctionnels). Cette fenêtre d'immunotolérance constitue un avantage majeur, permettant la xénogreffe de lignées cellulaires tumorales hétérologues ou de biopsies de patients (PDX) sans induction de rejet immunitaire immédiat (Deryugina & Quigley, 2008).

- Simplicité, coût et conformité éthique : Comparativement aux modèles de rongeurs, l'essai CAM se distingue par une mise en œuvre technique simplifiée, un coût d'exploitation minime et une scalabilité élevée pour le criblage à haut débit. De plus, sur le plan éthique, l'utilisation d'embryons avant le stade de perception de la douleur s'inscrit parfaitement dans la règle internationale des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), contournant les lourdes contraintes réglementaires liées à l'expérimentation animale sur mammifères (Kunz et al., 2019).

I.3.7.2. Limites intrinsèques et verrous techniques

- Biais de la réponse inflammatoire aspécifique : La principale limite du modèle réside dans sa propension à développer une réaction inflammatoire locale non spécifique face à des stimuli mécaniques (dispositifs de support, polymères, micro-anneaux) ou à des greffons hétérologues. Cette infiltration leucocytaire tardive peut induire une néovascularisation secondaire d'origine inflammatoire, susceptible d'être interprétée à tort comme une réponse pro-angiogénique spécifique de la substance testée (Ribatti et al., 2001).

- Fenêtre temporelle d'expérimentation restreinte : La durée des protocoles est conditionnée de manière absolue par le cycle d'incubation biologique de l'œuf, limitant la viabilité du système à un maximum de 21 jours. En pratique, la fenêtre utile pour le traitement et l'analyse quantitative ne dépasse guère 5 à 7 jours (généralement entre EDD 7 et EDD 14), excluant l'évaluation des effets thérapeutiques à long terme ou des cinétiques pharmacocinétiques chroniques (Ribatti, 2014).

- Haute sensibilité environnementale : L'homéostasie de l'embryon dépend d'une stabilité stricte des paramètres d'incubation. Des variations même mineures de température, d'hygrométrie ou de pression partielle d'oxygène (O_2) augmentent

drastiquement le taux de mortalité embryonnaire, ce qui exige des infrastructures de régulation hautement rigoureuses (Noiva et al., 2014).

- Divergences phylogénétiques : Bien que les cascades moléculaires fondamentales de l'endothélium soient conservées, le modèle aviaire présente des divergences métaboliques, anatomiques et immunologiques avec la physiologie des mammifères. Ces variations conspécifiques imposent une certaine prudence lors de l'extrapolabilité directe des doses et des mécanismes pharmacologiques à la clinique humaine (Houben et al., 2016).

Chapitre III .

Phytothérapie et activité anti- vasculaire des produits dérivés de plantes

III.1. Évolution Historique : de l'Empirisme Phytothérapique à la Phytopharmacologie Moléculaire

L'usage des matrices végétales à des fins thérapeutiques constitue le socle fondateur de l'arsenal médical mondial. Les premières évidences paléo-ethnopharmacologiques de cette pratique remontent à plus de 60 000 ans, comme l'ont révélé les investigations archéobotaniques menées sur le site préhistorique de la grotte de Shanidar (Irak), témoignant d'une sélection intentionnelle de taxons médicinaux par les populations (Solecki, 1975 ; Lietava, 1992). Durant l'Antiquité, cette approche empirique s'est progressivement codifiée et structurée sous l'impulsion de figures médicales majeures, au premier rang desquelles figure Dioscoride (Ier siècle), dont le traité synoptique *De Materia Medica* a servi de paradigme à la pharmacopée européenne pendant près de quinze siècles (Riddle, 1986).

Loin de rompre avec cet héritage classique, l'âge d'or de la science arabo-musulmane s'est affirmé comme le réceptacle et le vecteur de sa rationalisation. Des érudits d'envergure encyclopédique, tels qu'Avicenne (980-1037), ont consigné et systématisé ces savoirs au sein du célèbre *Canon de la médecine* (*Al-Qanun fi al-Tibb*), tout en propulsant la discipline vers une rigueur technique inédite (Saad et Said, 2011). C'est par le perfectionnement des opérations de génie galénique — notamment l'hydrodistillation et la sublimation — que cette période a marqué la transition historique décisive d'un empirisme naturaliste passif vers une méthodologie d'extraction rigoureuse et reproductible (Saad, 2013). Cette rationalisation des procédés d'obtention des fractions actives constitue le maillon épistémologique indispensable ayant permis, des siècles plus tard, l'essor de la pharmacognosie moléculaire et la validation de nos approches thérapeutiques actuelles (Saad, 2022 ; Yuan et al., 2016).

- Le XIXe siècle a opéré une rupture épistémologique majeure en amorçant la transition vers la pharmacologie moderne, caractérisée par le passage de la drogue végétale brute à la molécule pure. Cet avènement est jalonné par l'isolement pionnier de la morphine en 1804 par Friedrich Sertürner ; en démontrant que ce *« principium somniferum »* possédait des propriétés chimiques de base organique alcaline, Sertürner brisa le dogme de l'exclusivité des acides végétaux et jeta les fondements de la chimie des alcaloïdes (Sertürner, 1817 ; Huxtable et Schwarz, 2001). Cette dynamique fut rapidement consolidée par les travaux de Pelletier et Caventou, qui isolèrent la quinine en 1820, apportant la preuve irréfutable que les propriétés pharmacologiques majeures

d'une matrice végétale sont soustendues par des entités moléculaires chimiquement définies et isolables (Pelletier et Caventou, 1820 ; Huxtable et Schwarz, 2001).

Bien que le XXe siècle ait été dominé par l'essor de la synthèse chimique macromoléculaire et du criblage combinatoire à haut débit, les dernières décennies ont formalisé un renouveau scientifique majeur pour les métabolites secondaires naturels (Newman et Cragg, 2020). Ce revirement a été largement dicté par l'urgence thérapeutique face aux phénomènes d'échappement et de chimiorésistance, notamment en contexte oncologique (Efferth, 2007).

Cette trajectoire pharmacognosique moderne a été solennellement consacrée en 2015 par l'attribution du Prix Nobel de Médecine à Tu Youyou pour la découverte de l'artémisinine, issue des répertoires de la médecine traditionnelle chinoise à partir d'Artemisia annua (Tu, 2011 ; Tu, 2016).

Aujourd'hui, la phytopharmacologie s'intègre pleinement dans l'ère de la médecine de précision. Les investigations contemporaines dépassent le simple constat phénoménologique pour se concentrer sur la caractérisation mécanistique fine et moléculaire de métabolites secondaires de nature polyphénolique, alcaloïdique ou terpénique. Afin de valider scientifiquement le potentiel angio-modulateur de ces composés et de décrypter leurs interactions dynamiques avec le microenvironnement tumoral, la recherche académique s'appuie préférentiellement sur des modèles intégrés in ovo et in vivo robustes. Au premier rang de ces plateformes d'évaluation translationnelle figure l'essai sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet, qui offre un lit vasculaire idoine pour le criblage cinétique et morphométrique de nouvelles molécules anti-angiogéniques ou vasculo-disruptives d'origine naturelle (Ribatti, 2010).

III.2. Concepts fondamentaux et régulation de la phytothérapie

La phytothérapie moderne se définit comme l'utilisation thérapeutique scientifiquement validée de drogues végétales ou de préparations reproductibles qui en dérivent (Bruneton, 2016). Sa spécificité repose sur le concept pharmacologique de *Totum*, qui désigne la matrice intégrale des constituants chimiques naturellement présents dans la plante. L'activité d'un *Totum* ne se résume pas à la somme de ses parties ; elle résulte de synergies moléculaires multi-cibles et de modulations de biodisponibilité, conférant fréquemment un profil d'efficacité optimisé et une incidence d'effets indésirables modérée par

rapport aux principes actifs isolés (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Cette discipline tire sa légitimité internationale de son intégration rigoureuse dans les directives de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2019) et des monographies de l'Agence Européenne des Médicaments (Li et al., 2008), qui imposent des standards stricts de qualité, de sécurité d'emploi et de traçabilité analytique (profils chromatographiques, standardisation en biomarqueurs).

III.3. Description des plantes étudiées

Les plantes aromatiques et médicinales sélectionnées pour cette étude, à savoir le thym (***Thymus vulgaris L***), caractérisé par sa forte prévalence en monoterpènes phénoliques bioactifs tels que le thymol et le carvacrol (Salehi et al., 2018),la menthe verte (*Mentha spicata*), majoritairement corrélée à une abondance en carvone et en dérivés d'acide rosmarinique (Mahboubi, 2021), et la Talgouda (*Bunium bulbocastanum*), structurellement reconnue pour son profil d'intérêt en aldéhydes monoterpéniques et constituants de réserve phénoliques (Khan et al., 2023), témoignent d'une remarquable hétérogénéité et richesse en métabolites secondaires. Ces matrices complexes leur confèrent des propriétés biologiques majeures telles que des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-microbiennes et diurétiques (Atanasov et al., 2021). Au-delà de leurs usages traditionnels documentés dans le traitement des troubles digestifs, urinaires, cardio-vasculaires et respiratoires (Yuan et al., 2016)), la recherche moderne explore activement leurs extraits pour leurs potentialités cytotoxiques, antivasculaires et anti-angiogéniques. Ces investigations contemporaines ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement de stratégies anticancéreuses innovantes, ciblées et s'inscrivant dans le cadre d'un développement biomédical éco-responsable (Nishida et al., 2006).

III.3.1. Thym (*Thymus vulgaris L.*)

III.3.1.1. Description botanique et contextuelle

Le thym (***Thymus vulgaris L.***) désigne un sous-arbrisseau sauvage, ligneux et persistant appartenant à la famille des Lamiacées, se développant préférentiellement dans les écosystèmes secs, arides et ensoleillés des régions méditerranéennes, d'Europe et d'Asie. Atteignant une hauteur moyenne de 40 centimètres, cette plante aromatique présente une croissance buissonnante à la fois verticale et horizontale. Sa morphologie se caractérise par de petites feuilles sessiles gris-vert, opposées et lancéolées, exhalant un parfum aromatique

intense. La floraison, s'étalant de mai à septembre, se manifeste par des inflorescences en grappes de fleurs bilabiées de teinte rose à violette, dont l'odeur caractéristique est principalement corrélée à la biosynthèse de monoterpènes phénoliques volatiles, notamment le thymol (Morales, 2002).



Figure 18 : ***Thymus vulgaris L*** (Echappées sauvages, 2011)

III.3.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle

La caractérisation du profil volatil de l'huile essentielle de ***Thymus vulgaris L***, obtenue par hydrodistillation, est classiquement réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les investigations menées par Abozid (2013) ont mis en évidence un profil de chimiotype à thymol (CT thymol), au sein duquel 30 constituants distincts ont été sélectivement identifiés. Les principes majoritaires identifiés sont le thymol (39,44 %), le *p*-cymène (23,60 %) et le γ-terpinène (12,51 %), suivis de constituants mineurs tels que le lédol (2,24 %) et l'aromadendrène (2,12 %). Ces cinq

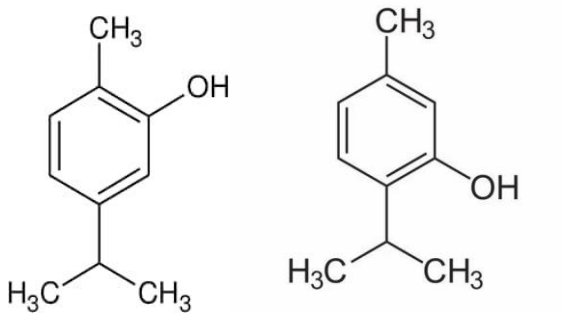
biomolécules représentent à elles seules près de 80 % de la fraction volatile totale de la matrice, conférant à cet extrait son identité phytochimique et ses propriétés biologiques spécifiques.

III.3.1.3. Classification

Tableau 02: Classification taxonomique de *Thymus vulgaris L*. (Djedir, 2018).

Règne	**Plantae (végétal)**
Sous-règne	Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Super-division	Spermatophyta (Plantes à graines)
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Thymus L. (Thym)
Espèce	***Thymus vulgaris L***

III.3.1.4. Les propriétés pharmacologiques



carvacrol **thymol**

Figure 19 : Structures chimiques du carvacrol et du thymol (Noman et al., 2025).

Sur le plan pharmacologique, le thym (***Thymus vulgaris L***.) possède un large spectre d'activités biologiques, attribué principalement à la présence de ses monoterpènes phénoliques majoritaires, le thymol et le carvacrol, ainsi qu'à une fraction diversifiée de flavonoïdes et de composés polyphénoliques (Noman et al., 2025).

En oncologie expérimentale, ces biomolécules exercent une activité antitumorale multidimensionnelle. Elles agissent de manière synergique en inhibant la prolifération des cellules malignes, en bloquant les points de contrôle du cycle cellulaire et en induisant la mort cellulaire programmée par l'activation des voies de signalisation de l'apoptose (Sharifi-Rad et al., 2018). Ces monoterpènes interfèrent de façon ciblée avec les cascades moléculaires régissant la survie et l'échappement des cellules tumorales. Toutefois, comme le soulignent Sampaio et al. (2021), bien que ces propriétés cytotoxiques soient solidement documentées par des screenings *in vitro*, leur transposition thérapeutique nécessite encore des validations rigoureuses au travers d'études cliniques approfondies.

Parallèlement à leur potentiel anticancéreux, les extraits de thym déploient de puissants effets anti-inflammatoires, antispasmodiques et antitussifs, justifiant leur utilisation traditionnelle dans le traitement des affections respiratoires et digestives. Son activité antimicrobienne est particulièrement marquée contre les souches bactériennes Gram-positives. Sur le plan cinétique, l'efficacité de l'huile essentielle est étroitement liée au stade phénologique de la plante : les extraits obtenus au stade de pleine floraison manifestent l'effet inhibiteur le plus puissant, altérant de façon drastique l'activité métabolique et l'intégrité membranaire des pathogènes.

Enfin, ***Thymus vulgaris L*** se distingue par des propriétés antioxydantes majeures, caractérisées par une neutralisation efficace des radicaux libres et une réduction du stress oxydatif intracellulaire. Cette capacité de piégeage radicalaire confère à la plante un effet hépatoprotecteur remarquable, notamment contre la cytotoxicité induite par les aflatoxines. Les métabolites du thym permettent de limiter significativement les lésions histopathologiques au niveau du parenchyme hépatique tout en restaurant les principaux paramètres biochimiques et enzymatiques du foie (Reddy et al., 2014).

III.3.2.Mentha spicata

III.3.2.1.Description

III.3.2. *Mentha spicata L*. (Menthe verte)

III.3.2.1. Description botanique et contextuelle

Mentha spicata L., communément dénommée menthe verte, est une plante herbacée vivace et stolonifère appartenant à la famille des Lamiacées. Elle se caractérise par une croissance rampante assurée par un système de rhizomes hautement développés, lui conférant une capacité de propagation végétative rapide et robuste. Sa hauteur varie généralement entre 30 et 100 centimètres. Elle présente une tige quadrangulaire (tige carrée) érigée, caractéristique morphologique distinctive du genre *Mentha*.

Ses feuilles, d'une longueur comprise entre 5 et 9 centimètres, sont opposées, sessiles ou sub-sessiles, de forme lancéolée à ovale, à bords nettement dentelés, et exhalent un parfum aromatique puissant dû à la forte densité de glandes trichomatiques sécrétrices. L'inflorescence se manifeste sous la forme d'épis terminaux denses, constitués de petites fleurs verticillées de couleur blanche à rose pâle. Dotée d'une remarquable plasticité écologique, *Mentha spicata* manifeste une large adaptabilité vis-à-vis des facteurs édaphiques et s'acclimate favorablement aux climats tempérés, tropicaux et subtropicaux (El Menyiy et al., 2022).

III.3.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *Mentha spicata L.* constitue un métabolite secondaire volatil complexe, synthétisé au niveau des trichomes glandulaires foliaires. Ce fluide hydrophobe est caractérisé par une forte hétérogénéité moléculaire, dont la variabilité quantitative et qualitative dépend étroitement des facteurs génétiques, des conditions environnementales (stress hydrique, nature du sol) et du stade phénologique de la plante lors de la récolte (Lawrence, 2007). Les analyses chromatographiques de référence (GC-MS) mettent en évidence la prédominance de monoterpènes oxygénés spécifiques.

Tableau 03 : Composition chimique majeure de l'huile essentielle de *Mentha spicata L.* (Boukhebti et al., 2011).

Constituants chimiques	Pourcentage (%)	Famille chimique
Carvone	59,40 %	Monoterpène oxygéné (Cétone)
Limonène	6,12 %	Monoterpène hydrocarboné
Germacrène D	4,66 %	Sesquiterpène hydrocarboné
β-Caryophyllène	2,97 %	Sesquiterpène hydrocarboné
β-Bourbonène	2,80 %	Sesquiterpène
α-Terpinéol	1,99 %	Monoterpène alcool
Terpinène-4-ol	1,12 %	Monoterpène alcool



Figure 20 : Morphologie macroscopique de *Mentha spicata L.* (Source : Cliché personnel / Prise de vue expérimentale).

III.3.2.3. Classification taxonomique

La position systématique de l'espèce, révisée selon les critères phylogénétiques et morphologiques contemporains, est structurée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 04 : Classification taxonomique de *Mentha spicata L*. (Mahendran et al., 2021)

Rang taxonomique	Taxon
Domaine	Eukaryota
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta
Sous-embranchement	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae (Magnoliopsida)
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	*Mentha* L.
Espèce	*Mentha spicata* L.

III.3.2.4. Propriétés pharmacologiques

L'intérêt thérapeutique de *Mentha spicata L*. découle d'une action pluri-analytique et synergique entre ses fractions volatiles (principalement la carvone et le limonène) et ses composés phénoliques non volatiles (Mahendran et al., 2021).

A. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de la menthe verte figure parmi ses propriétés biochimiques les mieux élucidées. Les investigations menées par Brahmi et al. (2022) sur des écotypes récoltés en Algérie révèlent une excellente capacité de piégeage des radicaux libres, validée par les modèles expérimentaux du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et du FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Cette efficacité protectrice est corrélée à une forte concentration en **acide rosmarinique**, un ester d'acide caféique doué d'une forte capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à préserver les macromolécules cellulaires des dommages oxydatifs (Brahmi et al., 2022).

B. Activités cytotoxique, anticancéreuse et angio-modulatrice

En oncologie expérimentale, les extraits de menthe verte démontrent des propriétés antitumorales prometteuses. L'huile essentielle de *Mentha spicata* induit une cytotoxicité sélective envers diverses lignées cellulaires malignes humaines, tout en préservent l'intégrité des lignées cellulaires saines (Sharma et al., 2014).

D'un point de vue mécanistique, la **carvone** orchestre cette sélectivité en réprimant la prolifération clonogénique et en déclenchant la cascade apoptotique via la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Vinothkumar & Nalini, 2013). L'analyse rigoureuse de la littérature scientifique valide la capacité des monoterpènes majoritaires présents dans les fractions volatiles végétales, singulièrement le d-limonène et la l-carvone, à exercer un effet inhibiteur ciblé sur l'angiogenèse tumorale.

Sur le plan mécanistique, l'activité du d-limonène se manifeste par une interférence directe avec la cascade de signalisation médiée par les facteurs de croissance endothéliaux (VEGF), s'accompagnant d'une diminution drastique de l'expression de la métalloprotéase de matrice MMP-9 (Murthy et al., 2012). De manière concomitante, la l-carvone réprime l'activation de la kinase des adhésions focales (FAK), induisant une régulation négative du stimulus angiogénique HIF-1α/VEGF ainsi qu'une inhibition de l'invasion cellulaire dépendante de la MMP-2 (de Lima et al., 2023).

III.3.3. *Bunium incrassatum* (Talghouda)

III.3.3.1. Description botanique et contextuelle

Bunium incrassatum (Batt.) Batt. & Trab. S'agissant ici de l'authentique écotype endémique de la région méditerranéenne et d'Afrique du Nord, localement dénommé « Talghouda ») est une macromatrice végétale hémicryptophyte et vivace, dont le développement caulinaire oscille verticalement entre 30 et 70 cm. Cette espèce affiche un morphotype caractéristique de la famille des Apiaceae (syn. Umbelliferae), matérialisé par une tige grêle, érigée et marquée par des striations longitudinales ou sillons profonds, particulièrement prononcés au niveau de sa portion supérieure(Attoui et al., 2021).

D'après les caractères diagnostiques établis par Quézel et Santa (1962), complétés ici par l'analyse des structures histologiques spécialisées, l'espèce présente un appareil foliaire à phyllotaxie alterne, caractérisé par un limbe profondément découpé à deux ou trois reprises en

segments filiformes étroits. Le système souterrain est défini par un tubercule globuleux et arrondi (1–2 cm de diamètre) pourvu d'un périderme subéreux protecteur et d'un parenchyme amylacé dense. Enfin, l'inflorescence en ombelles composées génère des diakènes oblongs à côtes primaires longitudinales proéminentes.



Figure 21 : Les fleurs et les tubercules de ***Bunium incrassatum*** « Talghouda» (Chentouh, et al, 2018).

III.3.3.2. Compositions chimiques

Les investigations phytochimiques et qualitatives appliquées aux différentes fractions de ***Bunium incrassatum*** révèlent une hétérogénéité métabolique marquée, soulignant la complexité de son *totum* chimique. L'analyse adaptative de la matrice souterraine (racines et tubercules) met en évidence une forte prévalence de composés physiologiquement actifs, incluant des fractions osidiques complexes (saccharose), des acides gras insaturés (acide oléique), des phytostérols ubiquitaires (β-sitostérol) ainsi que des métabolites spécialisés de nature coumarinique, représentés préférentiellement par la scopolétine et la scoparone (Bousetla et al., 2015).

Concerning volatile fractions, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) characterization of the aerial parts allowed the resolution of 31 distinct bioactive constituents, representing a total elution rate of 97.19% of the overall volatile extract composition. This chemotype profile is quantitatively dominated by palmitic acid (18.3%) and caryophyllene oxide (17.36%), followed by intermediate terpenic constituents such as β-eudesmol (13.95%),

n-pentacosane (5.13%), 10-*epi*-α-muurolol (4.36%), hedycaryol (4.14%), and spathulenol (4.04%) (El Kolli et al., 2017).

Au-delà de sa signature métabolique volatile, la fraction non volatile des tubercules de ***Bunium incrassatum* (Boiss.) Batt.** constitue un hydrogel macromoléculaire complexe capable d'influencer profondément la pharmacodynamie globale des extraits bruts (Bousetla et al., 2015). Cette matrice de réserve est structuralement organisée autour d'un réseau de polymères glucidiques — principalement représentés par l'amidon et des fractions de polysaccharides hautement polymérisés — associés à des fractions lipidiques endogènes et des protéines fonctionnelles . Sur le plan de la chimie des solutions et de la galénique naturelle, cette matrice macromoléculaire est susceptible d'agir comme un vecteur de libération prolongée, modifiant la solubilité apparente et les coefficients de partage des métabolites secondaires hydrophobes lors des phases d'extraction ou d'assimilation biologique (Miao & Hamaker, 2021 ; Samaniego-Rafaele et al., 2025).

III.3.3.3. Classification taxonomique

La position systématique et la nomenclature phylogénétique de l'espèce *Bunium incrassatum*, révisées selon les classifications de référence, sont rigoureusement ordonnées dans le tableau ci-dessous(Quézel & Santa, 1963).

Tableau 05 : Classification taxonomique de *Bunium incrassatum* (Quézel & Santa, 1963).

Rang taxonomique	**Taxon assigné**
Règne	Plantae (Végétal)
Sous-règne	Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)

Rang taxonomique	Taxon assigné
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae (Umbelliferae)
Genre	*Bunium* L.
Espèce	*Bunium incrassatum* (Batt.) Batt. & Trab.

III.3.3.4. Propriétés pharmacologiques et potentiel thérapeutique

Sur le plan de la pharmacologie translationnelle, les tubercules de ***Bunium incrassatum*** constituent une source de principes d'intérêt nutraceutique. Les extraits polaires dérivés de ces organes manifestent une activité de piégeage radicalaire élevée ainsi que des propriétés anti-hémolytiques significatives, témoignant d'une capacité à stabiliser les membranes érythrocytaires face à un stress oxydatif chimio-induit (Berroukeche et al., 2022).

L'exploitation des tubercules de ***Bunium incrassatum*** Boiss. Batt. & Trab. (syn. *Bunium bulbocastanum*), communément désignés sous le vocable vernaculaire de *Talghouda*, occupe une place documentée au sein de l'ethnopharmacopée des zones telliennes de l'Est algérien (Ouali et al., 2021). Les enquêtes médico-botaniques répertorient cette Apiaceae comme une ressource préférentielle pour la prise en charge empirique des altérations fonctionnelles et structurelles de la glande thyroïde. Le spectre d'application s'avère large, englobant des manifestations physiopathologiques opposées telles que l'hypo- et l'hyperthyroïdie, ainsi que les hypertrophies goitreuses (Taïbi et al., 2021).

Etudes expérimentales

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée au sein de l'animalerie de l'Institut des Sciences de la Nature et de la Vie, rattaché à l'Université Abd El Hafidh Boussouf de Mila.

La recherche avait pour objectif d'évaluer l'activité anti-vasculaire de différentes préparations végétales, à savoir les extraits bruts de menthe (Mentha spicata), de thym (**Thymus vulgaris**) et de « Talghouda » (Bunium incrassatum).

Pour cela, nous avons utilisé des approches in ovo reposant sur le test de la membrane chorioallantoïque (CAM) de l'embryon de poulet (Chick Chorioallantoic Membrane assay).

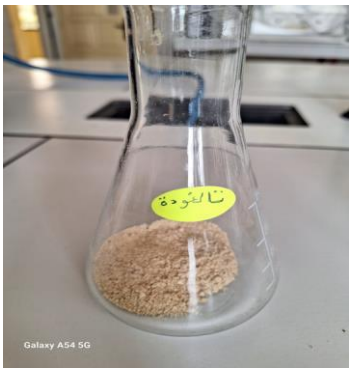
1.Matières végétales

1.1. Préparation et extraction

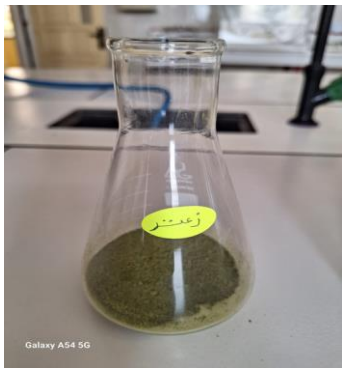
Trois plantes d'intérêt, à savoir la menthe (*Mentha*sp.), le thym (**Thymus sp**.) et la telghouda (*Buniumbulbocastanum* L.), ont été collectées dans la région de Mila. Les échantillons ont été séchés à l'ombre, à température ambiante, puis broyés mécaniquement jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.



Poudre de ***Mentha spicata L*** L



Poudre de *Bunium incrassatum*

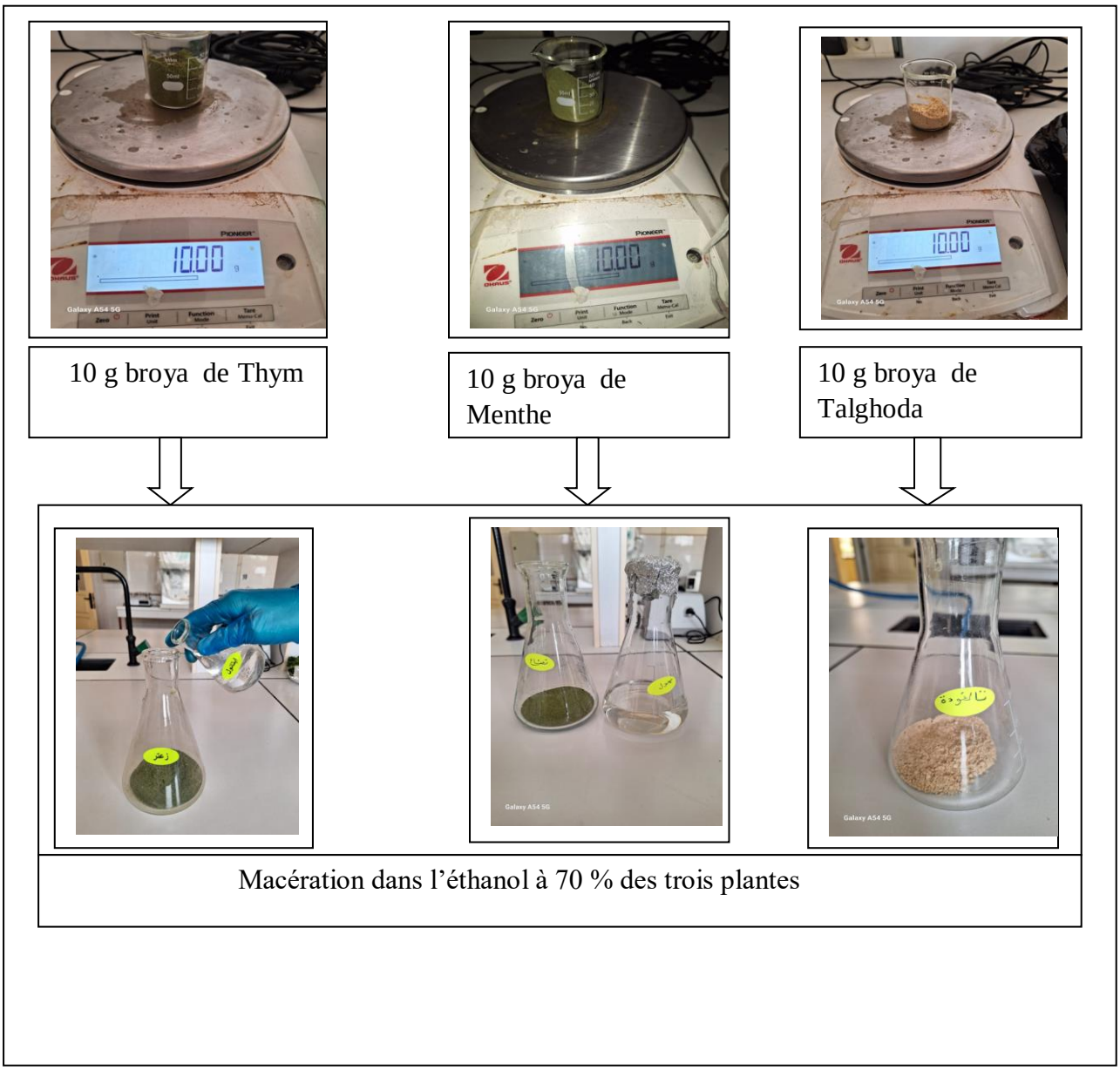


Poudre de **Thymus vulgari**

Figure 22 : Poudres des trois plantes

L'extraction a été réalisée par macération dynamique en utilisant un ratio matière/solvant de 1:10 (p/v), soit 10 g de poudre végétale pour 100 ml d'éthanol à 70% (v/v). Le mélange a été maintenu sous agitation constante à température ambiante pendant 72 heures. Cette approche constitue une adaptation simplifiée du protocole décrit par Jadhav*et al.* (2016).

À l'issue de la macération, le mélange a été clarifié par étapes successives : une première filtration sur gaze médicalestérile, suivie d'une filtration sur papier filtre. Le filtrat obtenu a été concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (BÜCHI Rotavapor R-II) . Enfin, les extraits ont été transférés dans des boîtes de Pétri et soumis à une dessiccation en étuve à 37 °C jusqu'à l'obtention des extraits secs bruts finaux**.**





Le mélange



Agitation







Filtration des trois plantes (Thym , Menthe , Talghoda)



Les extraits séchés



Séchage à l'étuve



Evaporation

Figure 23 : Différentes étapes de préparation de l'extrait hydroalcoolique de *Bunium incrassatum* , *Mentha spicata L* , ***Thymus vulgaris L*** .

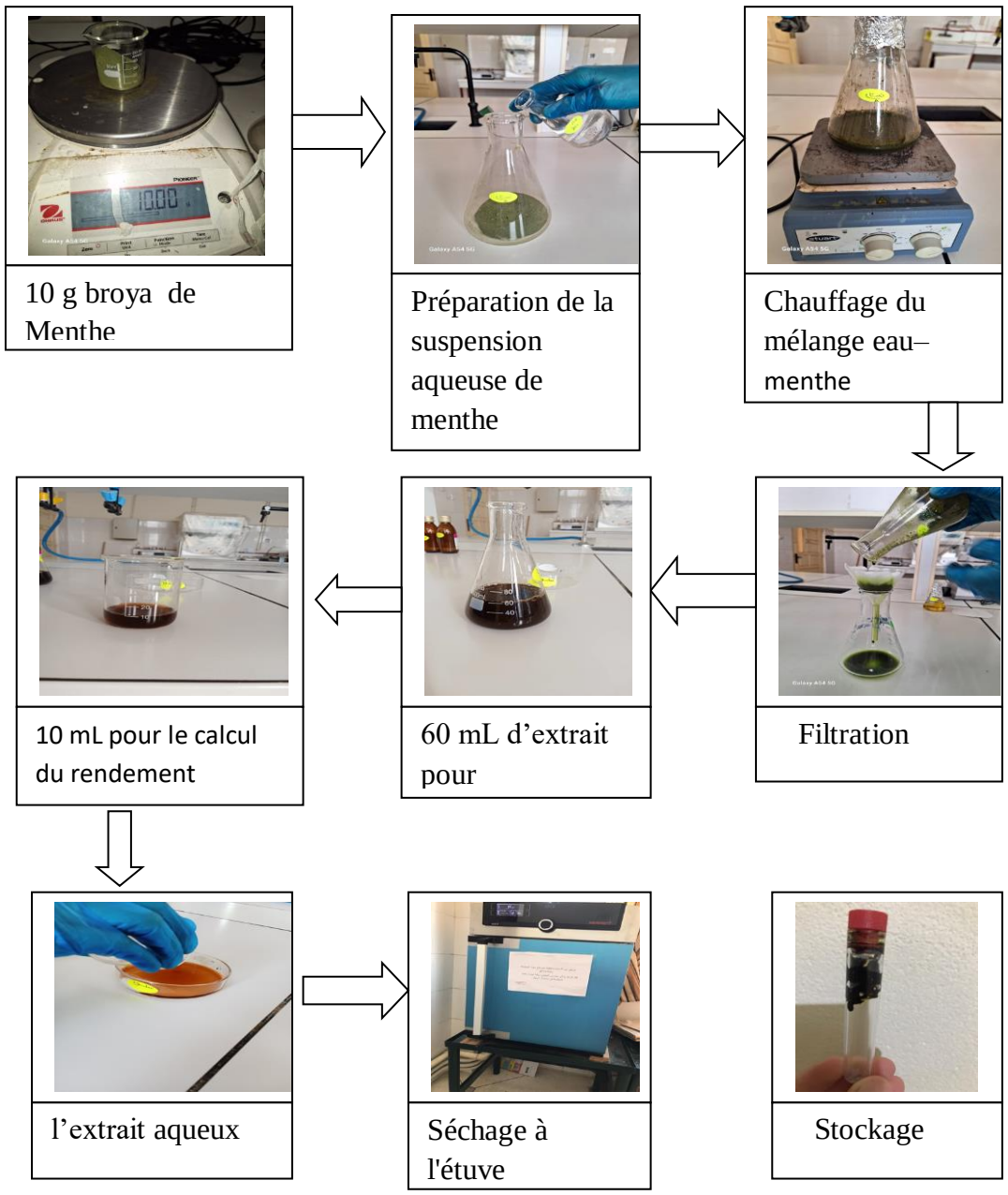


Figure 24 : Différentes étapes de préparation de l'extrait aqueux de menthe

1.2-Estimation du rendement et de la concentration des extraits

- **Calcul du rendement**

La formule donnée par Harborne, 1998 permet de calculer le rendement d'extraction :

$$R\ \% = (Me/Mv)x100$$

R % : Rendement en %.

Me: Masse de l'extrait après évaporation du solvant.

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction**.**

Détermination gravimétrique de la concentration des solutions mères

Afin d'établir avec précision la concentration massique des solutions mères d'extraits végétaux et de garantir la reproductibilité des bio-essais ultérieurs, une méthode de quantification par dessiccation jusqu'à obtention d'une masse constante a été rigoureusement appliquée.

Pour chaque extrait, un aliquot de volume déterminé (v, exprimé en mL) a été prélevé avec exactitude. Les échantillons ont été soumis à une évaporation thermique contrôlée au sein d'une étuve thermostatisée à 40°C afin de volatiliser la phase solvant (aqueuse ou hydro-organique) tout en préservant l'intégrité structurale des métabolites secondaires thermolabiles.

Le processus de dessiccation a été considéré comme achevé et définitif lorsque la cinétique de pesée, réalisée à intervalles réguliers à l'aide d'une balance analytique de précision (0,1 mg), a révélé une stabilité pondérale, définie comme l'atteinte d'une masse sèche constante (m_s).

La concentration massique finale (C) de la solution mère a été extrapolée mathématiquement selon la relation fondamentale suivante:

$$C = \frac{m_s}{v}$$

Où :

- C représente la concentration massique de l'extrait, exprimée en milligrammes par millilitre (mg/mL);
- ms désigne la masse sèche du résidu extrait après dessiccation totale, exprimée en milligrammes (mg);
- v correspond au volume précis de l'aliquot initialement prélevé, exprimé en millilitres (mL).

1.3-Préparation des solutions mères et des dilutions

Pour l'évaluation biologique, une solution mère à la concentration de 10 mg/ml a été préparée pour chacun des trois extraits bruts (*Mentha*sp.,*Thymus* sp. et *Buniumbulbocastanum* L.). Pour ce faire, 50 mg d'extrait brut ont été solubilisés dans un mélange constitué de 5 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO), soit une concentration finale de 0,1 % (v/v), puis complétés à un volume final de 5 ml avec du tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4 ; MARGOMED, Issers, Algérie). Des séries de dilutions géométriques (1/2, 1/4, et 1/8) ont ensuite été préparées de manière extemporanée à partir de chaque solution mère dans le même tampon.

1.4.Préparation des solutions témoins (négatif et positif)

Afin de valider la robustesse du modèle biologique, des témoins négatif et positif ont été préparés en parallèle et dans les mêmes conditions expérimentales.

- **Témoin négatif :** La solution de contrôle négatif a été préparée en incorporant 5 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans du tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4 ; MARGOMED, Issers, Algérie) pour un volume final de 5 ml, ajustant ainsi la concentration finale en solvant à 0,1 % (v/v). Ce témoin permet de s'assurer de l'absence de toxicité propre du véhicule de solubilisation sur la vascularisation de la CAM.
- **Témoin positif (CA4P) :** Le phosphate de combretastatine A-4 disodique (FosbretabulinDisodium, pureté ≥98 % ; Réf : CRN1972 ; Hubei CuiRan Bio-technology Co., Ltd., Chine), un agent de rupture vasculaire de référence, a été utilisé comme témoin positif. Une solution mère a été préparée de manière extemporanée en reconstituant le composé lyophilisé dans du tampon PBS (pH 7,4) afin d'obtenir la concentration souhaitée. Les dilutions de travail ont ensuite été réalisées par étapes successives dans le même tampon.

2.Test in ovo

2.1. Approvisionnement et traçabilité des œufs

Des œufs de poule fraîchement fertilisés, caractérisés par une hétérogénéité de calibre, ont été collectés auprès d'élevages avicoles traditionnels de la wilaya de Mila. Afin de minimiser la charge microbienne de surface et de prévenir tout risque de contamination ultérieure, la coquille de chaque œuf a été rigoureusement désinfectée par essuyage à l'éthanol à 70 % (v/v), puis séchée à l'air libre. Par la suite, un marquage individuel a été appliqué sur chaque unité, spécifiant un numéro d'identification unique ainsi que la date et l'heure précises du lancement de l'incubation.



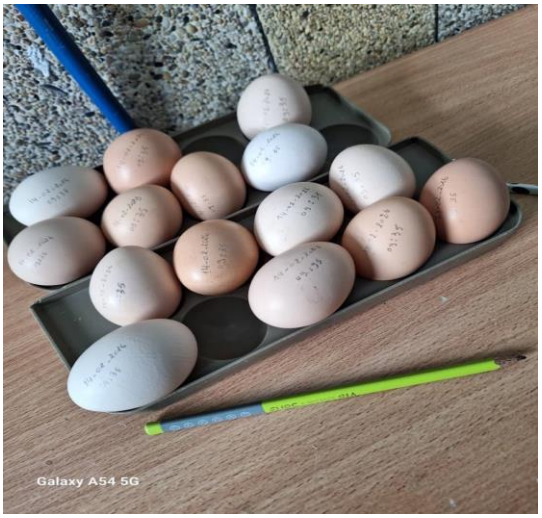


Figure 25: Désinfection des œufs **Figure 26** : Marquage des œufs

2.2. Conditions d'incubation

Les œufs ont été placés dans un incubateur (River Systems, Italie) préalablement stabilisé à une température constante de 37,5 °C et une humidité relative de 65 %. Le maintien strict et ininterrompu de ces paramètres homéostatiques est une condition critique pour le développement embryonnaire tout au long de la période expérimentale. Afin de ne pas perturber les phases initiales de la morphogenèse vasculaire, toute manipulation ou retournement des œufs a été rigoureusement proscrit durant les premières 48 heures. L'intégrité de ces conditions optimales a été assurée par un suivi quotidien et systématique de la température ambiante ainsi que du niveau d'eau de l'incubateur pour réguler l'hygrométrie.



Figure 27 : Incubation des œufs

2.3. Fenestration de la coquille et détachement de la membrane chorioallantoïdienne (CAM)

Au troisième jour d'incubation (ED3), la viabilité des embryons a été évaluée par mirage transcoquillaire à l'aide d'une source lumineuse de forte intensité (torche en LED du smartphone).



Figure 28 : Mirage pour vérifier la fécondité des œufs

Cette étape a permis d'éliminer les œufs non fertiles ou précocement arrêtés, en identifiant l'apparition caractéristique du réseau vasculaire primitif périphérique, communément appelé « forme en araignée ». Lors de cette procédure, l'emplacement exact de la chambre à air et le pôle embryonnaire ont été cartographiés au crayon.

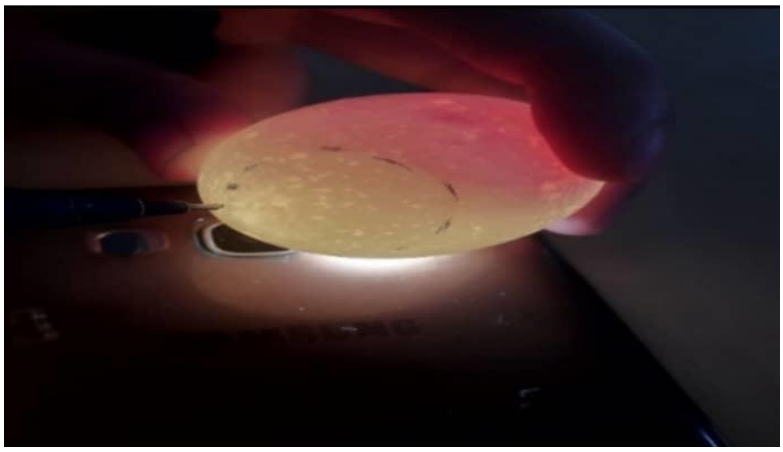


Figure 29 :Détermination de la chambre d'air

Afin d'abaisser le contenu vitellin et de faciliter le détachement de la CAM, une ponction a été délicatement réalisée au niveau du pôle pointu de la coquille à l'aide d'une aiguille de calibre 22G (0,70 X 30mm). Un volume précis de 3 ml d'albumen a été aspiré avec soin, en veillant scrupuleusement à ne pas perforer la membrane vitelline. Cette déplétion volumétrique a généré un espace d'air artificiel, provoquant le détachement de la CAM sous-jacente de la coquille et ses membranes.



Figure 30 : Prélèvement de l'Albumenair

Une fenêtre d'environ 2 cm de diamètre a ensuite été découpée à la pince fine sur la face supérieure de la coquille, révélant ainsi l'embryon et son lit vasculaire en cours de développement. Pour prévenir tout risque de déshydratation et de contamination microbiologique, la fenestration a été immédiatement scellée à l'aide d'un ruban adhésif

transparent stérile. Les œufs ainsi préparés ont été promptement réintroduits dans l'incubateur jusqu'au jour planifié pour l'application des traitements.



Figure 31: Ouverture d'une fenêtre



Figure 32: recouvrir les œufs



Figure 33:Réincubation des oufes in ovo

Essais pilotes : optimisation de la dose de CA4P et validation du système d'incubation

Au huitième jour du développement embryonnaire (ED8), des essais préliminaires ont été réalisés en exposant les embryons à des doses croissantes de CA4P. Cette étape de screening visait à déterminer la concentration optimale capable de reproduire fidèlement les effets phénotypiques délétères caractéristiques de cette molécule de référence (disruption vasculaire), tout en évitant une toxicité systémique aiguë, notamment l'effet létal précoce.

En parallèle, un groupe d'œufs n'a subi aucun traitement ni aucune manipulation après la fenestration. Ce lot de contrôle « blanc » a servi à valider le maintien des conditions

homéostatiques au sein de l'incubateur et à confirmer l'absence d'effet délétère lié à l'environnement d'élevage ou au protocole opératoire lui-même.

Plan d'étude et protocole d'administration (*Study Design*)

Au huitième jour du développement embryonnaire (ED8), les œufs préalablement fenestrés ont été répartis de manière aléatoire en sept groupes expérimentaux distincts. Le premier groupe (témoin négatif) a reçu une application topique de 20µL de PBS, tandis que le deuxième groupe (témoin positif) a été traité avec 20µL de CA4P. Les cinq groupes restants ont été exposés aux différentes concentrations des extraits végétaux testés, à raison de 20µL par unité.

Pour l'ensemble des lots, les solutions (témoins ou substances d'essai) ont été déposées directement à la surface de la membrane chorioallantoïdienne (CAM), au centre des anneaux de polymère.



Figure 34 : Application sur la membrane chorioallantoïque (CAM) au centre de l'anneau polymérique .

Le suivi cinétique des réponses vasculaires a été structuré en deux phases : une observation immédiate et continue durant les 5 premières minutes post-traitement, suivie d'évaluations macroscopiques périodiques s'étendant sur une période tardive de 72 heures.

L'apparition de toute altération structurelle — telle qu'une hémorragie, une coagulation, une déformation ou régression des vaisseaux sanguins, ou encore la létalité embryonnaire — a été

systématiquement consignée. De surcroît, le temps de latence précis (en secondes ou minutes) séparant le dépôt du produit et la manifestation visuelle de chaque événement a été rigoureusement enregistré.

Imagerie numérique et acquisition de données

Les images numériques ont été capturées en couplant l'appareil photo de 12 MP d'un smartphone (Samsung Galaxy S20 5G, SM-G981 ; Samsung Electronics, Corée du Sud) à l'oculaire du stéréomicroscope(Optika ST-30-2LF; Italy). Afin de garantir un alignement axial optique stable et de minimiser les vibrations, un adaptateur conçu sur mesure a été utilisé. Cette configuration a fait l'objet d'une validation interne pour assurer le maintien constant du plan focal tout au long d'études longitudinales à long terme.

Imagerie statique à partir de CAM fixées

Parallèlement, une cohorte distincte d'embryons (n = 10 par point temporel) a été sacrifiée afin de permettre une imagerie statique à haute résolution. À chaque intervalle défini, les zones traitées de la CAM (membrane chorio-allantoïdienne) ont été fixées *in situ* à l'aide de formol à 4 % (v/v) dans du PBS (pH 7,4 ; MARGOMED, Issers, Algérie). Après fixation, les membranes ont été délicatement excisées, montées sur des lames de verre et photographiées au stéréomicroscope aux grossissements 20x et 40x, afin d'évaluer les altérations structurelles telles que la régression vasculaire, l'hémorragie ou la congestion.

Chapitre V :

Résultats et discussion

V.1. Résultats et discussion

V.1.1. Rendements d'extraction et standardisation des concentrations

Le rendement d'extraction représente un indicateur métrologique fondamental en pharmacognosie. Il permet d'évaluer quantitativement l'efficience d'un système de solvants à éluer la fraction de substances extractibles (métabolites secondaires et macromolécules solubles) à partir d'une masse définie de matrice végétale sèche.

Dans le cadre de ce travail, les extractions par macération ont été conduites sur trois matrices végétales distinctes : les tubercules de **Buniumincrassatum L**. (Apiaceae), ainsi que les parties aériennes de *Mentha spicata L*. (Lamiaceae) et de ***Thymus vulgaris L***. (Lamiaceae). Les caractéristiques quantitatives de ces extractions ainsi que la standardisation des solutions mères sont répertoriées dans le Tableau 06

Tableau 06 :Rendements d'extraction et concentrations des solutions mères des extraits végétaux

Solvants d'extraction	**Espèces botaniques**	**Masse initiale de poudre sèche (g)**	**Masse d'extrait sec obtenu (g)**	**Rendement pondéral (% m/m)**	**Concentration de la solution mère (mg/mL)**
Eau distillée	***Thymus vulgaris L.***	**(-)**	**(-)**	**(-)**	**(-)**
	Mentha spicata L.	**10,0**	**3,30**	**33,0**	**10,0**
	Buniumincrassatum L.	**(-)**	**(-)**	**(-)**	**(-)**
Eau / Éthanol (30:70 v/v)	***Thymus vulgaris L.***	**10,0**	**0,87**	**8,7**	**10,0**
	Mentha spicata L.	**10,0**	**1,46**	**14,6**	**10,0**
	Buniumincrassatum L.	**10,0**	**1,20**	**12,0**	**10,0**

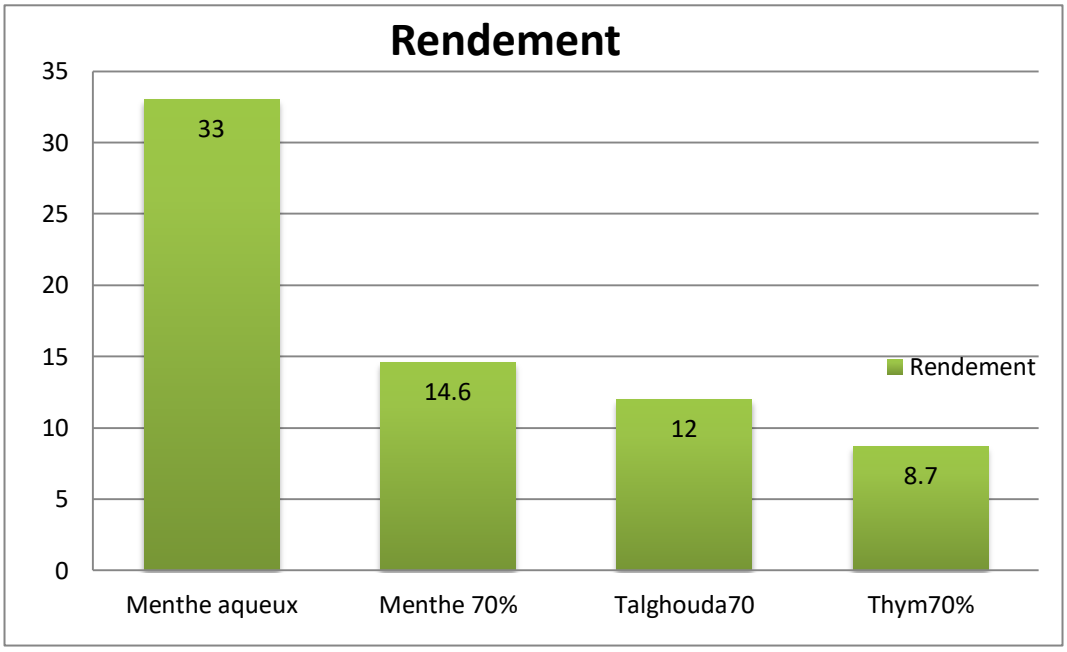


Figure 35: Pourcentage de rendement d'extraction des extrait aqueux et hydroéthanolique 70% de ***Thymus vulgaris L*** *Mentha spicata L et* ***Bunium incrassatum*** L

Note : Le symbole (-) désigne les configurations expérimentales non incluses dans le plan d'étude

Les données cinétiques et pondérales condensées dans le Tableau 06— et illustrées graphiquement dans le document de suivi histogram rendement et concentration extraits 3 plantes— mettent en évidence une hétérogénéité marquée des rendements. Cette fluctuation s'avère étroitement tributaire de la nature chimique du solvant d'extraction ainsi que des caractéristiques intrinsèques de la matrice végétale employée.

V.1.1. 1. Influence de la polarité du solvant sur l'efficacité d'élution

L'examen comparatif des rendements obtenus pour *Mentha spicata L.* révèle une supériorité hautement significative de l'extraction aqueuse pure (**33,0%**) vis-à-vis de l'extraction hydroéthanologique à 70% (**14,6%**). Ce comportement translationnel s'explique directement par la constante diélectrique élevée de l'eau pure. Ce solvant polaire par excellence possède une aptitude maximale à rompre les liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires des composants de la paroi végétale, favorisant le gonflement cellulaire et la mise en solution des molécules hautement hydrophiles (**Sierra et al., 2022**).

Outre les polyphénols hydrosolubles, l'eau co-extrait massivement des macromolécules interférentes douées d'une forte capacité de gonflement, telles que les polysaccharides pariétaux, les protéines hydrosolubles, les mucilages et les gommes, substances reconnues pour leur capacité à augmenter drastiquement la viscosité des solutions (Bruneton, 2016), ce qui majore substantiellement la masse brute de l'extrait sec résiduel.

À l'inverse, l'introduction de 70% d'éthanol abaisse la polarité globale du milieu d'extraction. Ce glissement de polarité induit une sélectivité physico-chimique accrue à l'égard des métabolites secondaires de polarité intermédiaire, tels que les flavonoïdes et certains acides phénoliques. Parallèlement, ce solvant exerce un effet d'exclusion (non-solubilisation) sur les polymères glucidiques lourds de charge élevée, attestant du maintien de ces solutés sous leur seuil de saturation (Sinko, 2017). Il en résulte, à masse de biomasse égale, une réduction mécanique de la masse d'extrait final obtenu, mais une limpidité optimale garantissant l'absence de micro-agrégats susceptibles d'obstruer localement la microvascularisation lors des screenings pharmacologiques.

Pour le solvant hydroéthanologique, les rendements se stabilisent à des valeurs modérées : **12,0%** pour **Buniumincrassatum L**. et **8,7%** pour ***Thymus vulgaris L***. Ces observations sont corroborées par la littérature scientifique ; en particulier, les travaux d'Elsherif et al. (2023) soulignent de la même manière que l'extrait éthanoïque de ***Thymus vulgaris L*** présente un faible rendement comparé aux extraits à l'acétate d'éthyle, aqueux ou au chloroforme.

V.1.2. Caractérisation macroscopique : Caractères organoleptiques et stabilité physique de la phase liquide

L'examen visuel des tubes microcentrifuges, montre trois profils chromatiques distincts, directement liés à la composition chimique intrinsèque de chaque plante extraite à l'eau/Ethanol (Tableau 07 et Figure 36).

- Thym (brun-acajou/ambré) & Menthe (jaune citrin/verdâtre) : Leurs teintes traduisent la solubilisation de composés chromophiles endogènes (phénols, flavonoïdes, résidus pigmentaires), mais nécessitent une validation analytique impérative (CCM, HPLC, ou dosages spectrophotométriques) pour identifier les composés responsables (Pluhár et al., 2012).

- Talghouda (incolore) : Cette absence de coloration est cohérente avec la nature de la matrice (tubercule souterrain de réserve), un organe non photosynthétique physiologiquement pauvre en pigments vacuolaires ou chloroplastiques (Bruneton, 2016 ; Quézel& Santa, 1963).

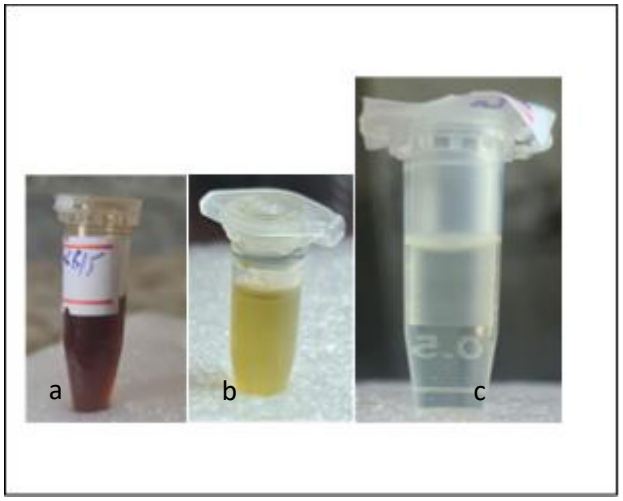


Figure 36 : Extraits hydroalcooliques ; a) ***Thymus vulgaris L***. ;b)*Mentha spicata L*. ;c)***Bunium incrassatum*** (Batt.) Batt. &Trab.

Les trois extraits végétaux montrent une faible viscosité corrélée à une limpidité optimale à 25 °C, révélant une co-extraction négligeable de macromolécules pariétales de haut poids moléculaire telles que les mucilages ou les gommes, substances reconnues pour leur capacité à augmenter drastiquement la viscosité des solutions (Bruneton, 2016). Sur le plan pharmacotechnique, cette grande fluidité constitue un paramètre critique déterminant : elle élimine les variations de volume délivré et garantit une exactitude ainsi qu'une reproductibilité rigoureuse lors du micro-pipetage des solutions mères au moment des dilutions sérielles, une propriété indispensable avant leur inoculation sur les modèles biologiques (Aulton& Taylor, 2013).De plus, la limpidité de la préparation et l'absence de turbidité, de sédimentation ou de séparation de phases à l'état initial (T_0) témoignent de la stabilité physique immédiate du système. Cette homogénéité macroscopique constitue un prérequis fondamental pour garantir la standardisation des doses, la reproductibilité et l'intégrité des screenings pharmacologiques ultérieurs (Sinko, 2017).

Tableau 07 : Caractéristiques organoleptiques et physiques des extraits hydroéthanoliques de ***Thymus vulgaris L***, Mentha spicata et Bunium incrassatum.

Solvants d'Extraction	**Plante**	**Couleur**	**limpidité**	**consistance/ État physique**	**stabilité**[a]
Eau /Ethanol	**Thym**	brun-acajou, ambré	Limpide, homogène	Liquide mobile	stable(absence de déphasage/précipité)
	Menthe	Jaune citrin à reflets verdâtres	Limpide, homogène	Liquide mobile	stable (absence de déphasage/précipité)
	Talghouda	Incolore	Limpide et translucide. Absence stricte de turbidité	Liquide mobile (faibleviscosité)	Stable. Aucun signe de sédimentation, de précipitation ou de déphasage.
Eau					

a : Les caractères organoleptiques et l'état d'équilibre des phases ont été consignés à température ambiante (25 C) immédiatement après filtration et conditionnement (T_0).

L'examen visuel des tubes microcentrifuges, montre trois profils chromatiques distincts, directement liés à la composition chimique intrinsèque de chaque plante extraite à l'eau/Ethanol.

- **Thym (brun-acajou/ambré) & Menthe (jaune citrin/verdâtre) :**Leurs teintes traduisent la solubilisation de composés chromophiles endogènes (phénols, flavonoïdes, résidus pigmentaires), mais nécessitent une validation analytique impérative (CCM, HPLC, ou dosages spectrophotométriques) pour identifier les composés responsables (Pluhár et al., 2012).
- **Talghouda (incolore) :** Cette absence de coloration est cohérente avec la nature de la matrice (tubercule souterrain de réserve), un organe non photosynthétique physiologiquement pauvre en pigments vacuolaires ou chloroplastiques(Bruneton, 2016; Quézel& Santa, 1963).

L'évaluation physico-chimique prospective des trois extraits végétaux met en évidence une faible viscosité corrélée à une limpidité optimale à 25 °C, révélant une co-extraction négligeable de macromolécules pariétales de haut poids moléculaire telles que les mucilages ou les gommes (Bruneton, 2016). Sur le plan pharmacotechnique, cette grande fluidité

constitue un paramètre critique déterminant : elle élimine les variations de fluidité de la solution et garantit une exactitude ainsi qu'une reproductibilité rigoureuses lors du micro-pipetage des solutions mères au moment des dilutions sérielles et des inoculations sur les modèles biologiques (Aulton& Taylor, 2013). De plus, la translucidité parfaite et l'absence globale de turbidité, de sédimentation ou de séparation de phases à l'état initial (T_0) attestent du maintien des solutés sous leur seuil de saturation thermodynamique. Cette stabilité macroscopique confirme la formation d'une solution parfaitement homogène, condition *sine qua non* pour assurer la standardisation, la fiabilité et l'intégrité des screenings pharmacologiques ultérieurs (Sinko, 2017).

V.2. Exploration des effets des trois extraits sur les vaisseaux sanguins de la membrane chorioallantoidenne (CAM Assay)

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'intermédiare 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.

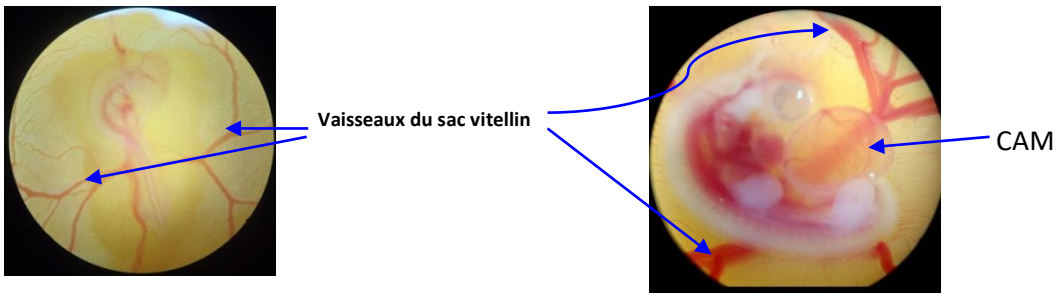


Figure 37 : Vaisseaux du sac vitellin sous stéréomicroscope à 20X

Figure 38: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 39:CAM Témoin à J8, culture *in ovo*.



Figure 40 : 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 (figure 41).

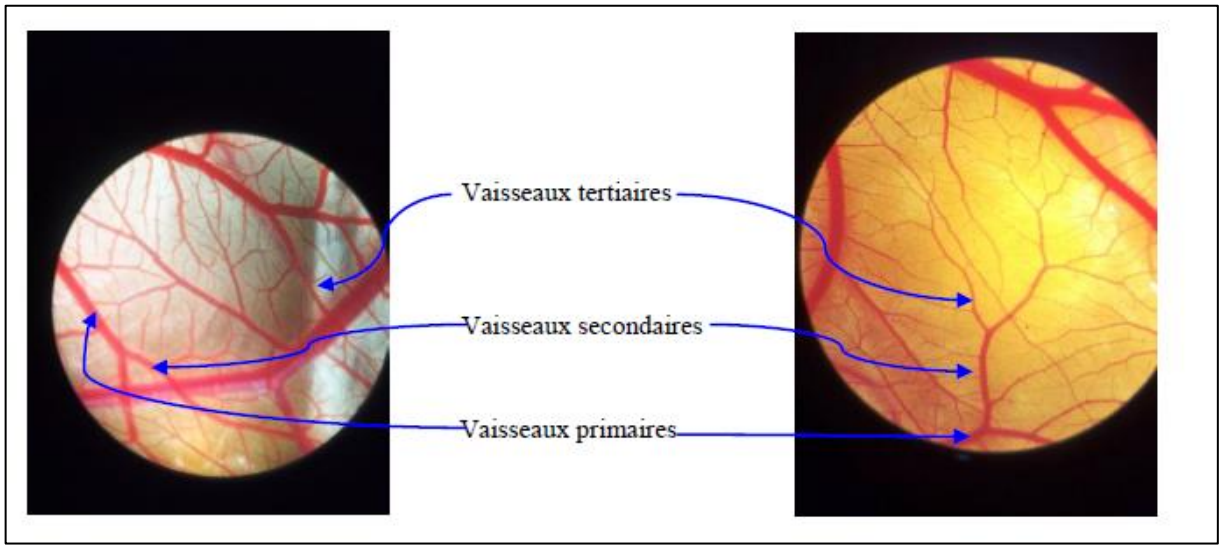


Figure 41: observation des vaisseaux primaires, secondaires et tertiaires sous stéréomicroscope 20X.

V.2. 1. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de la fosbrétabuline (témoin positif)

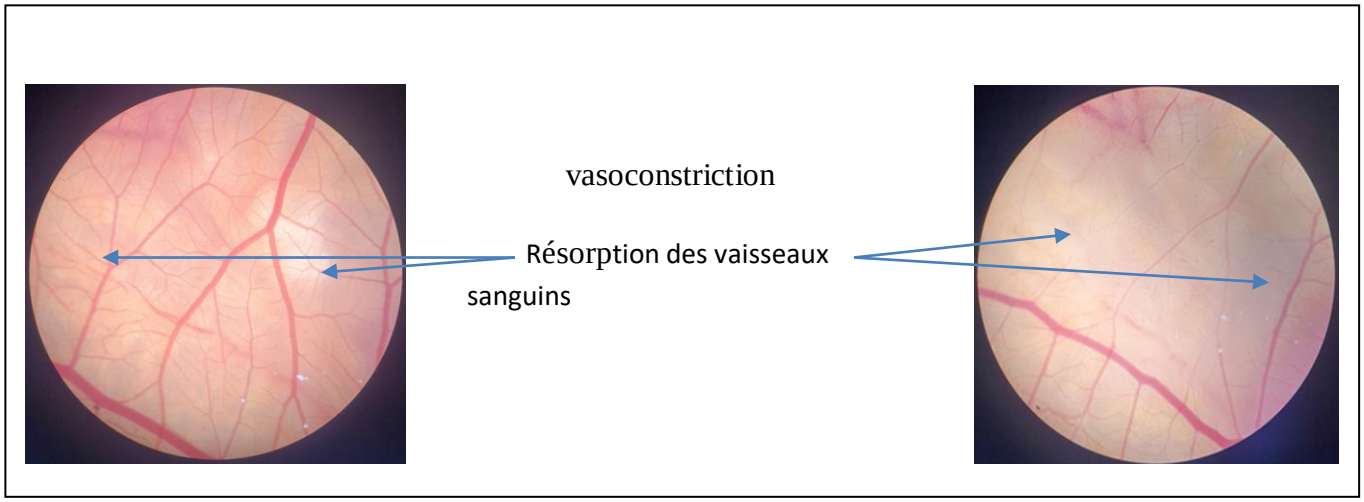


Figure 42 : Effet antivasculaire **de la fosbrétabuline** (témoin positif)

La fosbrétabuline, également connue sous le nom de phosphate de combretastatine A4 (CA4P), est le chef de file des agents perturbateurs vasculaires (VDAs, *Vascular Disrupting Agents*). Contrairement aux thérapies antiangiogéniques classiques qui inhibent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, la fosbrétabuline cible spécifiquement la structure tridimensionnelle du réseau vasculaire tumoral préexistant afin d'induire son effondrement rapide (Chen etal., 2026; Gómez-Escudero et al., 2025 ; Li et al., 2025)

Sur le plan pharmacologique, la fosbrétabuline est une prodrogue hydrosoluble rapidement biotransformée en son métabolite actif, la combretastatine A4 (CA4). Le

mécanisme d'action repose sur la fixation de la CA4 au niveau du site de la colchicine sur les dimères de β-tubuline au sein des cellules endothéliales. Cette liaison hautement sélective perturbe l'équilibre dynamique des microtubules en provoquant leur dépolymérisation brutale. La désorganisation du cytosquelette de tubuline entraîne une cascade d'événements intracellulaires, incluant la rupture des jonctions intercellulaires médiées par la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine) et l'activation de la voie de signalisation RhoA/ROCK. En conséquence, les cellules endothéliales tumorales immortelles, initialement aplaties, subissent un changement morphologique critique en s'arrondissant de manière drastique (National Cancer Institute [NCI],2024).

Au niveau histologique et tissulaire, ce gonflement cellulaire combiné à l'augmentation de la perméabilité endothéliale conduit à un rétrécissement immédiat de la lumière des vaisseaux. Ce phénomène induit une augmentation majeure de la résistance vasculaire locale, déclenchant des micro-hémorragies, une coagulation intravasculaire et l'occlusion complète du réseau capillaire tumoral. Privé d'apport en oxygène et en nutriments, le cœur de la masse tumorale subit une nécrose ischémique massive en l'espace de quelques heures(Siemann et al., 2009).

L'effet antivasculaire direct de la fosbrétabuline est parfaitement objectivé in ovo dans l'expérience documentée par la figure 42 L'analyse comparative met en évidence une vasoconstriction prononcée ainsi qu'une résorption marquée des vaisseaux sanguins après traitement, validant l'utilisation de la fosbrétabuline comme témoin positif robuste pour l'étude des molécules à activité perturbatrice vasculaire (Figure 42).

V.2. 2. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de la PBS/Eau physiologique (témoin négatif)

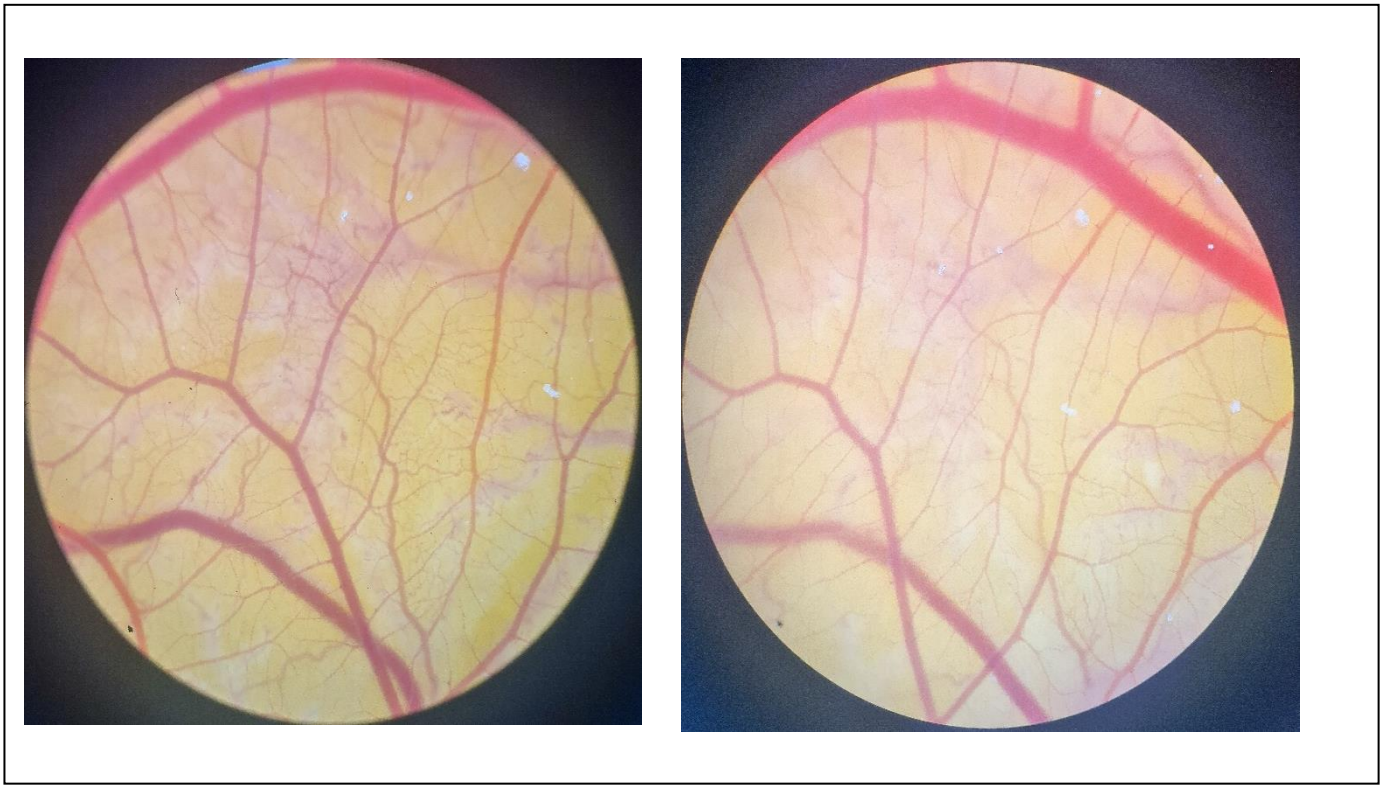


Figure 43 : Neutralité parfaite du sérum salé tamponné au phosphate (PBS). A)avant d'appliquer le PBS ; B) 3 heures après.

Sur la base de la conservation absolue de l'architecture microvasculaire au cours de la cinétique de 3 heures, le profil identifié est classé comme un témoin négatif. Le sérum salé tamponné au phosphate (PBS) démontre ici une neutralité phénotypique parfaite, validant l'absence de bioactivité secondaire ou de toxicité chimique intrinsèque. On remarque la présenced'aucun effet pro-angiogénique ni aucune interaction délétère avec les composants structurels de l'endothélium.

Ce profil de référence confirme que la technique d'application physique et le solvant n'introduisent aucun biais de stress biologique, établissant ainsi un groupe contrôle idéal pour l'évaluation ultérieure de molécules actives.

Largement employé comme véhicule en expérimentation, le PBS est considéré comme physiologiquement inerte. Cependant, Wilting et al. (1991) ont conclu que les cristaux formés après évaporation du tampon causent des modifications de l'épithélium de la CAM ainsi que des vaisseaux sanguins. Cette divergence apparente par rapport à nos observations s'explique par une différence méthodologique. Alors que nous avons appliqué le PBS directement sur la CAM, Wilting et al. (1991) ont imbibé une pastille de papier filtre puis l'ont séchée pour

l'utiliser comme support d'application ; ce processus de dessiccation a généré des cristaux salins qui irritent et endommagent la CAM.

V.2. 3. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de l'extrait hydroalcoolique de *Mentha spicata L.*

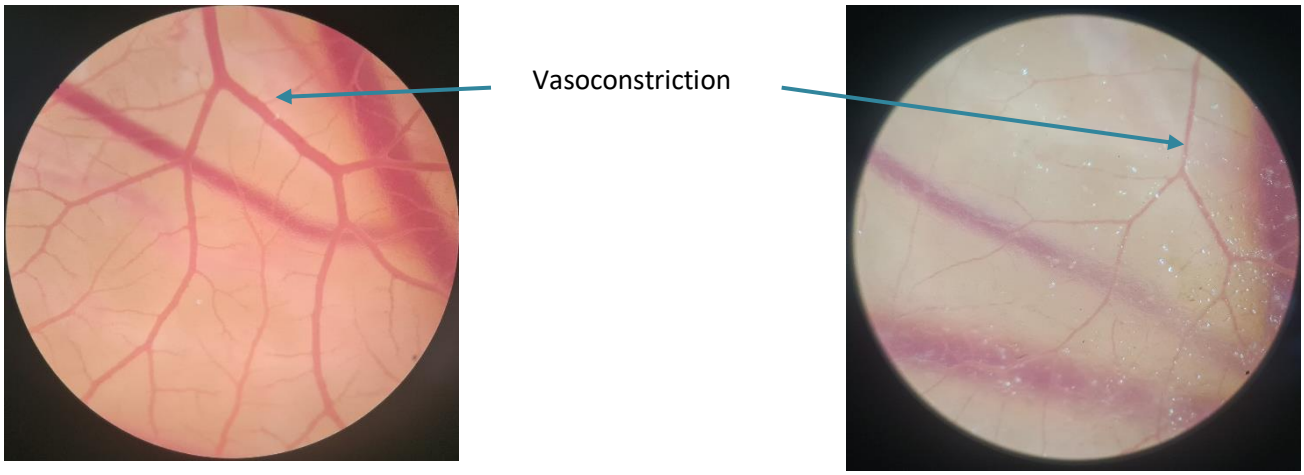


Figure 44: Action de l'extrait hydroalcoolique de *Mentha spicata* L. ; A) avant l'application de 20µL à 10mg/mL ; B) 7 heures après l'application.

L'application de l'extrait à une concentration de 10 mg/mL (dose absolue de 200 µg/œuf) induit une altération cinétique majeure du réseau vasculaire en phase liquide stable, en l'absence de tout phénomène d'évaporation.

Après 7 heures d'incubation, on observe (figure 44) :

- **Un blanchiment généralisé (*Blanching*) du lit vasculaire :** Les ramifications secondaires et le réseau capillaire fin subissent une extinction visuelle presque totale (80%).
- **L'apparition de vaisseaux fantômes (*Ghostvessels*) :** Les axes vasculaires principaux initialement gorgés de sang perdent leur signature chromatique rouge vif pour devenir pâles et translucides.
- **Une stase circulatoire totale :** L'observation en temps réel sous stéréomicroscope confirme l'arrêt complet du flux sanguin (*vascularshutdown*) au niveau du réseau superficiel.

Les données collectées démontrent de manière univoque la puissante **activité de disruption vasculaire (VDA)** de l'extrait testé à la dose de 200 µg (Patterson &Rustin, 2007).

V.2. 4. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de l'extrait hydroalcoolique de *Thymus vulgaris L*.

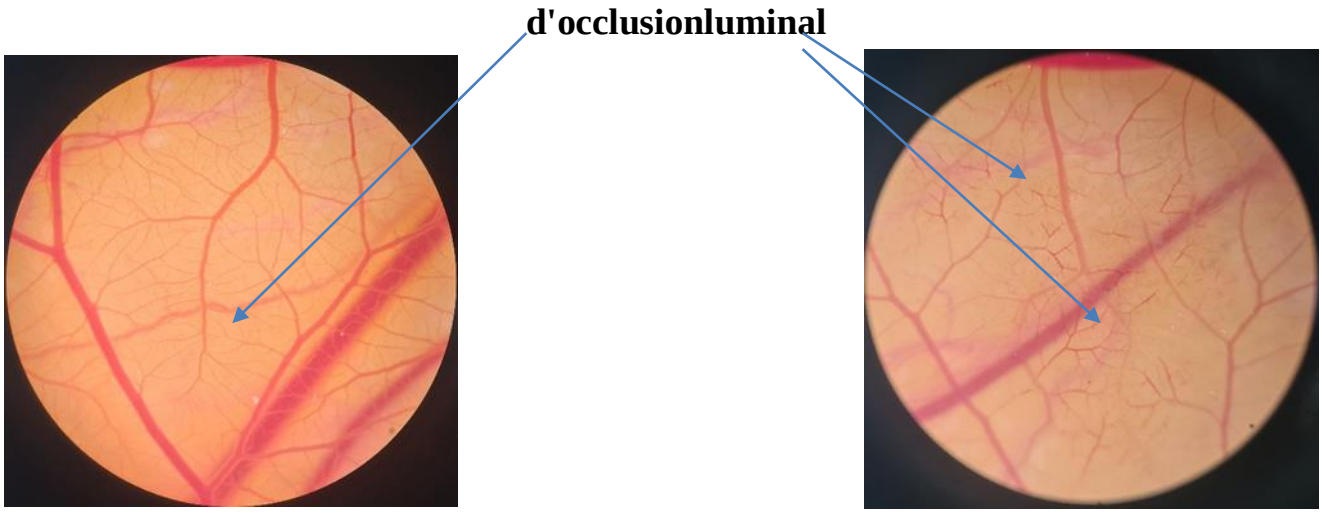


Figure 45: Action de l'extrait hydroalcoolique de ***Thymus vulgaris L***. ; A) avant l'application de 20µL à 10mg/mL ; B) 3 heures après l'application.

L'évaluation du potentiel angiosuppresseur ***Thymus vulgaris L*** a été réalisée *in ovo* sur le modèle de membrane chorioallantoïque (CAM) de poulet. Afin de discriminer une inhibition de la néovascularisation (effet anti-angiogénique) d'une destruction des réseaux préexistants (effet de rupture vasculaire), une cinétique d'observation à court terme a été adoptée, avec une collecte des données morphométriques fixée à t = 3 heures post-exposition.

L'analyse des données cinétiques et morphologiques ***Thymus vulgaris*L** révèle un profil pharmacologique hautement spécifique. Traditionnellement, les agents anti-angiogéniques requièrent une fenêtre temporelle de plusieurs jours pour manifester une réduction de la densité vasculaire, agissant par inhibition des voies de signalisation transcriptionnelles (ex. l'axe VEGF/VEGFR) induisant l'arrêt de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (Liu et al.,2025).

Ici, la survenue d'un effondrement microvasculaire en seulement 3 heures, corrélée à l'apparition formelle de foyers d'occlusion luminale et de stase thrombotique (Couche III,

Paramètre 8), permet de classer sans ambiguïté ***Thymus vulgaris*L.** parmi les **agents de rupture vasculaire (VDA - *VascularDisrupting Agents***) (Spear et al., 2011).

Cette cinétique d'occlusion aiguë est caractéristique des composés à ciblage cytosquelettique, agissant notamment par liaison au site de la colchicine sur la α/β-tubuline. L'exposition rapide à ***Thymus vulgaris*L.** induit une dépolymérisation des microtubules au sein des cellules endothéliales des micro-vaisseaux, provoquant un changement de morphologie cellulaire (passage d'une forme aplatie à une forme sphérique ou *cellrounding*). Cette rétraction cellulaire augmente drastiquement la résistance mécanique intraluminale et expose la matrice extracellulaire pro-coagulante. Il s'ensuit une cascade d'agrégation érythrocytaire et plaquettaire in situ, visualisée ici par la fragmentation de la colonne sanguine et la sédimentation focale (Tozer et al., 2005)

L'effet du ***Thymus vulgaris L*.** n'est donc pas une réduction de la néovascularisation par privation de facteurs de croissance, mais une ischémie aiguë provoquée par l'effondrement fonctionnel et thrombotique du réseau vasculaire préexistant.

V.2. 5. Effet antivasculaire : activité perturbatrice vasculaire de l'extrait hydroalcoolique de *Buniumincrassatum (Batt.) Batt. &Trab.*

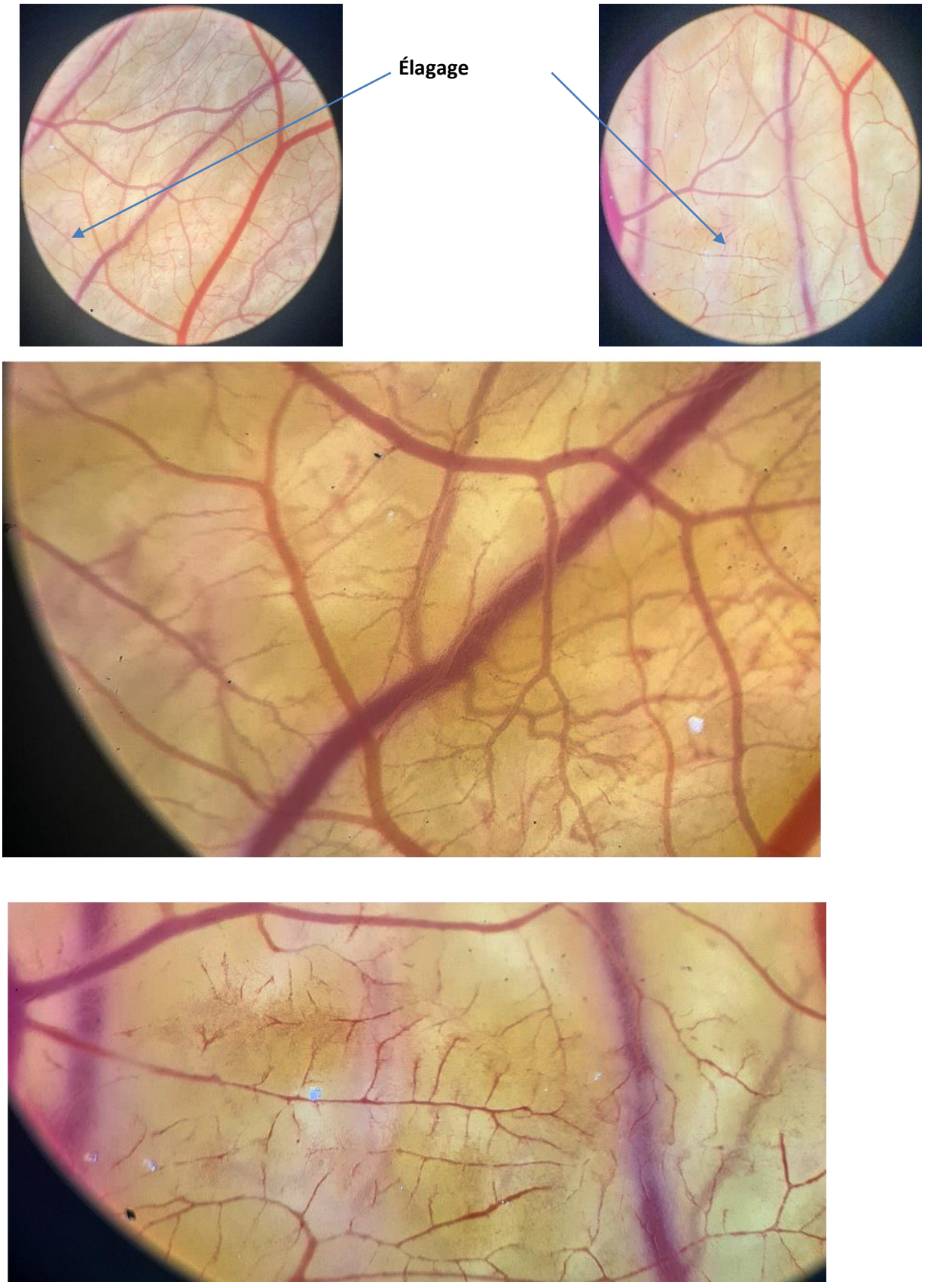


Figure 46: Action de l'extrait hydroalcoolique de ***Bunium incrassatum*** *(Batt.) Batt. & Trab.*; A) avant l'application de 20µL à 10mg/mL ; B) 8 heures après l'application.

L'évaluation de l'extrait hydroalcoolique de *Buniumincrassatum (Batt.) Batt. &Trab.*(appliquée à 10 mg/mL sous un volume de 20 µL, soit une dose de charge absolue de 200 µg/œuf) met en évidence une activité de disruption vasculaire (VDA - *VascularDisrupting Activity*) hautement sélective.

On note un effondrement structurel et fonctionnel du lit vasculaire en 3 heures :

- **Un élagage capillaire sélectif (*MicrovascularPruning*) :** L'analyse à fort grossissement révèle la disparition quasi-totale (~80 %) du réseau tridimensionnel de petits capillaires immatures. Les ramifications secondaires se rétractent, laissant place à des segments isolés, borgnes et non fonctionnels disposés en « squelette de poisson » ou en « peigne ».
- **Le phénotype des Vaisseaux Fantômes (*GhostVessels*) :** Les axes vasculaires principaux de gros calibre persistent sur le plan anatomique mais subissent un blanchiment macroscopique drastique (*blanching*). Ils se transforment en cylindres translucides, rose pâle, signant l'arrêt total du flux circulatoire superficiel (*vascularshutdown*).

L'ensemble de ces signes (vasoconstriction aiguë, rétraction endothéliale ciblée sur les vaisseaux immatures, stase circulatoire totale et maintien de l'intégrité structurale macroscopique sans hémorragie corrosive) démontre que l'extrait hydroalcoolique de *Buniumincrassatum (Batt.) Batt. &Trab.* agit comme un agent de disruption vasculaire. Ce profil mime le mécanisme d'action des molécules de référence ciblant le cytosquelette endothélial (type Combrétastatine A4), conférant à cet extrait un intérêt thérapeutique majeur dans le ciblage de la néovascularisation tumorale (Porcù et al.,2016).

Conclusion

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de recherche, s'est articulé autour de la valorisation pharmacobiochimique et de l'évaluation du potentiel antivasculaire de trois espèces végétales d'intérêt collectées dans la région de Mila : *Thymus vulgaris L.*, ***Mentha spicata L***. et *Buniumincrassatum* (Batt.) Batt. &Trab.. En exploitant le modèle d'angiogenèse *in ovo* de la membrane chorioallantoïdienne (*Chorioallantoic Membrane* – CAM), ces investigations ont permis de caractériser les profils d'activité perturbatrice vasculaire (VDA – *VascularDisrupting Activity*) de ces extraits, apportant des données d'intérêt pour le domaine de la pharmacologie moléculaire et translationnelle appliquée à l'oncologie.

Les conclusions majeures découlant de ce projet de recherche se déclinent selon quatre axes fondamentaux :

1. Optimisation pharmacotechnique et standardisation des extraits

Les procédés d'extraction par macération dynamique ont mis en évidence l'influence critique de la polarité du système de solvants sur la cinétique de transfert de masse et la sélectivité des phases cellulaires. Chez ***Mentha spicata L***., l'utilisation de l'eau pure a maximisé le rendement pondéral brut à 33,0 %, mais a induit une co-extraction de macromolécules pariétales interférentes (polysaccharides, mucilages, gommes) augmentant de façon critique la viscosité de la phase liquide. Le système solvant hydroéthanologique (eau/éthanol 30:70 v/v) a été validé comme le véhicule optimal pour le criblage biologique, stabilisant les rendements pondéraux à des valeurs modérées, soit 14,6 % pour ***Mentha spicata L***., 12,0 % pour *Buniumincrassatum* et 8,7 % pour *Thymus vulgaris L*..

2. Robustesse et validation de la sensibilité du modèle biologique *in ovo*

Le suivi cinétique du développement embryonnaire de *Gallus gallus* (de ED3 à ED14) a permis de cartographier l'établissement d'un réseau microvasculaire extra-embryonnaire hautement hiérarchisé (vaisseaux primaires en configuration en « Y », secondaires et tertiaires) au sein du tissu mésenchymateux, propice à l'analyse morphométrique des agents antivasculaires.

Le groupe témoin négatif (sérum salé tamponné au phosphate – PBS à 0,1 % de DMSO) a manifesté une neutralité phénotypique absolue au cours des cinétiques prolongées. La préservation intégrale de l'architecture vasculaire a validé l'innocuité du véhicule et

confirmé que la technique d'application physique n'introduisait aucun biais de stress biologique.

Le groupe témoin positif (fosbrétabuline / CA4P, pureté à 98 %) a pleinement validé la sensibilité pharmacologique du modèle.

3. Profils de disruption vasculaire (VDA) des extraits végétaux testés

L'administration topique directe d'un volume de 20 µL de solution mère (soit une dose de charge absolue de 200 µg/œuf) au douzième jour d'incubation (ED12) a révélé des propriétés de disruption vasculaire distinctes selon l'espèce végétale.

Thymus vulgaris L. **:** L'évaluation de l'extrait hydroalcoolique a mis en évidence un profil de rupture vasculaire aigu à court terme (t = 3 heures post-exposition).

L'extrait hydroalcoolique de ***Mentha spicata L.*** a provoqué une altération cinétique du réseau fonctionnel après 7 heures d'exposition, caractérisée par un blanchiment (*blanching*) généralisé du lit microvasculaire entraînant une extinction visuelle de 80 % des ramifications capillaires fines, parallèlement à la formation de vaisseaux fantômes (*ghostvessels*) translucides et à une stase circulatoire totale (*vascularshutdown*) objective sous stéréomicroscope.

L'extrait hydroalcoolique de *Buniumincrassatum* (Batt.) Batt. &Trab. a manifesté une cinétique d'action précoce, induisant un effondrement structurel et fonctionnel du lit vasculaire dès 3 heures post-traitement. L'analyse morphologique a révélé un élagage capillaire sélectif (*microvascularpruning*) causant la disparition de ~80 % des petits vaisseaux immatures sous forme de segments isolés non fonctionnels disposés en « peigne » ou en « squelette de poisson ». Ce profil a induit la transformation des axes principaux en vaisseaux fantômes et l'installation d'une stase circulatoire totale tout en maintenant l'intégrité macroscopique tissulaire, sans induction d'hémorragie corrosive. Ce comportement reproduit les signatures morphologiques caractéristiques des agents de disruption vasculaire (VDA) ciblant le cytosquelette des cellules endothéliales physiologiquement actives et hautement prolifératives.

4. Intégration de l'ingénierie d'imagerie numérique en bio-analyse

Sur le plan technologique, le protocole d'acquisition de données morphologiques par le couplage direct du capteur optique de 12 MP d'un smartphone (Samsung Galaxy S20 5G) à

l'oculaire du stéréomicroscope (Optika ST-30-2LF) via un adaptateur mécanique sur mesure a permis de standardiser l'acquisition morphométrique à haute résolution. Ce dispositif a garanti la stabilité du plan focal et le maintien de l'alignement axial optique au cours des analyses longitudinales et des évaluations statiques sur membranes fixées au formol à 4 %, offrant une alternative technique reproductible et performante pour l'analyse structurale en laboratoire.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Bien que ce travail apporte des évidences phénotypiques et pharmacologiques caractérisant l'activité de disruption vasculaire des extraits de *Buniumincrassatum* et de ***Mentha spicata L***., l'extension de ce programme de recherche exige la mise en œuvre des perspectives scientifiques suivantes :

1. **Fractionnement bio-guidé et caractérisation chimiométrique de haute résolution :** Déployer des analyses de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour les fractions volatiles (huiles essentielles), et de chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes ou à la spectrométrie de masse (HPLC-DAD/ESI-MS) sur les extraits polaires.
2. **Élucidation fine des mécanismes moléculaires et ultrastructuraux :** Conduire des analyses par immunohistochimie et par microscopie à fluorescence sur les tissus de la CAM fixés *in situ* afin de quantifier l'impact direct des extraits sur la dynamique de polymérisation du réseau de tubuline intracellulaire. Il s'agira également d'évaluer la désorganisation des complexes jonctionnels intercellulaires médiés par la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine), l'activation potentielle de la voie RhoA/ROCK, ainsi que l'induction d'apoptose endothéliale via le suivi de l'activation de la caspase-3 clivée.
3. **Modélisation dose-réponse et quantification par bio-analyse numérique :** Exploiter la série de dilutions géométriques extemporanées (1/2, 1/4, 1/6 et 1/8) afin d'établir les courbes de dose-réponse mathématiques, de déterminer précisément les concentrations minimales efficaces (CME) ainsi que les valeurs d' IC50 spécifiques. Cette étape intégrera des algorithmes de segmentation d'images numériques pour quantifier mathématiquement la densité de longueur vasculaire (*VascularLengthDensity* – VLD), l'index de bifurcation (points de branchement par

unité de surface) et la dimension fractale (Df) du réseau, tout en explorant d'éventuelles actions synergiques par la co-administration d'extraits combinés.

4. **Validation préclinique translationnelle sur modèles tumoraux *in vivo* :** Initier la transition vers le modèle supérieur d'évaluation en caractérisant la bioactivité de ces extraits standardisés sur des modèles de xénogreffes tumorales chez le rongeur (*in vivo*). L'objectif sera de confirmer leur capacité à induire une nécrose ischémique centrale sélective au sein d'une masse tumorale tridimensionnelle complexe, et d'étudier les stratégies d'association thérapeutique avec des agents chimiothérapeutiques ou antiangiogéniques conventionnels pour bloquer le phénomène d'échappement lié à la persistance de la bordure périphérique viable.

Références bibliographiques

- A. Spear, M., LoRusso, P., Mita, A., &Mita, M. (2011). Vascular disrupting agents (VDA) in oncology: advancing towards new therapeutic paradigms in the clinic. Current drug targets, 12(14), 2009-2015.
- Abdel-Rahman, O. and M. Fouad (2014). Risk of cardiovascular toxicities in patients with solid tumors treated with sunitinib, axitinib, cediranib or regorafenib: An updated systematic review and comparative meta-analysis. Critical Reviews in Oncology Hematology 92(3): 194-207.
- Abozid, M. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of the thyme and rosemary. International Journal of Academic Research, 5(3), 163-169. https://doi.org/10.7813/2075-4124.2013/5-3/A.26.
- Académie Nationale de Pharmacie. (2024). Dictionnaire des termes pharmaceutiques. http://dictionnaire.acadpharm.org/
- Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(6), 464-478.
- Aiouaz, N., & Bitam, A. (2022). Phytochemical study and valorization of Bunium incrassatum. Scientific report / thesis.
- Aiouaz, S., & Bitam, A. (2022). Effets des extraits de *Bunium incrassatum* sur la régulation hormonale et le métabolisme thyroïdien.
- Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. Circulation Research, 100(2), 158-173.
- Al-Hassan, A. Y., & Hill, D. R. (1986). Islamic Technology: An Illustrated History. Cambridge University Press. (Chapitre 5 : Chemical Technology, incluant l'histoire de la distillation et de la sublimation).
- Ammari, A., Amran, R., & Alhimaidi, A. (2026). Comparative Physiological and Phytochemical Characteristics of Syrian and Yemeni ***Thymus vulgaris L***. *Biology Bulletin*, *53*(2), 56.
- Amraoui, N., Boutefaha, Z., Belattar, N., & Arrar, L. (2024). Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous root extract of Algerian Bunium incrassatum. *Archives of Biological Sciences*, *76*, 15-25. https://doi.org/10.2298/abs231101042a
- Anton, M. (2013). Egg yolk :structures, functionalities and processes. Journal of Food Science and Technology,50(2), 185-193.

- 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 .
- Arul, B., &Kothai, R. (2020). Anticancer effect of capsaicin and its analogues. In Capsicum. London, UK:IntechOpen.
- Asadian, A. H. (2026). Agronomic Practices Affecting Yield and Phytochemical Composition of ***Thymus vulgaris L***: A Comprehensive Review.
- Asahara, T., et al. (1997). Isolation of putative endothelial progenitor cells for angiogenesis. Science, 275(5302), 964-967.
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Skalicka-Woźniak, K., ... & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. Nature Reviews Drug Discovery, 20(3), 200–216. https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z
- Attoui, N., Berroukeche, F., & Toul, F. (2021). Effect of the roots of Algerian *Bunium incrassatum* on biological, biochemical and histological parameters of mature female rats. Plant Archives (09725210), 21(1).
- Augustin, H. G., & Koh, G. Y. (2024). A systems view of the vascular endothelium in health and disease. *Cell, 187*(18), 4833-4858.
- Aulton, M. E., & Taylor, K. M. (Eds.). (2013). Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines (4th ed.). Churchill Livingstone.
- Ausprunk, D. H., et al. (1974).Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois. Developmental Biology, 38(2), 237-248.
- Aydin, E., et al. (2015). Anticancer and antioxidant properties of carvone and limonene in vitro. Plant Foods for Human Nutrition, 70(1), 19-24.
- Azzi, S., & Gavard, J. (2014). Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l'art du dialogue. Médecine/Sciences, 30(4), 408–414. https://doi.org/10.1051/medsci/20143004015.
- Babina, I. S., & Turner, N. C. (2017). Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. Nature Reviews Cancer, 17(5), 318-332. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.8.
- Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and signaling. Physiological Reviews, 84(3), 869-901.

- Beddiaf, B. (2007). Chronologie du developpement embryonnaire chez les oiseaux [Mémoire de Magister, .Université El-Hadj Lakhdar de Batna].
- Bennis, Y., Guillet, B., Curti, C., & Pisano, P. (2010). Intérêts thérapeutiques des médicaments antiangiogéniques disponibles en cancérologie. Therapies, 65(5), 423-428. https://doi.org/10.2515/therapie/2010057
- Berroukeche, F., Attoui, N., Toul, F., Ziane, M., Soulimane, N. M., & Merzouk, H. (2022). Investigation of antioxidant and anti-hemolytic properties of Algerian *Bunium incrassatum* tubers and their effects as diet on histological and biochemical parameters of normal Wistar rats. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, *2022*(01).
- Berroukeche, F., et al. (2022). Étude de la valorisation nutritionnelle et des activités biologiques des tubercules de Bunium incrassatum.
- Bielenberg, D. R. and B. R. Zetter (2015).The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. Cancer Journal 21(4): 267-273.
- Boukhebti H., Chaker A. N., Belhadj H., Sahli F., Laouer H., and Harzallah D., Chemical composition and antibacterial activity of Mentha pulegium L. and Mentha spicata L. essential oils, Der Pharmacia Lettre. (2011) 3, no. 4.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161(5), 839-851.
- Bousetla, A., et al. (2015). Chemical constituents of the roots of Algerian *Bunium incrassatum* and evaluation of its antimicrobial activity. Arabian Journal of Chemistry.
- Bousetla, A., Zellagui, A., Derouiche, K., & Rhouati, S. (2015). Chemical constituents of the roots of Algerian *Bunium incrassatum* and evaluation of its antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, *8*, 313-316. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.022
- Bracken, C. P., Fedele, A. O., Linke, S., Balshaw, W., Sharifi, M. N., Whitelaw, M. L., et Peet, D. J. (2006). Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1α and HIF-2α stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. Journal of Biological Chemistry, 281(32), 22575-22585.
- Brahmi, F., Lounis, N., Mebarakou, S., Guendouze, N., Yalaoui-Guellal, D., Madani, K., Boulekbache-Makhlouf, L., & Duez, P. (2022). Impact of Growth Sites on the Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Three Algerian Mentha Species (M.

pulegium L., M. rotundifolia (L.) Huds., and M. spicata L.). Frontiers in Pharmacology, 13, 886337.

- Bruneton, J. (2016). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicamenteuses (5e éd.). Éditions Lavoisier.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nature Medicine, 6(4), 389-395.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature, 438(7070), 932-936.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature, 407(6801), 249-257.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature, 473(7347), 298-307.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature, 473(7347), 298-307. https://doi.org/10.1038/nature10144
- Castan, A. (2014). Inhibition de l'angiogenèse tumorale : criblage d'une chimiothèque et caractérisation d'un nouveau composé agissant sur la voie de signalisation Ras-ERK (Thèse de doctorat, Université de Grenoble, France).
- Chen, L., Wang, S., Feng, Y., Zhang, J., Du, Y., Zhang, J., Van Ongeval, C., Ni, Y., & Li, Y. (2021). Utilisation of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model Platform for Imaging-Navigated Biomedical Research. Cells, 10(2), 463. https://doi.org/10.3390/cells10020463.
- Chen, Y., Wang, L., Jiang, J., Wei, Y., Jiao, P., Zhang, W., ... & Zhu, L. (2026). Combined treatment of TROP 2 targeted CAR-T and vascular disruptor CBP enhances anti tumor activity in triple negative breast cancer. Translational Oncology, 70, 102828.
- CHENTOUH S, B. S. (2018). EFFETS DES EXTRAITS ORGANIQUES DE Bunium incrassatum. Revue des BioRessources , 9
- Coon, J. T., M. Hoyle, et al. (2010). Bevacizumab, sorafenib tosylate, sunitinib and temsirolimus for renal cell carcinoma: a systematic review and economic evaluation Health Technology Assessment 14(2): 1-+.
- Couplan F, styner E. 1994. Plantes sauvages comestibles et toxiques. Delachaux et Niestlé édition, (Paris). Pl0-13, 389.

- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press.
- Cymer, I. M., McAuley, N., Richards, C. E., Jahns, H., Glavey, S. V., & Hopkins, A. M. (2026). A Bird's Eye View: A Close Look into Avian CAM Models for Translational Blood Cancer Research. *Cancers*, *18*(2), 209.
- DA SILVA, M. (2017). Les liquides amniotique et allantoïque de l'œuf de poule : caractérisation et rôles dans la protection de l'embryon au cours du développement [Thèse de doctorat, Université François-Rabelais de Tours].
- Dauqan, E. M. A., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and functional values of Thyme (***Thymus vulgaris L***.) Herb. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 5(02), 017-022. https://doi.org/10.7324/JABB.2017.50203.
- de Lima, L. T. F., Ganzella, F. A. O., Cardoso, G. C., dos Santos Pires, V., Chequin, A., Santos, G. L., ... & Cavalieri, E. A. S. R. (2023). l-carvone decreases breast cancer cells adhesion, migration, and invasion by suppressing FAK activation. Chemico-Biological Interactions, 378, 110480. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110480
- De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. Nature Reviews Cancer, 17(8), 457–474. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51
- Deeming, D. C. (2002). Avian Incubation: Behaviour, Environment, and Evolution. Oxford University Press.
- DELARUE,M.(2005).Disponible sur : http://www.inra.fr/actualites/NATURE/ypoule_biblio.htm
- Delgado-Bellido, D., Oliver, F. J., Vargas Padilla, M. V., Lobo-Selma, L., Chacón-Barrado, A., Díaz-Martin, J., & de Álava, E. (2023). VE-Cadherin in Cancer-Associated Angiogenesis: A Decœptive Strategy of Blood Vessel Formation. International Journal of Molecular Sciences, 24(11), 9343.
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. Histochemistry and Cell Biology, 130(6), 1119–1130.
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2008).Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. Histochemistry and Cell Biology, 130(6), 1119–1130. https://doi.org/10.1007/s00418-008-0536-2

- Djedir, G. (2018).Etude comparative entre deux espèces du Thym: Thymus coloratus et Thymus capitatus dans la région de Tlemcen : Aspect écologique, cartographique et morpho-métrique. Master, Université Aboubakr Belkaid, Tlemcen, Algérie.
- Dong, J., Sun, M., Cao, K., & Fang, T. (2026). Combination of vascular surgery with novel vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Frontiers in Oncology*, *15*, 1723016.
- Donnem, T., Hu, J., Ferguson, M., Adighibe, O., Snell, C., Harris, A. L..... & Pezzella, F. (2013). Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment?. Cancer medicine, 2(4), 427-436.
- Echappees sauvages. Thym - ***Thymus vulgaris L***. 2011. http://www.mauvaisesherbes.org/t1251-thym-thymus-vulgaris-1.
- Echappees sauvages. Thym - ***Thymus vulgaris L***. 2011. http://www.mauvaisesherbes.org/t1251-thym-thymus-vulgaris-1
- Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M. L., & Jouad, H. (2007).Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the South-East region of Morocco (Tafilalet). Journal of Ethnopharmacology, 111(1), 97-112.
- Efferth, T. (2007). From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy: Phytotherapy with artemisinin derivatives. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 13(8), 353-361.
- El Kolli, H., Laouer, H., & El Kolli, M. (2017). Chemical composition and biological activities of the essential oils and the methanolic extracts of *Bunium incrassatum* and Bunium alpinum from Algeria. Journal of the Chilean Chemical Society, 62(1), 3335-3341. https://doi.org/10.4067/S0717-97072017000100006
- El Menyiy, N., Mrabti, H. N., El Omari, N., El Bakili, A., Bakrim, S., Mekkaoui, M., Balahbib, A., Amiri-Ardekani, E., Ullah, R., Alqahtani, A. S., Shahat, A. A., & Bouyahya, A. (2022). Medicinal Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of Mentha spicata. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, Article 7990508. https://doi.org/10.1155/2022/7990508.
- Elsherif, E. A., Al-Shaeri, M. A., & Khan, J. A. (2023). Phytochemical screening and comparative evaluation of the antimicrobial potential of various extracts of ***Thymus vulgaris L***. Journal of King Saud University - Science, 35(4), 102611.

- Esper, R. J., Nordaby, R. A., Vilariño, J. O., Paragano, A., Cacharrón, J. L., & Machado, R. A. (2006). Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. Cardiovascular Diabetology, 5(1), 4.
- European Medicines Agency (EMA). (2023). Herbal medicinal products. Consulté sur le site officiel de l'EMA:https://www.ema.europa.eu.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., & Novotny, W. (2005). Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. Biochemical and biophysical research communications, 333(2), 328-335.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P., & Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nature Reviews Drug Discovery, 3(5), 391–400. https://doi.org/10.1038/nrd1381
- Firenzuoli, F. (2004). Phytotherapy: A quick reference to herbal medicine. Springer.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. New England Journal of Medicine, 285(21), 1182-1186.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*, *285*(21), 1182–1186.
- Folkman, J. (2003). Angiogenesis and apoptosis. Seminars in Cancer Biology 13(2): 159-167.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. Nature Reviews Drug Discovery, 6(4), 273-286.
- Fridman, W. H., &Sautès-Fridman, C. (2014). Le microenvironnement tumoral-Matrice nourricière, champ de bataille et cible thérapeutique des cancers. Médecine/Sciences, 30(4), 359-365.
- Gabrielli, M. G., & Accili, D. (2010). The chick chorioallantoic membrane: A model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. International Journal of Pediatrics, 2010, 940741. https://doi.org/10.1155/2010/940741
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid-derived suppressor cells by tumors. Nature Reviews Immunology, 12(4), 253–268. https://doi.org/10.1038/nri3175
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., & Betsholtz, C. (2003). VEGF guides

angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. The Journal of Cell Biology, 161(6), 1163-1177. https://doi.org/10.1083/jcb.200302047

- Gianni-Barrera, R., Trani, M., Fontanellaz, C., Heberer, M., Djonov, V., & Banfi, A. (2013). VEGF over-expression in skeletal muscle induces angiogenesis by intussusception rather than sprouting. Angiogenesis, 16(1), 123-136.
- Gilbert, A. B. (1971). The egg: Its physical and chemical characteristics. In D. J. Bell & B. M. Freeman (Eds.), Physiology and biochemistry of the domestic fowl (Vol. 3,
- Godo, S., &Shimokawa, H. (2017).Endothelial functions.Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 37(9), e108-e114. https://doi.org/10.1161/ATVBAH A.117.309813.
- Gómez-Escudero, J., Berlana-Galán, P., Guerra-Paes, E., Torre-Cea, I., Marcos-Zazo, L., Carrera-Aguado, I., ... & Muñoz-Félix, J. M. (2025). Vascular Disruption Therapy as a New Strategy for Cancer Treatment. International journal of molecular sciences, 26(20), 10085.
- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., & Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin.Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(17), 6624-6628. https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6624
- Guibert, P. (2023). Histoire dessubstances médicamenteuses: de l'herboristerie à la pharmacologie moléculaire. Éditions de Santé.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2016). Textbook of medical physiology (13th ed.). Elsevier.
- Halgrain, M. (2023). La membrane chorioallantoïque au cours du développement embryonnaire chez le poulet. Thèse de doctorat, Université de Tours.
- Hall, J. E., & Hall, M. E. (2021). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (14th ed.). Elsevier.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. Cancer Discovery, 12(1), 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144(5), 646-674 13.https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.0.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.

- Harborne .J.B, (1998).Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214.
- 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.
- Hayet, R., et al. (2017). Chemical composition of the essential oil of *Bunium incrassatum* aerial parts. Article scientifique.
- Hellström, M., et al. (2007). DII4 signalling through Notch1 regulates formation of mutant vessels during angiogenesis. Nature, 445(7129), 776-780.
- Heng, D. Y. C., & Kollmannsberger, C. (2009). Sunitinib. In Recent results in cancer research (pp. 71–82). Springer.
- Hincke, M. T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A. B., & McKee, M. D. (2012). The eggshell: structure, composition and mineralization. Frontiers in Bioscience, 17(1), 1266-1280. doi:10.2741/3985.
- Houben, R., Antonissen, G., Croubels, S., & De Backer, P. (2016). Pharmacokinetics of drugs in avian species and the applications and limitations of dose extrapolation. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 85(3), 124–132. https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154367
- Huxtable, R. J., & Schwarz, S. K. (2001). The isolation of morphine—and the Kliks of history. *Molecular Interventions*, 1(4), 189-191.
- Ivan, I. M., Popovici, V., Chițescu, C. L., Popescu, L., Luță, E. A., Ilic, E. I., ... &Gird, C. E. (2024). Phytochemical Profile, Antioxidant and Cytotoxic Potential of Capsicum annuum (L.) Dry Hydro-Ethanolic Extract. Pharmaceutics, 16(2), 245.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2001).Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation.
- Jadhav, A., et al. (2016). Anti-angiogenic activity of Mentha arvensis L. leaves extracts using Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) assay. World Journal of Pharmaceutical Research, 5(2), 679-688 .

- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation.Nature Medicine, 9(6), 685-693.
- Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. Science, 307(5706), 58-62.
- Janic, B., & Arbab, A. S. (2010). The role and therapeutic potential of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization. The Scientific World Journal 10 (1), 1088-1099.
- Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L., & Bouck, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. Nature Medicine, 6(1), 41-48. https://doi.org/10.1038/71517
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nature Reviews Cancer, 3(6), 422-433.
- Kamal, A., Shaik, R., & Yakkalaa, P. A. (2026). Tubulin polymerization inhibitors in early clinical studies as cancer therapeutics. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *35*(4), 273-294.
- Kanthou, C., & Tozer, G. M. (2002). The tumor vascular disrupting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and focal adhesions in endothelial cells. Blood, 99(6), 2060–2069. https://doi.org/10.1182/blood.V99.6.2060.
- Kennedy, D. C., Coen, B., Wheatley, A. M., & McCullagh, K. J. A. (2022). Microvascular experimentation in the chick chorioallantoic membrane as a model for screening angiogenic agents including from gene-modified cells. International Journal of Molecular Sciences, 23(1), 452. https://doi.org/10.3390/ijms23010452
- Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. New England Journal of Medicine, 358(19), 2039-2049.
- Khan, M. H., Dar, N. A., Alie, B. A., Dar, S. A., Lone, A. A., & Mir, G. H. (2023). Unraveling the variability of essential oil composition in different accessions of Bunium persicum collected from different temperate micro-climates. Molecules, 28(5), Article 2404. https://doi.org/10.3390/molecules28052404
- Khazir, J., Mir, B. A., Pilcher, L., & Riley, D. L. (2014). Role of plants in anticancer drug discovery. Phytochemistry letters, 7, 173-181.

- Kitowski, A., Heise, C., Sperling, S., Hotz, J., Bajic, D., Rubey, M., ... & Thorn-Seshold, J. (2026). Delivery of nano-formulated drugs to solid tumours is selectively increased by co-application of the vascular disrupting agent CA4P. *British Journal of Pharmacology*.
- Knighton, D., Ausprunk, D., Tapper, D., & Folkman, J. (1977). Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. British Journal of Cancer, 35(3), 347–356. https://doi.org/10.1038/bjc.1977.49
- Kunz, P., Schenker, A., Sähr, H., Lehner, B., Fellenberg, J., & Metzger, W. (2019). Optimized chicken chorioallantoic membrane assay as reliable in vivo model for the analysis of osteosarcoma. PLoS ONE, 14(4), e0215312.
- Kurz, H., Burri, P. H., & Djonov, V. G. (2003). Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: From form to function. News in Physiological Sciences, 18(2), 65-70.
- Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., & Samuel, J.-L.(2007).Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. John Libbey.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging biological principles of metastasis. Cell, 168(4), 670-691.
- Lawrence, B. M. (2007). The Composition and Plant Origins of Commercial Mint Essential Oils and Extracts. In: Mint: The Genus Mentha. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 67-153.
- Lerman, A., & Burnett, J. C. (1992). Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. Circulation, 86(6), III-19.
- Létard, H., et al. (2015).Phytothérapie: bases scientifiques et applications cliniques. Revue des Sciences de la Santé.
- Levey, M. (1973).Early Arabic Pharmacology: An Introduction Based on Ancient and Medieval Sources. Leiden: E.J. Brill.
- Li, H., Liu, K., Yang, Z., Sun, Q., Shang, W., Li, Y., ... & Shen, W. (2025). Oncolytic polymer-mediated combretastatin A4 phosphate delivery for enhancing vascular disrupting therapy. International Journal of Pharmaceutics, 674, 125438.
- Li-Chan, E., & Nakai, S. (1989). Biochemical basis for the properties of egg white. Critical Reviews in Poultry Biology, 2, 21-58.

- Lichota, A., & Gwozdzinski, K. (2018). Anticancer activity of natural compounds from plants and their outcomes in cancer therapy. International Journal of Molecular Sciences, 19(11), 3537.
- Lietava, J. (1992). Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV?. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(3), 263-266.
- Lin, Y., Xu, J., & Lan, H. (2019). Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications. Journal of Hematology & Oncology, 12(1), 76. https://doi.org/10.1186/s13045-019-0760-3
- Liu, X., Zhang, J., Yi, T., Li, H., Tang, X., Liu, D., ... & Li, Y. (2025). Decoding tumor angiogenesis: pathways, mechanisms, and future directions in anti-cancer strategies. BiomarkerResearch, 13(1), 62.
- López, J. R. H. (2026). Bioethics in the Use of Laboratory Animals, Strategies for Reduction, Replacement, and Refinement in rodents. *Mexican Journal of Medical Research ICSA*, *14*(27), 29-34.
- Mahboubi, M. (2021). *Mentha spicata L*. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in treatment of different ailments. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 11(2), 75-81.
- Mahendran, G., Verma, S. K., & Rahman, L. U. (2021). The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (*Mentha spicata L.):* A review. Journal of Ethnopharmacology, 278, 114266. https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114266.
- Majnooni, M. B., Fakhri, S., Ghanadian, S. M., Bahrami, G., Mansouri, K., Iranpanah, A., … &Mojarrab, M. (2023). Inhibiting angiogenesis by anti-cancer saponins: From phytochemistry to cellular signaling pathways. Metabolites, 13(3), 323.
- Mann, K. (2008). Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. Proteomics, 8(11), 2322-2332.
- Marieb, E. N., & Hoehn, K. (2019). Human anatomy & physiology (11th ed.). Pearson.
- Mentzer, S. J., & Konerding, M. A. (2014). Intussusceptive angiogenesis: Expansion and remodeling of microvascular networks. Angiogenesis, 17(3), 499-509.

- Mescher, A. L. (2013). Junqueira's basic histology: Text and atlas (12th ed.). McGraw-Hill Medical.
- Miao, M., & Hamaker, B. R. (2021). Food matrix effects for modulating starch bioavailability. Annual Review of Food Science and Technology, 12, 169–191. https://doi.org/10.1146/annurev-food-070620-013937
- Mine, Y. (2008). Egg Bioscience and Biotechnology. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. (Section: Antimicrobial proteins in eggshell membrane).
- Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. Thyme: the genus Thymus, 15-57.
- Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Højrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H. W., & Pizzo, S. V. (1999). Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), 96(6), 2811-2816. https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2811
- Murthy, K. N. C., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2012). D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. Life Sciences, 91(11-12), 429-439.
- Nakamura, T., & Mizuno, S. (2010). The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology and medicine [La découverte du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et son importance pour la biologie cellulaire et la médecine]. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 86(6), 588–610. https://doi.org/10.2183/pjab.86.58.
- National Cancer Institute. (2024). NCI drug dictionary: Fosbretabulin disodium. U.S. Department of Health and Human Services. Consulté le 21 juin 2026 sur https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/fosbretabulin-disodium
- Ndahindwa, V., Ngendahayo, L., & Vyankandondera, J. (2013). Aspects épidémiologiques et anatomopathologiques des cancers dans les centres hospitaliers universitaires (chu) du Rwanda.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803.

- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. Vascular Health and Risk Management, 2(3), 213–219.
- Noiva, R. M., Menezes, A. C., & Peleteiro, M. C. (2014). Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. BMC Veterinary Research, 10, 234. https://doi.org/10.1186/s12917-014-0234-3
- Noman, A. M., Sultan, M. T., Zafar, S., & Maaz, M. (2025). Thymol and carvacrol: molecular mechanisms, therapeutic potential, and synergy with conventional therapies in cancer management. Food Science & Nutrition, 13(9), Article e70936.
- Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. Angiogenesis, 17(4), 779–804.
- Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology and medicine. Angiogenesis, 17(4), 779-804.
- Nys, Y., & Guyot, N. (2011). Egg formation and chemistry. In: Improving the safety and quality of eggs and egg products. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp. 83-132.
- Nys, Y., Hincke, M.-T., Hernandez-Hernandez, A., Rodriguez-Navarro, A.-B., Gomez-Morales, J., Jonchère, V., García-Ruiz, J.-M., & Gautron, J. (2010). Structure, propriétés et minéralisation de la coquille de l'œuf : rôle de la matrice organique dans le contrôle de sa fabrication. INRA Productions Animales, 23(2), 143-154.
- Oguntade, A. S., Al-Amodi, F., Alrumayh, A., Alobaida, M., & Bwalya, M. (2021). Antiangiogenèse dans les thérapeutiques contre le cancer : la balle magique. Journal de l'Institut National du Cancer d'Égypte, 33, Article 15 .
- Okumura, K., et al. (2004).Structure of the chicken egg vitelline membrane. Animal Science Journal, 75(2), 107-117.
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7(5), 359-371.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., ... & Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79(2), 315-328.

- Organisation mondiale de la Santé (OMS). (2019). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle:2014-2023. OMS.
- Organisation mondiale de la Santé. (2013). •WHO traditional medicine strategy 2014–2023 .
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. Genes & Development, 29(14), 1463-1486. https://doi.org/10.1101/gad.266551.115.
- Patan, S. (2004). Vasculogenesis and angiogenesis. Cancer Treatment and Research, 117, 3-32.
- Patterson, D. M., & Rustin, G. J. S. (2007). Vascular damaging agents. Clinical oncology, 19(6), 443-456.
- Pelletier, J., & Caventou, J. B. (1820). Recherches chimiques sur les quinquinas. *Annales de Chimie et de Physique*, *15*, 289–318.
- 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.
- Phil, S. (2014). The Lymph System and Lymphoid Organs and Tissues. Retrieved https://www.slideserve.com/phil/the-lymph-system-and-lymphoid-organs-and-tissues (retrieved on July 7, 2024).
- Pluhár, Z., Simkó, H., Sárosi, S., Boros, B., Dörnyei, Á., Felinger, A., & Horváth, G. (2012, June). Determination of essential oil and polyphenolic compounds in Thymus species. In II International Symposium on Horticulture in Europe 1099 (pp. 661-670).
- Ponte, A., Ciucani, M. M., & Djonov, V. (2012). Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. Angiogenesis, 15(4), 529-540.
- Porcù, E., Salvador, A., Primac, I., Mitola, S., Ronca, R., Ravelli, C., ... & Viola, G. (2016). Vasculardisruptingactivity of combretastatin analogues. Vascular pharmacology, 83, 78-89.
- Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell, 146(6), 873-887.

- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. Cytokine & Growth Factor Reviews, 16(2), 159-178.
  Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(7), 2662-2671.
- Pugsley, M. K., & Tabrizchi, R. (2000). The vascular system: An overview of structure and function. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 44(2), 333–340. https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00125-8.
- Quézel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome II). Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).
- Rafii, S., & Lyden, D. (2003). "Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration." Nature Medicine, 9(6), 702-.712.
- Raica, M., & Cimpean, A. M. (2010). Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. Pharmaceuticals, 3(3), 572–599. https://doi.org/10.3390/ph3030572.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as a source of drugs. Toxicon, 39(5), 603–613.
- Reddy, V. P., Kandisa, R. V., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on Thymus vulgaris Traditional Uses and Pharmacological Properties. Medicinal & Aromatic Plants, 3(3), 164. doi:10.4172/2167-0412.1000167.
- Ribatti, D. (2010). The chick chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and anti-angiogenesis of natural products. Fitoterapia, 81(6), 467-473.
- Ribatti, D. (2014). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 328(2), 314-324.
- Ribatti, D. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. Mechanisms of Development, 141, 70–77. https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.05.003
- Ribatti, D. (2017). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. Reproductive Toxicology, 70, 97-101. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.004
- Ribatti, D. (2021). The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay in Angiogenesis Research. Methods in Molecular Biology.
- Ribatti, D. (2023).The chick embryo chorioallantoic membrane patient-derived xenograft (PDX) model.Pathology - Research and Practice, 243, 154367.
- Ribatti, D. (2025). Lymphatics in the chick embryo chorioallantoic membrane. Microvascular Research, 160, 104806.

- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P. H., & Djonov, V. (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. The Anatomical Record, 264(4), 317–324. https://doi.org/10.1002/ar.10021

- Riddle, J. M. (1986). Dioscorides on pharmacy and medicine. University of Texas Press.

- Risau W and Flamme I. (1995). Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 11: 73-91.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671-674.
- Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 11(1), 73-91.
- Risau, W., & Lemmon, V. (1988). Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. Development, 125(2), 441-450.
- Romanoff, A. L. (1960). The Avian Embryo: Structural and Functional Development. MacMillan, New York.
- Rose-Martel, M., Du, J., & Hincke, M. T. (2012). Proteomic analysis of the chicken eggshell membrane: Identification of novel proteins and canonical pathways. Journal of Proteomics, 75(14), 4347-4361.doi:10.1016/j.jprot.2012.03.040.
- Rüegg, C. (2002). Une nouvelle cible pour la thérapeutique anticancéreuse: la vascularisation tumorale. Sujet d'étude / Revue. https://pdfs.semanticscholar.org/...
- Saad, B. (2013). Greco-Arab and Islamic herbal medicine: A review of history, therapeutic applications, and scientific validation. Phytomedicine Plus, 4(3), 249-258.

- Saad, B., & Said, O. (2011). *Greco-Arab and Islamic herbal medicine: traditional system, ethics, safety, efficacy, and regulatory issues*. John Wiley & Sons.

- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. d. M., Segura-Carretero, A., Fathi, H., Nasrabadi, N. N., Kobarfard, F., & Sharifi-Rad, J. (2018).Phytochemical, pharmacological and therapeutic mechanisms of ***Thymus vulgaris L***. Phytotherapy Research, 32(9), 1688–1706. https://doi.org/10.1002/ptr.6109
- Samaniego-Rafaele, C., Salvador-Reyes, R., Quispe-Santivañez, G., & Barriga-Sánchez, M. (2025). Modified tuber starches as sustainable biopolymers for the

encapsulating bioactive compounds: A comprehensive review. Polymers, 17(24), 3257. https://doi.org/10.3390/polym17243257

- Sampaio, L. A., Pina, L. T. S., Serafini, M. R., Tavares, D. S., & Guimarães, A. G. (2021).Antitumor effects of carvacrol and thymol: A systematic review. Frontiers in Pharmacology, 12, Article 702487. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.702487 Science, 292(5516), 468-472. https://doi.org/10.1126/science.1059796
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nature Reviews Cancer, 3(10), 721-732. https://doi.org/10.1038/nrc1187.
- Sertürner, F. W. (1817). Ueber das Morphium, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandtheile des Opiums [Sur la morphine, une nouvelle base salifiable, et l'acide méconique, comme principaux constituants de l'opium]. *Annalen der Physik*, *55*(1), 56–89. https://doi.org/10.1002/andp.18170550104

- Sertürner, F. W. (1817). Ueber das Morphium, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandtheile des Opiums. *Annalen der Physik*, 55(1), 56-89.

- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., & Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature, 376(6535), .62-66.
- Sharifi-Rad, M., Ozcelik, B., Altın, G., Daşkaya-Dikmen, C., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., Alarcón-Zapata, P., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Leal, A. L. B., Coutinho, H. D. M., Gyawali, R., Tahergorabi, Reza., Ibrahim, S. A., & Sharifi-Rad, J. (2018). Salvia spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. Trends in Food Science & Technology, 80, 242–263. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.008.
- Sharma, V., Hussain, S., Gupta, M., & Saxena, A. K. (2014). In vitro anticancer activity of extracts of Mentha spp. against human cancer cells. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 51(5), 416–419.
- Sherazi, A. W., Rasool, M. F., Jiao, Z., & Alqahtani, F. (2026). A systematic review on clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors (TKIs) with high TDM scores. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 1-18.

- Shibuya, M. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: A crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. Genes & Cancer, 2(12), 1097–1105. https://doi.org/10.1177/1947601911423031.
- Siekmann, A. F., Covassin, L., & Lawson, N. D. (2008). Modulation of VEGF signalling output by the Notch pathway. Bioessays, 30(4), 303-313.
- Siemann, D. W. (2011). The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor Vascular Disrupting Agents. Cancer Treatment Reviews, 37(1), 63–74. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.05.001.
- Sierra, K., Naranjo, L., Carrillo-Hormaza, L., Franco, G., &Osorio, E. (2022). Spearmint (*Mentha spicata L.)* Phytochemical Profile: Impact of Pre/Post-Harvest Processing and Extractive Recovery. Molecules, 27(7), 2243. https://doi.org/10.3390/molecules27072243
- Silverthorn, D. U. (2018). Human physiology: An integrated approach (8e éd.). Pearson.
- Sinko, P. J. (2017). Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (7th ed.). Wolters Kluwer.
- Slaton, J. W., Perrotte, P., Inoue, K., Dinney, C. P., & Fidler, I. J. (1999).Interferon-a-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. Clinical Cancer Research, 5(10), 2726-2734.
- Sleijfer, S., Ray-Coquard, I., Papai, Z., Le Cesne, A., Goldstein, M., Schöffski, P., Vassal, G., Gill, S., Mendoza, J., Green, J., Marreaud, S., & Blay, J. Y. (2009). Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC 62043). Journal of Clinical Oncology, 27(19), 3126–3132.
- Solecki, R. S. (1975). Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science*, 190(4217), 880-881.
- Stadelman, W. J., & Cotterill, O. J. (1995). Egg Science and Technology. 4th Edition. CRC Press.

- Standring, S. (Ed.). (2021). Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice (42nd ed.). Elsevier.
- Swartz, M. A., & Lund, A. W. (2012). Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: Linking biology and mechanics. Nature Reviews Cancer, 12(3), 210–219. https://doi.org/10.1038/nrc3186.
- Szekanecz Z., Besenyei T., Paragh G et Koch A. E. (2010). Actualités sur l'angiogenèse synoviale. Revue du rhumatisme, 77(1), 14-20.
- Tafrihi, M., Imran, M., Tufail, T., et al. (2021). The Wonderful Activities of the Genus Mentha: Not Only Antioxidant Properties. *Molecules*, *26*(4), 1118. https://doi.org/10.3390/molecules26041118
- Taïbi, K., Ait Abderrahim, L., Helal, F., & Hadji, K. (2021). Ethnopharmacological study of herbal remedies used for the management of thyroid disorders in Algeria. Saudi Pharmaceutical Journal, 29(1), 43–52.
- 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). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering.
- Thorpe, P. E., Chaplin, D. J., & Blakey, D. C. (2003). The first international conference on vascular targeting: meeting overview.
- Toul, F., Djendan, A., Seladji, M., & Farid, B. (2022). Algerian Buniumincrassatum Seeds: Effects of Extraction Solvent Polarity on Phenolic Profile and Antioxidant Activity. Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry, 9(2), 475-482
- Tozer, G. M., Kanthou, C., & Baguley, B. C. (2005). Disrupting tumour blood vessels. Nature Reviews Cancer, 5(6), 423-435.
- Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. Nature Medicine, 17(10), 1217-1220.
- Tu, Y. (2016). Artemisinin—A gift from traditional Chinese medicine to the world (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 55(35), 10210-10226.
- Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. Nature Reviews Cancer, 10(2), 116-129. https://doi.org/10.1038/nrc2780.

- Voutouri, C., Kirkpatrick, N. D., Chung, E., Mpekris, F., Baish, J. W., Munn, L. L., ... & Stylianopoulos, T. (2019). Experimental and computational analyses reveal dynamics of tumor vessel cooption and optimal treatment strategies.
- Walewska, M., Dolka, I., Małek, A., Wojtalewicz, A., Wojtkowska, A., Żbikowski, A., Lechowski, R., & Zabielska-Koczywąs, K. (2017). Experimental tumor growth of canine osteosarcoma cell line on chick embryo chorioallantoic membrane (in vivo studies). Acta Veterinaria Scandinavica, 59(1), 30. https://doi.org/10.1186/s13028-017-0298-8
- Waugh, A., & Grant, A. (2022). Ross and Wilson anatomy and physiology in health and illness (14th ed.). Elsevier.
- Wichtl, M., & Anton, R. (2003). Plantes médicinales: Thérapeutique .et pharmacologie (3e éd.). Tec & Doc.
- Wilhelm, S. M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J. M., & Lynch, M. (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. Molecular Cancer Therapeutics, 7(10), 3129–3140.
- Wilting, J., Christ, B., &Bokeloh, M. (1991). A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors: Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin, and bFGF. Anatomy and embryology, 183(3), 259-271.
- 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.
- Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Sharma, V., & Kaur, G. (2015). Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. Journal of Clinical andDiagnosticResearch,9(6),XE01. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12016.6135
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. Molecules, 21(5), 559.
- 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.
- Zhou, M., Hou, J., Li, Y., Mou, S., Wang, Z., Horch, R. E., Sun, J., & Yuan, Q. (2019). The proangiogenic role of hypoxia inducible factor stabilizer FG-4592 and its

application in an in vivo tissue engineering chamber model. Scientific Reports, 9, 6035. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41924-5.