

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحي جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de  
la Vie  
Département de Biologie Moléculaire et  
Cellulaire



كلية: علوم الطبيعة والحياة  
قسم: البيولوجيات الجزيئية والخلوية

## Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme : de Master Académique en Sciences  
de La Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option: Sciences Pharmacologiques



## Thème

Etude de l'activité anti-angiogénique de l'extrait aqueux  
de fruits de *Pistacia lentiscus L.* par le test *in ovo* de la  
membrane chorioallantoïque de l'embryon du poulet

### Membres de Jury

Présidente: Dr. KEBSA Wided  
Examinatrice: Dr. ZABAIYOU Nada  
Encadrante: Dr. BENGUEDOUAR Lamia

### Présenté par :

GUERDOUH Nour-Elhouda  
TOUMI Nor -Elhouda

Année Universitaire 2021-2022

Numéro d'ordre (bibliothèque) :.....



## Remerciement

*Avant tout nous remercions "Allah" le tout puissant qui nous a donnés le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairés le chemin de la réussite*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à Madame Hadjer **KEMEL** et Monsieur le docteur **Boujerda Djamel** notre encadrante Madame le docteur **Lamia BENGUEDOUAR**,*

*Nous remercions vivement les membres de ce jury :*

*Madame le docteur **KEBSA Wided** et madame le docteur **ZABAIOU Nada** qui nous fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nos remerciements les plus sincères à nos très chers parents, pour leurs soutiens indéfectibles, leurs encouragements indispensables et précieux qui nous ont permis d'avancer. Nous espérons un jour, être à la hauteur de vos attentes. Nous exprimons nos vifs remerciements aux techniciens de laboratoires.*

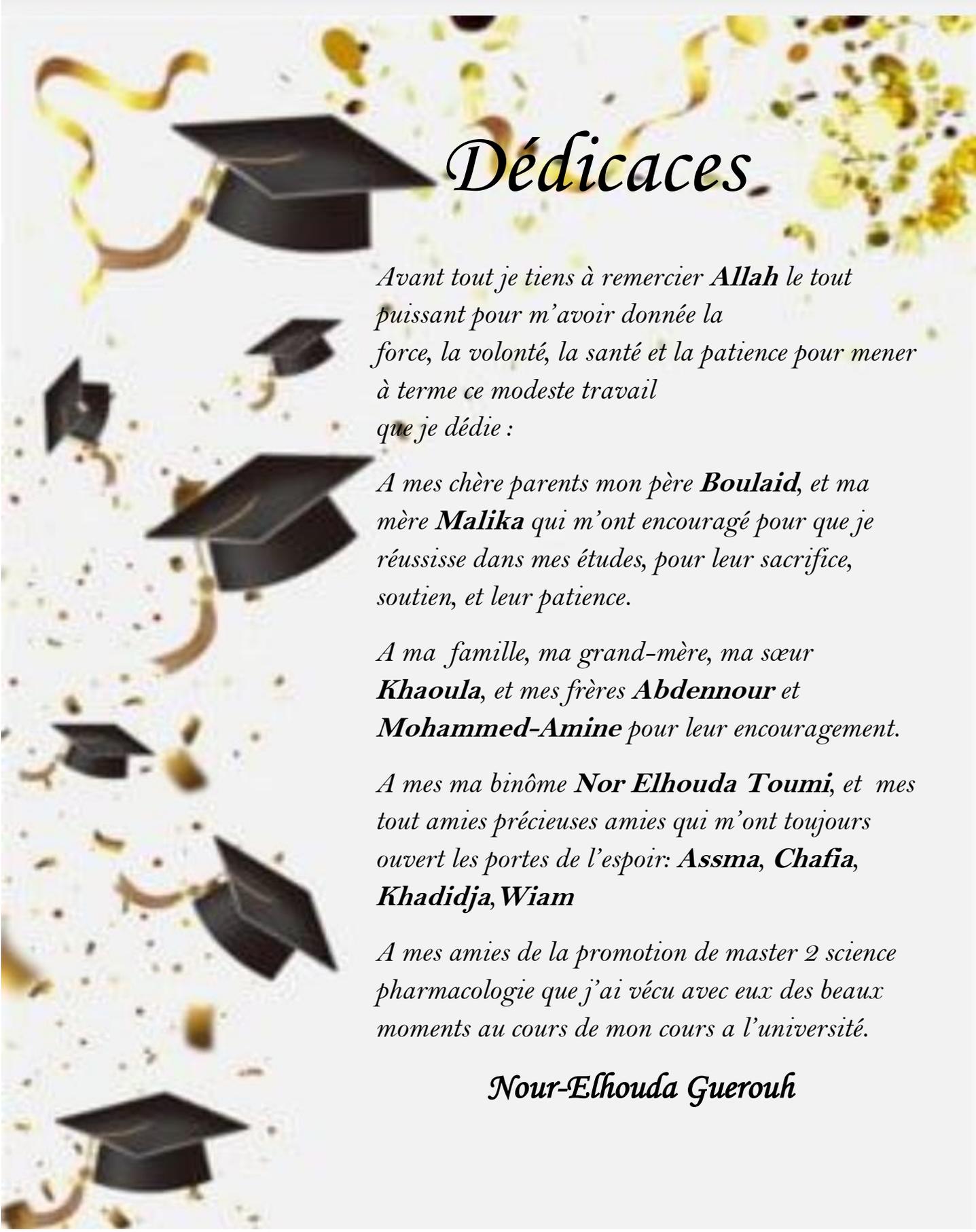
*Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des enseignants du département des Sciences de la Nature et de la Vie qui ont contribué à notre formation.*

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

**GVERDOUH Nour-Elhouda**

**TOUMI Nor -Elhouda**





# Dédicaces

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

*A mes chère parents mon père **Boulaid**, et ma mère **Malika** qui m'ont encouragé pour que je réussisse dans mes études, pour leur sacrifice, soutien, et leur patience.*

*A ma famille, ma grand-mère, ma sœur **Khaoula**, et mes frères **Abdenour** et **Mohammed-Amine** pour leur encouragement.*

*A mes ma binôme **Nor Elhouda Toumi**, et mes tout amies précieuses amies qui m'ont toujours ouvert les portes de l'espoir: **Assma, Chafia, Khadidja, Wiam***

*A mes amies de la promotion de master 2 science pharmacologie que j'ai vécu avec eux des beaux moments au cours de mon cours a l'université.*

**Nour-Elhouda Guerouh**



## *Dédicaces*

*Avec l'aide de DIEU le tout puissant est achevé le présent travail, Je dédie ce mémoire :*

*A mes beaux Parents, ma très chère mère **Messouda** la plus belle chose dans la vie ton amour et son affection et mon chère père **Amer** Pour sa confiance tous leurs amours, Pour tous leurs sacrifices, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, Que dieu leur procure bonne santé et longue vie*

*A mes sœurs et frères **Hayat, Naima, Halim et Mohamed** Pour leurs encouragements permanents vous occupez une place particulière dans mon cœur, Dieu vous donne santé, bonheur et réussite.*

*Ma belle sœurs **Meryem***

*Mes beaux -frères **Abdenmour et Mohammed***

*A mes nièces mes chers **Nasr-allah el amin et Ishak**, mes chères **Tawba djanan, Dounia et Wissem***

*Ma petite princesse **mariem nour elyakin** et mon prince **anes Youssef***

*La famille de ma mère **Bougaci** Surtout ma grands mère **Fatma**, mon oncle maternel **mouloud** et ma tante **safia***

*A mon binôme **Nour -el- houda Guerdouh***

*Mes meilleures amies **Sarra, Nassima, Asma, Khalissa, Fairouz , Messouda et soumia***

*Et À tous ceux qui me connaissent et me connectent avec amour et amitié*

***Nor-Elhouda Toumi***



# Sommaire

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	1
<b>Chapitre I. Angiogenèse</b>	
I.1.Généralités.....	3
I.2.L'angiogenèse .....	3
I.2.1.Définition .....	3
I.2.2 La cellule endothéliale .....	3
I.2.3.Les étapes de l'angiogenèse .....	4
I.2.3.1.La sélection .....	4
I.2.3.2.La migration .....	4
I.2.3.3.La fusion et la formation de la lumière .....	4
I.2.3.4.La maturation et le flux sanguin.....	4
I.3.Médiateurs de l'angiogenèse.....	5
I.3.1.Les activateurs.....	5
I.3.1.1.VEGF (vascular endothelial growth factor).....	5
I.3.1.2. FGF (fibroblast growth factor).....	5
I.3.1.3 .PDGF(Platelet derived Growth Factor) .....	6
I.3.2.Les inhibiteurs .....	6
I.3.2.1. Angiostatine .....	6
I.3.2.2. Thrombospondine-1 .....	6
I.3.2.3.Facteur plaquettaire-4.....	6
I.4. L'angiogenèse tumorale .....	6
I.4.1.Induction de l'angiogenèse tumorale par l'hypoxie (HIF).....	7
I.4.2.Induction de l'angiogenèse par des modifications génétiques .....	8
I.4.3. Switch angiogénique tumoral et signalisation VEGF/VEG.....	9
I.5.Thérapies antiangiogéniques .....	10

I.5.1. Inhibiteurs de la signalisation VEGF/VEGFR (Bevacizumab) .....	10
I.5.2 Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (Sorafenib) .....	10
I.6. Les différents tests de l'angiogenèse.....	12
I.7. Le test CAM de l'embryon de poulet .....	13
I.7. Généralités.....	13
I.7.2 . Le principe du test CAM.....	14
I.8. La relation entre l'angiogenèse et le stress oxydatif .....	16

## **Chapitre II. *Pistacia lentiscus* L.**

II.1.Généralités .....	20
II.2. Etude botanique et Taxonomique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	20
II.2.1. Description botanique .....	20
II.2.2.Taxonomie et classification botanique de <i>Pistacia lentiscus</i> L .....	22
II.2.3 .Répartition géographique.....	22
II.2.3.1.Dans le monde .....	22
II.2.3.2..En Algérie .....	23
II.3.Phytochimie de l'espèce <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	23
II.4.Activités pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>Pistacia lentiscus</i> L .....	24
II.4.1.Activité antioxydante .....	24
II.4.2.Activité antibactérienne et antifongique .....	24
II.4.3.Activité anti-inflammatoire.....	24
II.4.4.Activité anticancéreuse .....	25

## **Chapitre III : Matériel et Méthode**

III.1.Collecte des œufs et incubation .....	26
III.2.Le traitement des œufs.....	27
III.3.Sacrifice des œufs.....	28
III. 4. Evaluation quantitative de l'inhibition de l'angiogenèse .....	29
III.4.1.Traitement des images par le Wim CAM.....	29
III.4.2.Le pourcentage d'inhibition de l'angiogenèse.....	30
III.5. Evaluation des paramètres de stress oxydatif.....	30
III.5.1.Extraction de la fraction cytosolique .....	30
III.5.1.1.Dosage du glutathion cellulaire (GSH) .....	30
III-5-2-Le dosage du malondialdéhyde (MDA) .....	31
III.5.2.1.Analyse statistique.....	32

**Chapitre IV. Résultats et interprétation**

IV.1.Evaluation qualitative de l'inhibition de l'angiogenèse .....	33
IV.2.Evaluation quantitative de l'inhibition de l'angiogenèse.....	35
IV.2.1 .Le nombre des points de branchements totaux .....	35
IV.2.2.La densité des vaisseaux sanguins .....	36
IV.2.3.La Longueur des vaisseaux sanguins totaux .....	37
IV.2.4.Le pourcentage d'inhibition de l'angiogenèse .....	38
IV.3 Evaluation de l'état du stress oxydatif dans la membrane chorioallantoïdienne.....	38
IV.3.1.Variation du taux de glutathion .....	39
IV.3.2.Variation des taux du malonyldialdéhyde tissulaire (MDA).....	39
Discussion.....	41
Conclusion.....	44
Références bibliographiques.....	45
Annexe	
Résumé	

## Liste des abréviations

**CAM:** Membrane chorioallantoïdienne

**VEGF:** Vascular endothelial growth factor ou facteur de croissance Endothéliale vasculaire

**VEGFR :** Récepteur du VEGF

**PDGF:** Platelet-derived growth factor ou Produit de dégradation des facteurs de croissance

**bFGF:** basic Fibroblast Growth factor

**FGF:** Fibroblaste growth factor ou Facteur de croissance des Fibroblastes

**EGF:** Epidermal growth factor

**EGFR:** Epithelial Growth Factor Receptor

**FAC:** Fibroblastes associés aux carcinomes

**FDA:** Food and Drug Administration

**FLT-3:** Fms-related tyrosine kinase-

**3TGF-1 :** transforming growth factor

**HGF:** Hepatocyte growth factor

**HIF:** Hypoxia Inducible Factor

**HIF- $\alpha$ :** Hypoxia inducible factor –

**$\alpha$ HIF- $\beta$ :** Hypoxia inducible factor-

**$\beta$ HIF-1:** Hypoxia inducible factor-

**1HIF-2:** Hypoxia inducible factor-2

**IL-1:**Interleukin-1

**IL-6:**Interleukin-6

**Ang-1:**Angiopoïétine-1

**Ang-2:**Angiopoïétine-2

**EAFPL:** Extrait aqueux de fruit *pistacia lentiscus* L.

**MDA:** malondialdehyde

**GSH:** glutathion cellulaire

## Liste des figures

<b>Figure1.</b> Les étapes de l'angiogenèse normale.....	5
<b>Figure2.</b> La régulation de HIF-1 $\alpha$ dans les conditions d'hypoxie et de normoxie.....	8
<b>Figure3.</b> Transition angiogénique .....	9
<b>Figure4.</b> Les inhibiteurs du VEGF ou de ces récepteurs.....	11
<b>Figure5.</b> Schéma du test de l'implantation des cellules tumorales dans La membrane chorioallantoïque (CAM) .....	14
<b>Figure 6.</b> L'embryon de poulet et sa membrane chorioallantoïdienne.(A) Schéma de la structure générale d'un embryon de poulet âgé de 5 jours dans l'œuf avec les trois couches tissulaires de la CAM.(B) Coupe semi-fine de la CAM d'un embryon de poulet de 12 jours montrant l'épithélium chorionique (ch), le mésoderme vascularisé (m) et l'épithélium allantoïdien (al).(C) Embryon de poulet de 5 jours photographié <i>in ovo</i> .....	15
<b>Figure7.</b> L'augmentation de la production des ROS et/ou la réduction des défenses antioxydantes entraînent un stress oxydatif.....	16
<b>Figure8.</b> Activation de l'angiogenèse par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la voie dépendante et indépendante de l'hypoxie .....	18
<b>Figure9.</b> Arbuste de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	20
<b>Figure10.</b> Les fruits, feuilles, les fleurs et la résine de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	21
<b>Figure11.</b> Distribution géographique du genre <i>Pistacia</i> dans le monde .....	23
<b>Figure12.</b> l'effet thérapeutique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	25
<b>Figure 13. A. Mirage :</b> Traçage de la chambre à air. <b>B.</b> incubation des œufs dans l'incubateur.....	26
<b>Figure14.</b> Déroulement du test CAM. <b>A.</b> Vérification de la fécondité des œufs. <b>B.</b> traçage de l'ombre embryonnaire. <b>C.</b> Le traitement des œufs.....	28
<b>Figure15.</b> Sacrifice des œufs au 8 <sup>ème</sup> jour d'incubation.....	29
<b>Figure 16.</b> Réaction du DTNB avec un thiol(R-SH).....	31
<b>Figure17.</b> Principe du dosage du malondialdéhyde.....	32
<b>Figure18.</b> Observation macroscopique de l'œuf témoin .....	33
<b>Figure 19.</b> Observation macroscopique de l'œuf traité par la quercétine .....	34
<b>Figure20.</b> Observation macroscopique de l'œuf traité par l'extrait aqueux de fruit de <i>Pistacia</i> .....	34
<b>Figure21.</b> Les points de branchements .....	35
<b>Figure22.</b> Le nombre des points de branchements totaux .....	35
<b>Figure23.</b> Densité des vaisseaux sanguins .....	36

<b>Figure24.</b> Longueur des vaisseaux sanguins totaux .....	37
<b>Figure25.</b> Pourcentage d'inhibition de l'angiogenèse.....	38
<b>Figure26.</b> Variation du taux de GSH de la membrane chorioallantoïdienne .....	39
<b>Figure27.</b> Variations du taux MDA de la membrane chorioallantoïdienne .....	40

---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau1.</b> Impact de différents oncogènes sur l'angiogenèse tumorale dans les tumeurs solides.....	9
<b>Tableau2.</b> Les différents tests de pour étudier l'angiogenèse .....	12
<b>Tableau3.</b> Avantages et limites du test de CAM.....	15
<b>Tableau4.</b> Taxonomie de <i>Pistacia lentiscus</i> L .....	22
<b>Tableau5.</b> Le nombre des points de branchements totaux .....	35
<b>Tableau6.</b> Densité des vaisseaux sanguins.....	36
<b>Tableau7.</b> Longueur des vaisseaux totaux [px].....	37
<b>Tableau8.</b> Pourcentage d'inhibition de l'angiogenèse .....	38
<b>Tableau9.</b> La concentration de GSH .....	39
<b>Tableau10.</b> La concentration de MDA .....	40

# **Introduction**

## **Introduction**

Le cancer est la deuxième cause de décès derrière les maladies cardiovasculaires dans le monde développé, 23.6 millions de nouveaux cas sont attendus d'ici à 2030 (Saleh et *al.*, 2020).

La formation de métastases est un événement majeur dans l'histoire naturelle d'un cancer et a des conséquences particulièrement péjoratives sur le pronostic des patients. Le processus métastatique comporte plusieurs étapes distinctes et fait intervenir de très nombreux effecteurs moléculaires (Treppe et Gavard, 2015).

L'angiogenèse est la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants (Welten et *al.*, 2014). Ce processus physiologique existe durant l'embryogenèse, le cycle menstruel, la régénération tissulaire et la cicatrisation des plaies. Par contre le seul processus de développement et renouvellement qui s'observe dans les tissus différenciés c'est le processus de croissance tumorale à la phase invasive et métastatique (Martin et Ouafik, 2012).

Ce processus fait selon le concept du switch angiogénique, un déséquilibre de la balance proangiogénique et antiangiogénique. Ces médiateurs pro-angiogéniques comprennent, le facteur de croissance des cellules endothéliales (VEGF), le facteur induit par l'hypoxie (HIF), ainsi que des cytokines pro-inflammatoires, de nombreuses chimiokines, des molécules d'adhésion, des protéases et d'autres types de molécules (Szekanecz et *al.*, 2010).

Depuis plus de trois décennies, les chercheurs ont proposé de cibler l'angiogenèse pour bloquer la croissance tumorale et, bien sûr, sa progression pour donner des métastases (Folkman, 1971; Figg et Folkman, 2008).

Les produits naturels ont récemment reçu une grande attention parmi ceux recherchant la nouvelle thérapeutique d'anticancéreux. (Saleh et *al.*, 2020).

*Pistacia lentiscus* L. est un arbuste ou arbre dioïque qui appartient à la famille des Anacardiaceae (Hacini et Djelloul, 2017), pousse dans la région méditerranéenne (Aissat et *al.*, 2022). Cette plante est considérée comme un bon remède pour le traitement des ulcères, de l'hypertension, de toux, des maux de gorge, et de l'eczéma. Plusieurs travaux de recherche ont montré que la plante *Pistacia lentiscus* L. est riche en molécules bioactives.

Plus récemment, le test chorioallantoïque d'embryon de poulet a été utilisé pour mettre en évidence l'activité anti-angiogénique visant les nouvelles thérapies anticancéreuses et pour évaluer le comportement angiogénique des biomatériaux en cours de développement (Moreno-Jiménez et *al.*, 2017).

Notre objectif a été basé sur:

- Une synthèse bibliographique des connaissances dans le domaine de la biologie de l'angiogenèse et les traitements anti-angiogéniques.
- Une exploration, *in ovo* du potentiel inhibiteur de la néovascularisation, pour cela, nous avons étudié l'effet de la quercétine (30µM) et de l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. à 10mg/ml. Par un modèle expérimental, *in ovo* le test CAM.
- Evaluation des paramètres de stress oxydatif de la membrane chorioallantoïdienne des œufs traités par l'extrait aqueux de fruits de *Pistacia lentiscus* L. à 10mg/ml.

# ***CHAPITRE I.***

## ***L'angiogenèse***

### ***Tumorale***

## I.1. Généralités sur l'angiogenèse

De nombreuses données cliniques et expérimentales suggèrent que la croissance tumorale et le processus métastatique dans son ensemble seraient grandement influencés par les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement de l'organe hôte, en particulier les cellules endothéliales de nouveaux vaisseaux sanguins composant le stroma de la tumeur. La formation de ces nouveaux vaisseaux sanguins, ou angiogenèse, soutient la croissance tumorale en fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à l'expansion des néoplasmes (effet de perfusion), et en éliminant les déchets métaboliques (Ndiaye et Pagès, 2019 ;Montigny et al., 2021).

### I.2. L'angiogenèse

#### I.2.1. Définition

L'angiogenèse est un processus complexe, multi-étapes qui mène à la formation de nouveaux capillaires sanguins (néovaisseaux) à partir des vaisseaux préexistants (Chabannes et al., 2001). Ce processus physiologique existe durant l'embryogenèse et la formation du placenta en complément de la vasculogénèse ou indépendamment selon les tissus, le processus de néo vascularisation dépend de l'origine de l'organe. Ce processus est régulé par une balance entre des molécules favorisant l'angiogenèse appelées proangiogéniques (VEGF, PDGF, FGF...) et des molécules la limitant appelées anti-angiogéniques (angiostatine, thrombospondine...). L'angiogenèse n'est normalement observée que dans des conditions ou au sein de mécanismes physiologiques strictement régulés comme la réparation tissulaire, le cycle menstruel, la grossesse ou pour répondre à des besoins particuliers en oxygène et en nutriments (Lemaire et al., 2020).

#### I.2.2 La cellule endothéliale :

Les cellules endothéliales (CE) sont des cellules hautement spécialisées formant la couche interne des vaisseaux sanguins et tapissant tout le système circulatoire. (Wang, 2018), elles sont en interaction avec les péricytes et la matrice basale, elles contrôlent finement l'infiltration des protéines plasmatiques et les échanges entre le compartiment sanguin et les tissus environnants reposent sur l'ouverture et la fermeture des jonctions cellule-cellule (Azzi et Gavard, 2014).

Les cellules endothéliales sont parmi les cellules les plus stables de l'organisme; leur temps de renouvellement peut excéder 1 000 jours, mais cette durée peut être réduite à seulement cinq jours lors de l'angiogenèse, leur stimulation par différents facteurs angiogéniques, les plus couramment observés comme le bFGF (basic fibroblast growth factor) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) (Dumond et al., 2020; Taïlé, 2021).

### **I.2.3. Les étapes de l'angiogenèse :**

#### **I.2.3.1. La sélection :**

La première étape de l'angiogenèse correspond à l'activation et à la sélection de cellules endothéliales, interchangeables quant à leur fonction, qui conditionnent le déroulement de l'élongation (Treppe et Gavard, 2015).

#### **. I.2.3.2. La migration :**

A la suite de son activation et de sa sélection, la cellule de front bourgeonne à partir du vaisseau et acquiert de nombreuses protrusions membranaires de type filopodes qui sont hautement dynamiques (Wacker et Gerhardt, 2011 ; Azzi et Gavard, 2014).

L'acquisition de cette capacité de migration repose sur un affaiblissement des interactions entre les cellules endothéliales et une dégradation de la matrice extracellulaire (Azzi et Gavard, 2014). La stimulation des cellules endothéliales induit le démantèlement des jonctions adhérentes notamment via l'endocytose de la cadhérine endothéliale (Treppe et Gavard, 2015), tandis que l'activation de la voie de signalisation induite par le VEGF, inhibe les protrusions membranaires et favorise l'adhérence cellulaire permettant une migration collective en arrière (Bentley et al., 2014).

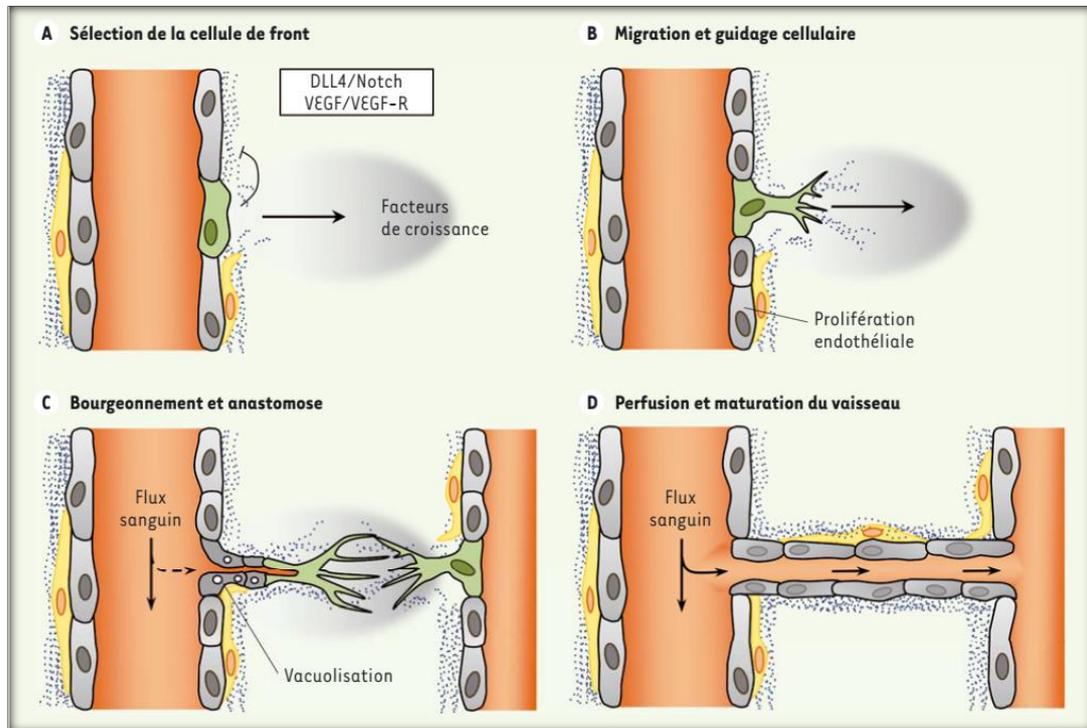
#### **I.2.3.3. La fusion et la formation de la lumière :**

Sous l'impulsion de la prolifération des cellules de soutien, le néovaisseau s'allonge, guidé par la cellule de front. Ce processus repose sur l'établissement d'un gradient de VEGF-C qui est secrété par les macrophages présents au niveau des sites de bourgeonnement. Par l'intermédiaire de son récepteur VEGF-R3, le VEGF-C stimule les cibles transcriptionnelles de la voie de signalisation impliquant « Notch » et diminue la sensibilité des cellules de front au VEGF (Tammela et al., 2008). Lorsque deux cellules de front entrent en contact au travers de leurs filopodes, les deux bourgeons vasculaires fusionnent par anastomose et forment un vaisseau connecté (Wacker et Gerhardt, 2011).

#### **I.2.3.4. La maturation et le flux sanguin :**

La maturation du vaisseau nécessite le rétablissement de la barrière endothéliale et du flux sanguin. La voie de signalisation impliquant l'angiopoïétine1 (Ang1) et son récepteur Tie2 s'oppose aux actions du VEGF. Elle induit le renforcement des jonctions entre les cellules endothéliales ainsi que leur quiescence (Gavard et al., 2008 ; Fukuhara et al., 2008). Un gradient de PDGF-BB (*platelet-derived growth factor*) et de TGF-1 (*transforming growth factor*) induit

parallèlement le recrutement des pericytes<sup>1</sup> et des cellules musculaires lisses, ainsi que le dépôt d'une nouvelle matrice extracellulaire à la surface des vaisseaux, assurant ainsi la maturation finale d'un vaisseau sanguin fonctionnel. A tout moment du processus, sous l'effet de modifications du microenvironnement ou d'adaptations physiologiques, l'angiogenèse peut être arrêtée (Ricard et Simons, 2015).



**Figure1** :Les étapes de l'angiogenèse normale (Treppe et Gavard, 2015)

### I.3. Médiateurs de l'angiogenèse

#### I.3.1. Les activateurs

##### I.3.1.1. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Les VEGFs constituent une superfamille de cinq molécules (VEGF-A à VEGF-E). Ce sont des protéines fixant l'héparine. Dans le cadre de l'angiogenèse, VEGF-A est le plus important, il joue un rôle clé à la fois dans la vasculogénèse et dans l'angiogenèse lors d'une hypoxie en recrutant de nouveaux vaisseaux sanguins pour assurer leurs besoins en oxygène et nutriments. Plus la vascularisation des tissus, et donc leur oxygénation, se développe, plus l'expression du VEGF diminue (Wang et al., 2018).

##### I.3.1.2. FGF (fibroblast growth factor)

Les FGFs constituent une famille de plus de vingt facteurs de croissance fixant l'héparine et qui agissent sur de nombreux types cellulaires. Dans le cadre de l'angiogenèse, le plus actif d'entre eux est le b-FGF (ou basic Fibroblast Growth Factor, PM : 18 kDa). Il peut être

synthétisé essentiellement par les fibroblastes et les macrophages mais également par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Staiger et al., 2017).

### **I.3.1.3. PDGF (Platelet Derived Growth Factor)**

Le PDGF est un constituant naturel du sérum. Il existe plusieurs isoformes (AA, BB et AB) et deux récepteurs PDGFR- $\alpha$  et PDGF- $\beta$ . Les cellules endothéliales quiescentes synthétisent et secrètent le PDGF-BB en réponse à l'action de l'angiopoïétine-1 sur Tie-2, afin de recruter les péricytes pour le maintien de la structure du capillaire. Cette sécrétion a lieu également après la mise en place des néovaisseaux (Roswall et al., 2018).

## **I.3.2. Les inhibiteurs**

### **I.3.2.1. Angiostatine**

L'angiostatine (56kDa) résulte du clivage du plasminogène par de nombreux métalloprotéases matricielles. Elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales induites le b-FGF et la migration cellulaire en se fixant aux intégrines. Par ailleurs, l'angiostatine induit l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, E-selectine (Yadav et al., 2015; Nijhawans et al., 2020).

### **I.3.2.2. Thrombospondine-1**

La thrombospondine-1 appartient à une famille de glycoprotéines produites par de nombreuses cellules. Elle n'est issue d'aucun clivage. Elle est stockée en grande partie dans les plaquettes où elle est complexée avec le TGF- $\beta$ , mais est également retrouvée dans la matrice extracellulaire. Elle inhibe directement le VEGF-A165, le b-FGF et les MMP-9 en s'y fixant. Par ailleurs, elle peut réduire le nombre de progéniteurs endothéliaux circulants (Bazzazi et al., 2017).

### **I.3.2.3. Facteur plaquettaire-4**

Le facteur plaquettaire-4 (PF-4) est un polypeptide de 7 kDa exprimé sous forme de tétramères. Il inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales et donc l'angiogenèse par son activité anti-héparine, par interaction directe avec b-FGF ou VEGF-A et par activation des récepteurs inhibiteurs membranaires endothéliaux (Fontaine, 2017).

## **I.4. L'angiogenèse tumorale**

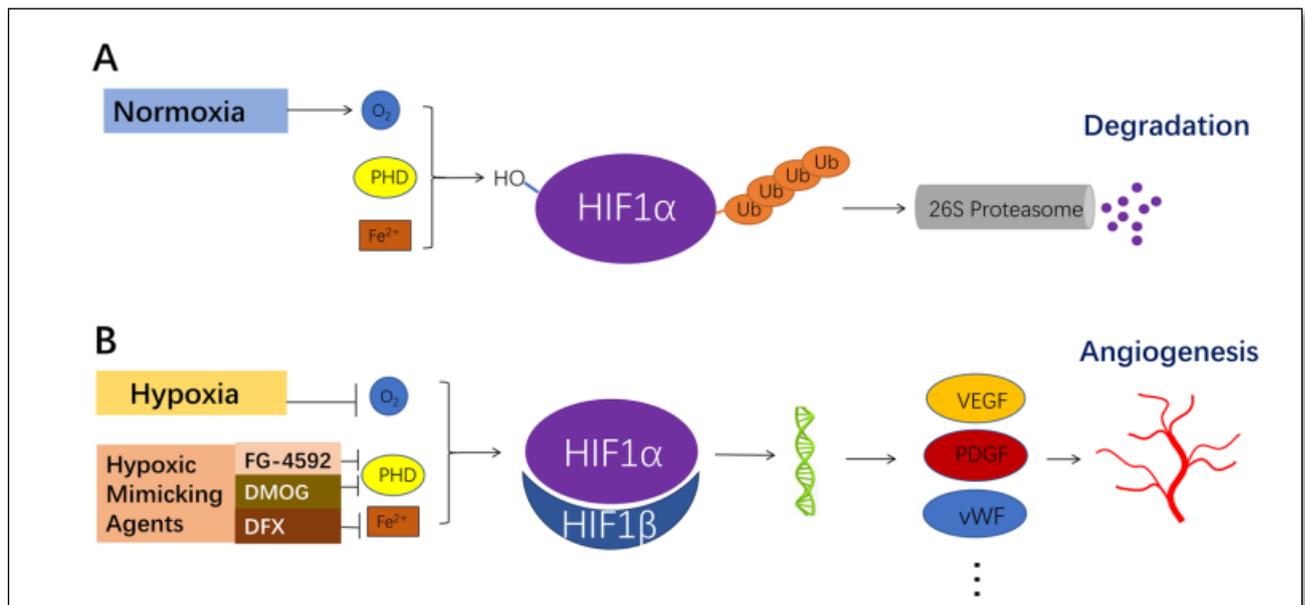
L'angiogenèse tumorale, telle qu'elle a été décrite par Folkman au début des années 70 est un processus complexe nécessaire à la croissance de toutes les tumeurs solides. (Folkman, 1971) résultant d'une interaction entre deux types tissulaires : la tumeur et le réseau vasculaire dans l'objectif de former des néovaisseaux. (Jiang et al., 2016) Il est approuvé par Folkman qu'une tumeur ne puisse se développer dans un volume défini si elle n'est pas vascularisée.

Les cellules tumorales accélèrent ce processus en produisant des facteurs angiogéniques responsables de la croissance et de la migration des cellules endothéliales quiescentes des vaisseaux sanguins proximaux. La conséquence est la création d'un nouveau réseau vasculaire pour alimenter la tumeur en oxygène, nutriments, des facteurs de croissance, des enzymes protéolytiques, des tumeurs et la dissémination dans l'hôte (Nashimoto et al., 2020). L'apport en nutriments et en oxygène et le drainage efficace des métabolites sont assurés par un réseau complexe de micro vascularisation tumorale (Kabiraj et al., 2018).

#### **I.4.1 Induction de l'angiogenèse tumorale par l'hypoxie (HIF)**

L'hypoxie, c'est-à-dire un manque d'oxygène, est une caractéristique commune des tumeurs malignes. Le facteur inductible par l'hypoxie HIF est l'un des premiers facteurs de croissance à initier le processus anormal de croissance vasculaire, et répond à la faible tension en oxygène dans la masse tumorale. Il est constitué des sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  (Greer et al., 2012). Il a été démontré que de multiples gènes cibles de HIF-1 modulent l'angiogenèse en favorisant les activités mitogènes et migratoires des cellules endothéliales (Jain et al., 2018).

L'HIF-1 est impliqué dans l'homéostasie de l'oxygène en activant la transcription de gènes codant pour des protéines qui augmentent l'apport de l'oxygène (O<sub>2</sub>), par exemple en stimulant l'angiogenèse, le remodelage vasculaire, ou la diminution de la consommation d'O<sub>2</sub> (Semenza, 2016). De plus dans les cellules tumorales induit une accumulation d'HIF-1 $\alpha$  et la synthèse par ces cellules de nombreux facteurs pro-angiogéniques. Dans le cas des tumeurs, ces facteurs sont essentiellement le VEGF-A, et le PlGF (Boulangier et al., 2019).



**Figure 2:** La régulation de HIF-1 $\alpha$  dans les conditions d'hypoxie et de normoxie (Zhou et al. 2019).

*La régulation de HIF-1 $\alpha$ . (A) En condition normoxique, la Prolyl hydroxylase (PHD), en présence de Fe<sup>2+</sup> et de molécules d'oxygène, hydroxyle HIF-1 $\alpha$  et déclenche son ubiquitination et sa protéolyse. (B) Dans des conditions hypoxiques ou à l'aide d'agents mimant l'hypoxie tels que le FG-4592, l'hydroxylation et la dégradation de HIF-1 $\alpha$  se poursuivent. et la dégradation de HIF-1 $\alpha$  sont bloquées. Ainsi HIF-1 $\alpha$  peut se dimériser avec HIF-1 $\beta$ , entrer dans le noyau pour réguler de manière transcriptionnelle l'expression de ses gènes cibles tels que le VEGF, le PDGF et le vWF, régulant finalement un large éventail de processus physiopathologiques, y compris l'angiogénèse.*

#### I.4.2. Induction de l'angiogénèse par des modifications génétiques

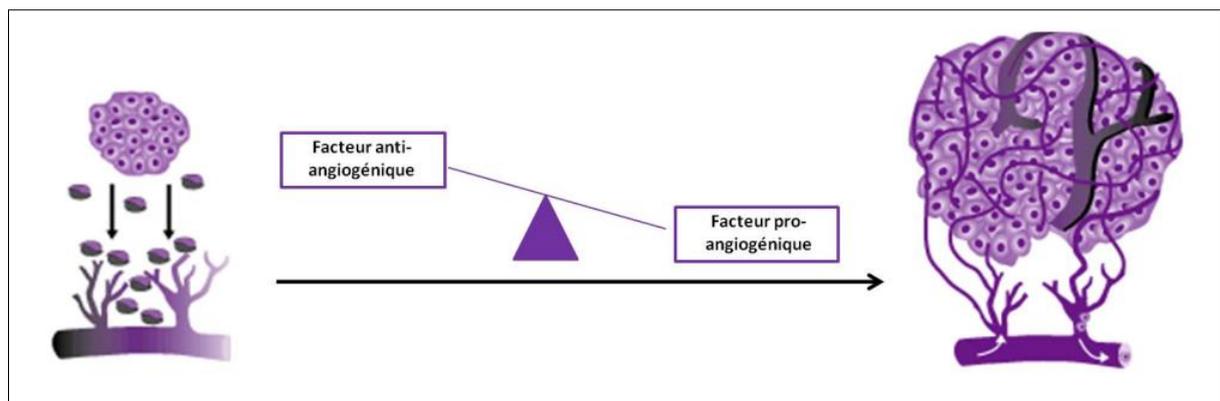
Les modifications que peuvent subir certains gènes dans les cellules aboutissent à la création de clone de cellules tumorales pour lesquelles l'apoptose et les capacités de différenciation sont fortement diminuées et pour lesquelles la prolifération est stimulée (Drouot, 2018).

**Tableau 1 :** Impact de différents oncogènes sur l'angiogenèse tumorale dans les tumeurs solides (Rak et al., 2000).

Oncogène <sup>b</sup>	Implicated pro-angiogenic activity
<i>K-ras, H-ras</i>	VEGF upregulation, TSP-1 downregulation
<i>v-src</i>	VEGF upregulation, TSP-1 downregulation
<i>c-myb</i>	TSP-2 downregulation
<i>N-myc</i>	angiogenic properties in neuroblastoma
<i>c-myc</i>	angiogenic properties in epidermis
<i>HER-2</i>	VEGF upregulation
<i>EGFR</i>	VEGF, bFGF, IL-8 upregulation
<i>PyMT</i>	TSP-1 downregulation
<i>c-fos</i>	VEGF expression
<i>trkB</i>	VEGF downregulation
<i>HPV-16</i>	secretion of VEGF and IFN- $\alpha$
<i>v-p3k</i>	VEGF production and angiogenesis
<i>ODC</i>	novel angiogenic factor
<i>PTTG1</i>	VEGF and bFGF upregulation
<i>E2a-Pbx1</i>	induction of mouse angiogenin-3

### I.4.3. Switch angiogénique tumoral et signalisation VEGF/VEG

Le "switch angiogénique" dépend majoritairement de la production, par les cellules néoplasiques de facteurs de croissances dirigés vers les cellules endothéliales. Ces facteurs peuvent stimuler la croissance de vaisseaux sanguins afin d'irriguer la tumeur, et/ou provoquer une hypo-sécrétion des inhibiteurs naturels de l'angiogenèse qui maintiennent normalement la quiescence vasculaire en conditions physiologiques. L'équilibre vasculaire est ainsi déstabilisé en faveur des facteurs proangiogéniques et déclenche la néo-vascularisation tumorale (Poupard, 2017).

**Figure 3 :** Transition angiogénique (Reille-Seroussi, 2014).

## **I.5. Thérapies anti-angiogéniques**

Depuis la découverte de l'angiogenèse tumorale par le docteur Folkman dans les années 1970, de nombreux progrès dans le domaine ont permis le développement de différents traitements anti-angiogéniques. L'autorisation de la mise sur le marché en 2004 du bevacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, fut un grand pas dans l'avancée des traitements anti-angiogéniques (Garcia et al., 2020).

Par la suite le VEGF et/ou ses récepteurs restèrent une cible d'étude prioritaire pour le développement de nouveaux traitements anti-angiogéniques. L'utilisation de ces nouveaux traitements montra vite l'apparition récurrente de phénomènes de résistance. Les bénéfices en termes de survie globale des patients sont souvent inférieurs à 6 mois et ne sont pas toujours supérieurs aux risques encourus du fait des différents effets secondaires (Jain et al., 2014).

### **I.5.1. Inhibiteurs de la signalisation VEGF/VEGFR (Bevacizumab)**

Le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal humanisé capable de se lier au VEGF, l'empêchant ainsi de se fixer à son récepteur et d'activer la cascade de signalisation qui provoque l'angiogenèse. La première preuve de concept que le ciblage du VEGF-A pouvait inhiber la croissance tumorale (Kim et al., 1993). Le bevacizumab a reçu son autorisation de mise sur le marché aux Etats-unis par la "Food and Drug Administration" (FDA) en 2004 et était indiqué initialement pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques en association avec la chimiothérapie de référence (association d'acide Folinique, Fluorouracil et Irinotecan: FOLFIRI) (Bennouna et al., 2019).

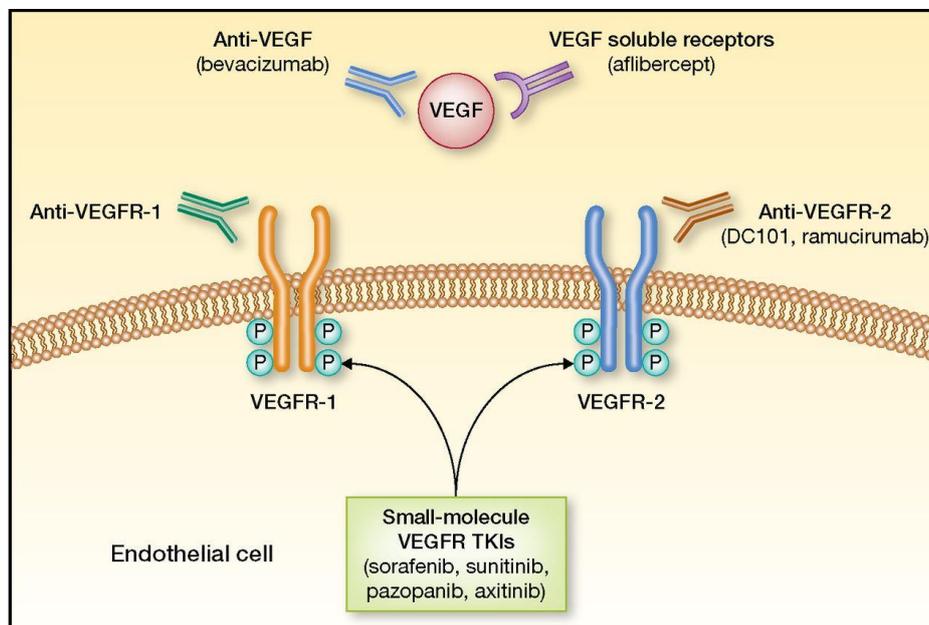
Le bevacizumab agit en se liant sélectivement au VEGF circulant, inhibant ainsi la liaison du VEGF à ses récepteurs de surface cellulaire. Cette inhibition entraîne une réduction de la croissance micro vasculaire des vaisseaux sanguins tumoraux et limite ainsi l'apport sanguin aux tissus tumoraux. Ces effets ont également pour effet de réduire la pression interstitielle des tissus, d'augmenter la perméabilité vasculaire, d'accroître la diffusion des agents chimio thérapeutiques et de favoriser l'apoptose des cellules endothéliales tumorales (Yadav et al., 2015).

### **I.5.2 Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (Sorafenib)**

Le sorafenib est un composé synthétique qui cible la signalisation de la croissance et l'angiogenèse. Le sorafénib bloque l'enzyme kinase RAF, un composant essentiel de la voie de signalisation RAF/MEK/ERK qui contrôle la division et la prolifération des cellules. La division

et la prolifération cellulaires. la cascade de signalisation VEGFR-2/PDGFR-beta, bloquant ainsi bloquant l'angiogenèse tumorale(Sankar *et al.*, 2021).

Le sorafenib (Nexavar®) inhibe les kinases permettent de bloquer les voies de signalisation intracellulaire induites par une activation des récepteurs transmembranaires. Dans le cas des traitements antiangiogéniques, la voie la plus étudiée est celle induite par les VEGFRs favorisant la prolifération et la survie cellulaire, la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. Cet inhibiteur est sur le marché depuis 2005 ciblent principalement les récepteurs du VEGF et PDGF. Dans une moindre mesure, ils ciblent également les récepteurs c-KIT, FLT3 et RET présents sur les cellules souches hématopoïétiques ou sur des leucocytes et dont l'activation favorise la progression tumorale (Pottier *et al.*, 2020).



**Figure 4 :** Les inhibiteurs du VEGF ou de ces récepteurs (Poupard, 2017) .

### I.6. Les différents tests de l'angiogenèse

La découverte du rôle de l'angiogenèse lors d'un cancer a ouvert la voie au développement de traitements anti-angiogéniques. Ces derniers ont pour objectif de limiter la progression du cancer et le développement de métastases dans d'autres régions de l'organisme. Plusieurs tests *in vitro* et *in vivo* sont utilisés pour la recherche de nouveaux produits anti-angiogéniques.

Les différents tests pour étudier l'angiogenèse sont résumés dans le tableau 2 suivant :

Tableau 2 .Les différents tests pour étudier l'angiogenèse

	Tests	Caractéristiques	Références
<b>Test de l'angiogenèse <i>in vitro</i></b>	<b>Test de prolifération des cellules endothéliales (Endothelial cell proliferation assays)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Mesure la prolifération des cellules endothéliales vivantes et indication du nombre de cellules.</li> <li>❖ Donne des informations sur le cycle cellulaire.</li> <li>❖ Mesure l'apoptose des cellules</li> </ul>	(Tahergorabi et Khazaei, 2012).
	<b>Tests de migration des cellules endothéliales (Endothelial cell migration assays)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Mesure la capacité des cellules endothéliales de l'invasion cellulaire par chimiotactisme.</li> <li>❖ L'essai de la chambre de Boyden.</li> <li>❖ Elle consiste en un insert de culture cylindrique niché au sein d'un puits de plaque de culture cellulaire. L'insert contient une membrane de polycarbonate avec une taille de pores définie.</li> </ul>	(Albini et <i>al.</i> , 2004).
	<b>Tests de différenciation des cellules endothéliales (Endothelial cell differentiation assays)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ La mesure de la capacité des cellules endothéliales à former des structures tridimensionnelles (formation de tubes).</li> </ul>	(Staton et <i>al.</i> , 2009).
<b>Test de l'angiogenèse <i>ex vivo</i></b>	<b>Le test de l'anneau aortique du rat (The rat aortic ring assay)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ L'aorte est coupée en anneaux de 1 mm de long et les anneaux sont placés dans la plaque 24 puits. Les anneaux sont plongés dans le Matrigel puis le l'excroissance des micro vaisseaux est surveillée sur une période de 10-14 jours.</li> </ul>	(Tahergorabi et Khazaei, 2012).
	<b>Essai sur l'arc aortique du poulet (Chick aortic arch assay)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Les arcs aortiques sont isolés de 12- 14 embryons de poulet et sont découpés en anneaux de 1 mm et sont cultivée dans une plaque à puits contenant du Matrigel.</li> </ul>	(Auerbach et Muthukkaruppan, 2012).
	<b>Essai d'angiogenèse cornéenne (Corneal angiogenesis)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Ce test utilise la cornée des lapins ou des rats</li> <li>❖ Une poche est créée dans la cornée et les substances d'essai sont placées dans micropoches qui stimulent ou</li> </ul>	(Akhtar et <i>al.</i> , 2002).

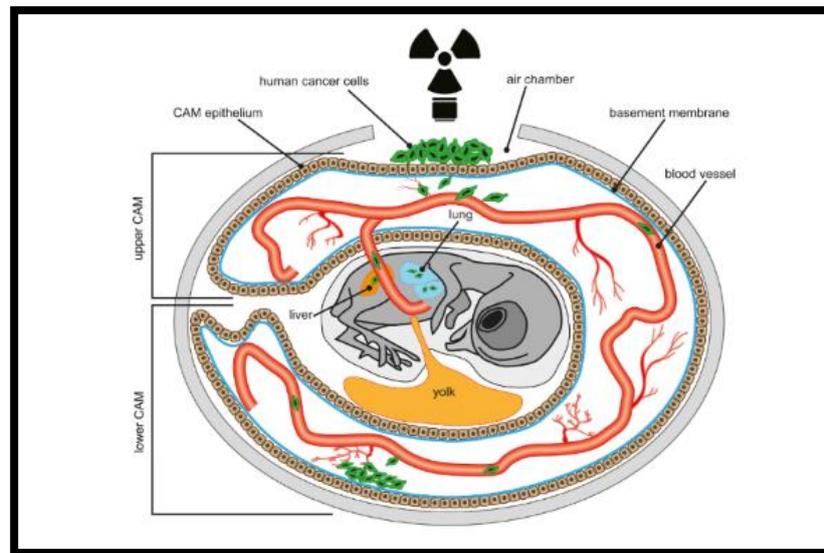
<b>Test de l'angiogenèse <i>in vivo</i></b>	<b>assay)</b>	inhibent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.	
	<b>Membrane chorio-allantoïque de poulet (CAM) (Chick chorioallantoic membrane (CAM))</b>	❖ Dans cette méthode, les substances à tester (Stimulateurs et/ou inhibiteurs) sont placées sur la membrane extra-embryonnaire à travers une fenêtre qui a été créée dans les embryons de poussins aux 7-9 jours. La fenêtre est ensuite scellée, les œufs sont réincubés et l'angiogenèse est étudiée après un temps d'incubation approprié.	(Auerbach et al., 2003).
	<b>le test CAM ex-ovo chik (Test chik ex-ovo CAM assay)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Le test CAM peut être utilisé efficacement pour étudier la potentiel angiogénique.</li> <li>❖ Par rapport à l'alternative <i>in vivo</i> approches, cette technique offre des avantages supplémentaires au chercheur car elle permet de mieux visualiser des biomatériaux implantés et possibilité d'implanter plusieurs échantillons simultanément permettant de réaliser des dosages combinatoires de biomatériaux.</li> </ul>	(Ribatti, 2008).

## I.7. Le test CAM de l'embryon de poulet

### I.7.1. Généralités

Au cours du développement embryonnaire des poulets, les couches mésodermiques de l'allantoïde et du chorion fusionnent pour former la membrane chorioallantonique (CAM) tout ça se développe rapidement. Cette structure est vascularisée qui fournit une interface pour l'échange gazeux et les déchets, elle est aussi reliée à la circulation embryonnaire par deux artères allantoïdiennes et une veine allantoïdienne. Cette membrane est utilisé largement dans plusieurs études comme l'étude des greffes tissulaires, la croissance tumorale, les métastases (figure 5) ainsi que l'analyse des molécules pro-angiogéniques et anti angiogéniques (Ribatti, 2017).

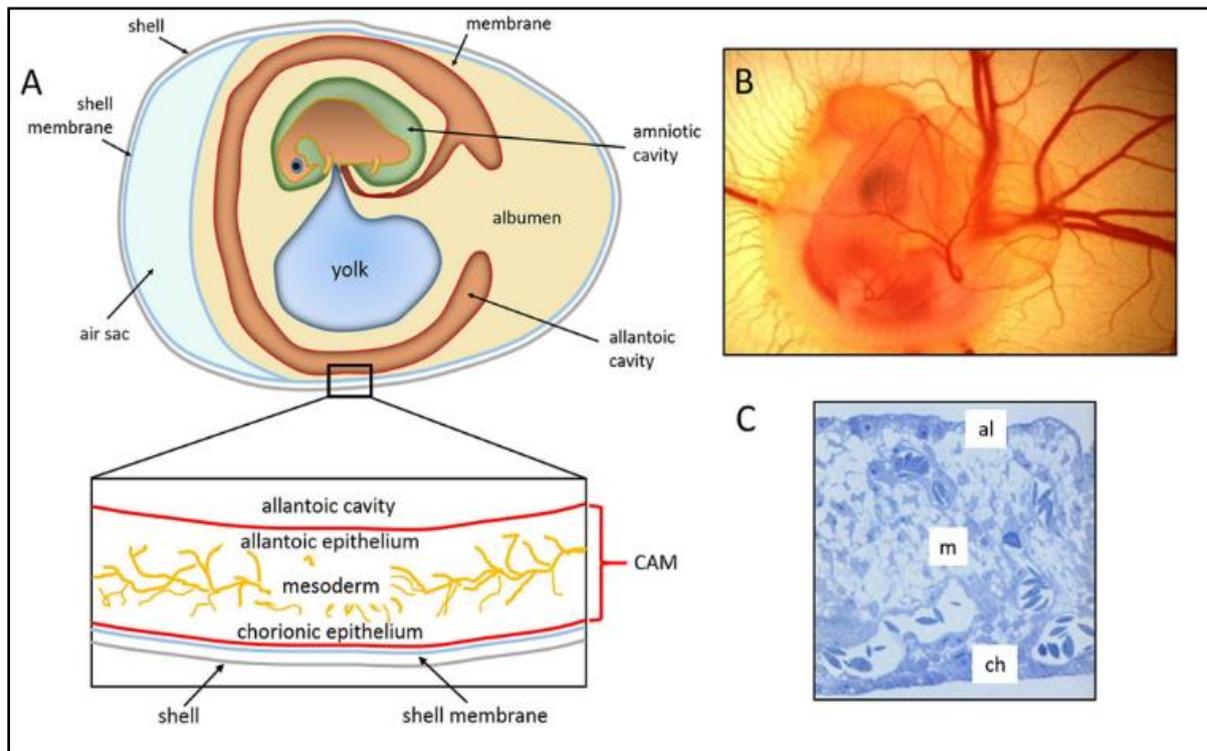
La membrane chorioallantoïque (CAM) du poussin commence à se développer au jour 7 après la fécondation et mûrit au jour 12. La CAM est naturellement immunodéficient et hautement vascularisé, ce qui en fait un système idéal pour l'implantation tumorale (Li et al., 2015). De plus, la CAM contient une matrice extracellulaire protéines telles que la fibronectine, la laminine, le collagène, l'intégrine et les métallo protéinases MMP-2, ce qui en fait un modèle attrayant pour étudier l'invasion tumorale et les métastase.



**Figure 5 :** Schéma du test de l'implantation des cellules tumorales dans la membrane chorioallantoïque (CAM) (Dünkeret Jendrossek, 2019).

### I.7.2. Le principe du test CAM

Les œufs fécondés sont incubés dans un incubateur rotatif humidifié à 38 °C et 50 % humidité. Entre le jour embryonnaire (E) 8, ou préférentiellement E10, lorsque le système vasculaire CAM est facilement visible, les œufs sont mirés en faisant briller la lumière dans la coquille à l'extrémité pour localiser la veine chorioallantoïdienne, marquée à environ 1 cm de son point de ramification. Ensuite, un trou est percé à travers l'extrémité de l'œuf dans le sac à air. Ensuite, la fenêtre de la coquille d'œuf est scellée hermétiquement avec du ruban adhésif et l'œuf est renvoyé dans l'incubateur. Déjà en 1958, le carcinome épidermoïde humain, le sarcome, l'adénocarcinome et le bronchogène des échantillons de carcinome ont été implantés sur le CAM, évalués pour la présence de métastases dans l'embryon de poulet et l'efficacité des chimiothérapies sur leur croissance (Harris, 1958). Kaufman et al. (1956) ont été les premiers à décrire des modifications de la CAM adjacente au site d'inoculation de la tumeur. Dagg et al. (1956) ont utilisé le test CAM pour étudier les métastases du carcinome épidermoïde humain, sarcome, et rhabdomyosarcome embryonnaire sur la CAM mais aussi sur l'embryon de poulet. Cependant, le CAM présente des limites d'utilisation et des avantages présentés dans le tableau 3 ci-dessous.



**Figure 6** :L'embryon de poulet et sa membrane chorioallantoïdienne.(A) Schéma de la structure générale d'un embryon de poulet âgé de 5 jours dans l'œuf avec les trois couches tissulaires de la CAM.(B) Coupe semi-fine de la CAM d'un embryon de poulet de 12 jours montrant l'épithélium chorionique (ch), le mésoderme vascularisé (m) et l'épithélium allantoïdien (al).(C) Embryon de poulet de 5 jours photographié in ovo (Ribatti, 2014) .

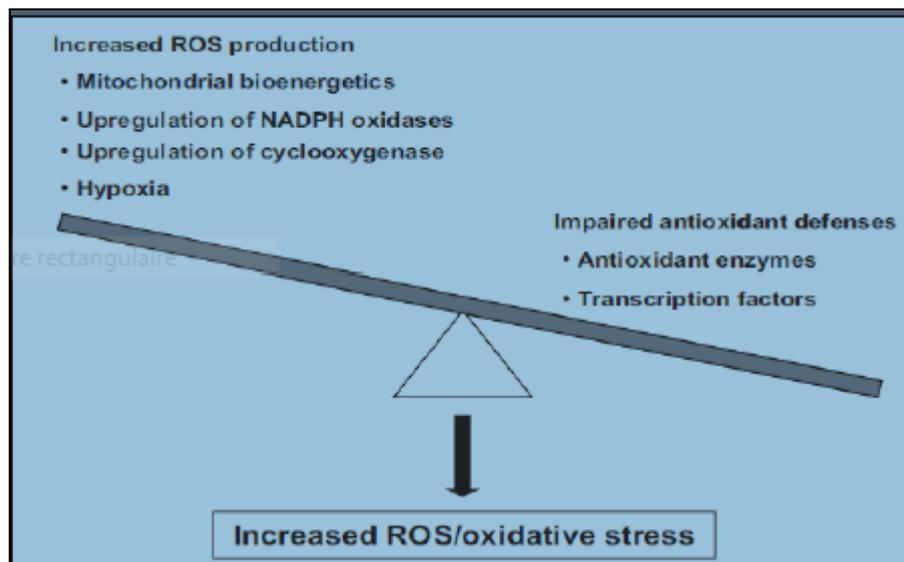
**Tableau 3** :Avantages et limites du test de CAM.(Ribatti, 2010).

Les avantages :	Les limites :
-Test facile par rapport à d'autres modèles animaux.	- Délai limité pour la croissance et les effets de la tumeur.
-Test expérimental court et peu coûteux	-incapacité à étudier les relations entre une tumeur et le système immunitaire
-Reproductible	
-Immunodéficient naturel (possibilité de culture des cellules humaines jusqu'à 18 <sup>ème</sup> jours après la fécondation).	

### I.8. La relation entre l'angiogenèse et le stress oxydatif :

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités de défense antioxydante de l'organisme. Les molécules oxydantes ou espèces réactives (ER) sont représentées essentiellement par les ROS (pour « Reactive Oxygen Species » ou espèces réactives de l'oxygène) dont le chef de file est l'anion  $O_2^{\bullet-}$ . Les ER sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires, dont la phagocytose, la signalisation cellulaire, la régulation des métabolismes et aussi la modulation de l'expression des gènes (Baudin, B. 2020).

Le stress oxydant serait la source des maladies chroniques et la conséquence de la présence trop importante des radicaux libres dans le corps (Edeas *et al.*, 2010).



**Figure7** :L'augmentation de la production des ROS et/ou la réduction des défenses antioxydantes entraînent un stress oxydatif (Shiota, 2021).

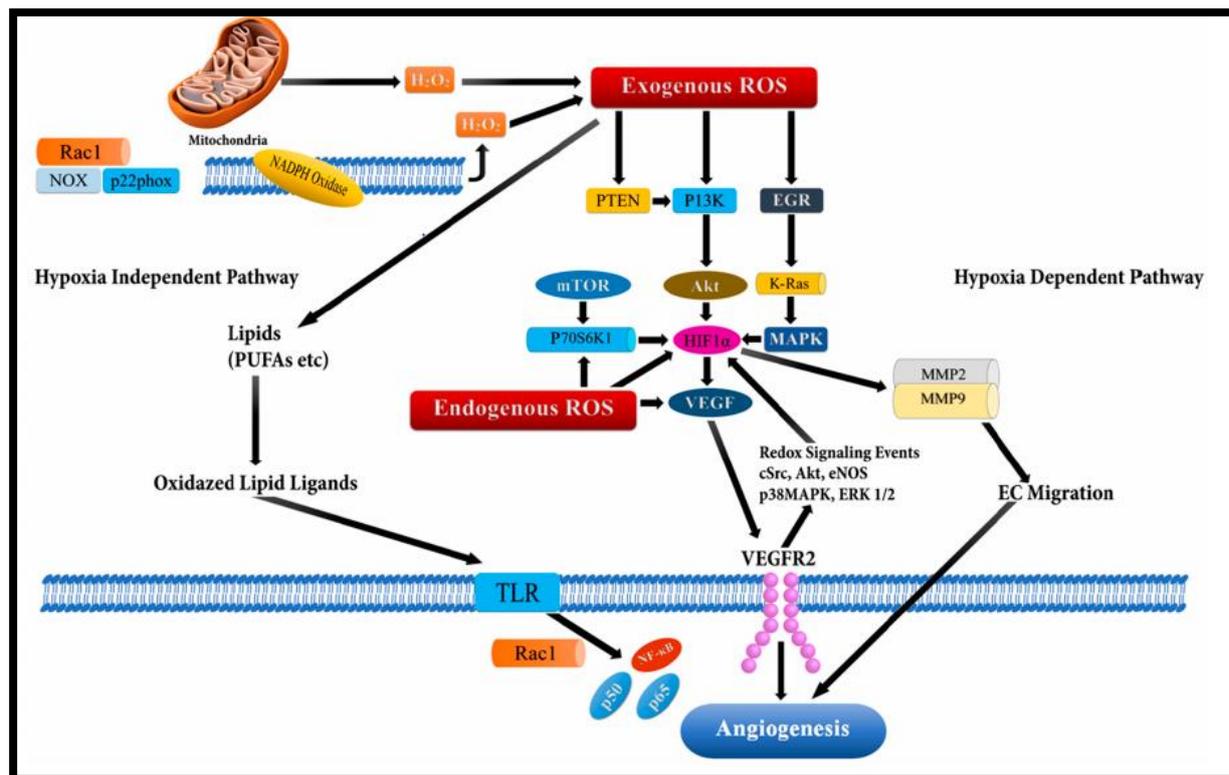
Le fonctionnement normal d'un tissu dépend de l'apport en oxygène et en nutriments par les vaisseaux sanguins. La compréhension des mécanismes impliqués dans la formation du système vasculaire est donc devenue un objectif majeur au cours de ces dernières années. Pendant l'embryogenèse, la formation des vaisseaux se produit en deux étapes, la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse correspond à l'apparition des vaisseaux primaires formant un réseau vasculaire immature. Puis ce réseau se ramifie et se stabilise lors de l'angiogenèse. À

l'âge adulte, de nouveaux vaisseaux se développent également par ce processus angiogénique (Lemaire et al., 2020).

L'angiogenèse dépendante des ROS est initiée par la prolifération du cancer, qui à son tour augmente le taux métabolique conduisant à la génération excessive des ROS. Ces niveaux élevés de ROS entraînent un stress oxydatif dans le microenvironnement tumoral, qui initie la sécrétion de modulateurs (Dewhirst et al., 2008).

Les ROS endogènes et exogènes sont les fers de lance de la stimulation des facteurs de croissance, des cytokines et des facteurs de transcription comme le VEGF et le HIF-1 $\alpha$ , qui favorisent la migration tumorale et prolifération par signalisation cellulaire dépendante des ROS (Dewhirst et al., 2008 ; Ushio-Fukai and Nakamura, 2008) (Karar and Maity, 2011).

L'hypoxie est une caractéristique majeure de la plupart des tumeurs solides. Les cellules s'adaptent à la baisse de l'apport en oxygène en stabilisant les facteurs de transcription HIF (hypoxia-inducible factor) qui, à leur tour, activent l'expression de nombreux gènes résultant en la survie et le maintien des fonctions cellulaires. Dans les cellules tumorales, l'exposition au stress hypoxique active, via les facteurs HIF, une série de molécules qui leur permettent de résister à la lyse dépendante des cellules tueuses du système immunitaire. L'hypoxie tissulaire régule également les fonctions des cellules de l'immunité et leur différenciation. Cette revue décrit les mécanismes de résistance tumorale aux effecteurs cytotoxiques induits par l'hypoxie, et les conséquences fonctionnelles de l'hypoxie sur les cellules immunes (Hasmim et al., 2014).



**Figure8 :** Activation de l'angiogenèse par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la voie dépendante et indépendante de l'hypoxie (Aggarwal et *al.*, 2019).

Il a été rapporté que la voie de signalisation Ras régule à la hausse la sécrétion de VEGF (Rezatabar et *al.*, 2019). Récemment, le mutant p53 a également été reconnu pour moduler la réponse angiogénique dans la prolifération tumorale par l'activation médiée par les ROS du VEGF-A et du HIF-1 dans les cellules de carcinome du côlon humain HCT116 (Khromova et *al.*, 2009).

Le mécanisme de l'angiogenèse médiée par les ROS a été largement étudié pour comprendre la signalisation cascade modulant la progression du cancer. Dans une étude réalisée à l'aide des cellules cancéreuses MDA-MB-231 du cancer du sein, la déféroxamine (DFO) a induit HIF-1 $\alpha$  via la phosphorylation de ERK1 / 2 qui a favorisé la migration et la métastase (Liu et *al.*, 2014).

Han et ses collègues ont démontré que les niveaux élevés de facteur de croissance épidermique (EGF) a déclenché la production de peroxyde d'hydrogène, qui a stimulé p70S6K1 via la voie de signalisation PI3K/Akt, conduisant à l'activation du VEGF et du HIF-1 (Han et *al.*, 2014) .

Dans le même sens, Liu et *al.* ont rapporté que l'EGF entraînait une production accrue de peroxyde d'hydrogène dans les cellules cancéreuses de l'ovaire OVCAR-3, qui ont activé la voie AKT/p70S6K1, entraînant ainsi une expression accrue du VEGF (Liu et *al.*, 2006).

Le peroxyde d'hydrogène a également été illustré pour inactiver la phosphatase et l'homologue de tension (PTEN) par l'oxydation réversible des phosphatases dans le groupe thiol de la cystéine et favorisent l'activation du Cascade de signalisation PI3K/Akt/mTOR et Ras (Brewer et *al.*, 2015).

La voie ERK/Akt a induit l'expression de ROS et HIF-1 ; sa molécule pro-angiogénique en aval dans Cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B (Jing et *al.*, 2012). De plus, plusieurs autres protéines de remodelage extracellulaires et les facteurs de transcription (p53, HIF-1, VEGF et MMP) ont été documentés comme étant régulés par les ROS (Coso et *al.*, 2012)( Matsuda et *al.*, 2018).

# ***CHAPITRE II***

***Pistacia  
lentiscus L.***

## II. *Pistacia lentiscus L.*

### II.1. Généralités

La flore algérienne comporte environ 3164 espèces de plantes vasculaire dont 7,9% sont endémiques appartenant à la quasi-totalité des familles botaniques. L'une de ces espèces à usage très fréquent par les populations rurales en Algérie est *Pistacia lentiscus L.* (Cheraft, 2011).

*Pistacia lentiscus L.* est connu sous l'appellation de : Darou en arabe, lentisque et arbre au mastic en Français, c'est un arbre (figure7) qui pousse spontanément dans le bassin méditerranéen. (Boutemine et *al.*, 2018).



**Figure 9 :** Arbuste de *Pistacia lentiscus L.* (Anonyme, 2014)

### II.2. Etude botanique et Taxonomique de *Pistacia lentiscus L.*

#### II.2.1. Description botanique

*Pistacia lentiscus L.* est un arbrisseau de 1 à 3 mètres, à odeur résineuse forte. Cette espèce est caractérisée par :

**II.2.1.1. Les feuilles :** Persistantes, paripennées, avec 4 à 10 folioles elliptiques, coriaces et luisantes et le pétiole est nettement ailé. On trouve des pieds mâles et femelles distincts (espèce dioïque) qui fleurissent en grappes denses en mois de Mai (Maameri, H.Z., 2014).

**II.2.1.2. Les fleurs :** unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe (figure 10), et très aromatiques, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles. Les fleurs femelles sont vert jaunâtre et les fleurs mâles (4–20 pour inflorescence) sont verdâtres et ont deux bractéoles, 2–5 lobes du périanthe, et un ovaire uniloculaire comprenant un ovule (Zaouli, Y *et al.*, 2018).

**II.2.1.3. Le fruit :** est une baie globuleuse (de 2 à 3 mm), d'abord rouge puis brunâtre à sa maturité, qui est complète à l'automne (figure 10), puis noire à maturité, mûrissent en novembre, comestible, arrondie, d'environ cinq millimètres qui renferme un seul noyau à une seule graine (Kessbia et Messaoudi, 2017).

**II.2.1.4. La résine :** appelée également mastic, c'est une substance aromatique et résineuse qui s'écoule du tronc et des branches principales (figure 10). Cette sécrétion peut être favorisée par des éraflures pratiquées dans le tronc et les branches. Les petites « larmes » qui s'écoulent de la plante sont séchées au soleil pour les faire durcir en gouttes translucides. (Abdeldjelil, 2016)



**Figure 10:** Les fruits, feuilles, les fleurs et la résine de *Pistacia lentiscus L.* (Belfadel and Boulebda, 2009).

**II.2.2. Taxonomie et classification botanique de *Pistacia lentiscus L.* :**

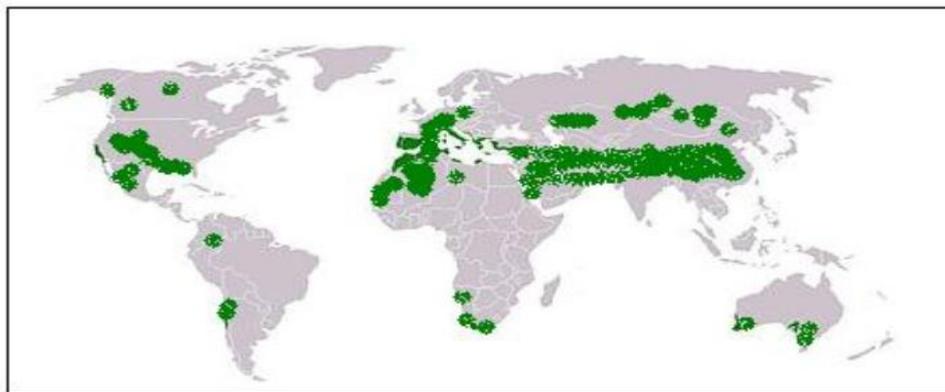
L'espèce *Pistacia lentiscus L.* est classée comme suite (tableau 4) :

**Tableau 4 :** Taxonomie de *Pistacia lentiscus L.* (Quézel and Santa, 1962)

<b>Taxonomie</b>	<b>Espèce</b>
<b>Règne</b>	Végétale
<b>Sous règne</b>	Tracheobionata
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous classe</b>	Rosidae
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famille</b>	Anacardiacees
<b>Genre</b>	<i>Pistacia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pistacia lentiscus L.</i>

**II.2.3. Répartition géographique****II.2.3.1. Dans le monde**

Cette plante se trouve dans les pays du bassin méditerranéen (Milia et *al.*, 2021), comme le Maroc, l'Espagne, l'Algérie, la Tunisie (Bachrouch et *al.*, 2010) , en plus de l'Italie, la France, la Grèce (Soulaidopoulos et *al.*, 2022), la Turquie et le Portugal, ainsi que les Canaries. une large distribution géographique et bioclimatique, s'étendant des zones humides aux zones arides (Harrat et *al.*, 2018 ; Mohamed et *al.*, 2018 ; Yıldırım et *al.*, 2019). Le pistachier est un arbrisseau qui préfère les sols siliceux et secs, il se développe aussi sur des sols calcaires (figure 11).



**Figure 11** :Distribution géographique du genre *Pistacia* dans le monde (Djedaia, 2017).

### II.2.3.2.En Algérie :

En Algérie, *Pistacia lentiscus* L.est dispersé sur tout le littoral et pousse dans divers habitats le long d'un gradient climatique qui varie en termes de rayonnement solaire, de température précipitation (Ait Said, 2011).

On le retrouve sur tout type de sol, dans l'Algérie subhumide et semi-aride, plus précisément dans le bassin du Soummam (Stoutah, 2016).Il est répandu en forêt seul ou associé avec d'autres espèces d'arbres comme le térébinthe, les olives et la caroube, dans tous zones côtières jusqu'à 700 mètres au-dessus du niveau de la mer ou dans les zones pierreuses au bord de la mer (Dahmoune et *al.*, 2014).

## II.3. Phytochimie de l'espèce *Pistacia lentiscus* L.

**II.3.1.les fruits :** de *Pistacia lentiscus* L. sont riches essentiellement en flavonoïdes, en anthocyanes et minoritairement en tanins, glucosides et amidon (Atmani et *al.*, 2009). Avec une présence modérée des mucilages et une absence totale des saponosides, des sénosides, des quinones libres, des coumarines, des irridoïdes et des alcaloïdes (Arab et *al.*, 2014).

**II.3.2.Les feuilles :**sont caractérisé par une forte teneur des feuilles en leuco anthocyanes, en saponosides, en sénosides, en alcaloïdes et en tannins totaux avec une forte teneur en tannins galliques et flavonoïdes et une teneur moyenne en glucosides (Arab et *al.*, 2014).

**II.3.3.L'huile essentielle :** L'huile essentielle représente 0,2% du poids des fruits, les mono terpènes à savoir,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\beta$ -myrcene, limonène, et  $\alpha$ -phellandrène sont les composés caractéristiques de cette huile. Quelques sesquiterpènes, esters aliphatique, cétones, et des composés phénoliques (thymol et carvacrol ont été aussi identifiés (Milia et *al.*, 2021).

**II.3.4.L'huile végétale (fixe) :** de *Pistacia lentiscus L.* est une huile alimentaire qui présente trois acides gras majeurs : 56% d'acide oléique, 25% d'acide palmitique et 15% d'acide linoléique (Mezni et *al.*, 2012). Le rendement en huile varie de 11,95% (fruits non mûres) à 45,97% (fruits trop mûrs).

#### **II.4. Activités pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus L.***

Plusieurs études ont mis en évidence une variété d'activités des différentes parties de *Pistacia lentiscus L.* (figure 12) on cite :

##### **II.4.1.Activité antioxydante**

Plusieurs études ont prouvé la capacité antioxydant de *Pistacia lentiscus L.* La richesse des différentes parties de la plante en composés poly phénoliques et en flavonoïdes lui confère l'activité antioxydant et cela par le piégeage direct des radicaux libres l'inhibition des enzymes génératrices d'ERO, la chélation des ions de métaux de transition, responsables de la production des ERO et l'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydants (Barbouchi et *al.*, 2020).

##### **II.4.2.Activité antibactérienne et antifongique**

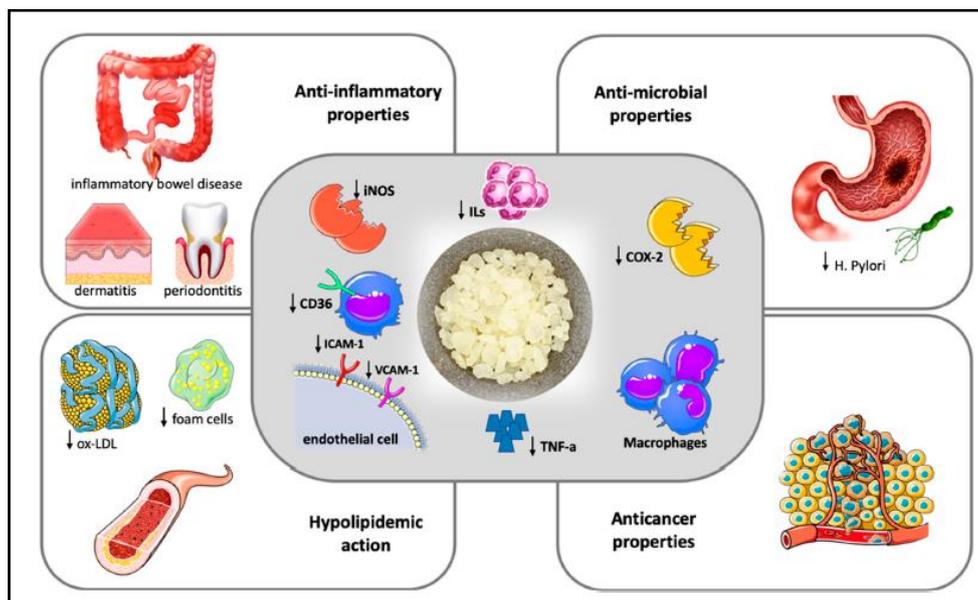
Les huiles essentielles possèdent des propriétés antimicrobiennes intéressantes et luttent contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et fongique. L'activité antibactérienne et antifongique de l'huile extraite du mastic et l'huile essentielle des fruits de *PistacialentiscusL.* est très élevée contre *Candidaalbicans* et *Staphylococcus aureus* (Amara et *al.*, 2019).

##### **II.4.3.Activité anti-inflammatoire**

De nombreuses études semblent indiquer que les polyphénols possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires, d'autres sont capables d'inhiber l'histamine. La présence de flavonoïdes dans les différentes parties de *Pistacia lentiscus L.* confirme la puissance de l'activité anti- inflammatoire (Mease, 2002).

#### II.4.4. Activité anticancéreuse

La résine de *Pistacia lentiscus L.* a été traditionnellement considérée comme un agent anticancéreux, en particulier contre les tumeurs du sein, du foie, de l'estomac, de la rate, et de l'utérus. Ces croyances traditionnelles sont en accord avec de récentes études montrant que mastic de Chios induit l'apoptose et dispose d'action anti-proliférateur contre les cellules cancéreuses du côlon (Spyridopoulou et al., 2017).



**Figure 12 :** l'effet thérapeutique de *Pistacia lentiscus L.* (Soulaidopoulos et al., 2022).

# ***CHAPITRE***

## ***III.***

### ***Matériels et***

### ***Méthodes***



### III-matériel et méthode :

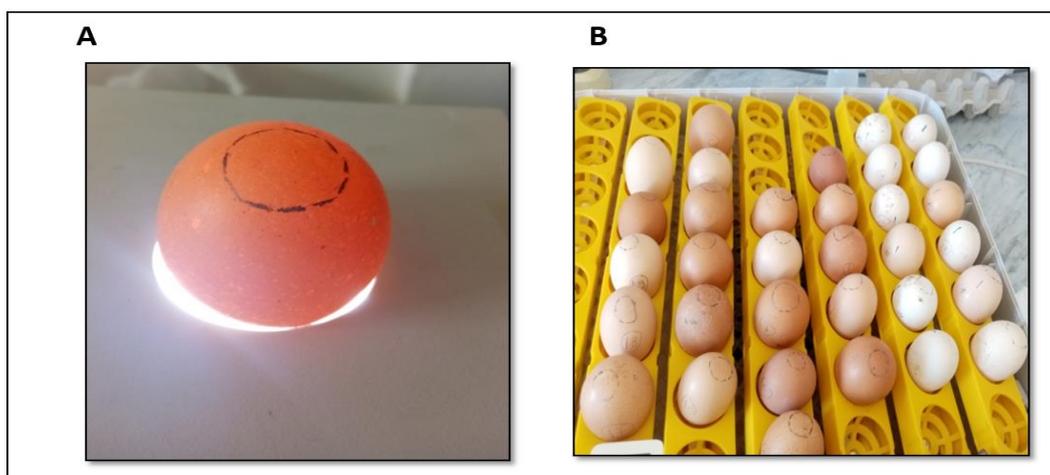
Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Toxicologie Moléculaire et le laboratoire de Biologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Mohamed Seddik Ben Yahia de Jijel. Cette étude est portée sur l'évaluation de l'effet anti-angiogénique de l'extrait aqueux de fruits de la plante *Pistacia lentiscus* L. (EAFPL) en utilisant comme inhibiteur et la quercétine. Nous avons opté pour un test *in ovo* qui consiste à évaluer la croissance des vaisseaux sanguins dans la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet.

#### III.1. Collecte des œufs et incubation :

Des œufs fraîchement fertilisés (34 œufs) ont été collectés dans une production locale au niveau de la wilaya de Jijel.

D'abord, nous avons mesuré le poids des œufs afin de les répartir dans des groupes de taille homogènes, ensuite nous avons réalisé un mirage pour tracer la chambre à air.

Le mirage des œufs est une technique avicole qui permet à la fois de tracer la chambre à air et de détecter les œufs morts afin de les écarter. Cette technique consiste à examiner l'œuf âgé de quelques jours placé devant une forte source lumineuse de façon à discerner des signes caractéristiques du développement de l'embryon, les filaments, appelés araignées, qui composent le futur réseau veineux. Si ces filaments ne sont pas visibles, l'œuf est mort et doit être ôté de la couveuse. Les œufs sont incubés à 39°et 60% d'humidité dans un INCUBATOR EW-56S. Les œufs sont balancés (tournés) de 60°chaque deux heures.



**Figure 13 :A. Mirage : Traçage de la chambre à air. B. incubation des œufs dans l'incubateur.**

### III. 2. Le traitement des œufs :

Dans le quatrième jour de l'incubation, un deuxième mirage a été réalisé pour trier les œufs qui sont effectivement fécondés et écarter ceux qui ne le sont pas. Nous avons tracé l'ombre embryonnaire de chaque œuf pour suivre son développement.

Les œufs sont groupés en cinq groupes (n=4)

**Groupe 1 :** les œufs reçoivent 0.1 ml ( $1 \cdot 10^{-2}$  mg /g d'œuf) de l'eau physiologique au 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.

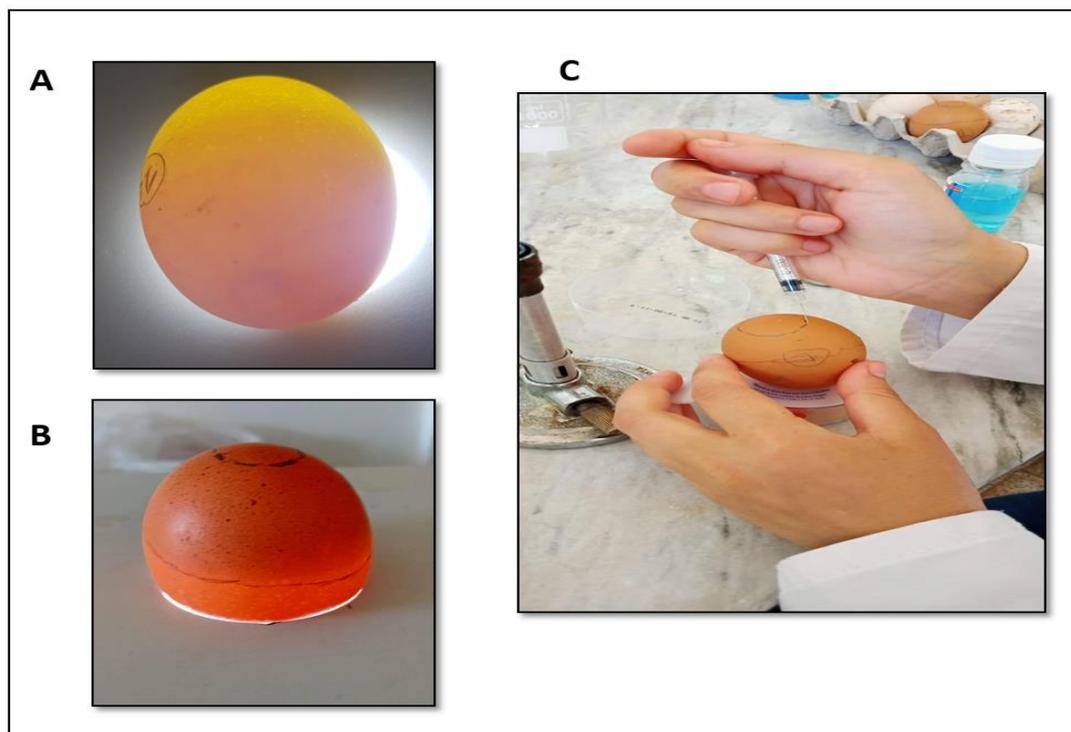
**Groupe 2 :** les œufs reçoivent 0.1 ml ( $0.7 \mu\text{M}$  /g d'œuf) de la quercétine à  $30 \mu\text{M}$  le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.

**Groupe 3 :** les œufs reçoivent 0.1 ml ( $2 \cdot 10^{-2}$  mg/g d'œuf) de l'EAFPL à 10 mg/ml le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.

**Groupe 4 :** les œufs reçoivent 0.1 ml ( $2 \cdot 10^{-2}$  mg/g d'œuf) de l'EAFPL à 20 mg/ml le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.

**Groupe 5 :** les œufs reçoivent 0.1 ( $2 \cdot 10^{-2}$  mg/g d'œuf) ml de l'hile de PL à 10 mg/ml le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.

Dans une zone stérile, nous avons fait un petit trou 1cm au-dessus du trait de la chambre à air pour pouvoir injecter le traitement, ensuite nous avons refermé ce trou par le para film pour éviter des contaminations. Les œufs sont remis dans l'incubateur jusqu'au jour du sacrifice.

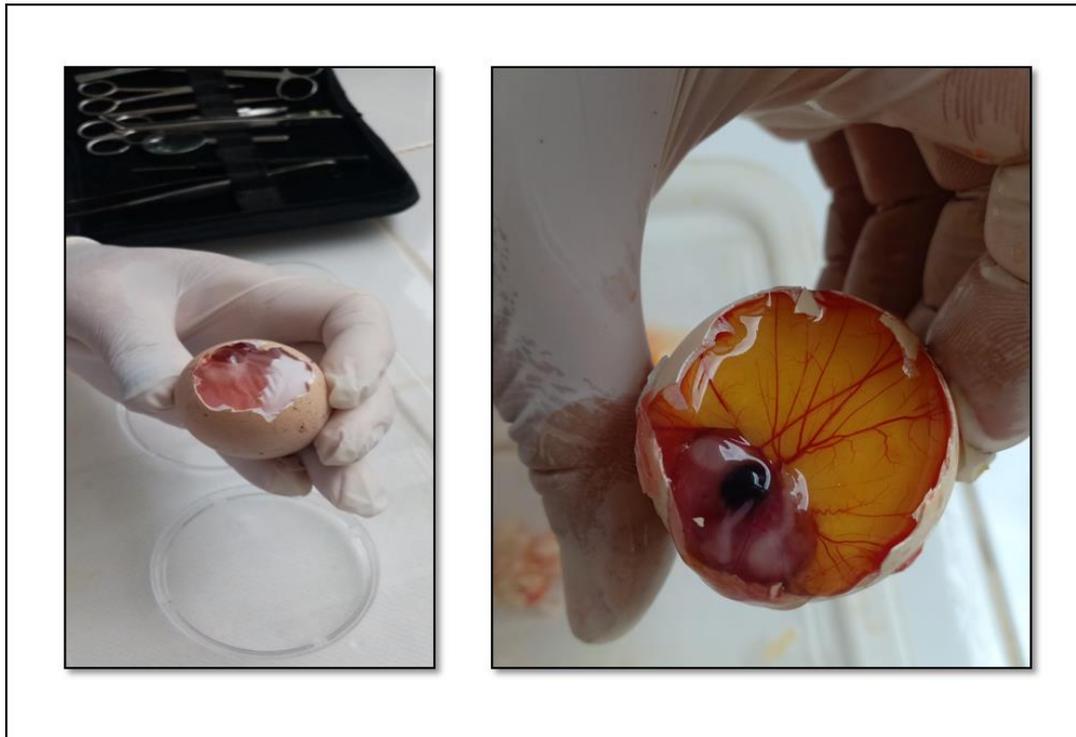


**Figure 14 :** Déroulement du test CAM. **A.** Vérification de la fécondité des œufs. **B.** traçage de l'ombre embryonnaire. **C.** Le traitement des œufs

### III. 3. Sacrifice des œufs

Au 8<sup>ème</sup> jour, les œufs sont sacrifiés, une grande ouverture a été réalisé sur la chambre à air puis tous le contenu de l'œuf est renversé dans une boîte de pétrie.

Une observation sous une loupe binoculaire (stéréo microscope) est rapidement effectuée, des photos sont été prises sous binoculaire à l'agrandissement X10 pour calculer le nombre des vaisseaux sanguins. Ensuite, la membrane chorioallantoïdienne est stocké à - 20°C est servira pour la préparation de la fraction cytosolique utilisée pour l'évaluation des paramètres du stress oxydatif cytosolique.



**Figure 15:** Sacrifice des œufs au 8<sup>ème</sup> jour d'incubation.

### III. 4. Evaluation quantitative de l'inhibition de l'angiogenèse

#### III .4. 1. Traitement des images par le Wim CAM

Les microphotographies sont traitées par un service Web le Wim CAM (Onimagin Technologies, Espagne). Le traitement des images par le Wim CAM fournit des données

Suivantes :

- La longueur des vaisseaux : C'est la somme de longueur de tous les vaisseaux sanguins

Sur l'image en pixel

- La densité des vaisseaux : La proportion de la surface vaisseaux sanguins sur la surface

Totale mesurée. Elle est calculé selon l'équation suivante :  $DV = \frac{\text{surface vasculaire}}{\text{surface totale}} * 100$

- Le nombre des points de branchements : C'est le nombre des points de ramification des vaisseaux sanguins en vaisseaux primaire, secondaire et tertiaire pour former la néovascularisation .

(annexe1)

### III.4. 2. Le pourcentage d'inhibition de l'angiogénèse

Un comptage des vaisseaux sanguins d'ordre secondaire et tertiaire est effectué. Le taux de réduction de la vascularisation est calculé selon la formule suivante :

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

Où :

**TRv** : le taux de réduction des vaisseaux sanguins exprimé en pourcentage.

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

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

### III.5. Evaluation des paramètres de stress oxydatif

#### III.5.1. Extraction de la fraction cytosolique

Pour préparer la fraction cytosolique, 0.1 g de membrane chorioallantoïdienne est coupée et homogénéisée avec 300µl volume du tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1M, pH = 7.4) contenant du KCl à 1.17% à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 12 min à 4°C pour séparer les débris nucléaires, puis le surnageant récupéré est centrifugé encore une fois à 9600 rpm pendant 30 min à 4°C. C'est le surnageant final obtenu qui va servir à l'évaluation des biomarqueurs biochimiques du système antioxydant non enzymatique (GSH) ainsi que le MDA cytosolique (Iqbal et al., 2003).

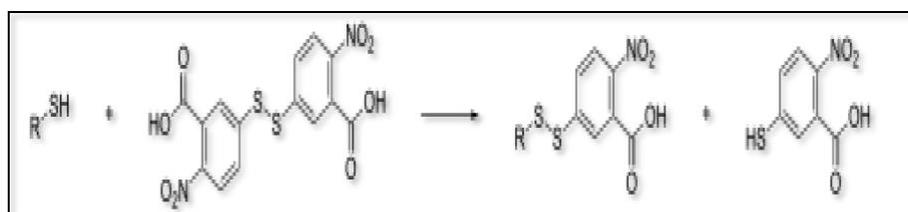
#### III.5.1.1. Dosage du glutathion cellulaire (GSH)

Le dosage du glutathion réduit est basé sur l'évaluation du contenu en groupement –SH par spectrophotométrie. Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfures S-S.

Le principe consiste à l'oxydation du GSH par le DTNB (acide 5,5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque) et la libération de l'acide thionitrobenzoïque (TNB)(figure 14) un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible. ANALYTTEK (264V/5-60 Hz, Germany).

Pour cela, 30  $\mu$ l de la fraction cytosolique a été mélangée avec 30  $\mu$ l de TCA à 5%, après agitation et incubation 5 min à 4°C, le mélange ensuite a été centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 min. 25  $\mu$ l du surnageant est récupéré et additionné à 5 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH=8). Après agitation, 1.5 ml de ce mélange est ajouté à 20  $\mu$ l de la solution (0.01M). Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante l'absorbance a été mesurée à 412 nm.

Le taux de GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimés en Mm par gramme de tissus (annexe 2).



**Figure 16** : Réaction du DTNB avec un thiol (R-SH) (Ellman ,1959).

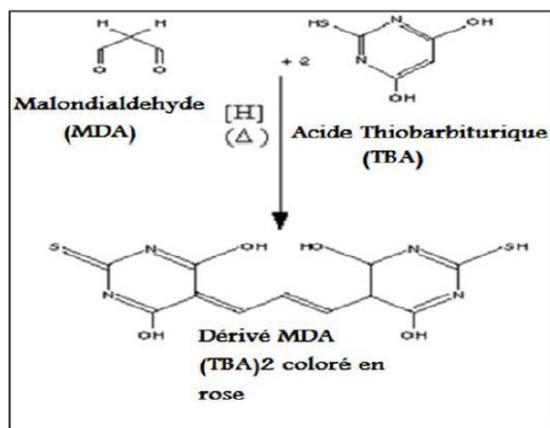
### III-5-2-Le dosage du malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode d'Ohkawa et al. (1979). Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress oxydatif. En milieu acide et à chaud (100 °C) une molécule de MDA est condensée avec des molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose, le n-butanol est ensuite utilisé pour extraire le MDA (figure15). La lecture de la DO est réalisée à la longueur d'onde 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible. ANALYTTEK (264V/5-60 Hz, Germany).

Pour ce dosage, 100  $\mu$ l de la fraction est additionné à 100  $\mu$ l d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et à 200  $\mu$ l d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 0.8 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15minutes à 3000rpm, l'absorbance est déterminée sur le surnageant, représentant la phase n-butanolique, à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible. ANALYTTEK (264V/5-60 Hz, Germany) à la longueur d'onde de 530 nm.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer Lambert en utilisant le coefficient d'extinction molaire, du complexe MDA –TBA,  $\varepsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Buege & Aust, 1978).

Le taux du MDA est exprimé en  $\mu\text{M/g}$  de tissu.



**Figure 17** : Principe du dosage du malondialdéhyde (Ohkawa et al., 1979).

### III.5.2.1. Analyse statistique :

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et d'écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test (T) de Student réalisé par le logiciel Excel 2013. La valeur trouvée par le calcul de T peut affirmer que les populations sont différentes par rapport au contrôle avec un risque d'erreur « p » tel que :

- $P > 0.05$  (ns #) : la différence n'est pas significative.
- $P < 0.05$  (\*) : la différence est significative.
- $P < 0.01$  (\*\*) : la différence est très significative.
- $P < 0.001$  (\*\*\*) : la différence est très hautement significative

***CHAPITRE***

***IV.***

***Résultats et  
Interprétation***

## IV. Résultats

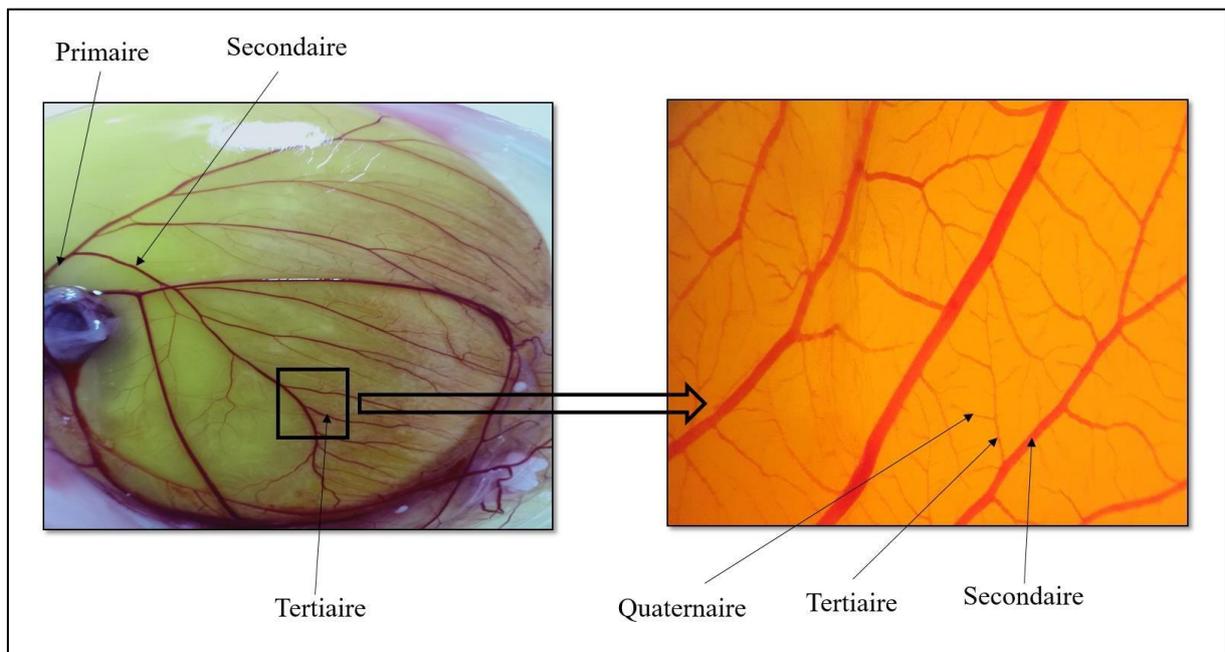
L'évaluation de l'effet anti-angiogénique de l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. à été réalisée en utilisant le test *ex vivo* du CAM. L'implication du stress oxydatif dans le processus de l'angiogenèse est mise en évidence par l'évaluation des paramètres non enzymatiques du stress oxydatif, le GSH et le MDA.

### IV.1. Evaluation qualitative de l'inhibition de l'angiogenèse

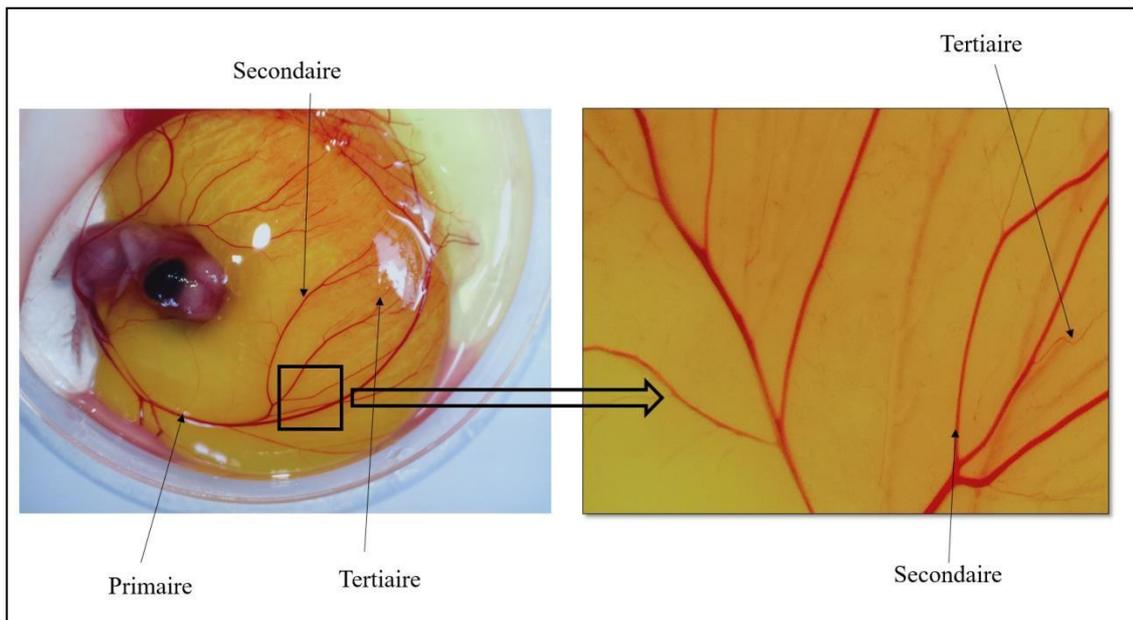
Un taux de mortalité considérable dans les groupes 4 et 5 (EAFPL à 20 mg/ml, l'huile de PL à 10 mg/ml) Ceci peut être dû à des facteurs externe à l'expérimentation (infections, conditions climatiques,...), donc difficile à contrôler.

Les œufs ont été traités par l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. (EAFPL) 10mg/ml et la quercétine 30µM et réincubés jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour. Après le sacrifice des œufs, l'observation macroscopique des œufs traités a été réalisée par un stéré microscope.

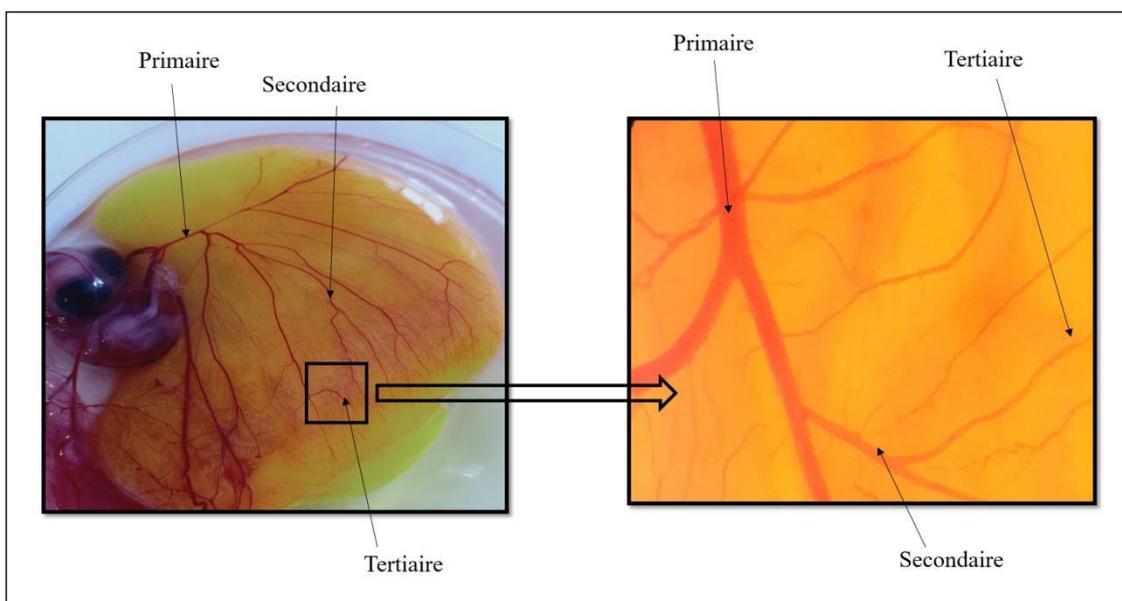
La figure 18 montre la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet avec ses différents vaisseaux sanguins. Les vaisseaux sanguins primaires sont des vaisseaux qui sortent directement de l'embryon et qui se ramifient en vaisseaux secondaires, tertiaires et quaternaires.



**Figure18:** Observation macroscopique de l'œuf témoin.



**Figure 19 :** Observation macroscopique de l'œuf traité par la quercétine.



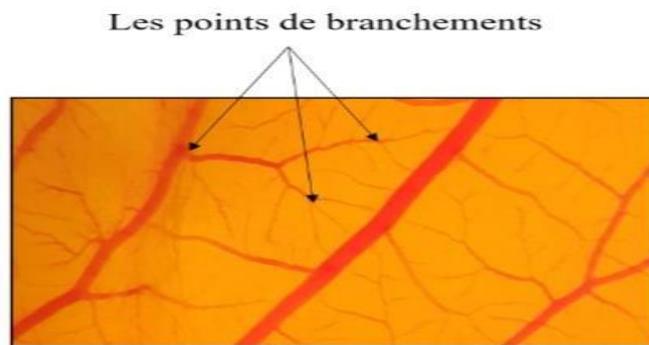
**Figure 20:** Observation macroscopique de l'œuf traité par l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus L.*

Nous avons constaté une réduction du nombre des vaisseaux sanguins chez les groupes traités par la quercétine (figure 19) et l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus L.* (figure 20) par rapport au groupe témoin qui présente plus de vaisseaux sanguins notamment les vaisseaux sanguins tertiaires et quaternaires (figure 18).

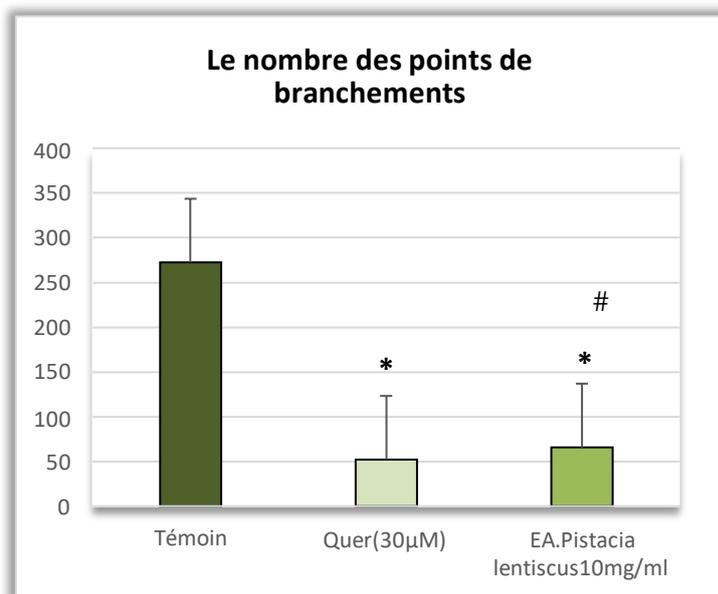
## IV.2. Evaluation quantitative de l'inhibition de l'angiogénèse

### IV.2.1 .Le nombre des points de branchements totaux

Le point de branchement est le lieu où un vaisseau se ramifie en plus petits vaisseaux, ce phénomène est appelé angiogénèse. Le dénombrement des points de branchement (figure 21) des vaisseaux sanguins primaires, secondaires et tertiaires est réalisé sur des microphotographies de la membrane Chorioallantoïdienne d'embryon de poulet. Le résultat est présenté dans la figure 22 et le tableau 5 ci-dessous :



**Figure21** : Les points de branchements



**Figure22**: Le nombre des points de branchements totaux

**Tableau5**: Le nombre des points de branchements totaux

	Les points de branchements Totaux
<b>Témoin</b>	272,33±88.79
<b>Quercétine</b>	52±43.03
<b>EA.Pistacia lentiscus</b>	65,66±73.08

Le point de branchement est le lieu où un vaisseau se ramifie en plus petits vaisseaux, ce phénomène est appelé angiogénèse. Nous avons comparé le nombre des points de branchements chez les groupes traités par la quercétine (30µM), utilisée dans

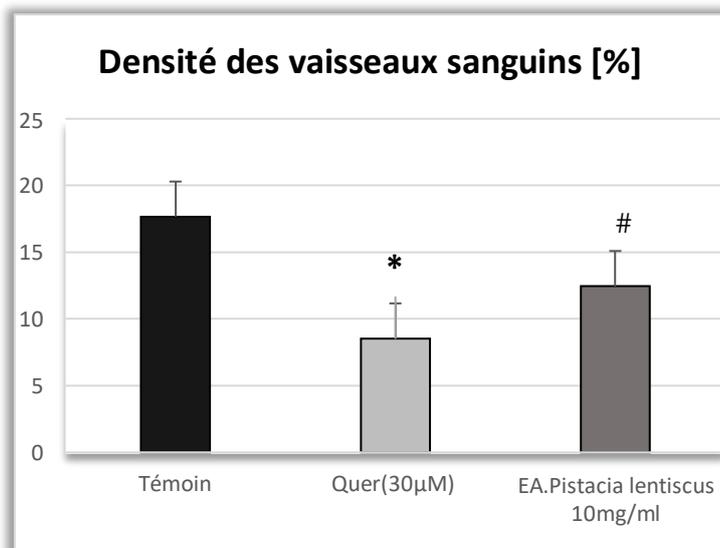
cette étude comme anti-angiogénique de référence conformément à l'étude de Pratheeshkumar (2012) (Pratheeshkumar et al. 2012) et l'extrait de fruit de *Pistacia lentiscus L* (10mg/ml) par rapport au groupe témoin.

À partir de la figure 22 nous pouvons constater une diminution significative ( $P < 0,05$ ) des points de branchements chez le groupe traité par la quercétine ( $52 \pm 43.03$ ) par rapport au groupe témoin ( $272,33 \pm 88.79$ ). Une diminution significative ( $P < 0,05$ ) aussi a été remarquée chez le groupe traité par l'EAFPL.

#### IV.2.2. La densité des vaisseaux sanguins

Un autre paramètre pour évaluer l'inhibition de l'angiogenèse est la densité des vaisseaux sanguins.

Une diminution significative ( $P < 0,05$ ) de la densité a été constatée dans le groupe traité par la quercétine ( $13,4 \pm 3.64$ ) par rapport au groupe témoin ( $30,2 \pm 5.11$ ) (figure 20).

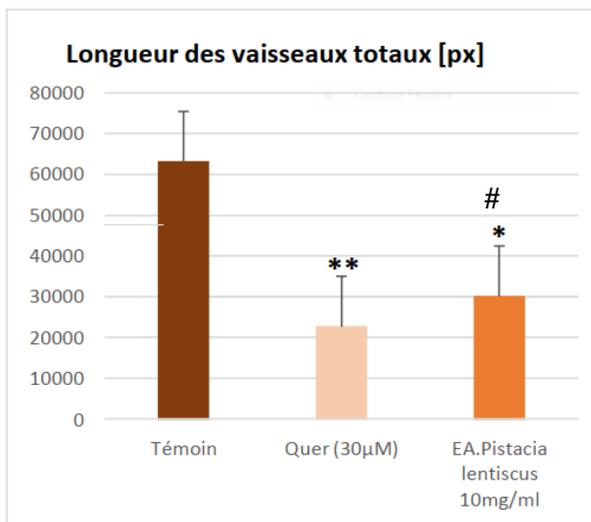


**Figure 23:** Densité des vaisseaux sanguins.

**Tableau 6:** Densité des vaisseaux sanguins

	Densité des vaisseaux [%]
<b>Témoin</b>	30,2 ± 5.11
<b>Quercétine</b>	13,4 ± 3.64*
<b>EA. Pistacia lentiscus</b>	18,86 ± 6.02

## IV.2.3. La Longueur des vaisseaux sanguins totaux



**Tableau7:** Longueur des vaisseaux totaux [px]

	Longueur des Vaisseaux totaux [px]
<b>Témoin</b>	63022,26
<b>Quercétine</b>	2256,6
<b>EA. Pistacia lentiscus</b>	29986,76

**Figure 24 :** Longueur des vaisseaux sanguins totaux.

\* : significatif

# : Non significatif par rapport au quercitine

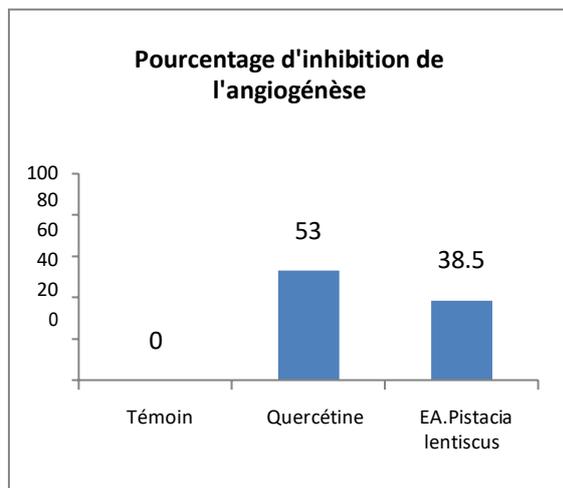
La longueur de tous les vaisseaux sanguins a été calculée. Nous avons constaté un effet hautement significatif ( $P < 0,01$ ) chez le groupe traité par la quercétine (2256,6 px) par rapport au groupe témoin (63022,26 px). Un effet significatif ( $P < 0,05$ ) a été remarqué chez le groupe traité par l'EAFPL (29986,76px).

La comparaison des résultats des différents paramètres (le nombre de vaisseaux, la densité et la longueur des vaisseaux) de l'angiogenèse entre le groupe EAFPL et quercétine ont montré une différence non significative ce qui suggère que l'effet de la l'EAFPL se rapproche de celui de la quercétine qui est utilisé comme référence.

#### IV.2.4. Le pourcentage d'inhibition de l'angiogénèse

Le comptage des vaisseaux d'ordre secondaire et tertiaire d'une partie de la membrane chorioallantoïdienne Le tableau 8 ci-dessous montre le pourcentage d'inhibition de l'angiogénèse de chaque groupe.

**Tableau8:** Pourcentage d'inhibition de l'angiogénèse



	Pourcentage d'inhibition %
<b>Témoin</b>	<b>0%</b>
<b>Quercétine</b>	<b>53%</b>
<b>EA. <i>Pistacia lentiscus</i></b>	<b>38.5%</b>

**Figure 25:** Pourcentage d'inhibition de l'angiogénèse

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que la quercétine réduit 53 % la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon du poulet par rapport au témoin, cela révèle que la quercétine possède un pouvoir antiangiogéniques élevé.

L'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. présente aussi un effet antiangiogéniques avec un pourcentage de l'inhibition de l'angiogénèse égale à 38.5%. Il est possible de constater que la différence de l'activité entre les deux substances est de l'ordre de 14.5% et que l'effet de la quercétine est 1,4 fois l'effet de l'EAFPL.

#### IV.3.Evaluation de l'état du stress oxydatif dans la membrane chorioallantoïdienne

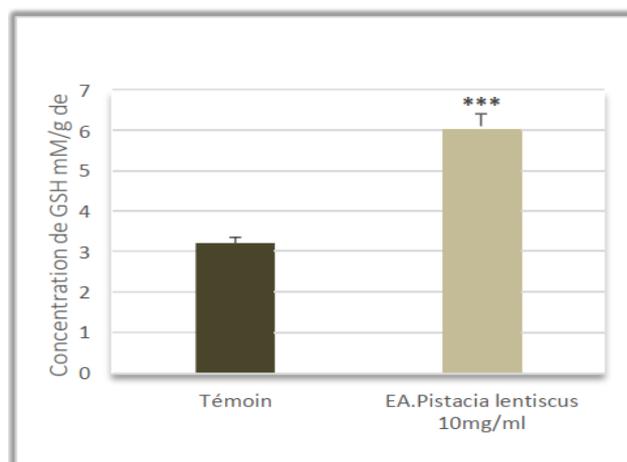
Nous avons Au cours du processus angiogénique, nous avons fait une évaluation de stress oxydatif dans la membrane chorioallantoïdienne

Le stress oxydant implique un ensemble complexe de paramètres et ne peut donc être mis en évidence par une seule méthode, dans notre étude nous avons fait la détermination des antioxydants non enzymatiques GSH et MDA.

### V.3.1. Variation du taux de glutathion

L'évaluation des taux de GSH chez les œufs traités par l'EAFPL 10mg/ml a été déterminée sur la fraction cytosolique de la membrane Chorioallantidienne le 8<sup>ème</sup> jour après sacrifice. Les données sont enregistrées dans la figure 26.

D'après nos résultats, nous avons constaté une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de réserve en GSH chez les œufs traités par l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. par rapport au groupe témoin.



**Tableau 9:** La concentration de GSH

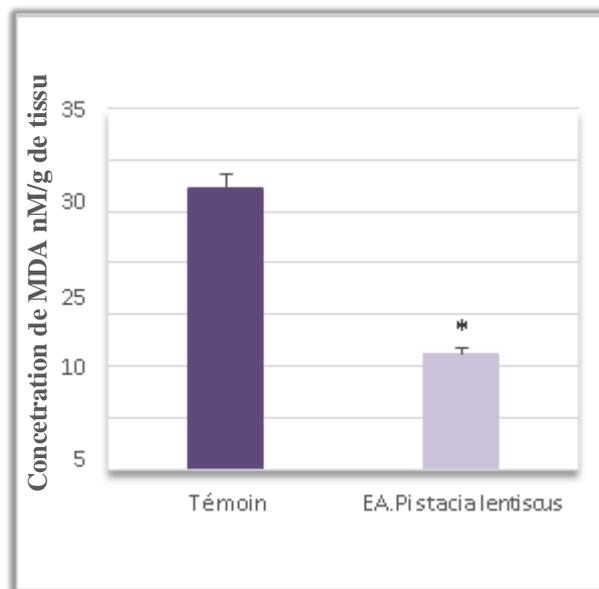
	La concentration de GSH
<b>Témoin</b>	3,1875±0.31
<b>EA. <i>Pistacia lentiscus</i></b>	6,093±0.64

**Figure 26 :** Variation du taux de GSH de la membrane chorioallantoïdienne

### IV. 3. 2. Variation des taux du malonyldialdéhyde tissulaire (MDA)

L'évaluation des taux du MDA chez les œufs traités par l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. 10 mg/ml est enregistrée dans la figure 25.

Nos résultats montrent que le traitement des œufs par l'extrait *Pistacia lentiscus* L. induit une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) de la peroxydation lipidique par rapport au groupe témoin.

**Tableau 10:** La concentration de MDA

	La concentration de MDA
<b>Témoin</b>	27,24±19.68
<b>EA. Pistacia lentiscus</b>	11,16±13.23

**Figure 27:** Variations du taux MDA de la membrane chorioallantoïdienne

# *Discussion*

## Discussion

L'étude de l'angiogenèse au cours de la croissance des tumeurs constitue un secteur de recherche qui attire beaucoup l'attention des chercheurs. Cet intérêt provient de résultats importants, montrant que la progression tumorale est très étroitement liée au degré de néo-vascularisation intratumorale. L'inhibition de cette néo-vascularisation par des composés perturbant certaines étapes moléculaires et cellulaires associées au développement des nouveaux vaisseaux est actuellement à l'étude dans plusieurs essais cliniques, et pourrait permettre le développement de traitements contrôlant la progression de métastases (Tahergorabi et Khazaei, 2011; Treps et Gavard, 2015).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) sont les éléments phytochimiques qui présentent les effets pharmacologiques les plus importants des plantes. Plusieurs études ont démontré l'effet anti angiogénique des polyphénols comme le Resvératrol (Chen et Tseng, 2007), l'acide gallique et la quercétine (Xiao et al., 2011) en inhibant des molécules impliquées dans l'angiogenèse et les métastases telles que le VEGF, la E-cadhérine et les métalloprotéinases matricielles 2 et 9 (Sun et al., 2015).

Cette étude vise, principalement, l'évaluation du potentiel antiangiogénique de l'extrait aqueux de fruits de *Pistacia lentiscus* L. en comparaison avec la quercétine utilisée dans ce travail de recherche comme inhibiteur d'origine naturelle de l'angiogenèse (Pratheeshkumar et al., 2012).

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

Nous avons adopté la dose testée de la quercétine à partir des résultats de l'étude de l'équipe de (Pratheeshkumar et al., 2012).

L'observation macroscopique des œufs traités par la quercétine (30 µM) a révélé une diminution visible de la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne par rapport au groupe témoin. Ce résultat est en accord avec celui de Pratheeshkumar et al. où ils ont trouvé un effet inhibiteur de l'angiogenèse de la quercétine (20 µM et 40 µM).

Pour l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. (EAFPL) l'observation macroscopique a montré une diminution de la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne. Cet effet inhibiteur est également rapporté par une étude de (Seifaddinipour et al., 2018) sur un extrait de l'espèce *Pistacia vera* L.

Pour quantifier cette inhibition, une analyse quantitative a été réalisée. Nous avons évalué le nombre des points de branchements totaux, la densité des vaisseaux sanguins et la longueur des vaisseaux sanguins totaux.

Les résultats obtenus de ces trois paramètres prouvent que la quercétine et l'EAFPL ont un pouvoir antiangiogénique puissant statistiquement significatif.

La comparaison de ce pouvoir inhibiteur des deux traitements a été effectuée par le calcul du pourcentage d'inhibition de l'angiogenèse, en comptant le nombre des vaisseaux sanguins secondaires et tertiaires. Le résultat a montré que la quercétine réduit 53 % la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne de même pour l'EAFPL qui la réduit de 38.5%. Ce résultat confirme que la quercétine est beaucoup plus puissante (1,4fois) que l'extrait de *Pistacia lentiscus* L.

Malgré l'effet néfaste sur les tissus à haute concentration, il a été prouvé que le stress oxydatif joue un rôle positif au cours de l'angiogenèse physiologiques ou pathologiques. La genèse est initiée par les demandes tissulaires de l'oxygène et les nutriments, entraînant une hyper- cycle hypoxie/réoxygénation, qui, à son tour, favorise la formation des radicaux libres oxygénés (ROS). Les ROS peuvent être générés soit de manière endogène, par la mitochondrie au niveau de la chaîne de transport d'électrons ou de manière exogène, résultant de l'exposition aux agents environnementaux (Khatri et al., 2004; Kim and Byzova, 2014; Tangetal., 2022).

Activation de l'angiogenèse par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) via l'hypoxie dépendante et voies indépendantes de l'hypoxie. La voie dépendante de l'hypoxie augmente l'endothélium vasculaire expression du facteur de croissance (VEGF) via la sous-unité régulatrice de la phosphoinositide-3-kinase/AKT sérine/thréonine kinases/cible mécaniste de la rapamycine kinase (PI3K/Akt/mTOR), PTEN (homologue de la phosphatase et de la tensine) et signalisation MAPK (Mitogen-activated protein kinases) cascade via HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) et p70S6K1 (ribosomal protein S6 kinase B1), qui libèrent diverses cytokines, facteurs de croissance et régulation positive des MMP (matrice métalloprotéinases) conduisant à l'angiogenèse. La voie indépendante de l'hypoxie conduit à l'angiogenèse via des ligands lipidiques oxydatifs qui activent NF- $\kappa$ B (sous-unité B du facteur nucléaire kappa) via Toll-likers

(Aggarwal et al., 2019).

Les antioxydants sont composés qui protègent les molécules endogènes en atténuant les blessures. De par leur structure, les flavonoïdes peuvent exercer un effet antioxydant en agissant comme agents réducteurs dans plusieurs réactions. Les mécanismes sous-jacents des flavonoïdes comprennent le piégeage des ROS, inhiber les oxydases responsables de la production de l'anion superoxyde, chélatant les métaux traces et activant les enzymes antioxydantes (Slika et al., 2022).

Pour évaluer l'effet de l'extrait de fruit de *Pistacia lentiscus* L. et son action sur le stress oxydant nous avons évalué le taux de MDA et de glutathion.

L'extrait de fruit de *Pistacia lentiscus* L. exerce un effet antioxydant, il augmente la réserve en GSH du double et diminue la peroxydation lipidique. Cette activité antioxydante probablement due à la richesse de cet extrait en composés phénoliques (Bhatti et al., 2015). Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antiradicalaire la plus élevée (Wang et al., 2016) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes d'hydrogènes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de Pinedo et al., 2007).

Cette activité anti radicalaire de l'extrait aqueux réduit le taux des radicaux libres responsables à l'angiogénèse. Plusieurs études ont démontré que les antioxydants pouvaient réduire ou inhiber l'angiogénèse à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces composés comprennent des substances naturelles (catéchines, resvératrol, polyphénols, flavonoïdes, glutathion) et des plantes médicinales (Jung et al., 2013; Prauchner, 2014; Kamble and Gacche, 2019).

Nos résultats sur l'effet antiangiogénétique de l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. sont en accord avec ceux de la littérature montrant que les produits naturels, les flavonoïdes ont la capacité d'inhiber l'angiogénèse (Romani et al., 2002; Chen et Tseng, 2007 ; Xiao et al., 2011; Koosha et al., 2016).

D'après (Lirdprapamongkol et al., 2009), la vaniline une substance antioxydante inhibe l'angiogénèse *in vitro* dans un test de migration cellulaire, le Transwell et *in vivo* par le test CAM (Lirdprapamongkol et al., 2009).

# Conclusion

## Conclusion

L'angiogenèse tumorale est primordiale pour le développement de la tumeur. La thérapie antiangiogénique a démontré un bénéfice en termes de survie globale pour les patients atteints de certains cancers métastatiques.

Les résultats obtenus de la présente étude ont montré que l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L. à 10mg/ml et la quercétine à 30  $\mu$ M exercent un effet anti angiogénique en inhibant la néovascularisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon du poulet.

L'extrait de fruit de *Pistacia lentiscus* L. exerce un effet antioxydant *in vivo* en augmentant la réserve du glutathion et en diminuant la peroxydation lipidique.

Nos résultats sont préliminaires, des recherches plus approfondies sur d'autres modèles permettront d'élucider les mécanismes à l'origine de ces constatations.

Donc, il est nécessaire de compléter ce travail de recherche par des études sur les voies de signalisation notamment la voie de VEGE/VEGFR, des études *in vitro* de migration cellulaire et de l'angiogenèse.

*Références*  
*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

- Abdeldjelil, M.C., 2016. Effets cicatrisants de produits à base d'huile de lentisque (*Pistacialentiscus* L.) sur les brûlures expérimentales chez le rat.
- Ait Said, S., 2011. Strategies adaptatives de deux especes du genre pistacia (*p. lentiscus* l. et *p. atlenticadesf.*) aux conditions d'altitude, de salinite et d'aridite:[texte imprimé]: approches morpho-anatomiques, phytochimiques et ecophysiologiques. Université Mouloud Mammeri.
- Aggarwal, V., Tuli, HS, Varol, A., Thakral, F., Yerer, MB, Sak, K., ... & Sethi, G. (2019). Rôle des espèces réactives de l'oxygène dans la progression du cancer : mécanismes moléculaires et avancées récentes. *Biomolécules*, 9 (11), 735.
- Akhtar, N., Dickerson, E.B., Auerbach, R., 2002. The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* 5, 75–80.
- Amara, N., Benrima, A., Anba, C., Belkhir, H., 2019. Activité antimicrobienne de l'huileessentielle des fruits du pistachier lentisque (*pistacia lentiscus* l.) 8.
- Anonyme (2014) Mastic tree.<http://files.ginostimo.com/2000001871d7c67/mastiha%205.jpg> consulté le 21-11-2014
- Albini, A., Benelli, R., Noonan, D.M., Brigati, C., 2004. The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *International Journal of Developmental Biology* 48, 563–571.
- Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K., 2014. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* l.). *J. Fundam. Appl. Sci.* 6, 79–93.
- Atmani, Dina, Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, Djebbar, 2009. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem.* 112, 303–309.
- Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., Akhtar, N., 2003. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical chemistry* 49, 32–40.
- Auerbach, R., Muthukkaruppan, V., 2012. The chick embryo aortic arch assay, in: *The Textbook of Angiogenesis and Lymphangiogenesis: Methods and Applications*. Springer, pp. 149–157.

Azzi, S., Gavard, J., 2014. Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l'art du dialogue. *médecine/sciences* 30, 408–414.

Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., ... & Sethi, G. (2019). Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules*, 9(11), 735.

## B

Bachrouch, O., Jemâa, J.M.-B., Wissem, A.W., Talou, T., Marzouk, B., Abderraba, M., 2010. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.* 46, 242–247.

Barbouchi, M., Elamrani, K., El Idrissi, M., 2020. A comparative study on phytochemical screening, quantification of phenolic contents and antioxidant properties of different solvent extracts from various parts of *Pistacia lentiscus* L. *J. King Saud Univ.-Sci.* 32, 302–306.

Bazzazi, H., Isenberg, J. S., & Popel, A. S. (2017). Inhibition of VEGFR2 activation and its downstream signaling to ERK1/2 and calcium by Thrombospondin-1 (TSP1): In silico investigation. *Frontiers in physiology*, 8, 48

Belfadel, F.Z., Boulebda, N., 2009. Huile de fruits de *Pistacia lentiscus*. Caractéristiques physico-chimiques et effets biologiques (Effet cicatrisant chez le rat).

Bennouna, J., Hiret, S., Bertaut, A., Bouché, O., Deplanque, G., Borel, C., ... & Borg, C. (2019). Poursuite du bevacizumab vs cétuximab plus chimiothérapie après la première progression du cancer colorectal métastatique de type sauvage KRAS : l'essai clinique randomisé UNICANCER PRODIGE18. *JAMA oncologie*, 5 (1), 83-90.

Bentley, K., Franco, C.A., Philippides, A., Blanco, R., Dierkes, M., Gebala, V., Stanchi, F., Jones, M., Aspalter, I.M., Cagna, G., 2014. The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis. *Nature cell biology* 16, 309–321.

Boulanger, H., Lefèvre, G., Ahriz Saksi, S., Achiche, J., Bailleul, S., Ekoukou, D., Drouin, D., Sault, C., Stawiarski, N., Dupuis, E., 2019. Intérêts potentiels des facteurs angiogéniques placentaires comme biomarqueurs dans la pré-éclampsie pour le clinicien. *Néphrologie & Thérapeutique* 15, 413–429. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2018.10.005>

Boutemine, I.-M., Amri, M., Amir, Z.-C., Fitting, C., Mecherara-Idjeri, S., Layaida, K., Sennoun, N., Berkane, S., Cavaillon, J.-M., Touil-Boukoffa, C., 2018. Gastro-protective, therapeutic and anti-inflammatory activities of *Pistacia lentiscus* L. fatty oil against ethanol-induced gastric ulcers in rats. *J. Ethnopharmacol.* 224, 273–282.

Brewer, T.F.; Garcia, F.J.; Onak, C.S.; Carroll, K.S.; Chang, C.J. Chemical approaches to discovery and study of sources and targets of hydrogen peroxide redox signaling through NADPH oxidase proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 2015, 84, 765–790. [CrossRef] [PubMed].

Baudin, B. (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020(522), 22-30.

## C

Chabannes, E., Bernardini, S., Wallerand, H., Bittard, H., 2001. L'angiogenèse dans les tumeurs vésicales: indicateur pronostique et cible thérapeutique. *Progrès en Urologie* 11.

Chen, Y., Tseng, S.-H., 2007. Pro-and anti-angiogenesis effects of resveratrol. *in vivo* 21, 365–370.

Cheraft, N., 2011. Activité biologique in vitro des extraits de Pist. *Lentiscus*.

Coso, S.; Harrison, I.; Harrison, C.B.; Vinh, A.; Sobey, C.G.; Drummond, G.R.; Williams, E.D.; Selemidis, S. NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: Current and emerging concepts. *Antioxid. Redox Signal.* 2012, 16, 1229–1247. [CrossRef] [PubMed]

## D

Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K., 2014. Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* 61, 31–40.

de Montigny, J., Iosif, A., Breitwieser, L., Manca, M., Bauer, R. et Vavourakis, V. (2021). Une procédure hybride in silico basée sur le continuum/agent pour modéliser le développement du cancer : interroger l'interaction entre l'invasion du gliome, la vascularisation et la nécrose. *Méthodes*, 185, 94-104.

Djedaia, M.S., 2017. Etude physico-chimique et caractérisation du fruit de la plante lentisque (*Pistacia Lentiscus* L.). Univ. BADJI MOKHTAR-ANNABA.

- Drouot, G., 2018. Recherche de partenaires potentiels de la protéine Damaged-DNA Binding 2 dans la régulation de l'expression génique: le cas des heterogeneous ribonucleoprotein K et J dans la régulation du gène NFKBIA. Université de Lorraine.
- Dumond, A., Demange, L., & Pagès, G. (2020). Les neuropilines-Des cibles pertinentes pour améliorer le traitement des cancers. *médecine/sciences*, 36(5), 487-496.
- Dünker, N., & Jendrossek, V. (2019). Mise en œuvre du modèle Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) dans la radiobiologie et la recherche expérimentale en radio-oncologie. *Cancers*, 11 (10), 1499.
- Dewhirst, M.W.; Cao, Y.; Moeller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 425–437. [CrossRef]

## E

- Ellman G L. Plasma antioxidants. *Arch. (1959) Biochemistry and Biophysics*. 82:70-77.
- Edeas M, Attaf D, Mailfert A-S, Nasu (3)M, Joubet R. Maillard. Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathol Biol*. 2010 Jun;58(3):220–5.

## F

- Folkman, Judah, 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 82, 4–7.
- Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england journal of medicine* 285, 1182–1186.
- Fukuhara, S., Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H.Z., Kodama, T., Shibuya, M., Takakura, N., Koh, G.Y., Mochizuki, N., 2008. Differential function of Tie2 at cell–cell contacts and cell–substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nature cell biology* 10, 513–526.
- Fontaine, M. (2017). Etude de la communication entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires via le transfert de microARN.

## G

- Garcia, J., Hurwitz, HI, Sandler, AB, Miles, D., Coleman, RL, Deurloo, R. et Chinot, OL (2020). Bevacizumab (Avastin®) dans le traitement du cancer : bilan de 15 ans d'expérience clinique et perspectives d'avenir. *Examens du traitement du cancer*, 86, 102017

Gavard, J., Patel, V., Gutkind, J.S., 2008. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Developmental cell* 14, 25–36.

Geiger, T.R., Peeper, D.S., 2009. Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1796, 293–308.

Greer, S.N., Metcalf, J.L., Wang, Y., Ohh, M., 2012. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *The EMBO journal* 31, 2448–2460.

## H

Harrat, M., Benalia, M., Gourine, N., Yousfi, M., 2018. Variability of the chemical compositions of fatty acids, tocopherols and lipids antioxidant activities, obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus* L. growing in Algeria. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 11, 199–215.

Harris, J.J., 1958. The human tumor grown in the egg. *Annals of the New York Academy of Sciences* 76, 764–774.

Hacini, N., Djelloul, R. (2017). Study of the Antibacterial and Antifungal Activities of Oils of *Pistacia lentiscus* l. *International Journal of Applied Environmental Sciences*, 12(1), 133-143.

Han, X.; Sun, S.; Zhao, M.; Cheng, X.; Chen, G.; Lin, S.; Guan, Y.; Yu, X. Celastrol stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor cells by initiating the ROS/Akt/p70S6K signaling pathway and enhancing hypoxia-inducible factor-1alpha protein synthesis. *PLoS One* 2014, 9. [CrossRef].

Hasmim, M., Messai, Y., Noman, M. Z., & Chouaib, S. (2014). L'hypoxie tumorale-Un déterminant clé de la réactivité stromale et de la réponse antitumorale. *médecine/sciences*, 30(4), 422-428.

## I

Iqbal, M., Sharma, S.D., Okazaki, Y., Fujisawa, M., Okada, S., 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 33–38.

## J

Jain, R.K., Martin, J.D., Stylianopoulos, T., 2014. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annual review of biomedical engineering* 16, 321.

- Jiang, S., Yang, Y., Fang, M., Li, X., Yuan, X. et Yuan, J. (2016). Co-évolution des macrophages associés aux tumeurs et des néo-vaisseaux tumoraux lors de l'invasion du cancer du col de l'utérus. *Lettres d'oncologie* , 12 (4), 2625-2631.
- Jain, T., Nikolopoulou, EA, Xu, Q., & Qu, A. (2018). Facteur inductible par l'hypoxie comme cible thérapeutique de l'athérosclérose. *Pharmacologie & thérapeutique* , 183 , 22-33.
- (de Sá Junior et al., 2017)63. de Sa Junior, P.L.; Camara, D.A.D.; Porcacchia, A.S.; Fonseca, P.M.M.; Jorge, S.D.; Araldi, R.P.; Ferreira, A.K. The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. [CrossRef] [PubMed]
- Jing, Y.; Liu, L.Z.; Jiang, Y.; Zhu, Y.; Guo, N.L.; Barnett, J.; Rojanasakul, Y.; Agani, F.; Jiang, B.H. Cadmium increases HIF-1 and VEGF expression through ROS, ERK, and AKT signaling pathways and induces malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 2012, 125, 10–19. [CrossRef] [PubMed]

## K

- Kabiraj, A., Jaiswal, R., Singh, Anil, Gupta, J., Singh, Arun, Samadi, F.M., 2018. Immunohistochemical evaluation of tumor angiogenesis and the role of mast cells in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 14, 495.
- Kerbel, R., Folkman, J., 2002. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2, 727–739.
- Kessbia A . ,Messaoudi A ., 2017 .Etudes ethnobotanique, screening phytochimique et évaluation du pouvoir antimicrobien des polyphenols des grains de lentisque *Pistacia lentiscus* L. Mémoire Master en biologie. Université, Faculté des sciences de la nature et de la vie,université de boumerdes, 42 p.
- Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N., 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841–844.
- Koosha, S., Alshawsh, M.A., Looi, C.Y., Seyedan, A., Mohamed, Z., 2016. An association map on the effect of flavonoids on the signaling pathways in colorectal cancer. *International journal of medical sciences* 13, 374.
- Karar, J.; Maity, A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 2011, 4. [CrossRef].
- Khromova, N.V.; Kopnin, P.B.; Stepanova, E.V.; Agapova, L.S.; Kopnin, B.P. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett.* 2009, 276, 143–151. [CrossRef]

## L

- Li, M., Pathak, R.R., Lopez-Rivera, E., Friedman, S.L., Aguirre-Ghiso, J.A., Sikora, A.G., 2015. The in ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an efficient xenograft model of hepatocellular carcinoma. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e52411.
- Lemaire, J., Larrue, R., Perrais, M., Cauffiez, C., & Pottier, N. (2020). Aspects fondamentaux du développement tumoral. *Bulletin du Cancer*, 107(11), 1148-1160.
- Liu, Y.; Cui, Y.; Shi, M.; Zhang, Q.; Wang, Q.; Chen, X. Deferoxamine promotes MDA-MB-231 cell migration and invasion through increased ROS-dependent HIF-1 $\alpha$  accumulation. *Cell. Physiol. Biochem.* 2014, 33,1036–1046. [CrossRef].
- Liu, L.Z.; Hu, X.W.; Xia, C.; He, J.; Zhou, Q.; Shi, X.; Fang, J.; Jiang, B.H. Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 41, 1521–1533. [CrossRef] [PubMed]

## M

- MAAMERI, H.Z. (2014) . thèse de doctorat : Pistacia lentiscus L.: Evaluation pharmacotoxicologique . *Pharmacologie Toxicologie* , 4-5.
- Mease, P.J., 2002. Tumour necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: pathophysiology and treatment with TNF inhibitors. *Ann. Rheum. Dis.* 61, 298–304.
- Mezni, F., Khaldi, A., Maaroufi, A., Hamrouni, L., Msallem, M., Boussaid, M., Khouja, M.L., 2012. Composition en acide gras et propriétés biologiques de l'huile fixe des fruits de pistacia lentiscus l., in: *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM 2012* 997. pp. 219–224.
- Milia, E., Bullitta, S.M., Mastandrea, G., Szotáková, B., Schoubben, A., Langhansová, L., Quartu, M., Bortone, A., Eick, S., 2021. Leaves and fruits preparations of Pistacia lentiscus L.: A review on the ethnopharmacological uses and implications in inflammation and infection. *Antibiotics* 10, 425.
- Mohamed, K., Zine, K., Fahima, K., Abdelfattah, E., Sharifudin, S.M., Duduku, K., 2018. NiO nanoparticles induce cytotoxicity mediated through ROS generation and impairing the antioxidant defense in the human lung epithelial cells (A549): Preventive effect of Pistacia lentiscus essential oil. *Toxicol. Rep.* 5, 480–488.

Matsuda, S.; Nakagawa, Y.; Kitagishi, Y.; Nakanishi, A.; Murai, T. Reactive Oxygen Species, Superoxide Dimutases, and PTEN-p53-AKT-MDM2 Signaling Loop Network in Mesenchymal Stem/Stromal Cells Regulation. *Cells* 2018, 7, 36. [CrossRef]

## N

Nashimoto, Y., Okada, R., Hanada, S., Arima, Y., Nishiyama, K., Miura, T. et Yokokawa, R. (2020). Cancer vascularisé sur puce : L'effet de la perfusion sur la croissance et l'administration de médicaments du sphéroïde tumoral. *Biomatériaux* , 229 , 119547

Ndiaye, P. D., & Pagès, G. (2019). VEGF-C et vaisseaux lymphatiques-Une épée à double tranchant dans le développement tumoral et la dissémination métastatique. *médecine/sciences*, 35(2), 132-137

Nijhawans, P., Behl, T. et Bhardwaj, S. (2020). Angiogenèse dans l'obésité. *Biomédecine & Pharmacothérapie* , 126 , 110103.

## O

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.

## P

Pottier, C., Fresnais, M., Gilon, M., Jérusalem, G., Longuespée, R., & Sounni, NE (2020). Inhibiteurs de la tyrosine kinase dans le cancer : percée et défis de la thérapie ciblée. *Cancers* , 12 (3), 731.

Poupard, N., 2017. Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparanase pour le traitement de l'angiogénèse tumorale. Université de La Rochelle.

Pratheeshkumar, P., Budhraj, A., Son, Y.-O., Wang, X., Zhang, Z., Ding, S., Wang, L., Hitron, A., Lee, J.-C., Xu, M., Chen, G., Luo, J., Shi, X., 2012. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR-2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. *PLoS One* 7, e47516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047516>

## Q

Quézel, P., Santa, S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

## R

- Rak, J., Joanne, L.Y., Klement, G., Kerbel, R.S., 2000. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth, in: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Elsevier, pp. 24–33.
- Reille-Seroussi, M., 2014. Système VEGF/VEGFR: conception et évaluation de molécules ciblées et régulation potentielle par les métaux. Université René Descartes-Paris V.
- Ribatti, D., 2008. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *International review of cell and molecular biology* 270, 181–224.
- Ribatti, D., 2010. *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis: The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis*. Springer Science & Business Media
- Ribatti, D., 2014. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res* 328, 314–324. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.06.010>
- Ribatti, D., 2017. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive toxicology* 70, 97–101.
- Ricard, N., Simons, M., 2015. When it is better to regress: dynamics of vascular pruning. *PLoS biology* 13, e1002148.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M., 2002. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* 13, 79–86.
- Roswall, P., Bocci, M., Bartoschek, M., Li, H., Kristiansen, G., Jansson, S., ... & Pietras, K. (2018). Microenvironmental control of breast cancer subtype elicited through paracrine platelet-derived growth factor-CC signaling. *Nature medicine*, 24(4), 463-473.
- Rezatabar, S.; Karimian, A.; Rameshknia, V.; Parsian, H.; Majidinia, M.; Kopi, T.A.; Bishayee, A.; Sadeghinia, A.; Yousefi, M.; Monirialamdari, M.; et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J. Cell. Physiol.* **2019**. [CrossRef]

## S

- Sankar, P.R., Sailu, A.B., Eswarudu, M.M., Satya, M.N., Sreeja, P., Roja, P., Rijwana, S., 2021. Analytical Methods For Determination Of Different Members Of FDA approved Tyrosine Kinase Inhibitors Like Dasatinib, Lapatinib, Imatinib, Sorafenib,

- Nintedanib, Sunitinib And Pazopanib: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 13, 313–318.
- Seifaddinipour, M., Farghadani, R., Namvar, F., Mohamad, J., Abdul Kadir, H., 2018. Cytotoxic Effects and Anti-Angiogenesis Potential of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hulls against MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Molecules* 23, 110. <https://doi.org/10.3390/molecules23010110>
- Semenza, G.L., 2016. Targeting hypoxia-inducible factor 1 to stimulate tissue vascularization. *Journal of investigative medicine* 64, 361–363.
- Slika, H., Mansour, H., Wehbe, N., Nasser, SA, Iratni, R., Nasrallah, G., ... & Eid, AH (2022). Potentiel thérapeutique des flavonoïdes dans le cancer : mécanismes médiés par les ROS. *Biomédecine & Pharmacothérapie* , 146 , 112442.
- Soulaidopoulos, S., Tsiogka, A., Chrysohoou, C., Lazarou, E., Aznaouridis, K., Doundoulakis, I., Tyrovola, D., Tousoulis, D., Tsioufis, K., Vlachopoulos, C., 2022. Overview of Chios Mastic Gum (*Pistacia lentiscus*) Effects on Human Health. *Nutrients* 14, 590.
- Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Lampri, E., Fitsiou, E., Vasileiadis, S., Vamvakias, M., ... & Chlichlia, K. (2017). Dietary mastic oil extracted from *Pistacia lentiscus* var. *chia* suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě de Angelis, M. et Häring, HU (2017). Facteur de croissance des fibroblastes 21 - rôle métabolique chez la souris et l'homme. *Revue endocrinienne* , 38 (5), 468-488.
- Staton, C.A., Reed, M.W., Brown, N.J., 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International journal of experimental pathology* 90, 195–221.
- Stoutah, F., 2016. Etude de la variabilité morpho-anatomique et des teneurs en pigments photosynthétiques de quelques populations de *Pistacia lentiscus* L. en Algérie. Université Mouloud Mammeri.
- Sun, Q., Heilmann, J., König, B., 2015. Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic properties – a review from the chemical point of view. *Beilstein J. Org. Chem.* 11, 249–264. <https://doi.org/10.3762/bjoc.11.28>
- Szekanecz, Z., Besenyei, T., Paragh, G., & Koch, A. E. (2010). Actualités sur l'angiogenèse synoviale. *Revue du rhumatisme*, 77(1), 14-20.
- (Schito, 2019) 64. Schito, L. Hypoxia-Dependent Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019,1136, 71–85. [PubMed].

Shiota M, Yokomizo A, Naito S. Chapter 2 - Oxidative Stress and Prostate Cancer. In: Preedy V, editor. Cancer [Internet]. San Diego: Academic Press; 2014 [cited 2014 Jul 14]. p. 15–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124052055000027>.

## T

Tahergorabi, Z., Khazaei, M., 2012. A review on angiogenesis and its assays. Iranian journal of basic medical sciences 15, 1110.

Taïlé, J. (2021). Étude des altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique associée au diabète: rôle protecteur des polyphénols de plantes médicinales (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).

Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomäki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Waltari, M., Hellström, M., Schomber, T., Peltonen, R., 2008. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 454, 656–660.

Treps, L., Gavard, J., 2015a. L'angiogenèse tumorale-Quand l'arbre de vie tourne mal. *médecine/sciences* 31, 989–995.

Treps, L., Gavard, J., 2015b. L'angiogenèse tumorale: Quand l'arbre de vie tourne mal. *Med Sci (Paris)* 31, 989–995. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111013>

## U

Ushio-Fukai, M.; Nakamura, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2008, 266, 37–52. [CrossRef] [PubMed]

## W

Wacker, A., Gerhardt, H., 2011. Endothelial development taking shape. *Current opinion in cell biology* 23, 676–685.

Wang, D., 2018. Étude de médicaments botaniques de la médecine traditionnelle chinoise pour la croissance des cellules endothéliales et l'angiogenèse.

Wang, D., Jiang, Y., Yang, X., Wei, Q., & Wang, H. (2018). 6-Shogaol reduces progression of experimental endometriosis in vivo and in vitro via regulation of VEGF and inhibition of COX-2 and PGE2-mediated inflammatory responses. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 22(6), 627-636.

## X

Xiao, X., Shi, D., Liu, L., Wang, J., Xie, X., Kang, T., Deng, W., 2011. Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PLoS one* 6, e22934.

## Y

Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., & Sharma, V. (2015). Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: a review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(6), XE01.

Yıldırım, H., Onay, A., Gündüz, K., Ercişli, S., Karaat, F.E., 2019. An improved micropropagation protocol for lentisk (*Pistacia lentiscus* L.).

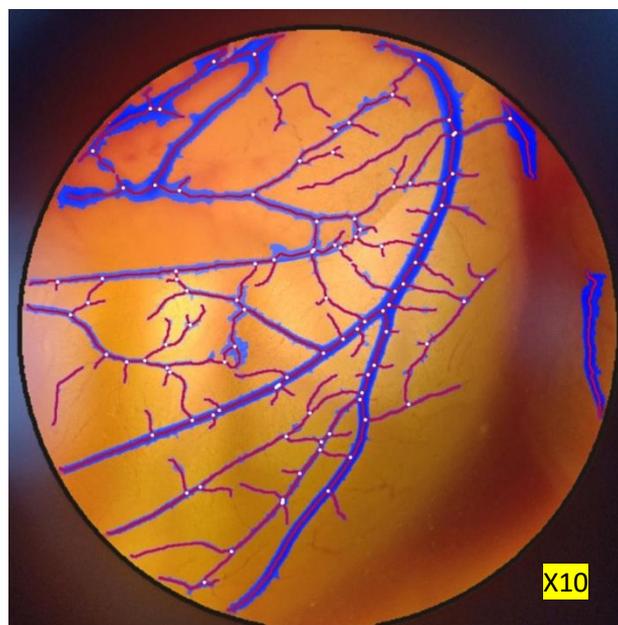
## Z

Zaouali, Y., BelHadj, Y.I. , Jaouadi, R., Messaoud, C., Boussaid, M. (2018). Sex-related differences in essential oil composition, phenol contents and antioxidant activity of aerial parts in *Pistacia lentiscus* L. during seasons . *Industrial Crops & Products* , 121 , 151-159 .

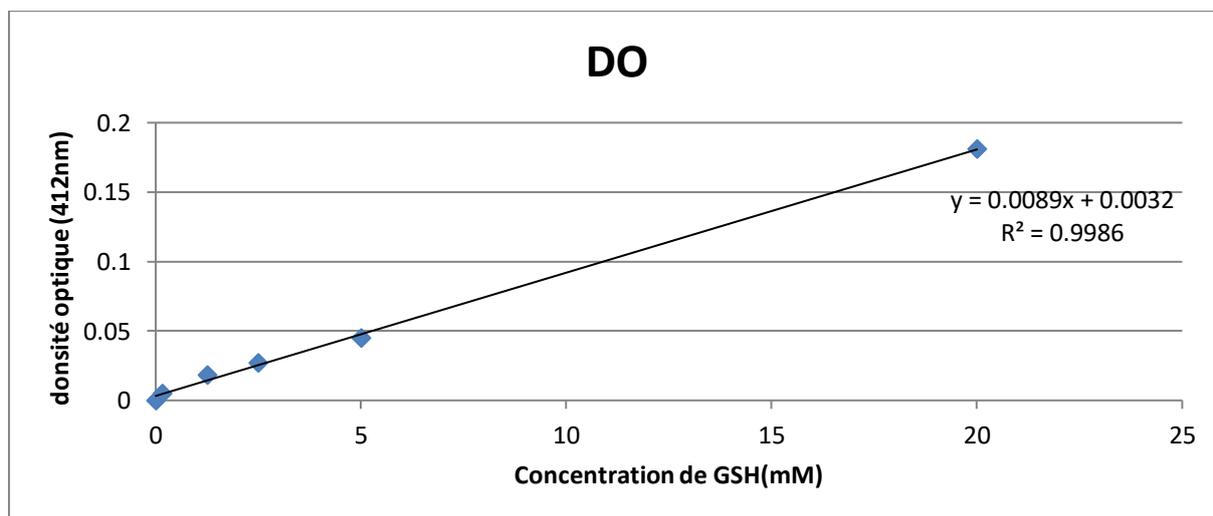
Zhou, M., Hou, J., Li, Y., Mou, S., Wang, Z., Horch, R.E., Sun, J., Yuan, Q., 2019. The pro-angiogenic role of hypoxia inducible factor stabilizer FG-4592 and its application in an in vivo tissue engineering chamber model. *Sci Rep* 9, 6035. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41924-5>

# **Annexes**

## Annexes



**Annexe1.**Le traitement de la microphotographie de la membrane chorioallantoïdienne de poulet traité par la quercétine 30µM par le logiciel WimCAM.



**Annexe2.** la courbe d'étalonnage du GSH .



## **Thème :** Etude de l'activité anti-angiogénique de l'extrait aqueux de fruits de *Pistacia lentiscus* L par le test *in ovo* de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet

### **Résumé :**

L'étude de l'angiogénèse au cours de la croissance des tumeurs constitue un secteur de recherche qui tire beaucoup l'intention des chercheurs. Cette étude explore *in ovo* l'effet inhibiteur de la quercétine et l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* vis-à-vis la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM). Les résultats obtenus de la présente étude ont montré que l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* L à 10mg/ml et la quercétine à 30  $\mu$ M exercent un effet anti angiogénique en inhibant la néovascularisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon du poulet. La quercétine à 30 $\mu$ M inhibe la vascularisation de la CAM avec un pourcentage d'inhibition 53 % de par rapport au témoin. L'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus*, à une dose 10mg/ml diminue la vascularisation de la CAM à un pourcentage de 38,5 % par rapport au témoin. L'extrait de fruit de *Pistacia lentiscus* exerce un effet antioxydant *in vivo* en augmentant la réserve du glutathion et en diminuant la peroxydation lipidique. La quercétine et l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* mérite une exploration approfondie de son potentiel angiogénique dans le cadre d'une approche thérapeutique

**Mots clé :** Angiogénèse, CAM, Quercétine, *Pistacia lentiscus*.

### **Abstract:**

The study of angiogenesis during tumor growth is a research that takes much attention of researchers. This study explores *in ovo*, the inhibitory effect of quercetin and the aqueous extract of *Pistacia lentiscus* on the vascularization of the chorioallantoid membrane (CAM). The results obtained from the present study showed that the aqueous extract of *Pistacia lentiscus* L fruit at 10mg/ml and quercetin at 30  $\mu$ M exert an anti-angiogenic effect by inhibiting the neovascularization of the chorioallantoid membrane (CAM). Quercetin at 30  $\mu$ M inhibits the vascularization of the CAM with 53% of inhibition percentage compared to the control. The aqueous extract of *Pistacia lentiscus*, at 10mg/ml, decreases the vascularization of the CAM to 38.5% compared to the control. The aqueous extract of *Pistacia lentiscus* exerts an antioxidant effect *in vivo* by increasing glutathione storage and decreasing lipid peroxidation. Quercetin and the aqueous extract of *Pistacia lentiscus* deserves more exploration of its angiogenic potential as part of a therapeutic approach.

**Key words:** Angiogenesis, CAM, Quercetin, *Pistacia lentiscus*.

### **ملخص :**

تعتبر دراسة تولد الأوعية أثناء نمو الورم السرطاني إحدى المجالات البحثية التي تلفت انتباه الباحثين. فمن خلال هذا البحث، بدراسة التأثير التثبيطي للمستخلص النباتي المائي من *Pistacia lentiscus* والكيرسيتين على الأوعية الدموية في الغشاء المشيمي للبيض (CAM). أظهرت النتائج أن الكيرسيتين بتركيز 30 ميكرومول قلل من تكوين الأوعية الدموية في الغشاء المشيمي للبيض بنسبة 53% و38.5% بالنسبة للمستخلص النباتي المائي من *Pistacia lentiscus* بتركيز 10 ملغ/مل. أيضا أظهرت الدراسة أن المستخلص النباتي المائي من *Pistacia lentiscus* قام بتحفيز مضادات الأكسدة وذلك من خلال زيادة مخزون الجلوتاثيون وخفض أكسدة الدهون على مستوى الخلية. يمكن أن يرشح الكيرسيتين والمستخلص النباتي المائي من *Pistacia lentiscus* لدراسات معمقة قصد استعماله كعلاج مضاد لتخليق الأوعية الدموية لدى مرضى السرطان.

**الكلمات المفتاحية:** تولد الأوعية، CAM، الكيرسيتين، *Pistacia lentiscus*.