الجمهوريـــة الجزائريـــة الديمقراطيـــة الشعبيـــة
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليـم العالـــي والبحـث العلمـــي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعـة باجـي مختـــار-عنابـــة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
Spécialité : Immunologie

Effets préventifs de différentes substances ''Graviola, Dichloroacétate et immunostimulants'' en application seules ou combinées sur une cancérogénèse chimique expérimentale de la peau

Présentée par : Mr ABDELLAOUI Mohammed

Directrice de thèse : Mme KADI Assia — **MCA., Université de Annaba**

Membres de Jury:

Présidente :	**MmeBOUMENDJEL Amel**	**Prof., Université Badji Mokhtar - Annaba**
Examinatrices :	**Mme ALEM Karima**	**MCA., Université Badji Mokhtar - Annaba**
	Mlle LAYACHI Naima	**MCA, Université Mohamed-Cherif Messaadia - Souk Ahras**
Invitée :	**Mme KHERFI Hind**	**Médecin anatomopathologite, EPH Azzaba- Skikda**

N° DBCH...../2024 — **Année universitaire : 2023/2024**

Remerciements

Un Grand remerciement d'abord pour « **Allah »**, notre Dieu tout-puissant, de m'avoir permis d'atteindre le stade où je suis aujourd'hui.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Madame **Assia KADI**, Maitre de conférences A à l'université d'Annaba, ma directrice de thèse, pour son précieux soutien et ses conseils éclairés tout au long de ce parcours académique. Son expertise, sa disponibilité et ses orientations ont été des atouts essentiels dans la réussite de ce projet de recherche. Je souhaite également lui témoigner ma reconnaissance de m'avoir donné une liberté dans la prise de décisions scientifiques et de les avoir orientées, chose qui m'a permis de faire évoluer mon esprit critique et scientifique.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers Monsieur le professeur **Mahfoud MESSARAH**, pour son soutien indéfectible, Je suis profondément reconnaissant pour l'opportunité qu'il m'a offert et de la chance que j'ai eu de travailler sous sa direction.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers Madame la Professeur **Amel BOUMENDJEL**, pour ses conseils avisés et ses suggestions précieuses et son encouragement tout au long de mon parcours académique.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail : Mme **Amel BOUMENDJEL,** Professeur à l'université d'Annaba Mme **Karima ALEM** Maitre de conférences A à l'université d'Annaba, Mme **Naima LAYACHI,** Maitre de conférences A à l'université Cherif MESSAADIA , Souk Ahras, et Mme. **Hind KHERFI,** médecin anatomopathologiste à EPH Mohamed Denden , Azzaba, Skikda.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude au Dr. **Yacine KADI** et au Dr. **Hind KHERFI**, médecins anatomopathologiste, pour leur précieuse contribution à l'interprétation des coupes histologiques de mon travail. Leur expertise et leurs conseils avisés ont été d'une grande aide et ont grandement enrichi la qualité de cette recherche. Merci infiniment pour votre temps, votre dévouement et votre soutien inestimable.

Je tiens à exprimer ma gratitude la plus profonde à l'âme de **mon père**, sa mémoire m'a accompagné à chaque étape de cette recherche, et je lui dédie ce travail avec amour et

respect. De même, je souhaite exprimer ma profonde gratitude et mon amour infini à **ma mère**. Sa patience, son soutien inconditionnel et ses encouragements constants ont été des piliers essentiels tout au long de ce parcours.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé :

L'objectif principal de notre travail a été d'évaluer les effets préventifs de trois types de substances : la poudre de feuilles de l'Annona muricata (Graviola) à 120 mg/kg, le dichloroacétate (DCA) à 100 mg/kg, et un mélange d'immunostimulants d'origine fongique (Reishi, Shiitake et Maitake à 6,66 mg/kg, associés au β-glucane levurien et à l'arabinogalactane à 6,66 mg/kg) en application seule et combinée sur une carcinogenèse expérimentale de la peau induite chimiquement en deux étapes avec 100 µg de DMBA/ml d'acétone comme initiateur et l'huile de croton comme promoteur. Dans un premier temps, nous avons procédé à la mise au point du modèle animal de la cancérogénèse sur la souche locale de souris swiss albinos en variant soit la dose soit la fréquence d'application de l'initiateur. Les observations morphologiques et histologiques ont permis d'établir le modèle voulu. En deuxième étape, nous avons testé la toxicité chronique de la poudre de feuilles de Graviola ainsi que du mélange des deux immunostimulants (β-glucane et arabinogalactane) en utilisant une dose dix fois supérieure à celle utilisée en pharmacopée. Nos résultats histologiques et biochimiques ont confirmé l'innocuité des immunostimulants, tandis que les feuilles de Graviola ont montré une reprotoxicité, se traduisant par une baisse de la fertilité. Enfin, nous avons procédé à l'évaluation de l'éventuel effet préventif des substances sur la cancérogénèse expérimentale. Nos résultats ont montré une inhibition totale du développement des papillomes chez les lots traités par toutes les substances testées, qu'elles soient appliquées seules ou combinées. Les paramètres histologiques et hématologiques ont indiqué l'implication du système immunitaire dans la suppression tumorale, avec cependant une plus forte réponse inflammatoire lorsque les traitements sont combinés. Les paramètres du stress oxydant ont indiqué que la suppression tumorale serait probablement due à une augmentation de l'état de stress causé par un cumul de peroxyde d'hydrogène. Notre expérience représente un criblage pour estimer les substances ayant un effet antitumoral et constitue une étape initiale pour tester et sélectionner d'autres substances. Nos modèles pourront servir à l'avenir comme plateforme pour étudier des substances à action prophylactique contre le cancer de la peau.

Mots clés : Cancer de la peau, DMBA/Huile de croton, Immunostimulants, Annuna muricata, Dichloroacétate, Souris Swiss Albinos.

Abstract:

The primary objective of our work was to assess the preventive effects of three types of substances: Annona muricata (Graviola) leaf powder at 120 mg/kg, dichloroacetate (DCA) at 100 mg/kg, and a mixture of fungal-origin immunostimulants (Reishi, Shiitake, and Maitake at 6.66 mg/kg, combined with yeast β-glucan and arabinogalactan at 6.66 mg/kg) applied alone and in combination on a chemically induced experimental skin carcinogenesis model using 100 µg of DMBA/ml of acetone as an initiator and croton oil as a promoter. Initially, we developed the animal model for carcinogenesis in the local strain of Swiss albino mice by varying either the dose or the frequency of the initiator application. Morphological and histological observations established the desired model. In the second phase, we tested the chronic toxicity of the Graviola leaf powder and the mixture of the two immunostimulants (β- glucan and arabinogalactan) using a dose ten times higher than that used in pharmacopoeia. Our histological and biochemical results confirmed the safety of the immunostimulants, whereas Graviola leaves showed reproductive toxicity, resulting in decreased fertility. Finally, we evaluated the potential preventive effect of the substances on experimental carcinogenesis. Our results showed a complete inhibition of papilloma development in groups treated with all tested substances, whether applied alone or combined. Histological and hematological parameters indicated the involvement of the immune system in tumor suppression, although there was a stronger inflammatory response when treatments were combined. Oxidative stress parameters suggested that tumor suppression was likely due to an increased state of stress caused by a buildup of hydrogen peroxide. Our experiment serves as a screening tool to estimate substances with antitumor effects and constitutes an initial step for testing and selecting other substances. Our models may serve in the future as a platform to study substances with prophylactic action against skin cancer.

Keywords: Skin cancer, DMBA/Croton oil, Immunostimulants, Annona muricata, Dichloroacetate, Swiss Albino Mice.

ملخص

الهدف الرئيسي من عملنا هو تقييم التأثيرات الوقائية لثلاثة أنواع من المواد: المستخلص المائي لأوراق الجرافيولا بجرعة 100 ملغ/كغ، ومزيج من (DCA) بجرعة 120 ملغ/كغ، والديكلوروأسيتات (*Annona muricata*) المحفزات المناعية ذات الأصل الفطري (ريشي، شيتاكي، ومايتاكي بجرعة 6.66 ملغ/كغ، مضافًا إليها البيتا-غلوكان والأرابينوغالاكتان المستخلصين من الخميرة بجرعة 6.66 ملغ/كغ)، سواء عند استخدامها بشكل فردي أو مشترك، مل /DMBA على السرطنة الكيميائية ذات المرحلتين (البدء والتعزيز) في جلد الفئران باستخدام 100 ميكروغرام من .من الأسيتون

في البداية، لتحديد الجرعة المناسبة من المادة المسرطنة لاختبار المواد قيد الدراسة، كان من الضروري تطوير نموذج تجريبي مناسب لسلالة الفئران المحلية لدينا. لهذا الغرض، تم اختبار جرعتين من المادة المسرطنة (100 ميكروغرام/مل و200 ميكروغرام/مل من الأسيتون) مع ترددين مختلفين للتطبيق (3 و4 تطبيقات لجرعة 100 ميكروغرام/مل من الأسيتون). سمحت لنا الملاحظات المورفولوجية والنسيجية بفهم تأثير الجرعة وتكرار التطبيق .على سرطنة الجلد

بمجرد تطوير نموذج حيواني للسرطنة، قمنا باختبار السمية المزمنة لبعض المواد باستخدام جرعات أعلى بعشر مرات من الجرعات المستخدمة في الصيدلة، وخاصة لأوراق الجرافيولا ومحفزَي المناعة (بيتا-غلوكان وأرابينوغالاكتان). سمية تناسلية تمثلت في انخفاض *Annona muricata* أكدت نتائجنا سلامة المحفزات المناعية، بينما أظهرت أوراق .الخصوبة. تم تأكيد هذه النتائج من خلال الشرائح النسيجية ونتائج الإجهاد التأكسدي والتحاليل البيوكيميائية

بعد هاتين الخطوتين، انتقلنا إلى تقييم المواد على السرطنة التجريبية. أظهرت نتائجنا تثبيطًا تامًا للورم الحليم في المجموعات التي عولجت بجميع المواد المختبرة، سواء بشكل فردي أو مشترك. أشارت المعايير الدموية إلى احتمال تورط الجهاز المناعي في قمع الورم في كل مجموعة من الفئران التي تم اختبارها. كانت هذه النتائج متوافقة مع الملاحظات النسيجية. بالإضافة إلى ذلك، قمنا بتقييم التأثير المضاد للأكسدة لكل مادة وكذلك للمزيج، مما قد يسهم في .تأثيرها المثبط للسرطنة

تُعد تجربتنا بمثابة فحص تمهيدي لتقدير المواد ذات التأثيرات المضادة للورم أو المضادة للسرطان، وتمثل خطوة أولى لاختبار واختيار مواد أخرى. يمكن أن تُستخدم نماذجنا مستقبلاً كمرجع لتحديد المواد ذات التأثير الوقائي ضد سرطان .الجلد

الكلمات المفتاحية : سرطان الجلد، /DMBA زيت الكروتون، المحفزات المناعية، *Annona muricata*, ديكلوروأسيتات، فئران سويسرية ألبينو

TABLE DES MATIÈRES

Introduction **1**

Chapitre 1 : la peau et le cancer cutané **3**

1 Structure anatomique 3

1.1 L'épiderme 4

1.2 Le derme 6

1.3 L'hypoderme 7

2 Fonction de la peau 7

2.1 Fonction protectrice 7

2.2 Régulation thermique 8

2.3 Fonction sensitive 8

3 Le cancer de la peau 8

3.1 Facteurs de risque 9

3.2 Epidémiologie 9

3.3 Différents types de cancers de la peau 10

3.3.1 Les carcinomes 10

3.3.1.1 Le carcinome basocellulaire (CBC) 10

3.3.1.2 Le carcinome spinocellulaire (épidermoide) (CSC) 10

3.3.2 Les mélanomes 11

3.3.3 Les Sarcomes 11

4 Cancérogenèse chimique de la peau 12

4.1 Identification 12

4.2 Etapes de la cancérogénèse cutanée chimiquement induit 12

4.2.1 L'initiation 13

4.2.2 La promotion 13

4.2.3 La progression 14

4.3 Les inhibiteurs de la cancérogénèse 14

4.4 Le Le 7,12 Diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) et Ses Composés Précurseurs 16

4.4.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) 16

4.4.2 Les Benzanthracènes 16

4.4.3 Le 7,12 Diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) 17

4.5 Cancérogenèse chimique de la peau induite par le DMBA 18

4.5.1 L'initiation par le DMBA 18

4.5.2 L'huile de croton, le promoteur 20
4.6 Les limites de la cancérogénèse chimiques par le DMBA/huile de croton 21
5 Le dépistage des cancers cutanés par biopsie 22
6 Le métabolisme de la cellule cancéreuse 22
6.1 Effet Warburg 22
Chapitre 2 : le stress oxydatif 24
1 Définition du stress oxydatif 24
2 Implication du stress oxydant dans le cancer 25
3 Implication de la protéine p53 26
4 Le stress oxydatif et le cancer de la peau 27
4.1 Dans la Phase d'initiation 29
4.2 Dans la Phase de promotion 29
4.3 Dans la Phase de progression 29
5 Stratégies antioxydantes dans le cancer 29
6 Les nouvelles approches utilisées dans le traitement du cancer 30
6.1 L'immunothérapie 30
6.2 La thérapie cellulaire adoptive 30
6.3 Les nanoparticules 31
6.4 Les thérapies Combinées 31
7 Approches thérapeutiques traditionnelles 31
7.1 Chimiothérapie 31
7.2 Radiothérapie 32
7.3 Immunothérapie 33
7.3.1 Fondements de l'Immunothérapie 33
7.3.2 Immunostimulants Naturels 34
Chapitre 3 : traitements préventifs expérimentaux du cancer 36
1 Le Dichloroacétate (DCA) 36
1.1 Structure 36
1.2 Mécanisme d'action 36
1.3 DCA et cancer de la peau 37
1.4 Effets secondaires et toxicité 38
2 Les Immunostimulants 38
2.1 Beta-glucanes 38
2.2 Arabinogalactane 39

2.3 Shiitake 40
2.4 Maitake 40
2.5 Reishi 41
2.6 Mécanismes d'action des β-glucanes 42
3 La Phytothérapie 44
3.1 Le Graviola (Annona Muricata) 44
3.2 Les Acétogenines (AGGs) 46
Chapitre 4 : Matériel et Méthodes 46
1 Ethique 46
2 Etapes et choix des expériences 46
3 Mise au point du modèle animal de la cancérogenèse chimique expérimentale 47
3.1 Objectif 47
3.2 Animaux, conditions d'élevage et adaptation 47
3.3 Protocole expérimental 47
3.3.1 Cancérogénèse chimique 47
3.4 Étude histologique 50
4 Etude toxicologique 51
4.1 Animaux et conditions d'élevage 51
4.2 Annona Muricata (Graviola) 51
4.3 Les Immunostimulants 52
4.4 Composition des lots et traitement des souris 53
4.5 Sacrifice et prélèvement 53
4.6 Dosage de quelques biomarqueurs plasmatiques biochimiques 55
4.6.1 Glucose 55
4.6.2 Triglycérides 55
4.6.3 Cholestérol 56
4.6.4 Aspartate Amino Transférase (ASAT ou TGO) 56
4.6.5 Alanine Amino Transférase (ALAT ou TGP) 57
4.7 Dosage des paramètres de stress oxydatif 58
4.7.1 Dosage des protéines totales 58
4.7.2 Activité de la Catalase (CAT) 59
4.7.3 Activité de la Glutathion Peroxydase (GPx) 60
4.7.4 Dosage du Malondialdéhyde (MDA) 60
4.7.5 Dosage du glutathion réduit (GSH) 62

4.8 Étude histologique 63
4.9 La reprotoxicité 63
5 Etude de l'effet préventif des différents traitements contre la cancérogenèse chimique de la peau en application seules ou combinées 64
5.1 Animaux et conditions d'élevage 64
5.2 Effet du Graviola sur la cancérogénèse 64
5.3 Effet du mélange d'immunostimulants sur la cancérogénèse chimique 65
5.4 Effet du dichloroacétate (DCA) sur la cancérogénèse chimique 66
5.5 La combinaison 66
5.6 Composition des lots et traitements des souris 66
5.7 Biopsie, sacrifice et prélèvement 69
5.7.1 Biopsie cutanée 69
5.7.2 Sacrifice et prélèvement 69
5.7.2.1 La numération de la formule sanguines (FNS) 70
5.7.2.2 Préparation des homogénats des organes 70
5.8 Exploration des paramètres du stress oxydant 70
5.8.1 Activité de la Superoxyde Dismutase (SOD) 70
5.8.2 Activité de la Catalase (CAT) : (cf. 4.7.2) 72
5.8.3 Activité de la Gluthation peroxydase GPx : (cf. 4.7.3) 72
5.9 Etude histologique (cf. 3.4) 72
5.10 Analyses statistiques 72
Chapitre 5 : Résultats et discussions 73
1 Mise au point du modèle animal de la cancérogenèse chimique 73
1.1 Evolution des papillomes en nombre et en volumes 73
1.2 Analyse morphologique et histologique 78
1.3 Discussion 81
1.4 Conclusion 83
2 Etude toxicologique 84
2.1 Variation du poids corporel 84
2.2 Formule de numération sanguine (FNS) 85
2.3 Paramètres biochimiques 86
2.3.1 Glycemie, cholesterol et triglycerides 86
2.3.2 Transaminases 87
2.4 Paramètres du stress oxydatifs 88

2.4.1 Catalase (CAT) ... 88
2.4.2 Glutathion peroxydase (GPx) ... 88
2.4.3 Malondialdéhyde (MDA) ... 88
2.4.4 Glutathion réduit (GSH) ... 88
2.5 La Reprotoxicité ... 91
2.5.1 Le Graviola ... 91
2.6 Les immunostimulants ... 91
2.7 Etude histologique ... 92
2.7.1 Le Graviola ... 92
2.7.2 Les immunostimulants ... 93
2.8 Discussion ... 94
2.8.1 2.7.1 Pour le Graviola ... 95
2.8.2 Pour les immunostimulants ... 103
2.9 Conclusion ... 107
3 Étude de l'effet préventif du Graviola, Dichloriacétate, immunostimulant en application seules ou combinées sur la cancérogenèse expérimentale de la peau ... 109
3.1 Etude morphologique et anatomopathologique ... 109
3.1.1 Témoin/DMBA ... 109
3.1.2 Témoin-traitement ... 111
3.1.3 DMBA/traitement ... 111
3.1.4 Discussion ... 116
3.1.5 Conclusion ... 118
3.2 Le poids corporel ... 119
3.3 La formule de numérotation sanguine (FNS) ... 120
3.3.1 Comparaison des lots DCA, IS, Grav et COMB versus témoin ... 120
3.3.2 Comparaison du lot DMBA versus témoin ... 120
3.3.3 Comparaison des lots DMBA/DCA, DMBA/IS, DMBA/Grav et DMBA/COMB versus le lot DMBA ... 120
3.3.4 Comparaison entre les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/Grav versus le lot DMBA/COMB ... 120
3.3.5 Discussion ... 121
3.4 Les paramètres du stress oxydatif ... 124
3.4.1 La catalase (CAT) ... 124
3.4.1.1 Comparaison des lots DCA, IS, Grav et COMB versus témoin ... 124

3.4.1.2 Comparaison des lots DMBA versus témoin 124
3.4.1.3 Comparaison des lots DMBA/DCA, DMBA/IS, DMBA/Grav et DMBA/COMB versus le lot DMBA 124
3.4.1.4 Comparaison entre les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/Grav versus le lot DMBA/COMB 124
3.4.2 La superoxyde dismutase (SOD) 125
3.4.2.1 Comparaison des lots DCA, IS, Grav et COMB versus témoin 125
3.4.2.2 Comparaison des lots DMBA versus témoin 126
3.4.2.3 Comparaison des lots DMBA/DCA, DMBA/IS, DMBA/Grav et DMBA/COMB versus le lot DMBA 126
3.4.2.4 Comparaison entre les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/Grav versus le lot DMBA/COMB 126
3.4.3 La GPx 127
3.4.3.1 Comparaison des lots DCA, IS, Grav et COMB versus témoin 128
3.4.3.2 Comparaison des lots DMBA versus témoin 128
3.4.3.3 Comparaison des lots DMBA/DCA, DMBA/IS, DMBA/Grav et DMBA/COMB versus le lot DMBA 128
3.4.3.4 Comparaison entre les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/Grav versus le lot DMBA/COMB 128
3.4.4 Comparaison des activités enzymatiques de la SOD, CAT et GPx 129
3.4.5 Discussion 130
3.4.6 Conclusion 133
Conclusion Générale et Perspectives 133
références bibliographiques 135
Annexes 183

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques de l'initiation et de la promotion dans la peau de la souris. 14
Tableau 2: Composés bioactifs issus de champignons présentant une activité anticancéreuse 35
Tableau 3: Composition du milieu réactionnel pour le dosage de l'activité enzymatique de la CAT. 59
Tableau 4: Composition des milieux réactionnels utilisés pour le dosage de l'activité de la SOD..... 71
Tableau 5: Le ratio V/n dans les diffèrent groups en fin d'expérimentation..... 74
Tableau 6: Variation dans les volumes totaux des papillomes au cours des semaines 77
Tableau 7: Résultats de la mise bas et pourcentage de Souriceaux. 91
Tableau 8: Variation des activités des enzymes antioxydantes 130

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Coupe transversale de la peau et du pannicule 3
Figure 2: Principales structures de l'épiderme humain en couches transversales 6
Figure 3: Photographie d'une coupe de derme prise au microscope optique 7
Figure 4: Les formes de cancers les plus fréquents chez deux sexes en Algérie en 2010 9
Figure 5: Types de cancers cutanés : A) Carcinome basocellulaire superficiel (CBC) B) Nodule important de carcinome épidermoïde (CSC) de la main C) Mélanome 11
Figure 6: Sarcome de Kaposi chez un patient atteint du SIDA 12
Figure 7: Schéma des différentes étapes de la cancérogenèse cutanée et des endroits où les inhibiteurs potentiellement utiles sont efficaces 16
Figure 8: Structure de Benzanthracène 17
Figure 9: Structure de 7,12-diméthylbenzaanthracène (DMBA) 18
Figure 10: Structures des Adduits DMBA-ADN 19
Figure 11: Croton tiglium 20
Figure 12: Structure chimique de TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) 21
Figure 13: Comparaison entre les métabolismes d'une cellule cancéreuse et celui d'une cellule saine 23
Figure 14: Production et neutralisation des ERO. SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; GR : glutathion réductase 25
Figure 15: La protéine p53 exerce des fonctions à la fois de promotion et d'inhibition des processus oxydatifs. 27
Figure 16: Dommages à l'ADN : un événement central dans le cancer de la peau. 28
Figure 17: Radiolodrmatite chronique avec une atrophie cutanée marquée et de nombreuses télangiectasies 33
Figure 18: Structure et Mécanisme d'action du DCA. **(a)** Structure chimique du DCA. **(b)** Mécanisme d'action du DCA 37
Figure 19: Structure chimique du β-glucane dans la levure Saccharomyces cerevisiae 39
Figure 20: Champignons Shiitake (Lentinula edodes) 40
Figure 21: Le champignon lingzhi (Ganoderm\a lucidum) 41
Figure 22: Structure des β-D-glucanes de Ganoderma lucidum, A, Diagramme moléculaire primaire ; B, Diagramme moléculaire de niveau supérieur 42
Figure 23: L'absorption et les actions ultérieures du β-glucane sur les cellules immunitaires 43
Figure 24: Fonction du β-glucan sur le système immunitaire inné et adaptatif 44
Figure 25: le Graviola : Plante entière **(A),** feuilles **(B),** tige **(C),** fleur **(D)** et fruit **(E)** d'A. muricata Linn 45
Figure 26: Répartition des activités pharmacologiques de A. muricata 46
Figure 27: Structure représentative des Acétogénines annonacées 47
Figure 28: Altérations des activités mitochondriales dans les cellules cancéreuses et les conséquences suite au traitement par les acetogenins 48
Figure 29: les étapes et les choix des expériences 46
Figure 30: Schéma expérimental 49
Figure 31: Emballage commercial de la poudre de feuilles de Graviola. 52
Figure 32: Emballage commercial des Immunostimulants (β-glucane/arabinogalactane) 52
Figure 33: Schéma récapitulatif de l'expérimentation. 54

Figure 34: Gamme d'étalonnage de la BSA 58
Figure 35: Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique. 61
Figure 36: Souriceaux nouveau-nés 63
Figure 37 : Feuilles séchées d'Annona muricata (Graviola) 64
Figure 38 : Le mélange de trois immunostimulants issus de champignons 65
Figure 39: Schéma de traitements des différents lots de souris. 68
Figure 40 : A) Injection intrapéritonéale de l'anesthésie. B) Biopsie cutanée. 69
Figure 41: Schéma récapitulatif des interactions dans le milieu réactionnel pour mesure de l'activitéde la SOD 71
Figure 42 : Moyenne du ratio V/n entre la 9ème et la 14ème semaine de promotion. 74
Figure 43 : (A) Le nombre de souris qui ont développé des papillomes dans les différents groupes au cours des 21 semaines d'expérimentation. (B) Variation hebdomadaire du nombre de papillomes 75
Figure 44 : Variation hebdomadaire du volume total de papillomes 78
Figure 45: L'aspect morphologique et histologique de la zone dorsale et des coupes. histologiques de peau des souris des différents groupes 80
Figure 46: Variations du poids moyen des souris 84
Figure 47: Variation de la formule de la numération sanguine des pourcentages de Globules Rouges et Lymphocytes 85
Figure 48: Variation de la formule de la numération sanguine des Globules Blanc, Globules Rouges, Monocytes et Lymphocytes 86
Figure 49: Variations du taux de la glycémie, du cholestérol et des triglycérides sanguins 87
Figure 50: Variations des taux de TGO et TGP 87
Figure 51: Variation des activités des enzymes du stress oxydant chez les souris traitées avec le Graviola ou avec les immunostimulants. 89
Figure 52: Variation des taux des marqueurs du stress oxydant chez les souris traitées avec le Graviola ou avec les immunostimulants 90
Figure 53 : Coupes histologiques du foie, du cerveau et de l'utérus chez le lot traité par la poudre des feuilles de Graviola. 93
Figure 54 : Coupes histologiques du foie, du cerveau chez le lot traité par les immunostimulants. 94
Figure 55: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots témoin et DMBA 110
Figure 56: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots DCA et DMBA/DCA 112
Figure 57: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots IS et DMBA/IS 113
Figure 58: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots Grav et DMBA/Grav 114
Figure 59: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots COMB et DMBA/COMB 115
Figure 60: Variations du poids corporel des souris appartenant aux différents groupes expérimentaux. 119
Figure 61: Numération de la formule sanguine effectuée sur sérum/EDTA 121
Figure 62: Variation de l'activité de la CAT hépatiques entre les différents groupes de souris. 125
Figure 63: Variation de l'activité de la SOD hépatiques entre les différents groupes de souris. 127
Figure 64: Variation de l'activité de la GPx hépatiques entre les différents groupes de souris. 129

Liste des abréviations
ADN : Acide désoxyribonucléique.
AGG : Aétogénines.
AK : Kératose actinique.
ALAT : L'alanine aminotransférase.
ASAT : L'aspartate aminotransférase.
ATP : Adenosine triphosphate.
BSA : Bovine Serum Albumin.
CAT : Catalase.
CBC : Le carcinome basocellulaire.
CG : Groupe contrôle.
CMM : Cutaneous malignant melanoma.
CNESST : La Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail
COMB : Pour Combinaison.
CR-3 : Récepteur du complément 3.
CSC : Le carcinome spinocellulaire (épidermoïde).
CTLA -4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein-4
CYP1A1: Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1.
CYP1B1: Cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1.
DC : Cellules dendritiques.
DCA : Dichloroacetate.
DMBA : 7,12-Dimethylbenz(a)Anthrazene.
DRG : Dorsal root ganglion**.**
DTNB : 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque.
EDTA : L'acide éthylènediaminetétraacétique
ER : Espèces réactives.
ERN : Espèces réactives de l'azote.
ERO : Especes reactives d'Oxygene.
FDA : Food and Drug Administration, agence USA.
FNS : La numération de la formule sanguines.
GB : Globule Blanc.

GPx : Glutathion peroxydase.
GR : Glutathion réductase ou Globule rouge.
Grav : Graviola
GSH : Le glutathion.
GSSG : Le disulfure de glutathion.
GST : Transférases S-glutathione.
HAP : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.
IGF-1R : Insulin-like growth factor 1.
IS : Immunostimulants.
LDH : Lactate déshydrogénase.
LDL : Low Density Lipoprotéine.
MD fraction : Maitake D-fraction.
MDA : Malondialdéhyde.
MO : Monocyte.
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit.
NF-κB : Nuclear Factor-kappa B.
NK : Cellules tueuses naturelles (Naturel Killer).
NMSC : Le cancer de la peau non mélanique
OMS : L'Organisation mondiale de la santé.
ONOO : Peroxy-nitrite
PD-1 : Programmed Death-1 protéine.
PDH : La pyruvate déshydrogénase.
PLSD : Fisher's least significant difference procedure.
PTCH : Le gène patched-1
PXR : Pregnane X Receptor.
RIPR : Réaction inflammatoire post-radiation.
SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise.
SOD : Dismutases de superoxyde.
Tc : Lymphocyte T Cytotoxique.
TGO : Transaminase glutamique-oxaloacétique.
TGP : Transaminase glutamique-pyruvique.
Th : Lymphocyte T helper

THF : Tétrahydrofuranne.
TLR : Toll-like Receptors.
TNFα : Tumor Necrose Factor Alpha.
TPA : Le phorbol-12-myristate-13-acétate
UV : Rayons Ultra-Violet.
5-FU : Fluorouracile.

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules transformées, soumises à une évolution par sélection naturelle. Cette définition actualisée a été proposée par **(Brown et al., 2023)**. D'après les estimations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2019, le cancer est classé comme première ou deuxième cause de décès avant l'âge de 70 ans dans 112 des 183 pays. Il est classé en troisième ou quatrième position dans 23 autres pays **(Sung et al., 2021).** Le registre des tumeurs de la wilaya Alger révèle qu'en 2021, sur une population de 3 890 828 habitants de cette wilaya, 8731 nouveaux cas de cancers, y compris les carcinomes basocellulaires, ont été enregistrés. Ce chiffre représente une augmentation de 12,8 % par rapport à l'année 2020, où 7615 nouveaux cas avaient été recensés. Parmi ces types de cancer, on note 141 cas de cancer de peau (carcinomes basocellulaires exclus) soit 3,7 % des cas enregistrés (**Boutekdjiret & Bouheraoua, 2021)**.

Notre travail vise à approfondir notre compréhension de la carcinogenèse de la peau, en mettant au point un modèle local de carcinogenèse cutanée qui pourrait servir de référence pour évaluer à l'avenir les effets anticancéreux, qu'il soit prophylactique ou curatif, de substances in vivo. L'étude de la carcinogenèse expérimentale est essentielle pour comprendre les mécanismes de formation des tumeurs cutanées **(Tanaka et al., 2013).** Ceci nous permettra d'évaluer la réponse de notre souche locale de souris de laboratoire à la carcinogenèse chimique et au traitement. Dans ce contexte, le papillome est un type de tumeur cutanée induit par des substances chimiques, telles que le 7,12- diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) et le phorbol-12-myristate-13-acétate (TPA). Ces substances peuvent induire des mutations génétiques et des modifications épithéliales, menant à la formation de papillomes, qui peuvent évoluer vers des carcinomes spinocellulaires (épidermoïdes) plus agressifs **(Neagu et al., 2016).**

Nous avons débuté par une mise au point de la cancérogenèse cutanée en testant plusieurs doses et fréquences d'exposition à l'initiateur (DMBA). Une fois le modèle choisi, nous avons, à la base d'une profonde étude bibliographique, sélectionné trois substances (le dichloroacétate (DCA), un mélange d'immunostimulants, et les feuilles de Graviola (Annona muricata)) pour évaluer leurs effets préventifs contre la cancérogénèse chimique. Cependant,

avant d'entreprendre ces évaluations, nous avons estimé nécessaire de vérifier l'éventuelle toxicité du Graviola et du mélange d'immunostimulants (bêta-glucane et arabinogalactane) pour garantir l'innocuité de ces substances sur l'organisme. Nous avons exclu le DCA de cette étude en raison de son utilisation en clinique comme traitement approuvé pour l'acidose lactique **(Stacpoole et al., 2008).** La toxicité chronique a été évaluée au niveau du foie, du cerveau et de l'utérus, ainsi que sur les paramètres de stress et les paramètres biochimiques sanguins. Cette évaluation nous aidera à comprendre les effets secondaires potentiels de ces substances et à approuver leur utilisation à long terme. Notre approche est caractérisée par la combinaison des trois thérapies. Cette approche est souvent utilisée dans les soins complémentaires ou alternatifs pour maximiser les bénéfices thérapeutiques en intégrant plusieurs modalités de traitement **(Mokhtari et al., 2017)**. La combinaison comporte :

- ⇨ **La Phytothérapie** : le Graviola, qui un arbre tropical dont les feuilles, en particulier, sont souvent étudiées pour leurs composés bioactifs, notamment les Acétogénines qui présentent un grand pouvoir anticancérigène.
- ⇨ **La Myco-immunothérapie**: les immunostimulants dérivés de champignons et de levures (Beta-glucanes) en plus de l'arabinogalactane, connus pour leur rôle activateur de la réponse immune innée.
- ⇨ **Thérapie métabolique expérimentale** : le DCA connu pour son rôle inhibiteur de la Pyruvate déhydrogénase kinase (PDK).

Les effets anticancérigènes de ces traitements ont été évalués via des études morphologiques et histologiques, les paramètres hématologiques, ainsi que les paramètres du stress oxydatif. Cette étude pourrait ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement du cancer.

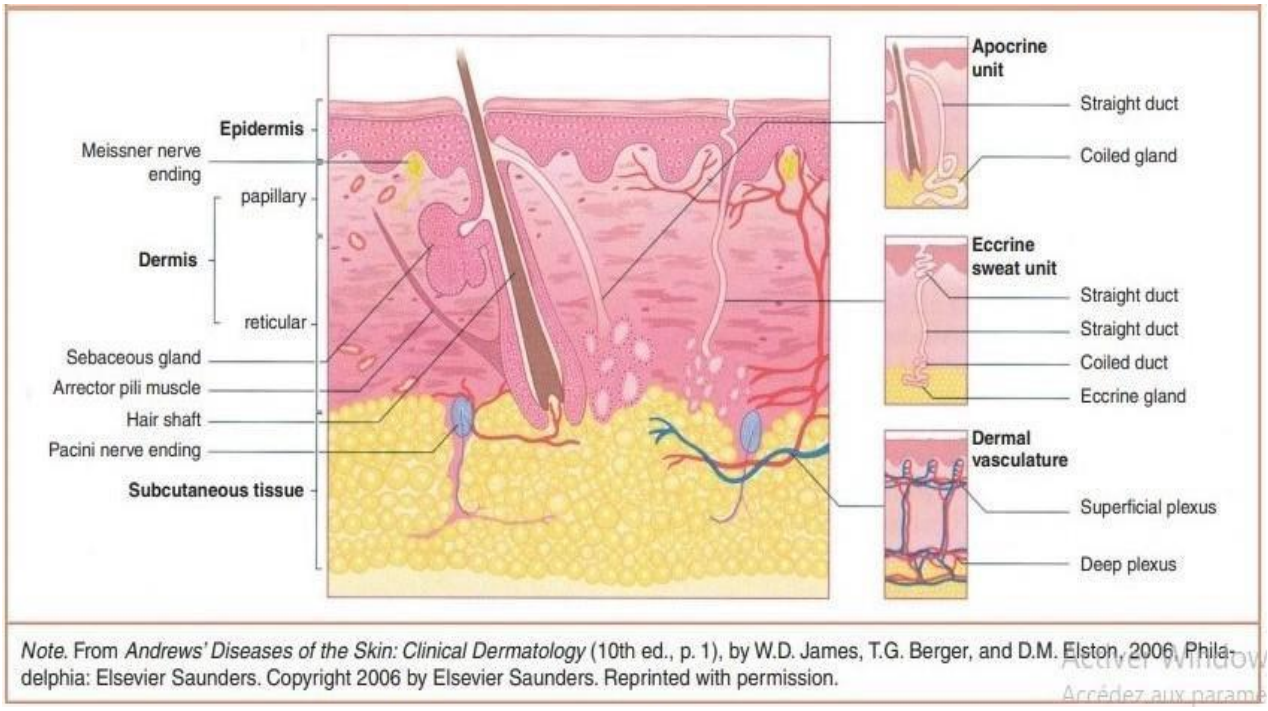
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : la peau et le cancer cutané

1 Structure anatomique :

La peau, appelée aussi tégument (du latin *tegumentum* = couverture), est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme, elle pèse environ 4Kg et sa superficie est de 2 m^2. L'épaisseur de la peau varie, en fonction de la région, elle est de 1 mm au niveau des paupières (peau fine) et de 4 mm au niveau de la paume de la main (peau épaisse). Elle constitue beaucoup plus qu'une simple enveloppe recouvrant notre corps ; elle est le siège de nombreuses fonctions : protection, thermorégulation, fonctions sensorielles, d'échanges et métaboliques. Sur un plan structural, la peau est constituée de trois tissus superposés :

- L'épiderme : est le tissu le plus externe,
- Le derme : est le tissu intermédiaire,
- L'hypoderme : est et le tissu le plus profond (figure 1) **(Levacher & Melissopoulos, 2012)**.



Note. From *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology* (10th ed., p. 1), by W.D. James, T.G. Berger, and D.M. Elston, 2006, Philadelphia: Elsevier Saunders. Copyright 2006 by Elsevier Saunders. Reprinted with permission.

Activer Windows
Accédez aux paramè

Figure 1: Coupe transversale de la peau et du pannicule **(Kolarsick et al., 2011).**

1.1 L'épiderme :

L'épiderme est un tissu de revêtement, c'est un épithélium stratifié squameux kératinisé qui assure principalement la protection de l'organisme contre les agressions extérieures. Cette protection est assurée par la cohésion des cellules épithéliales et la production de kératine, une protéine fibreuse résistante. Les cellules épidermiques sont reliées par les desmosomes, elles sont attachées au derme par la jonction dermo-épidermique. L'épiderme, non vascularisé, Il est alimenté par la diffusion de fluides intercellulaires depuis la vascularisation dermique **(Levacher & Melissopoulos, 2012).**

L'épiderme contient plusieurs types de cellules **(figure 2)**:

- **Les kératinocytes :** représentent la population majoritaire des cellules épidermiques (90 à 95 %), ils produisent une protéine fibreuse, la kératine, qui confère aux cellules de l'épiderme leurs propriétés protectrices **(Démarchez, 2015)**. Les kératinocytes subissent un processus de différenciation lors de leur migration de la couche basale vers la surface de la peau, résultant en la kératinisation. Ce processus se divise en une phase synthétique où la cellule accumule de la kératine, un filament fibreux faisant partie du cytosquelette cellulaire suivi de la phase dégradative où la cellule est transformée en une cellule cornée ou cornéocyte. Ce processus de maturation aboutissant à la mort cellulaire est appelé différenciation terminale **(Kolarsick et al., 2011)**.
- **Les mélanocytes :** ce sont des cellules épithéliales caractérisées par de fines ramifications, responsables de la synthèse de la mélanine, un pigment qui s'accumule autour du noyau des kératinocytes conférant à la peau sa teinte brune. Les variations raciales dans la couleur de la peau ne sont pas dues à des différences dans le nombre de mélanocytes, mais plutôt au nombre, à la taille et à la distribution des mélanosomes ou granules de pigment à l'intérieur des kératinocytes **(James et al., 2019)**.
- **Les cellules de Langerhans :** présentes à hauteur de 3% à 5% parmi les kératinocytes du stratum spinosum, elles jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire. Elles appartiennent à la lignée monocyte-macrophage et sont essentielles pour la reconnaissance, l'absorption, le traitement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T sensibilisés **(James et al., 2019)**

- **Les cellules de Merkel** : ce sont des mécanorécepteurs de type I en forme ovale et à adaptation lente, elles sont localisées dans des zones de forte sensibilité tactile, telles que les doigts, les lèvres et certaines parties de la cavité buccale. Elles sont attachées aux kératinocytes basaux par des jonctions desmosomales. Des déformations légères des kératinocytes voisins déclenchent la sécrétion d'un signal chimique par les cellules de Merkel, induisant un potentiel d'action dans le neurone afférent voisin et transmettant ainsi le signal au cerveau **(Kolarsick et al., 2011)**.

Tous les 28 jours, les kératinocytes basaux se différencient et migrent vers le haut pour former le stratum corneum après une accumulation de kératine et de lipides **(Abdo et al., 2020).**

Les cellules mentionnées ci-dessus occupent l'épiderme et forment quatre couches distinctes :

1. **La couche basale** : la plus profonde, est constituée de cellules souches qui se différencient et se divisent, avec les cellules filles rejoignant les couches plus superficielles. Les cellules de cette couche sont également appelées basales, d'où le nom du carcinome basocellulaire.
2. **La couche épineuse :** est formée de plusieurs rangées de kératinocytes.
3. **La couche granuleuse :** est composée de kératinocytes aplatis dont les organites se désintègrent, et le cytoplasme est rempli de granules.
4. **La couche cornée** : la plus superficielle, est constituée de plusieurs couches de kératinocytes morts, transformés en sacs membraneux remplis de kératine. C'est la couche qui est éliminée lors d'un gommage de la peau. Les cellules des couches 2, 3 et 4 sont également appelées squameuses, malpighiennes, épidermiques ou spineuses, d'où le nom du **carcinome spinocellulaire (So, 2007) (Marieb et al., 2015).**

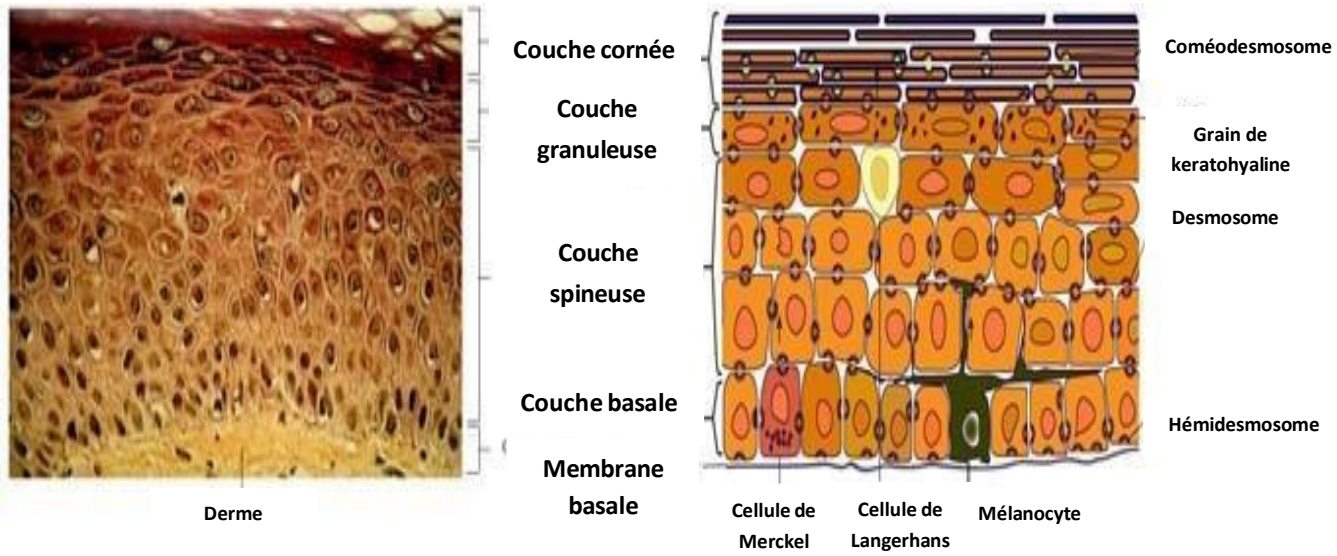


Figure 2: Principales structures de l'épiderme humain en couches transversales **(Démarchez, 2015).**

1.2 Le derme :

C'est un tissu conjonctif constitué d'une substance fondamentale dans laquelle baignent des fibroblastes et diverses cellules, des fibres de collagène de types I et III à raison de 70%, des fibres élastiques à raison de 5% qui confèrent à la peau ses propriétés extensibles. L'épaisseur du derme varie de 0,5 à 5 mm selon la région du corps. Il se divise en deux couches principales :

- ⇨ **Le derme papillaire**, en contact avec la membrane basale,
- ⇨ **Le derme réticulaire**, en contact avec le tissu sous-cutané.

Le derme abrite également des vaisseaux sanguins, des canaux lymphatiques et des nerfs sensoriels. Il contient également des terminaisons nerveuses spécialisées, telles que les corpuscules de Pacini pour la détection des vibrations et les corpuscules de Meissner pour les sensations tactiles et de pression **(figure 3) (Lai-Cheong & McGrath, 2017; Marieb et al, 2015).**

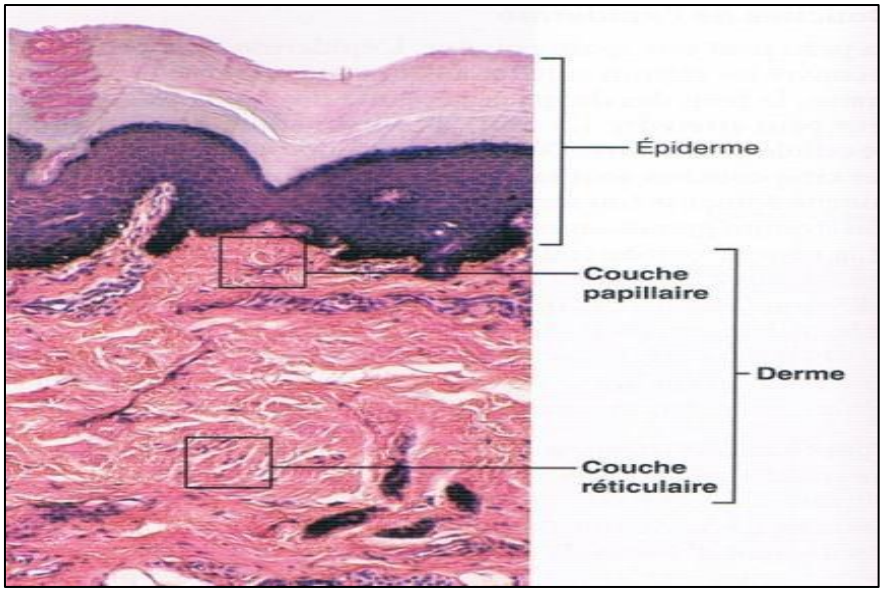


Figure 3: Photographie d'une coupe de derme prise au microscope optique **(Marieb Elaine N, 2015).**

1.3 L'hypoderme :

Principalement composé de tissu adipeux qui stocke les graisses et joue un rôle crucial dans les réserves énergétiques. Il assure également la liaison entre la peau et les structures sous-jacentes, en particulier les muscles, tout en permettant une liberté de mouvement en glissant sur ces structures **(figure 1)**. Chez les individus non obèses, environ 80 % de la graisse corporelle totale est localisée dans le tissu sous-cutané. Ce tissu adipeux a une fonction endocrinienne, il produit la leptine qui joue un rôle dans la régulation de l'appétit et le contrôle énergétique métabolique **(Alexandre et al, 2012 ; Lai-Cheong & McGrath, 2017; Levacher & Melissopoulos, 2012).**

2 Fonction de la peau :

2.1 Fonction protectrice :

La peau exerce une fonction protectrice essentielle contre diverses agressions extérieures. Elle assure une protection mécanique contre les mouvements du corps et les chocs grâce à la couche cornée, aux fibres du derme et au coussin graisseux de l'hypoderme. La barrière chimique est assurée par la couche cornée et le film formé par la sueur et le sébum, mais certains produits peuvent la franchir, représentant un risque d'absorption,

notamment chez les nourrissons. La peau protège également contre les microbes par la couche cornée, les cellules immunitaires du derme et la flore microbienne normale.
Contre les rayons du soleil, la peau s'épaissit et sécrète davantage de mélanine pour une double protection **(Tran, 2007).**

2.2 Régulation thermique :

La peau joue un rôle crucial dans le maintien d'une température corporelle constante. Deux mécanismes contribuent à la thermorégulation cutanée : le contrôle du flux sanguin cutané et la sudation thermique. En réponse à la chaleur, elle favorise l'évacuation de l'excès de la chaleur par la dilatation des petits vaisseaux du derme et la sudation. En cas de froid, la peau agit en resserrant les petits vaisseaux, en utilisant le coussin graisseux de l'hypoderme et en provoquant la contraction des petits muscles des poils (chair de poule), afin de contrer le refroidissement de l'organisme **(Cranston, 1989; Tran, 2007).**

2.3 Fonction sensitive :

La peau joue un rôle essentiel dans notre perception sensorielle, encodant des sensations telles que la température, le toucher et la douleur. Les sensations cutanées sont générées par des neurones somatosensoriels présents dans la peau. Ces neurones, dont les corps cellulaires se trouvent dans les ganglions trigéminaux et dorsaux (DRG), convertissent les stimuli sensoriels en potentiels d'action qui se propagent vers le système nerveux central **(Lumpkin & Caterina, 2007)**. La peau peut détecter des motifs fins grâce à une collaboration entre terminaisons nerveuses et capteurs épidermiques. Les diverses cellules de l'épiderme, telles que les kératinocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans et cellules de Merkel, expriment des protéines capteurs et des neuropeptides, contribuant ainsi au système sensoriel de la peau **(Boulais & Misery, 2008).**

3 Le cancer de la peau :

Le cancer de la peau est la forme la plus répandue de cancer aux États-Unis. Il se divise généralement en cancer de la peau mélanique et non mélanique. Les études épidémiologiques indiquent une augmentation des cancers cutanés au fil des décennies. Les options de

traitement incluent l'excision chirurgicale, la cryothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie et la radiothérapie. La protection solaire adéquate, notamment l'utilisation de crème solaire, est cruciale pour prévenir le cancer de la peau **(Gruber & Zito, 2024)**.

3.1 Facteurs de risque :

Le principal facteur de risque environnemental pour tous les cancers de la peau est le rayonnement ultraviolet. La nature de l'exposition aux rayonnements ultraviolets, qu'elle soit intermittente ou accumulée, semble différer entre le carcinome épidermoïde (CSC) et le mélanome (CMM). En outre, des caractéristiques individuelles telles que le type de peau, la couleur des yeux et des cheveux, la présence de nævus et la suppression immunitaire jouent un rôle crucial en tant que facteurs prédictifs de la susceptibilité individuelle au cancer de la peau. De plus, le mélanome est également associé à un statut socioéconomique élevé **(Alam & Ratner, 2001; Y. Chang et al., 2009; Robsahm et al., 2014).**

3.2 Epidémiologie :

Selon le Plan National du Cancer, 2015-2019 Algérien on observe que la fréquence des cancers cutanées en Algérie reste faibles avec un pourcentage légèrement plus élevé chez les hommes par rapport aux femmes **(figure 4) (PLAN NATIONAL CANCER 2015 2019, 2014)**.

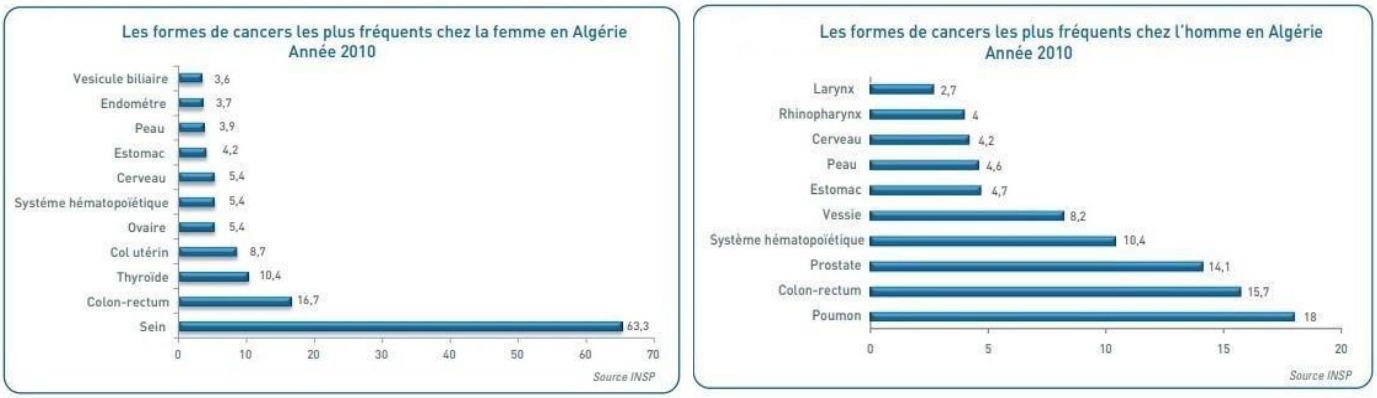


Figure 4: Les formes de cancers les plus fréquents chez deux sexes en Algérie en 2010.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) Un tiers des cancers diagnostiqués sont des cancers de la peau, et environ un Américain sur cinq développera cette maladie au cours de sa vie, selon la 'Skin Cancer Foundation'. La diminution des niveaux d'ozone entraîne une perte de la protection filtrante de l'atmosphère, exposant davantage la surface terrestre aux rayonnements ultraviolets solaires (*Radiation*, s. d.).

3.3 Différents types de cancers de la peau :

On peut différencier les cancers de la peau en fonction de leurs types histologiques en carcinomes et sarcomes.

3.3.1 Les carcinomes :

3.3.1.1 Le carcinome basocellulaire (CBC) :

Le carcinome basocellulaire (CBC) est la forme la plus fréquente de cancer de la peau, représentant la majorité des cas diagnostiqués chaque année aux États-Unis avec plus de 4 millions de cas diagnostiqués chaque année aux États-Unis ce qui représente 80 % de tous les cancers de la peau non mélanomes. En raison de sa croissance lente, la plupart des CBC sont curables avec un traitement précoce. La prévention et la détection précoce, notamment la protection solaire, sont cruciales, car 90 % des cancers de la peau, excluant le mélanome, sont liés à une exposition aux rayons UV. Bien que l'origine exacte des cellules à l'origine du CBC soit débattue, une hypothèse courante suggère qu'elles proviennent des cellules souches basales des kératinocytes. Cette compréhension approfondie est essentielle pour développer des stratégies de prévention et de traitement efficaces **(figure5 A) (Fagan et al., 2024; Julie K. Karen & Ronald L. Moy, 2020).**

3.3.1.2 Le carcinome spinocellulaire (épidermoïde) (CSC) :

C'est la deuxième forme la plus fréquente des cancers de la peau, après le carcinome basocellulaire. Il est caractérisé par des lésions précurseur appelées kératoses actiniques. Il affiche une progression tumorale et a le potentiel de métastaser. Son principal facteur de risque consiste en l'exposition cumulée aux radiations solaires ultraviolettes (UV) **(Howell & Ramsey, 2023).** Les petites lésions de carcinome épidermoïde peuvent être excisées sans être fatales, mais leur emplacement peut entraîner une morbidité significative. La plupart des cancers épidermoïdes **(figure 5 B)** dans la région de la tête et du cou nécessitent une

chirurgie complexe, susceptible de causer une esthétique défavorable. Les cancers épidermoïdes avancés ont un pronostic sombre, avec un taux de survie de 5 ans (inférieur à 40%). Les lésions plus importantes présentent également un risque de récurrence tumorale malgré une excision large **(Dalal et al., 2018; Higgins et al., 2018).**

3.3.2 Les mélanomes :

Résultent de la transformation maligne des mélanocytes, qui sont issus de la crête neurale. Bien que ces tumeurs se développent généralement sur la peau, elles peuvent également apparaître dans d'autres régions où les cellules de la crête neurale migrent, telles que le tractus gastro-intestinal et le cerveau. Le taux de survie relatif sur cinq ans varie considérablement en fonction du stade, atteignant 97% pour le stade 0 et environ 10% pour le stade IV **(Heistein et al., 2024)**. Le mélanome est souvent déclenché par une mutation de l'ADN, généralement liée à une exposition excessive au soleil. Les individus à la peau claire et aux cheveux clairs, vivant dans des environnements fortement exposés au soleil, présentent un risque accru. Sur le plan clinique, le mélanome se caractérise par une forme irrégulière, une couleur inégale et une asymétrie **(figure 5 C)** Parfois, il peut présenter des signes d'ulcération et de saignement, associés à un pronostic plus sombre **(Puckett et al., 2024)**

Figure 5: Types de cancers cutanés : **A)** Carcinome basocellulaire superficiel (CBC**) (James et al., 2019). B)** Nodule important de carcinome épidermoïde **(CSC) de la main (Rigel, 2011).C)** Mélanome **(Heistein et al., 2024).**

3.3.3 Les Sarcomes :

Les sarcomes cutanés sont des tumeurs malignes mésenchymateuses qui se forment dans le derme ou le tissu sous-cutané, bien qu'ils soient moins fréquents que d'autres types de néoplasmes cutanés. Parmi les sarcomes primaires courants, on compte le dermatofibrosarcome protubérant, le fibroxanthome atypique, le sarcome pléomorphe cutané

indifférencié et le léiomyosarcome. Il existe également les néoplasmes vasculaires tels que le sarcome de Kaposi **(figure 6)** et l'angiosarcome. Ces sarcomes, provenant des tissus conjonctifs et mous, peuvent se manifester sur la peau par croissance continue ou métastases. En raison d'un pronostic souvent moins favorable, leur prise en charge nécessite généralement l'intervention de chirurgiens spécialisés et/ou de radiothérapeutes. L'utilisation de l'immunohistochimie est essentielle pour une différenciation précise et l'exclusion d'autres diagnostics, tels que les tumeurs malignes des gaines nerveuses périphériques ou le mélanome **(Kohlmeyer et al., 2017).**

Figure 6: Sarcome de Kaposi chez un patient atteint du SIDA **(James et al., 2019).**

4 Cancérogenèse chimique de la peau :

4.1 Identification :

La cancérogénèse chimique a débuté en 1915 avec les travaux de Yamagiwa et Ichikawa, qui ont mis en évidence la cancérogénicité du goudron de houille sur l'oreille du lapin **(Yamagiwa, K. & Ishikawa, K., 1917)**. Ultérieurement, Elizabeth C. Miller et James A. Miller ont indiqué que la cancérogénèse peut survenir par une interaction directe de composés électrophiles avec l'ADN **(da Costa et al., 2021; Miller & Miller, 1981)**.

4.2 Etapes de la cancérogénèse cutanée chimiquement induit :

La cancérogenèse peut être divisée en trois étapes distinctes : initiation, promotion et progression **(Hennings et al., 1993)**. Dans un modèle murin de carcinogenèse cutanée, les souris ont été traitées d'abord avec un hydrocarbure aromatique polycyclique (initiateur),

suivi d'huile de croton (promoteur). Ce modèle a été étendu à d'autres tissus chez les rongeurs, notamment la vessie, le côlon, l'œsophage, le foie, les poumons, la glande mammaire, l'estomac et la trachée **(Weston & Harris, 2003)**.

4.2.1 L'initiation :

La phase initiale se manifeste par des altérations génétiques irréversibles déclenchées par le DMBA, entraînant des mutations dans le gène Ha-ras, cette phase représente une étape essentielle du processus d'amorçage des tumeurs cutanées **(Cipolat et al., 2014).**

4.2.2 La promotion :

Contrairement aux changements génétiques irréversibles nécessaires à l'initiation tumorale, les modifications induites par les promoteurs semblent être principalement épigénétiques et largement réversibles. La promotion, réalisée par des applications répétées du promoteur en respectant une dose et une fréquence déterminées, favorise la croissance des cellules mutées, conduisant à leur expansion clonale formant une déformation cutanée appelée papillome. Le promoteur le plus étudié est le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13- acétate). L'exposition aux promoteurs entraîne des altérations dans l'expression génique, l'induction de l'inflammation, la prolifération cellulaire et la différenciation terminale, mais aucun changement critique spécifique n'a été identifié **(tableau 1) (Hennings et al., 1993)**.

Bien que l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine soit cruciale, les mécanismes précis par lesquels le TPA active cette voie demeurent peu clairs, selon l'étude de Su et al., (2018), le TPA entraine une cascade réactionnelle aboutissant à l'activation des gènes cibles Wnt ces gènes gouvernent des protéines qui jouent un rôle dans divers processus de développement physiologiques, notamment la prolifération cellulaire, la différenciation et l'homéostasie tissulaire.

Tableau 1: Caractéristiques de l'initiation et de la promotion dans la peau de la souris.

Initiation 1. Efficace en une seule application rapide 2. Irréversible 3. Additif 4. Induit par des agents mutagènes Promotion 1. Nécessite des semaines d'exposition 2. Réversible 3. Épigénétique 4. Une exposition continue est nécessaire pour le maintien de certains papillomes 5. S'accompagne de changements dans l'expression génique 6. Sélection en faveur de la croissance des cellules initiées

4.2.3 La progression :

La phase de progression du cancer de la peau implique la transformation des papillomes en tumeurs malignes appelées carcinomes spinocellulaire ou épidermoïdes (CSC). Cette transformation est associée à l'accumulation de changements génétiques supplémentaires dans les cellules des papillomes, notamment des trisomies des chromosomes 6 et 7 ainsi que la perte d'hétérozygotie **(DiGiovanni, 1992)**. La transformation des papillomes en carcinomes épidermoïdes dépend de la souche animale et se produit de manière aléatoire ; à mesure que la population cellulaire se développe, la probabilité de modifications génétiques supplémentaires augmente, et le traitement mutagène ou la perte de p53 amplifie cette progression. La transition subséquente des carcinomes épidermoïdes en carcinomes fusiformes est un événement peu fréquent **(Kemp et al., 1993; Nowotarski et al., 2015)**.

4.3 Les inhibiteurs de la cancérogénèse :

La chimioprévention du cancer, par le biais d'interventions alimentaires ou chimiques, a le potentiel de prévenir ou de retarder l'apparition du cancer dans les populations à haut risque. Bien que la kératose actinique (AK) ait été reconnue comme un précurseur du carcinome épidermoïde (CSC) mais non du carcinome basocellulaire (CBC), les AK qui sont

plus fréquentes que le CSC, représentent d'excellentes cibles pour la chimioprévention. **(Einspahr et al., 2003)**.

Des résultats de recherche révélateurs montrent que plusieurs inhibiteurs présentent un potentiel considérable pour contrecarrer des étapes spécifiques **(figure 7)** ou inhiber plusieurs étapes du processus de carcinogenèse. Ces découvertes ouvrent la voie à des approches ciblées et polyvalentes dans le développement d'agents de chimioprévention. A titre d'exemple, la vitamine E et le sélénium ont été découverts pour inhiber la carcinogenèse mammaire de manière synergique au niveau de l'étape de la promotion **(Slaga, 1984).**

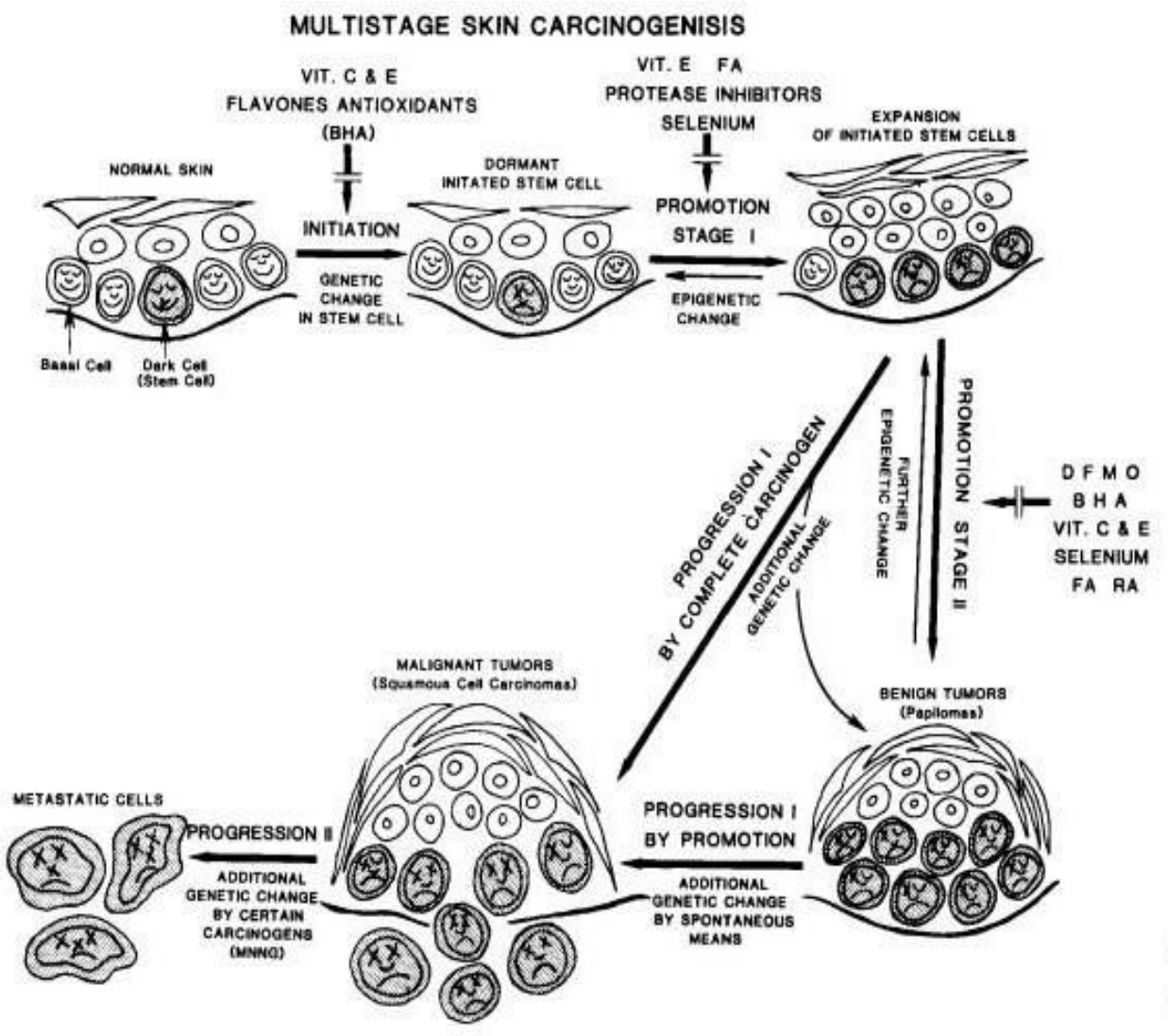


Figure 7: Schéma des différentes étapes de la cancérogenèse cutanée et des endroits où les inhibiteurs potentiellement utiles sont efficaces **(Slaga, 1984).**

4.4 Le Le 7,12 Diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) et Ses Composés Précurseurs :

4.4.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) :

C'est une catégorie de substances chimiques ayant une grande importance pour l'environnement. Les HAP sont des contaminants chimiques constitués de structures d'anneaux aromatiques possèdent deux cycles de benzène ou plus et formés de carbones et d'hydrogènes. Ils se présentent généralement sous forme de composés solides sans couleur, ou de substances blanches ou jaune pâle **(Ma et al., 2022)**.. On appelle HAP légers ceux qui comportent jusqu'à quatre cycles, tandis que ceux qui en possèdent plus sont considérés comme des HAP lourds. Les HAP lourds sont plus stables et plus toxiques que les HAP légers **(Sahoo et al., 2020)**.

Les êtres humains peuvent être exposés aux HAP par inhalation, contact cutané et ingestion. Les effets des HAP sur la santé humaine dépendent de la durée et de la voie d'exposition, de la concentration des HAP et de leur toxicité relative. De nombreux HAP sont connus pour être des cancérigènes, des mutagènes et des tératogènes, ce qui représente un danger significatif pour la santé et le bien-être des individus. Une exposition à long terme aux HAP peut favoriser le développement de tumeurs dans divers organes tels que la peau, les poumons, le pancréas, l'œsophage, la vessie, le côlon et le sein **(Ma et al., 2022)**.

4.4.2 Les Benzanthracènes :

Ce sont des substances cristallines composées de quatre cycles benzéniques fusionnés **(figure 8)**, ils sont formés lors d'une combustion incomplète de matières organiques. On les retrouve principalement dans les gaz d'échappement des véhicules à essence et diesel, la fumée de tabac et de cigarette, le goudron de houille et le brai de goudron de houille, les émissions provenant de la combustion du charbon, les aliments grillés au charbon de bois, ainsi que dans les acides aminés, les acides gras et les produits de pyrolyse des glucides. Ils sont également présents dans la fumée de bois et de suie, la créosote, l'asphalte et les huiles minérales **(Bouzidi, 2022).**

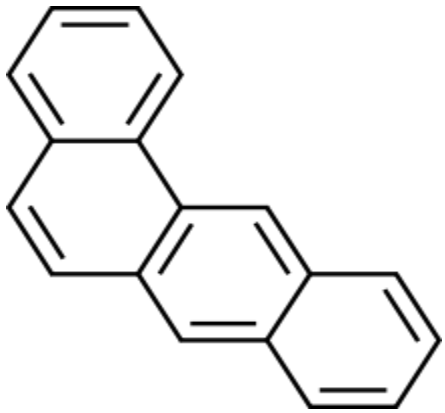


Figure 8: Structure de Benzanthracène **(« Http://Www.Chemspider.Com », s. d.).**

Le Benzanthracène a été démontré comme étant génotoxique et cancérigène dans des études sur des animaux. L'ingestion, l'application cutanée et les injections sous-cutanées et intrapéritonéales de Benzanthracène ont induit des tumeurs chez de jeunes souris, affectant le foie, la peau et les poumons. Le Benzanthracène subit un métabolisme via le cytochrome P450 et l'époxyde hydrolase, donnant lieu à plusieurs Dihydrodiols, notamment le trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[a]anthracène qui est ensuite métabolisé en un carcinogène ultime.

4.4.3 Le 7,12 Diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) :

Le DMBA, acronyme de Diméthylbenzanthracène, est une substance chimique cancérogène appartenant au groupe des hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) et fait partie de la famille des Benzanthracènes. En se basant sur les sources pertinentes, il est clair que le 7,12-diméthylbenzaanthracène (DMBA) est un carcinogène fréquemment utilisé dans les études expérimentales liées au cancer. Le DMBA **(figure 9)**, un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) puissant, est couramment employé pour induire divers types de cancer, tels que le cancer du sein, de la peau et de la bouche **(Abd-Ellatef et al., 2017; Balakrishnan et al., 2022; Han et al., 2007; C. Li et al., 2016; Modi et al., 2012).** Des recherches ont démontré que le DMBA peut provoquer des mutations dans les gènes responsables du cancer du sein et est utilisé comme initiateur ou promoteur dans le processus de la cancérogénèse **(Z. Wang & Zhang, 2017).**

Diverses études se sont penchées sur les effets de différents composés naturels et agents synthétiques pour prévenir ou inhiber la carcinogenèse induite par le DMBA. Par exemple, des substances telles que l'extrait de grenade, l'eugénol et les polysaccharides d'ulvane ont démontré un potentiel d'inhibition du cancer induit par le DMBA dans des modèles expérimentaux, Ces substances ont été identifiées comme ayant la capacité de réguler différents aspects de la carcinogenèse induite par le DMBA, englobant les dommages à l'ADN, le stress oxydatif, et l'expression des gènes liés à l'initiation et à la progression des tumeurs **(Abd-Ellatef et al., 2017; Bishayee et al., 2015; Han et al., 2007).**

Le DMBA, choisi comme modèle d'étude des effets immunosuppresseurs par l'équipe de F. Dean, est une molécule synthétique mutagène, cancérogène et immunosuppressive. Le DMBA interagit avec les lymphocytes T, jouant un rôle central dans la réponse immunitaire. Il est le plus puissant immunosuppresseur de cette catégorie de composés **(Dean et al., 1985; Saas, 1997).**

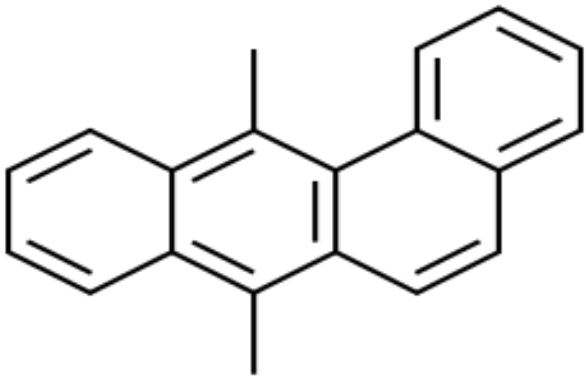


Figure 9: Structure de 7,12-diméthylbenzaanthracène (DMBA)
(« Http://Www.Chemspider.Com », s. d.).

4.5 Cancérogenèse chimique de la peau induite par le DMBA :

4.5.1 L'initiation par le DMBA :

Le processus de cancérogenèse cutanée déclenché par le DMBA a fait l'objet d'études approfondies. On sait que le DMBA provoque des dommages à l'ADN dans la peau, entraînant la formation d'adduits d'ADN et conduisant ultérieurement à la carcinogenèse **(Devanesan et al., 1993a; Kleiner et al., 2002).** L'activation métabolique du DMBA

implique des enzymes du cytochrome P450, notamment le CYP1A1 et le CYP1B1, qui catalysent la création de métabolites réactifs contribuant aux dommages à l'ADN et à l'amorçage tumoral **(Vabeiryureilai et al., 2019).**

Le DMBA-3,4-dihydrodiol, qui est le précurseur du Diolepoxide de la région de la baie, a été démontré comme étant un agent puissant pour initier des tumeurs dans la peau de souris Des études ont signalé la formation d'adduits d'ADN DMBA dans l'épiderme de souris **(Figure 10)**, induite par les énantiomères du tram-3,4-dihydrodiol à travers leurs DMBA- 3,C-dihydrodiol 1,2-époxydes, Malgré le fait que la plupart des adduits de DMBA formés suite à l'activation microsomale soient éliminés par dépurination **(Devanesan et al., 1993)**. En outre, la carcinogenèse cutanée provoquée par le DMBA a été liée à l'augmentation de différentes voies de signalisation, notamment NF-κB et le récepteur de xénobiotiques pregnane (PXR) **(Dao et al., 2015; Elentner et al., 2015).** De plus, il a été démontré que le DMBA induit des mutations génétiques, comme la mutation du codon 61 de Hras, qui joue un rôle spécifique dans le déclenchement de la carcinogenèse cutanée **(Goldstein et al., 2015; Hu et al., 2020).**

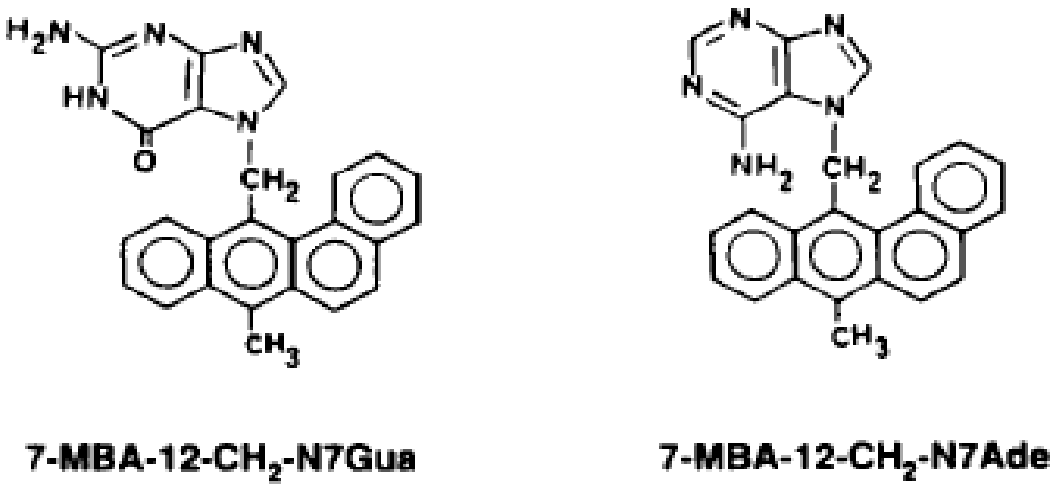


Figure 10: Structures des Adduits DMBA-ADN **(Devanesan et al., 1993a)**.

Aussi récemment il a été démontré que le développement et la progression des cancers de la peau sont influencés par plusieurs voies de signalisation, en particulier celle du récepteur du facteur de croissance similaire à l'insuline 1 (IGF-1R). Cette signalisation favorise divers aspects du cancer, tels que la prolifération cellulaire, la survie, la migration,

l'angiogenèse, la réponse à l'hypoxie et la métastase. De plus, elle contribue à la résistance aux traitements anticancéreux. Des preuves indiquent que l'IGF-1R est surexprimé dans les zones tumorales du carcinome épidermoïde **(X. Wang et al., 2022).**

4.5.2 L'huile de croton, le promoteur :

L'origine de l'huile de Croton se situe dans les graines du croton tiglium (Figure 11), une plante faisant partie de la famille des Euphorbiacées ; le genre Croton possède la plus grande diversité d'espèces, totalisant environ 13 000 variétés **(Hamer, 1888; Luu-dam et al., 2023)**. Le Croton est largement répandu dans les régions tropicales d'Asie du Sud-Est et de Chine. Diverses études antérieures ont examiné les actions pharmacologiques et physiologiques des espèces de Croton, mettant en avant leurs propriétés anti-inflammatoires, anticonvulsivantes et cicatrisantes **(C. Li et al., 2016).**

Les dermatologues et les chirurgiens plasticiens recourent à l'huile de Croton lorsqu'ils réalisent des peelings chimiques profonds **(Justo et al., 2021)**. Le 12-O- tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) **(Figure 11)** présent dans l'huile de Croton, en combinaison avec le DMBA, joue un rôle évident dans le développement des papillomes cutanés **(Ajith & Janardhanan, 2011).**

Figure 11: Croton tiglium **(*Croton Tiglium L.* | *Plants of the World Online* | *Kew Science*, s. d.).**

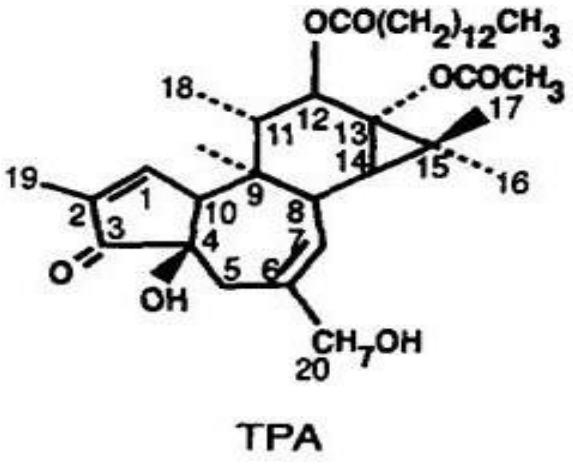


Figure 12: Structure chimique de TPA **(12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) (DiGiovanni, 1992).**

4.6 Les limites de la cancérogénèse chimiques par le DMBA/huile de croton :

Bien que le modèle de carcinogenèse cutanée en deux phases soit largement utilisé et présente de nombreuses applications pour répondre à diverses questions concernant la biologie fondamentale des cancers épithéliaux, il présente certaines restrictions. Dans ce modèle, les souris développent principalement des papillomes, qui n'ont pas de correspondance humaine directe. Néanmoins, les carcinomes épidermoïdes qui apparaissent après une transformation maligne sont histologiquement très similaires à ceux observés chez l'homme. Une autre limitation de ce modèle est que Hras est la principale cible de l'initiation chimique chez la souris, alors que Tp53 semble être une cible plus significative pour les mutations géniques dans le cancer de la peau non mélanique chez l'homme. Les cibles génétiques pour l'initiation chimique dans la peau de souris sont plus comparables à celles trouvées dans d'autres cancers épithéliaux humains, tels que les cancers du poumon, du côlon et du pancréas. Par ailleurs, le modèle de carcinogenèse cutanée en deux étapes a une utilité limitée pour étudier les métastases. Comme pour plusieurs autres modèles murins de cancer, le taux de métastases des tumeurs cutanées est relativement faible **(Abel et al., 2009).**

5 Le dépistage des cancers cutanés par biopsie :

La détection du cancer par biopsie est un aspect essentiel du diagnostic et de la stadification du cancer. La biopsie cutanée est une procédure cruciale pour le diagnostic du cancer de la peau, servant de norme de référence pour l'examen histopathologique **(Mogensen & Jemec, 2007).**

La dermoscopie a été prouvée pour augmenter la sensibilité de la détection du cancer de la peau, diminuant le nombre de biopsies de lésions bénignes nécessaires pour chaque diagnostic malin et permettant la détection de mélanomes plus minces par rapport à l'examen visuel à l'œil nu **(Wolner et al., 2017).** En outre, la biopsie cutanée est décrite comme une procédure ambulatoire sûre, simple et pertinente pour le diagnostic, mettant en évidence sa commodité et son importance diagnostique **(Nischal et al., 2008).** En outre, l'utilisation de la radiomique à travers des séquenceurs radiomiques profonds à plusieurs colonnes a démontré une sensibilité et une spécificité élevées dans la détection du cancer de la peau, fournissant un outil puissant pour améliorer l'efficacité, la cohérence et la précision du diagnostic du cancer cutané **(Shafiee & Wong, 2017).**

6 Le métabolisme de la cellule cancéreuse :

6.1 Effet Warburg :

En 1920, le physiologiste allemand Otto Heinrich Warburg a identifié une caractéristique distinctive des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. Contrairement à la cellule saine, qui tire 95% de son énergie de la respiration oxydative dans la mitochondrie en mode aérobie, la cellule cancéreuse obtient son énergie principalement par la voie anaérobie, favorisant la dégradation anaérobie du glucose dans le cytoplasme **(figure 13)**. La phosphorylation oxydative catalysée par le pyruvate déshydrogénase (PDH) génère un rendement énergétique plus élevé que celui la voie lactique catalysée par le lactate déshydrogénase (LDH). Le bilan énergétique défavorable d'une cellule cancéreuse constitue la principale cause de la cachexie cancéreuse **(Sutendra & Michelakis, 2013)**, phénomène connu sous le nom d'« Effet Warburg ». Warburg a avancé l'idée que le cancer résultait d'un dysfonctionnement mitochondrial. L'accumulation d'acide lactique à des concentrations élevées favorise le développement tumoral et les métastases en activant l'angiogenèse et, par

conséquent, la mobilité cellulaire. D'un autre côté, l'inactivation de la mitochondrie confère à la cellule cancéreuse son caractère distinctif, l'empêchant de déclencher le processus d'apoptose, en inhibant toutes les voies mitochondriales dédiées à cet effet **(Warburg, 1956).**

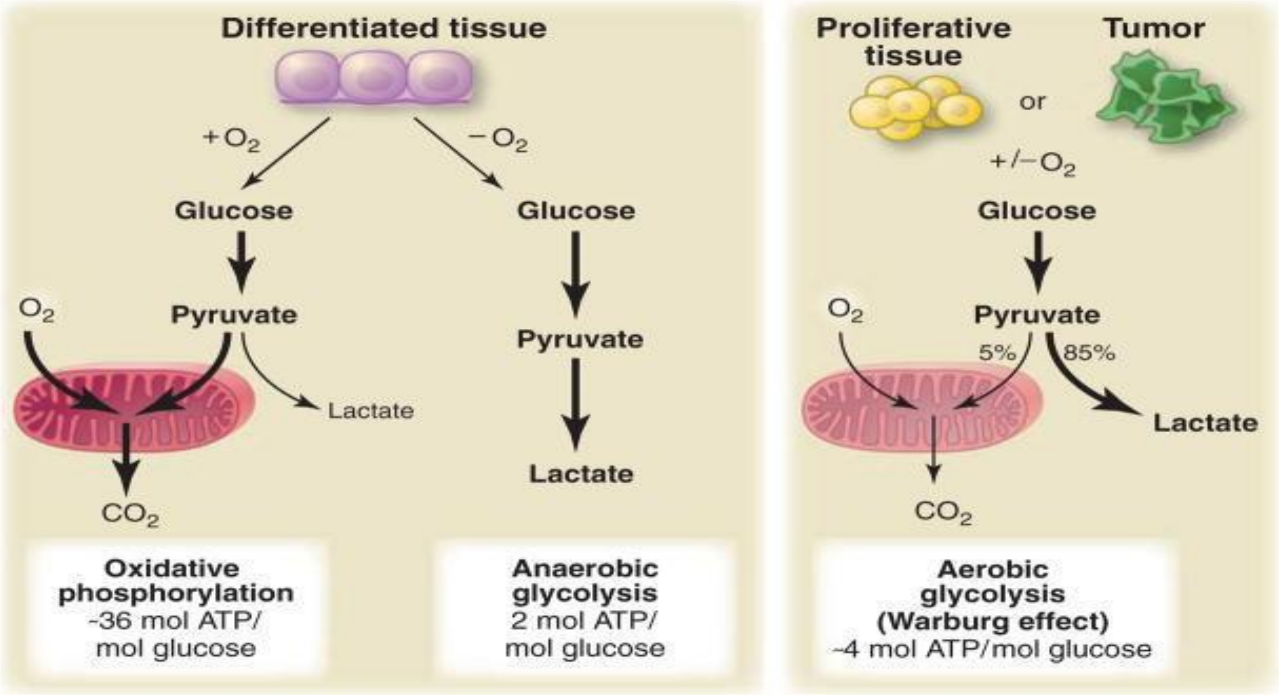


Figure 13: Comparaison entre les métabolismes d'une cellule cancéreuse et celui d'une cellule saine **(Vélez-Páez et al., 2021)**

.

Chapitre 2 : le stress oxydatif

1 Définition du stress oxydatif :

Le stress oxydatif a été initialement décrit en 1985 comme un déséquilibre en faveur des pro-oxydants par rapport aux antioxydants. Au fil du temps, les sources de pro-oxydants, tant endogènes qu'exogènes, ont été identifiées, tout comme les antioxydants qui agissent comme des puits métaboliques pour ces pro-oxydants. Aujourd'hui, le stress oxydatif est défini de manière plus précise comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'espèces réactives de Nitrogène (ERN) d'une part, et les antioxydants de l'autre, favorisant les premières. Si la production d'antioxydants l'emporte sur celle de ERO et de ERN, on parle de stress réducteur **(K. Yuan & Zhang, 2021)**.

Les molécules ou les fragments moléculaires contenant un ou plusieurs électrons non couplés sont appelés radicaux libres. En général, un radical libre est extrêmement réactif en présence d'électrons non couplés. La classe la plus importante de ces espèces produites dans les systèmes vivants est constituée de radicaux dérivés de l'oxygène **(Valko et al., 2004)**.

Les molécules antioxydantes de la peau interagissent avec les ERO ou leurs sous-produits pour les éliminer ou réduire leurs effets négatifs. Le glutathion (GSH), l'alpha-tocopérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), les peroxydases de glutathion, la réductase de glutathion, les transférases S-glutathione (GST), les dismutases de superoxyde (SOD), la catalase et le réducteur de quinone sont quelques-unes de ces molécules antioxydantes **(Bickers & Athar, 2006) .**

Le stress oxydatif dans la peau est une conséquence naturelle du métabolisme aérobie, générant normalement de faibles niveaux de radicaux libres d'oxygène. Ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) jouent des rôles importants dans des processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose, ainsi que dans les réponses immunitaires. Cependant, des niveaux élevés de stress oxydatif surviennent en raison de demandes métaboliques accrues et de l'exposition à des sources externes telles que les rayonnements ultraviolets, la pollution, la fumée de tabac, les micro-organismes et les xénobiotiques **(Trouba et al., 2002)**. Malgré la présence de systèmes antioxydants dans la peau, ceux-ci peuvent être submergés lorsque la génération d'ERO est excessive. Ce déséquilibre oxydatif conduit à des dommages cellulaires, notamment la peroxydation lipidique, les dommages à

l'ADN et l'oxydation des protéines **(Gordon & Brieva, 2012)**. Une production incontrôlée d'ERO joue un rôle significatif dans diverses maladies cutanées, y compris le cancer de la peau.

2 Implication du stress oxydant dans le cancer :

Au sein du processus métabolique cellulaire, l'oxygène engendre la formation de composés nuisibles pour notre organisme, connus sous le nom d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Ces substances sont chimiquement instables et manifestent une grande réactivité, comprenant des éléments tels que l'anion superoxyde (O2•−), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxy-nitrite (ONOO-), le radical hydroxyle (HO●), et le monoxyde d'azote (NO●) **(Barouki, 2006)**. En conditions normales, une petite quantité de radicaux libres est générée principalement au niveau mitochondrial lors de la conversion de l'oxygène en eau pendant la respiration cellulaire. Le radical superoxyde (O2•−) ainsi produit, est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une forme plus stable, grâce à l'action de la superoxyde dismutase (SOD). Ensuite, il est transformé en une substance non toxique, l'eau, soit par la catalase (CAT), soit par la glutathion peroxydase (GPx) **(Turrens, 1997)**. On appelle ceci le système antioxydant **(figure14)**.

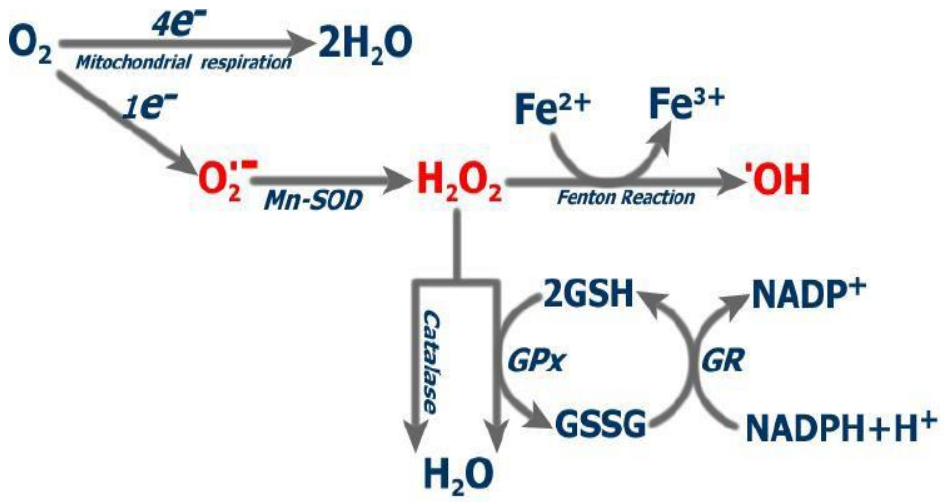


Figure 14: Production et neutralisation des ERO. SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; GR : glutathion réductase **(Valle et al., 2010).**

Des espèces réactives (ER) se forment dans le corps et agissent comme des agents oxydants, pouvant endommager l'ADN et d'autres biomolécules. Une augmentation de la formation d'ER peut favoriser le développement tumoral, ce qui pourrait expliquer le risque accru de cancer chez les personnes âgées. la diminution d'enzymes de défense antioxydantes accroît les dommages oxydatifs et favorise le cancer lié à l'âge **(Halliwell, 2006)**.

3 Implication de la protéine p53 :

Le gène TP53 code pour la protéine suppresseur de tumeur p53, souvent appelée le "Gardien du Génome". Sa fonction principale consiste à protéger l'intégrité de l'ADN cellulaire, tout en jouant des rôles additionnels dans le développement, le vieillissement et la différenciation cellulaire **(Borrero & El-Deiry, 2021).**

La protéine p53 joue un rôle complexe en réponse au stress **(Figure 15)**. **(a)** En l'absence de stress ou après un stress léger, des niveaux bas de p53 favorisent l'expression de gènes codant pour des protéines antioxydantes, réduisant ainsi les espèces réactives (ER) et facilitant la réparation de l'ADN. **(b)** Cependant, une activation plus importante de p53 en réponse à un stress sévère peut conduire à la formation accrue d'ER, contribuant à la sénescence cellulaire ou à la mort, ce qui peut jouer un rôle dans la suppression des tumeurs.
(c) La perte ultérieure de la fonction de p53 au cours de la malignité augmente les niveaux d'ER, endommage l'ADN, et peut augmenter le taux de mutation, entraînant finalement le développement du cancer en raison de l'incapacité à déclencher l'apoptose en réponse aux altérations oncogéniques **(Halliwell, 2006).**

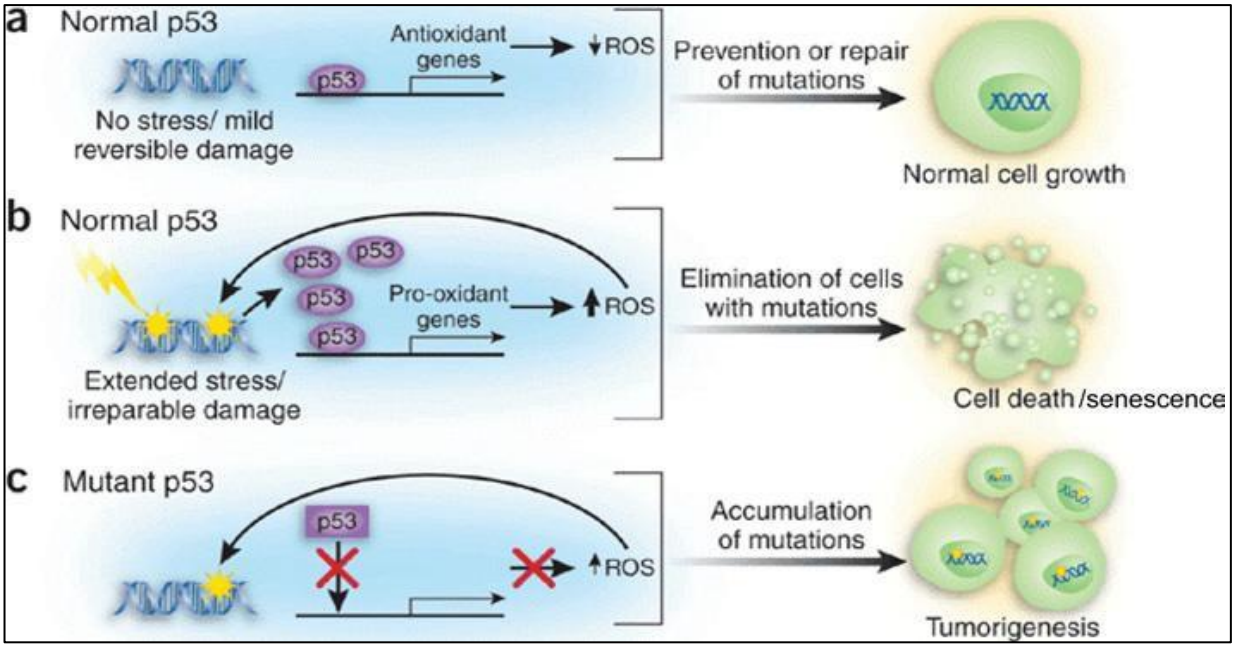


Figure 15: La protéine p53 exerce des fonctions à la fois de promotion et d'inhibition des processus oxydatifs. *(Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Medicine [40], copyright 2005 (http://www.nature.com/nm), by courtesy of Dr Karim Bensaad and Dr Karen Vousden).*

4 Le stress oxydatif et le cancer de la peau

Le cancer de la peau non mélanique (NMSC) est influencé par des facteurs environnementaux, des caractéristiques phénotypiques et des éléments génétiques qui favorisent le stress oxydatif cutané. L'exposition aux rayonnements ultraviolets (UVA et UVB), constitue le principal facteur de risque, provoquant des dommages dans l'ADN. Ces altérations néfastes non réparées peuvent provoquer des modifications progressives dans les gènes, incluant les gènes suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes, conduisant ultimement à la formation de tumeurs **(Choi et al., 2002; Karampinis et al., 2023)**. Concernant le carcinome basocellulaire (CBC), l'exposition aux rayonnements ultraviolets et au stress oxydatif, par exemple, favorise des altérations génétiques dans le gène PTCH **(NEAGU et al., 2016),** qui code pour la protéine transmembranaire PTCH. Ces altérations conduisent à une activation anormale de la voie de signalisation hedgehog, jouant ainsi un rôle important dans le processus de développement du CBC **(Karampinis et al., 2023).**

De plus, les dommages à l'ADN causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) déclenchent la production de cytokines immunosuppressives et une suppression immunitaire,

favorisant ainsi le développement du cancer de la peau **(figure 16)**, Les effets des ERO entraînent une physiologie cellulaire anormale, favorisant une augmentation des ERO, telle que l'activité accrue de la Superoxyde Dismutase (SOD). Cela perpétue le cycle des dommages à l'ADN, créant ainsi un potentiel pour le développement d'événements favorables au cancer **(Trouba et al., 2002).**

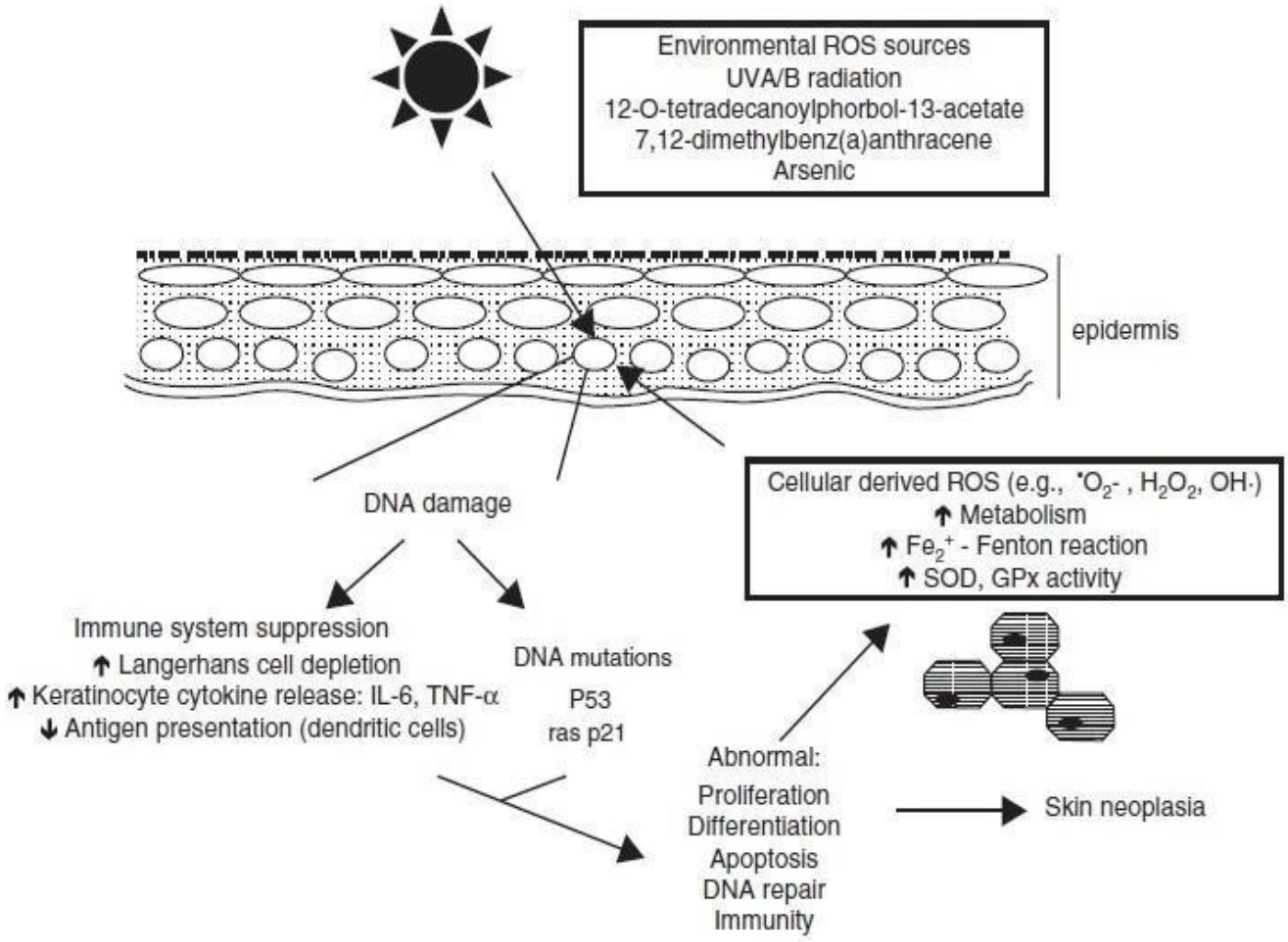


Figure 16: Dommages à l'ADN : un événement central dans le cancer de la peau **(Trouba et al., 2002).**.

On peut conclure l'effet du stress oxydatif dans chaque étape de cancérogenèse comme suit :

4.1 Dans la Phase d'initiation :

Au cours de cette phase, les ERO occasionnent des dommages à l'ADN, notamment des cassures simples ou doubles brins de cette molécule. De plus, ces ERO peuvent provoquer la formation de thymine glycol, qui constitue le principal produit des altérations touchant les résidus de thymidine dans l'AND **(Athar, 2002; Nishigori et al., 2004).**

4.2 Dans la Phase de promotion :

Pendant la phase de promotion, le consensus sur le stress oxydatif en tant que mécanisme de promotion tumorale est largement fondé sur des études sur le cancer de la peau chez la souris. Par exemple, les peroxydes et les générateurs de radicaux libres favorisent la formation de tumeurs cutanées chez la souris, il a été démontré que plusieurs promoteurs de tumeurs généraient des ERO, réduisant ainsi les niveaux de capteurs des ERO et d'antioxydants qui préviennent la croissance des tumeurs **(Bickers & Athar, 2006)**.

4.3 Dans la Phase de progression :

La troisième étape de la carcinogenèse se produit lorsque les papillomes bénins évoluent en tumeurs malignes. Athar et al. ont montré que les souris porteuses de papillomes développaient un nombre accru de carcinomes cutanés lorsqu'elles étaient traitées avec des composés générateurs de radicaux libres, démontrant ainsi que les ERO contribuent à la progression tumorale **(Athar et al., 1989)**.

5 Stratégies antioxydantes dans le cancer :

Bien que des études aient montré l'efficacité des antioxydants dans la prévention et le traitement du cancer, la plupart de ces conclusions proviennent d'expériences in vitro. En pratique in vivo, l'utilisation d'antioxydants n'a souvent pas réussi à inhiber l'initiation et la croissance du cancer, en raison des conditions complexes telles que le type et le stade de la tumeur, la capacité antioxydante endogène de la tumeur, et l'état redox de la niche tumorale. Il existe un débat sur l'utilisation d'antioxydants ou de pro-oxydants dans le traitement du

cancer, car certains médicaments anticancéreux actuels exercent leur cytotoxicité en stimulant la production de radicaux oxygénés. Les stratégies pro-oxydantes reposent sur l'idée que, dans les cellules cancéreuses, la capacité antioxydante est souvent renforcée pour équilibrer la surproduction de radicaux oxygénés due à l'hypoxie et aux stress métaboliques. Cependant, cette augmentation de la capacité antioxydante peut entraîner une résistance à la chimiothérapie, car de nombreux antioxydants ont la capacité de détoxifier les médicaments. Par conséquent, lors de la modification de l'état redox pour prévenir ou traiter le cancer, il est crucial de prendre en considération les caractéristiques redox spécifiques de la tumeur.**(Chaiswing et al., 2018; DeBerardinis & Chandel, 2016; H. Yang et al., 2018; K. Yuan & Zhang, 2021).**

6 Les nouvelles approches utilisées dans le traitement du cancer :

Au cours des dernières décennies, d'importantes percées ont marqué la recherche sur le cancer, ouvrant la voie au déploiement de stratégies novatrices et révolutionnaires dans le traitement de cette pathologie, parmi ces Stratégies on peut citer :

6.1 L'immunothérapie :

Il s'agit de mobiliser les défenses naturelles du patient en exploitant son système immunitaire pour cibler et éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses. En mettant l'accent sur les thérapies ciblant les points de régulation immunitaire, tels que PD-1 et CTLA- 4, on observe un succès remarquable dans le traitement de diverses formes de cancer, notamment le mélanome et le cancer du poumon. **(Borghaei et al., 2015; Hodi et al., 2021).**

6.2 La thérapie cellulaire adoptive :

Elle consiste à extraire les cellules immunitaires du corps du patient, à les modifier pour cibler les cellules cancéreuses, puis à les réinjecter dans le patient **(Bollard & Heslop, 2016; Maude et al., 2014).** Cette technique a montré une réussite remarquable dans le traitement de certains types de cancers du sang, tels que la leucémie et le lymphome.

6.3 Les nanoparticules :

Elles ont également émergé comme une nouvelle approche prometteuse pour le traitement du cancer. Les nanoparticules sont des petites particules qui peuvent être conçues pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et délivrer directement des agents thérapeutiques à ces dernières **(Davis et al., 2008)**. Cette approche a le potentiel de minimiser les effets secondaires associés à la chimiothérapie traditionnelle et d'améliorer l'efficacité du traitement.

6.4 Les thérapies Combinées :

L'utilisation de thérapies combinées, composées de médicaments cytotoxiques standard et de nouvelles petites molécules ciblant la p53 et les voies de signalisation connexes, peuvent être une approche clé potentielle pour lutter contre le cancer **(Wu et al., 2020).** Par ailleurs, l'émergence d'aptamères, définis comme des molécules d'ADN, d'ARN ou de peptides sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement à des cibles biologiques, est promue comme une approche novatrice dans le traitement des types de cancer résistants aux thérapies conventionnelles **(Shigdar et al., 2021).**

7 Approches thérapeutiques traditionnelles :

7.1 Chimiothérapie :

La chimiothérapie est une méthode de traitement largement utilisée dans la gestion du cancer, impliquant diverses approches et applications. Elle constitue un traitement systémique pouvant être administré en tant que traitement initial (ou inductif), en tant que traitement adjuvant après une intervention chirurgicale définitive et/ou une radiothérapie, et de manière concomitante avec la radiothérapie définitive et adjuvante **(Adelstein, 2003).** La chimiothérapie vise à entraver la croissance des cellules cancéreuses, que ce soit en les éliminant ou en les empêchant de se diviser.

Pour le carcinome basocellulaire, le carcinome épidermoïde de la peau, et la kératose actinique, la chimiothérapie adopte généralement une forme topique, consistant à appliquer les médicaments directement sur la peau sous forme de crème ou de lotion. Le fluorouracile

topique (5-FU) est ainsi employé pour traiter le carcinome basocellulaire **(PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002).**

En raison de l'incidence croissante du cancer de la peau et des problèmes de résistance à la chimiothérapie, il a été nécessaire de mettre au point des composés synthétiques innovants. Dans l'étude de **(Chaube et al., 2016)** ils ont pu identifier Cinq molécules dérivées de la pyrimidine, efficaces contre le cancer cutané, en utilisant des modèles pharmacophores et des études in silico. Où quatre molécules se sont révélées efficaces in vitro, notamment contre les cellules du cancer de la peau. Ce composé appelé **6h**, a démontré une action favorable lors d'une étude in vivo avec le modèle de cancer de la peau induit par le DMBA**.**

Les inconvénients liés à la chimiothérapie sont nombreux et ont été minutieusement examinés dans le cadre du traitement contre le cancer. L'absence de sélectivité de la chimiothérapie, agissant sur les cellules tumorales et les cellules normales qui se multiplient rapidement, entraîne divers effets secondaires tels que la toxicité orale, la mucosité et des problèmes gastro-intestinaux **(Chaveli-López, 2014).** Les répercussions des effets secondaires de la chimiothérapie sont fréquentes, persistent tout au long du traitement et peuvent être graves, impactant le bien-être et la qualité de vie des patients **(Pearce et al., 2017).**

7.2 Radiothérapie :

La radiothérapie constitue une méthode de traitement fréquemment utilisée pour divers types de cancer, y compris le cancer de la peau. On estime qu'au moins la moitié de tous les patients atteints de cancer dans les pays développés recevront une radiothérapie à un moment donné de leur maladie. Cependant, un nombre important de patients peuvent développer des réactions cutanées induites par les radiations à la suite de ce traitement **(Porock & KristJanson, 1999).** Ces réactions cutanées incluent la radio-dermatite **(figure 17)**, l'hyperpigmentation et l'irritation, pouvant avoir un impact significatif sur la qualité de vie des personnes atteintes de cancer **(Chu et al., 2021).** De plus, des études ont montré que la radiothérapie prédispose les individus au développement ultérieur de cancers de la peau primaires, principalement non mélanique, dans la zone irradiée **(Hoyt & Cohen, 2014).**

Figure 17: : Radiodermatite chronique avec une atrophie cutanée marquée et de nombreuses télangiectasies **(Hernández Aragüés et al., 2017)**.

Dans le cadre du cancer de la peau, l'utilisation de la radiothérapie est reconnue comme une méthode essentielle de traitement, surtout dans le cas des cancers cutanés non mélanique **(Veness & Richards, 2003)**. Néanmoins, il est impératif de gérer attentivement les éventuelles complications de la radiothérapie, telles que le RIPR **(**Réaction inflammatoire post-radiation), afin d'assurer le bien-être des patients **(J. Liu et al., 2022).**

7.3 Immunothérapie :

7.3.1 Fondements de l'Immunothérapie :

L'immunothérapie dans le contexte des cancers vise à stimuler le système immunitaire avec des médicaments pour cibler les cellules cancéreuses. Principalement utilisée pour les mélanomes, elle s'étend aux cancers de la peau non mélanique. L'immunité joue un rôle crucial dans la défense contre le cancer, cependant, elle peut être entravée par diverses limitations telles que la reconnaissance inefficace des cellules cancéreuses ou la fragilité de la réponse immunitaire en elle-même **(Anjali & Kaliyadan, 2022).**

Des études ont mis en lumière le potentiel des nanomodulateurs et nanocapteurs fonctionnalisés pour améliorer l'immunothéranostique du cancer de la peau et la médecine de précision, ouvrant de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies immunothérapeutiques ciblées **(Farhana, 2023**).

Le développement d'un vaccin contre le cancer de la peau, axé sur l'immunothérapie, explore des formulations innovantes, telles que l'utilisation de nanoparticules comme les liposomes, pour administrer efficacement les composants du vaccin aux cellules dendritiques de la peau. Ces avancées mettent en lumière le potentiel de la vaccination transcutanée dans le traitement du cancer cutané. **(J. Liu et al., 2022; Saliba et al., 2017).**

7.3.2 Immunostimulants Naturels :

Les immunostimulants d'origine naturelle **(tableau 2)** suscitent un intérêt croissant en raison de leur potentiel dans le traitement du cancer de la peau. L'exploitation d'immunostimulants issus de sources naturelles, comme les polysaccharides d'algues et les polysaccharides de baies de ginseng, montre des résultats prometteurs dans le renforcement de l'immunité non spécifique pour lutter contre les maladies **(Dong et al., 2022; Lee et al., 2019)**.

Tableau 2: Composés bioactifs issus de champignons présentant une activité anticancéreuse (Ayeka, 2018).

CHAMPIGNON	Cancer	Conunon naine	Composé/extrait
AGARICUS BISPORE	Sein, colorectal	Bouton blanc	Polysaccharides, lectine
GANODERMA LUCIDUM	Sein, colorectal, cervical, prostate, foie et poumon	Lingzhi/reishi	*Ganoderme*polysaccharides ,peptides polysaccharides
CORIOL VERSICOLOR	Sein, colorectal etpeau	Yun Zhi	Krestin, PSK, PSP
LEN'TIIVUS ÉDODES	Cervicale/ovarienne, gastrique et	Shiitake	Lentinane
GRIFOLA FROIVDOS	Poitrine et vessie	Maitake	Grifolan, fraction D de Maitake
AGARICUS BLAZEI	Leucémie, hématologique, estomac et poumon	brésilien	*Aga•icus*polysaccharides
P. ***TUBERCULE-RÉGIUM***	Foie	Tubercule royal	Pleurane
FLAMMULLVA VÉLUTIPES	Peau	\\Tinter	Flammuline

Chapitre 3 : traitements préventifs expérimentaux contre le cancer

1 Le Dichloroacétate (DCA) :

1.1 Structure :

L'acide Dichloroacétique, également appelé DCA ou Dichloroacétate, est un analogue acide de l'acide acétique. Sa formule chimique est $CHCl_2COOH$, avec une formule moléculaire $C_2H_2Cl_2O_2$ et une masse molaire de 128,94 g/mol. Il se présente sous forme d'un solide cristallin incolore ayant une forte odeur, son point de fusion est de 9,44 °C **(« Dichloroacetic Acid Formula », 2020).**

1.2 Mécanisme d'action :

Le DCA est un modulateur métabolique, dans la recherche contre le cancer il a été examiné en tant qu'inhibiteur de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), enzyme inhibant la pyruvate déshydrogénase (PDH). Il aurait ainsi la capacité d'inverser l'effet Warburg, une modification métabolique observée chez les cellules cancéreuses **(figure 18) (Gang et al., 2014).** En inhibant la PDK, le DCA relance la voie de la phosphorylation oxydative et inhibe la voie lactique (LDH). L'efficacité potentielle du DCA dans le traitement du cancer provient des propriétés métaboliques des cellules cancéreuses, généralement caractérisées par une activité glycolytique accrue et une oxydation mitochondriale réduite, quelle que soit la disponibilité en oxygène. Le lactate dérivé de la glycolyse est absorbé par les cellules environnantes pour soutenir la croissance tumorale et inhibe l'apoptose. En revanche, le pyruvate dans les mitochondries provoque un remodelage des organelles entraînant un afflux accru de cytochrome c et d'autres facteurs induisant l'apoptose et une régulation positive des niveaux de ERO avec une réduction conséquente de la viabilité des cellules cancéreuses **(Tataranni & Piccoli, 2019).**

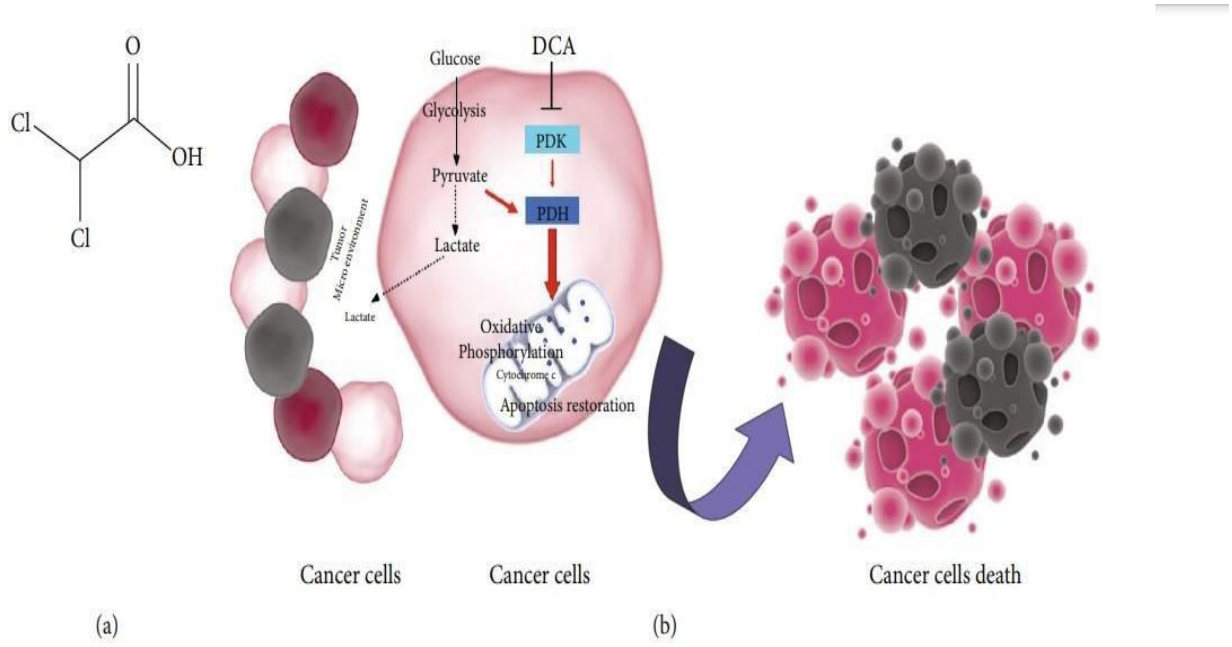


Figure 18: Structure et mécanisme d'action du DCA. **(a)** Structure chimique du DCA. **(b)** Mécanisme d'action du DCA : Lignes pointillées noires, processus biochimiques inhibés par le DCA ; Flèches rouges, voies métaboliques activées par le DCA **(Tataranni & Piccoli, 2019).**

1.3 DCA et cancer de la peau :

Les effets anticancéreux du DCA ont surtout été démontrés dans le cancer colorectal **(Lan et al., 2019).** Cancer du pancreas **(Tataranni et al., 2019)**. Carcinome rénal à cellules claires (**Kinnaird et al., 2016).** Cependant, il est important de noter que même si le DCA semble prometteur en tant qu'agent anticancéreux, son utilisation clinique efficace en thérapie anticancéreuse demeure restreinte aux essais cliniques **(Tataranni & Piccoli, 2019).** Y compris dans le cas de cancer de la peau **(Leclerc et al., 2017).** Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement les implications cliniques et les effets indésirables potentiels du DCA dans le traitement du cancer.

1.4 Effets secondaires et toxicité :

L'acide Dichloroacétique (DCA) est un composé toxique largement documenté, en particulier en ce qui concerne ses effets sur divers organes et systèmes. Des recherches ont démontré que le DCA peut provoquer une toxicité développementale chez des espèces de poissons, comme le poisson-zèbre, et est lié à des effets indésirables sur le foie, les reins, le système nerveux, les testicules et les yeux **(Hassoun et al., 2005; F. Williams et al., 2006)**. De plus, le DCA aurait des effets spécifiques au genre, les souris mâles étant plus sensibles à sa toxicité par rapport aux souris femelles **(Y. Zhang et al., 2011)**. Il est cependant essentiel de noter que le traitement au DCA n'a été associé à aucune preuve de toxicité hématologique, hépatique, rénale ou cardiaque sévère dans des rapports précliniques et cliniques **(Al-Azawi et al., 2021; Khan et al., 2016).** Néanmoins, il est crucial de prendre en considération les possibles effets secondaires, car le DCA a été lié à la carcinogenèse hépatique chez certaines souches de rongeurs lorsqu'il est administré à des doses élevées **(Stacpoole et al., 2008).**

2 Les Immunostimulants :

2.1 Les Beta-glucanes :

Les β-glucanes sont des polysaccharides naturels composés de monomères de D- glucose liés par une liaison β-glycosidique **(figure 19)**. Ils constituent des éléments structurels essentiels de la paroi cellulaire et servent de réserves d'énergie chez divers organismes tels que les bactéries, les champignons, les levures, les algues et les plantes. Notablement absents des tissus des vertébrés et des invertébrés, les β-glucanes jouent un rôle significatif dans la biologie cellulaire et la physiologie de ces organismes **(Stier et al., 2014; Vetvicka & Vetvickova, 2011; Zeković et al., 2005).**

La recherche sur les β-glucanes a débuté dans les années cinquante du siècle précédent avec la découverte de l'effet immunomodulateur d'une fraction insoluble de levure. Plus tard, il a été établi que l'activité immunologique de cette fraction provient des β-(1,3)-D-glucanes **(Stier et al., 2014).** Les β-glucanes provenant de champignons et de levures, caractérisés par un squelette composée de liaisons (1,3)-β accompagné de quelques ramifications liées par

une liaison (1,6)-β, sont principalement identifiés pour leurs propriétés immunomodulatrices. Cela se traduit par des activités antitumorale, l'antibactérien, l'antiviral, l'anticoagulant, et la promotion de la cicatrisation des plaies **(Bohn & BeMiller, 1995).**

La paroi cellulaire des levures telles que Saccharomyces cerevisiae renferme deux types de β-glucanes. Dans le cas de cette levure en particulier, le β-(1,3)-glucane ramifié représente environ 50 à 55%, tandis que le β-(1,6)-glucane constitue de 10 à 15% de l'ensemble des polysaccharides de la paroi cellulaire. Chaque chaîne de cette paroi peut s'étendre jusqu'à 140 à 350 résidus de glucose en longueur. La proportion de résidus de glucose ramifiés en position 3,6 varie selon les espèces de levures, avec des pourcentages de 7%, 15%, et 75% respectivement pour S. cerevisiae, Candida albicans, et Schizosaccharomyces pombe **(Aimanianda et al., 2009; Lesage & Bussey, 2006).**

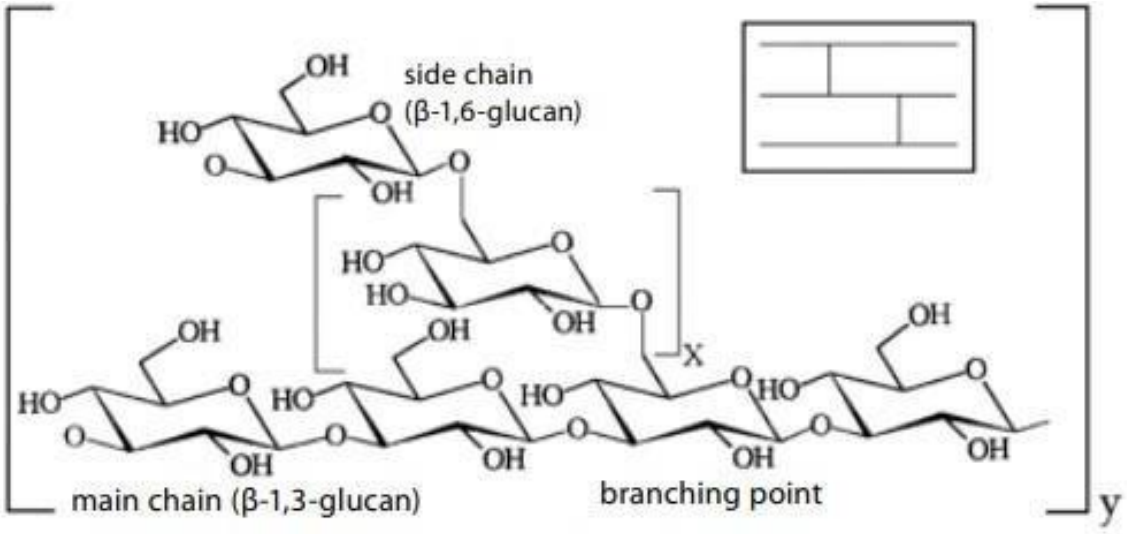


Figure 19: Structure chimique du β-glucane dans la levure Saccharomyces cerevisiae

(Kath & Kulicke, 1999).

2.2 L' Arabinogalactane :

L'arabinogalactane de mélèze, un polysaccharide présent dans le bois de mélèze, a été étudié pour ses effets sur le système immunitaire. Les recherches indiquent qu'il renforce les cellules tueuses naturelles, les macrophages, et favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires **(Dion et al., 2016)**. De plus, il a été observé qu'il augmente la réponse en anticorps au vaccin contre la pneumonie, suggérant un potentiel renforcement de la fonction immunitaire **(Udani et al., 2010)**.

2.3 Lentinula edodes (Shiitake) :

Le lentinane extrait du shiitake **(figure 20)** est un β-glucane qui a été signalé comme un polysaccharide antitumoral grâce à l'amélioration du système immunitaire de l'hôte **(Ahn et al., 2017).** En plus, Le mycélium de Lentinula edodes a été identifié comme renfermant un sélénopolysaccharide novateur qui impacte l'activation des lymphocytes T humains et la production de cytokines **(Roszczyk et al., 2022).**

Figure 20: Champignons Shiitake (Lentinula edodes) **(*Shiitake Mushroom - A Comprehensive Guide*, 2022).**

2.4 Grifola frondosa (Maitake) :

Le Maitake, un champignon apprécié au Japon, est associé à une fraction appelée MD, un glucane bêta (1,3)(1,6) hautement purifié et soluble dérivé du G. frondosa. Cette fraction a démontré une activité antitumorale en stimulant le système immunitaire de l'hôte, activant notamment les macrophages, les cellules dendritiques (DCs) et les cellules tueuses naturelles (NK). Ces actions favorisent une réponse immunitaire de type Th-1 **(Masuda et al., 2008, 2009; Nanba et al., 1987).**

Le champignon Maitake (Grifola frondosa) a été l'objet d'études approfondies en raison de ses potentiels bienfaits pour la santé. Des recherches ont démontré que les extraits de Maitake activent les cellules tueuses naturelles et les cellules dendritiques, renforçant ainsi l'immunité antitumorale chez les souris **(Tsao et al., 2013)**. En outre, on a observé que le β-glucane soluble issu du Maitake induit la régression tumorale en collaboration avec un

agoniste de TLR9 par le biais de l'immunité médiée par les cellules dendritiques (Masuda et al., 2015). De plus, le Maitake a démontré une activité anticancéreuse et des effets préventifs dans un modèle expérimental de carcinogenèse mammaire chez la souris **(Braico et al., 2017).** En parallèle, le Maitake a été étudié pour ses propriétés antioxydantes et ses composés aromatiques volatils **(Aydın et al., 2021).**

2.5 Ganoderma lucidum (Reishi) :

Le Reichi **(figure 21)**, également connu sous les noms de "Ling Zhi" et "Mannentake", est un champignon médicinal puissant reconnu depuis des centaines voire des milliers d'années. Il est associé à des propriétés bénéfiques pour la santé, la guérison, la longévité, la connaissance et le bonheur. Utilisé comme "champignon de l'immortalité" en Asie depuis 2000 ans, le Ganoderma lucidum a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son potentiel thérapeutique. Ses composés bioactifs, tels que les triterpénoïdes, les polysaccharides, les nucléotides, les stérols, les acides gras et les protéines, présentent divers effets pharmacologiques, notamment : l'immunomodulation, anti-athérosclérose, anti-inflammatoire, analgésique, chimioprévention, anticacérigène, améliore l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie promotion du sommeil, antibactérien et antiviral **(Sanodiya et al., 2009; Suárez-Arroyo et al., 2022; Wasson, 1968).**

Figure 21: Le champignon lingzhi (Ganoderm\a lucidum) **(Wachtel-Galor et al., 2011).**

Les effets thérapeutiques Anti-Cancéreux, Antitumoral, Chimio et Radio Préventifs de Ganoderma lucidum sont due au D-glucanes, hétéropolysaccharides, glycoprotéines,

lanostanoid et a un stéroïde **(Sanodiya et al., 2009)**. Les polysaccharides biologiquement actifs présents dans G. lucidum sont principalement les β-D-glucanes **(figure 22)**, ont montré une activité antitumorale, en particulier grâce aux β-D-glucanes ramifiés (1→3) **(Slíva, 2003).**

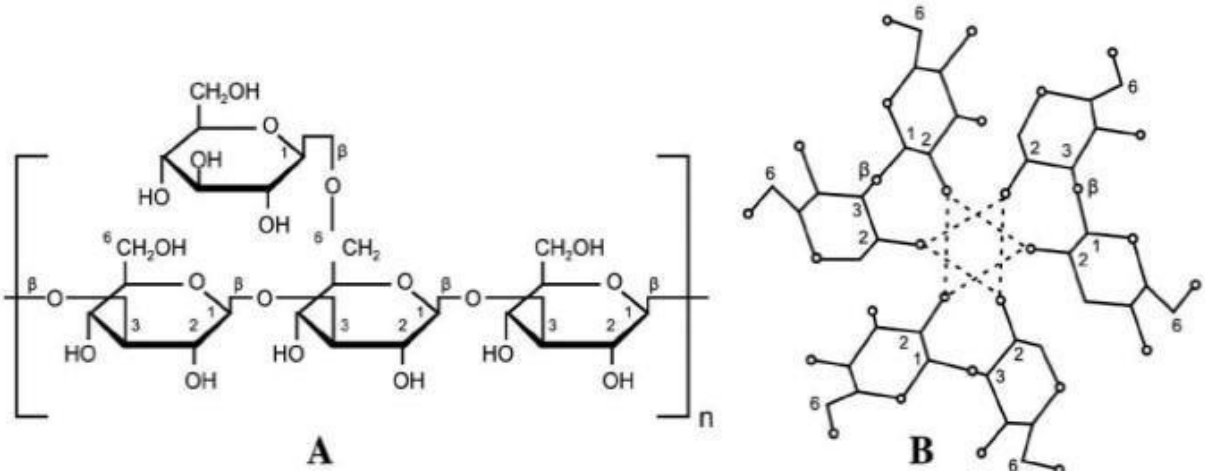


Figure 22: Structure des β-D-glucanes de Ganoderma lucidum, A, Diagramme moléculaire primaire ; B, Diagramme moléculaire de niveau supérieur **(Sanodiya et al., 2009)**.

2.6 Mécanismes d'action des β-glucanes :

Les bêta-glucanes, des glucides naturels, sont reconnus pour leur capacité à moduler le système immunitaire, bien que les mécanismes précis de leur action restent largement inconnus **(Tsoni & Brown, 2008)**. Ces composés activent les cellules immunitaires innées telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les granulocytes et les cellules tueuses naturelles (NK), induisant la sécrétion de cytokines qui inhibent la prolifération et favorisent l'apoptose des cellules tumorales **(Susanti et al., 2018 ; Yoon & Koppula, 2013)**. Les β- glucanes sont capturés par les macrophages via le récepteur Dectin-1, indépendamment de la présence de TLR-2/6 **(figure 23)**. Ces grosses molécules de β-glucanes sont internalisées et fragmentées en morceaux plus petits à l'intérieur des macrophages. Une fois libérées, les fragments plus petits de β-glucanes sont ensuite absorbés par les granulocytes, monocytes ou macrophages circulants via le récepteur du complément (CR)-3. Les granulocytes contenant des β-glucanes fluorescentes liées au CR3 ont été montrés capables de détruire les cellules tumorales inactivées opsonisées par le complément 3b (iC3b) après avoir été attirés vers un

site d'activation du complément, comme les cellules tumorales revêtues d'un anticorps monoclonal **(Chan et al., 2009; Hong et al., 2004).**

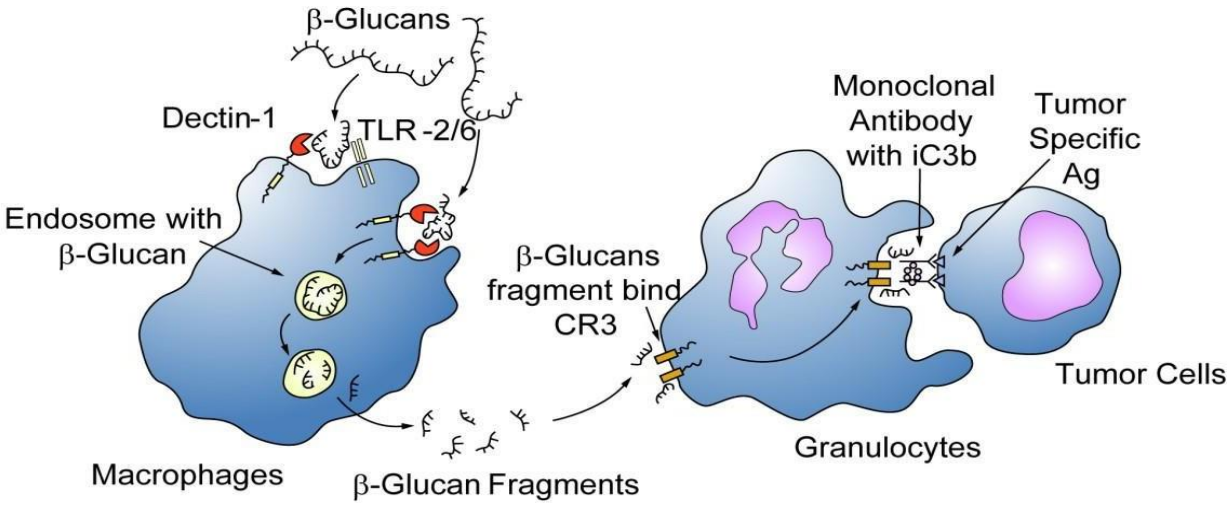


Figure 23: L'absorption et les actions ultérieures du β-glucane sur les cellules immunitaires **(Chan et al., 2009).**.

De plus, les β-glucanes réduisent l'activation plaquettaire, présentent des propriétés antioxydantes et sont liés à la régulation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire **(Błaszczyk et al., 2018; Saluk-Juszczak et al., 2010).** En outre, les bêta-glucanes montrent un potentiel à améliorer la réponse glycémique et à moduler la microbiote intestinale **(Telle-Hansen et al., 2022).**

Le β-glucane exerce une fonction sur le système immunitaire inné et adaptatif en se liant à divers récepteurs membranaires sur les cellules immunitaires **(figure 24)**. **a** initialement la liaison des β-glucanes se fait via déctine-1, les récepteurs de type Toll (TLRs) et le récepteur du complément 3 (CR3). Cette interaction active plusieurs voies de signalisation qui conduisent à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL- 12, l'IL-1, l'IL-6 et le TNFα, ainsi qu'à l'expression de molécules co-stimulatrices comme le B7.1 et le B7.2, présent sur les macrophages et les cellules dendritiques, Ces cytokines et molécules co-stimulatrices stimulent les lymphocytes T (TH et TC), les activant. Les lymphocytes TC libèrent ensuite des substances cytotoxiques telles que la perforine et la granzyme, favorisant la destruction des cellules tumorales. **b** le β-glucane se lie au CR3 sur les cellules tueuses naturelles (NK), les activant également. Les NK, stimulées par le β-

glucane, libèrent la perforine et la granzyme, leur permettant de tuer directement les cellules tumorales. (TH : lymphocytes T auxiliaires, TC : lymphocytes T cytotoxiques) **(Roudi et al., 2017).**

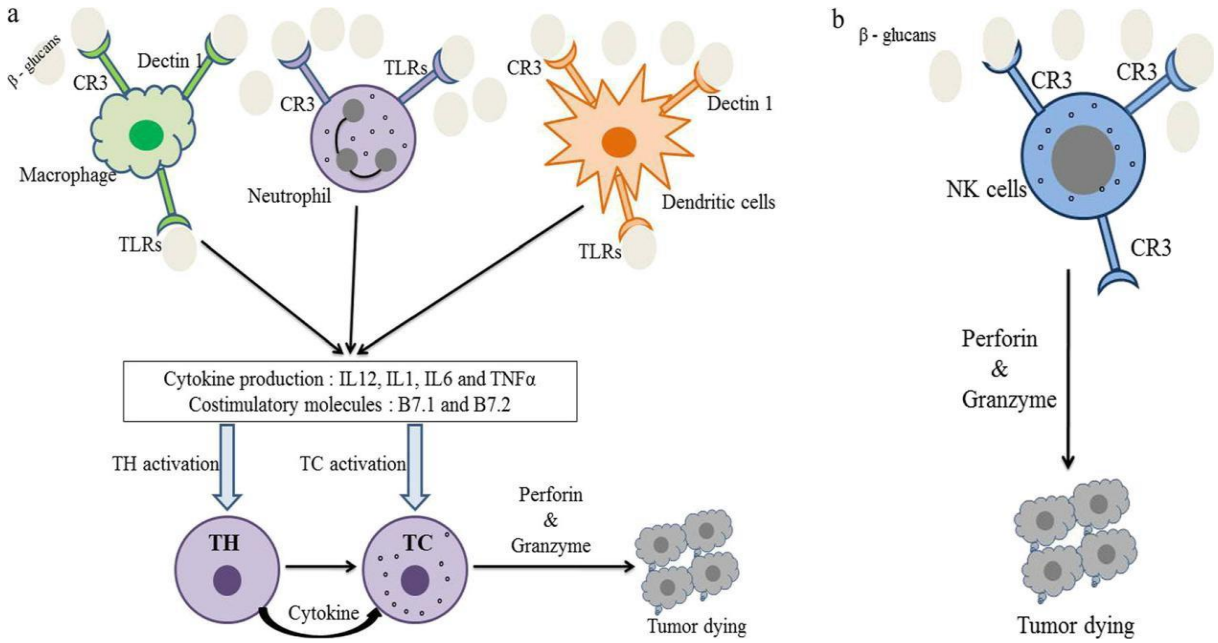


Figure 24: Fonction du β-glucan sur le système immunitaire inné et adaptatif **(Roudi et al., 2017).**

.

3 La Phytothérapie :

3.1 Annona muricata (Graviola) :

Annona muricata, également connue sous les noms de Graviola, Corossol ou Guanabana, est une plante tropicale à feuilles, à verdure persistantes produisant un fruit vert épineux à la pulpe blanche sub-acide **(figure 25)**. On l'utilise dans la préparation de jus frais, de sorbets, ou comme fruit de dessert **(Campbell, 1985; F.-R. Chang & Wu, 2001; Janick & Paull, 2008)**. Il est largement reconnu comme un remède éthnomédicinal accepté pour divers maux en raison de ses propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antidépressives et de sa capacité à abaisser la pression artérielle, ainsi que pour sa "cytotoxicité sélective". De plus, le fruit est consommé avec la conviction culturelle et folklorique qu'il possède des propriétés anti- cancéreuses **(de Sousa et al., 2010).**

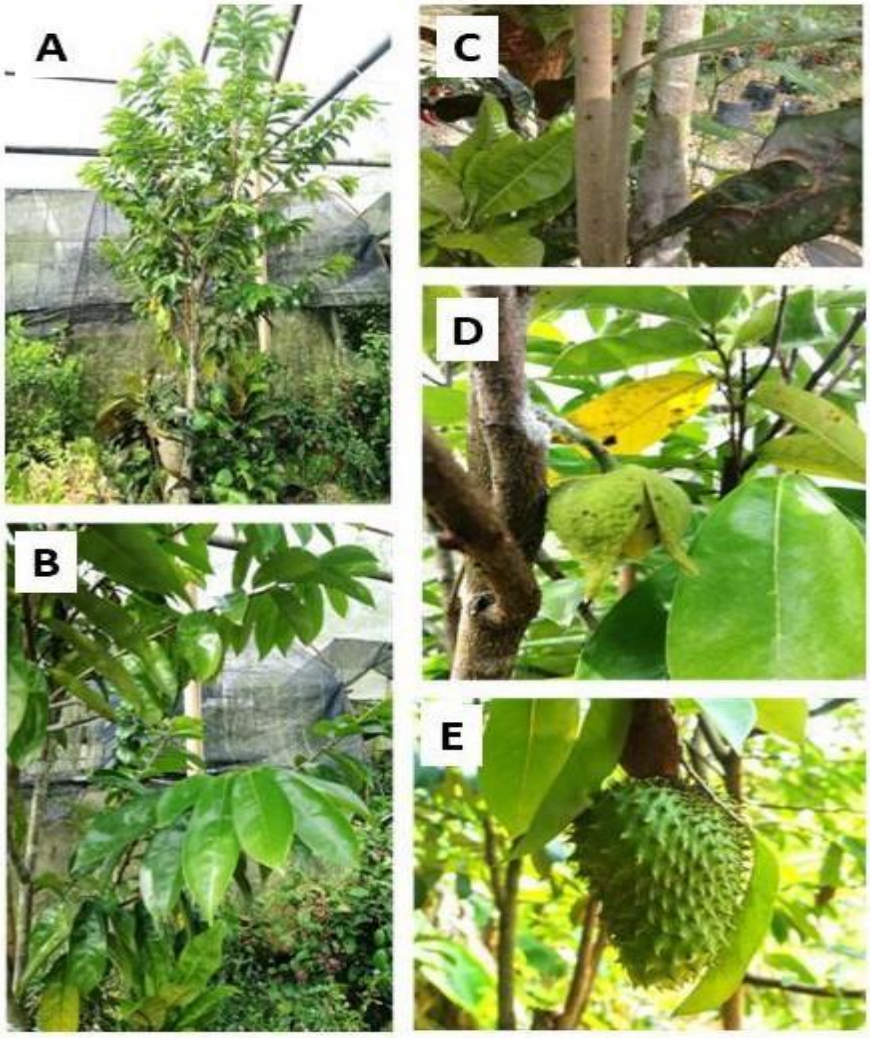


Figure 25: le Graviola : Plante entière **(A),** feuilles **(B),** tige **(C),** fleur **(D)** et fruit **(E)** d'A. muricata Linn **(Zubaidi, Mohd Nani, et al., 2023).**

A. muricata a fait l'objet d'études phytochimiques approfondies en raison de ses propriétés médicinales potentielles. L'analyse phytochimique a révélé que les Acétogénines annonacées sont les principaux constituants de A. muricata **(Moghadamtousi et al., 2015)**. Aussi, les flavonoïdes et les alcaloïdes isoquinoléiniques ont été identifiés dans cette plante, démontrant des effets anti-inflammatoires, antioxydants et anticancéreux **(Wahab et al., 2018; C. Yang et al., 2015)**. Plusieurs extraits de feuilles d'A. muricata ont montré une forte activité inhibitrice de la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires in vitro **(Grijaldo et al., 2023)**. L'extrait de feuilles n-butanoliques de A. muricata, riche en composés phénoliques, a montré un potentiel antinéoplasique significatif **(George et al., 2012)**. Des alcaloïdes provenant des racines ont démontré des propriétés antinéoplasiques et

antipaludiques **(Nugraha et al., 2019)**. De plus, les feuilles de A. muricata ont une activité antioxydante attribuée à leur composition phytochimique **(Orak et al., 2019; Qorina et al., 2019).**

A. muricata présente des propriétés pharmacologiques dans différentes parties de la plante, telles que les feuilles, les fruits, les graines, l'écorce et les racines **(figure 26)**.

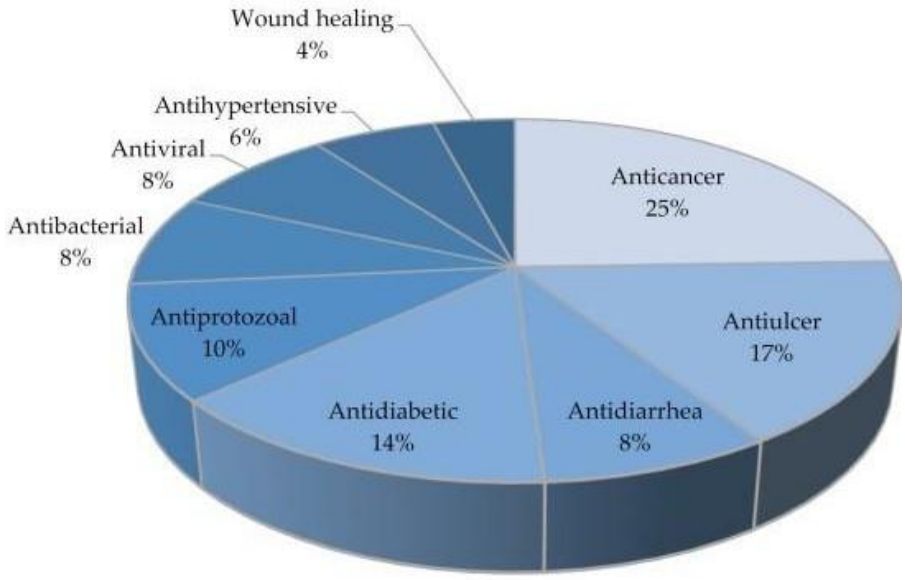


Figure 26: Répartition des activités pharmacologiques de A. muricata **(Mutakin et al., 2022).**

3.2 Les Acétogenines (AGGs) :

La plupart des Acétogénines annonacées présentent entre un et trois cycles THF (tétrahydrofuranne), avec un ou deux groupes hydroxyle flanquant le centre d'un acide gras en C32/34. De plus, l'acide carboxylique terminal se combine à une unité de 2-propanol pour former une γ-lactone α,β-insaturée **(**figure 27) **(Kojima & Tanaka, 2009).**

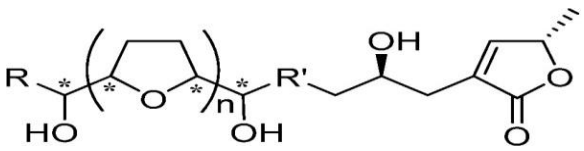


Figure 27: Structure représentative des Acétogénines annonacées **(Kojima & Tanaka, 2009).**

La classe des Acétogénines annonacées à une large gamme de propriétés biologiques, comprenant des activités anticancéreuses, anti-infectieuses, immunosuppressives, pesticide et répulsif alimentaire pour insectes et parasites **(Takahashi et al., 2008).**

Plusieurs études ont souligné la capacité des Acétogénines à agir comme composés bioactifs ayant des propriétés médicinales importantes, surtout dans le domaine du traitement du cancer **(Bridgemohan et al., 2015; F.-R. Chang & Wu, 2001; Hamada et al., 2004).**

Ces polykétides agissent comme des inhibiteurs du complexe I dans la chaîne respiratoire des cellules tumorales soit la NADH: ubiquinone oxydoréductase de la chaîne respiratoire mitochondriale, Cette inhibition du complexe I entraîne une perturbation de la fonction mitochondriale et une privation d'ATP, des éléments cruciaux pour la survie des cellules cancéreuses influençant ainsi le métabolisme tumoral, la mort cellulaire, l'apoptose et l'autophagie. D'où ces substances se sont révélées être fortement cytotoxiques envers les cellules cancéreuses **(Cecil & Brown, 2002; Hernandez-Fuentes et al., 2019; Jacobo-Herrera et al., 2019; Y. Liu et al., 2012).**

Le cycle tétrahydrofurane (THF) mono ou bis, accompagné de deux groupes hydroxyles ou plus, est suggéré comme le groupe fonctionnel responsable de leur activité antinéoplasique. Leur structure bis-THF est responsable de leur activité biologique principale ainsi que Des études ont démontré que les AGGs mono-THF, agissent comme des inhibiteurs non compétitifs du complexe I dans la chaîne respiratoire, La bioactivité polyvalente des AGGs les positionne comme des agents thérapeutiques potentiels pour le traitement du cancer **(Jacobo-Herrera et al., 2019).**

Plus de 500 AGGs ont été répertoriées. Ils ont manifesté une activité cytotoxique contre diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines, notamment celles du poumon, du sein, du côlon, du rein, du pancréas, de la prostate, du foie et de la vessie **(Jacobo-Herrera et al., 2019; F. Yuan et al., 2015)**.

Les Acétogénines provoquent aussi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 déclenchant ainsi l'apoptose médiée par les mitochondries **(figure 28)**. Ils stimulent la formation des ERO et la protéine pro-apoptotique Bax, tout en inhibant la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Ces actions altèrent le potentiel membranaire mitochondrial, entraînant la libération de cytochrome c. Ce dernier active les apoptosomes, amorçant la cascade caspase intrinsèque et induisant la fragmentation de l'ADN, conduisant finalement à l'apoptose **(Gavamukulya et al., 2017; Mutakin et al., 2022; Zubaidi, Mohd Nani, et al., 2023).**

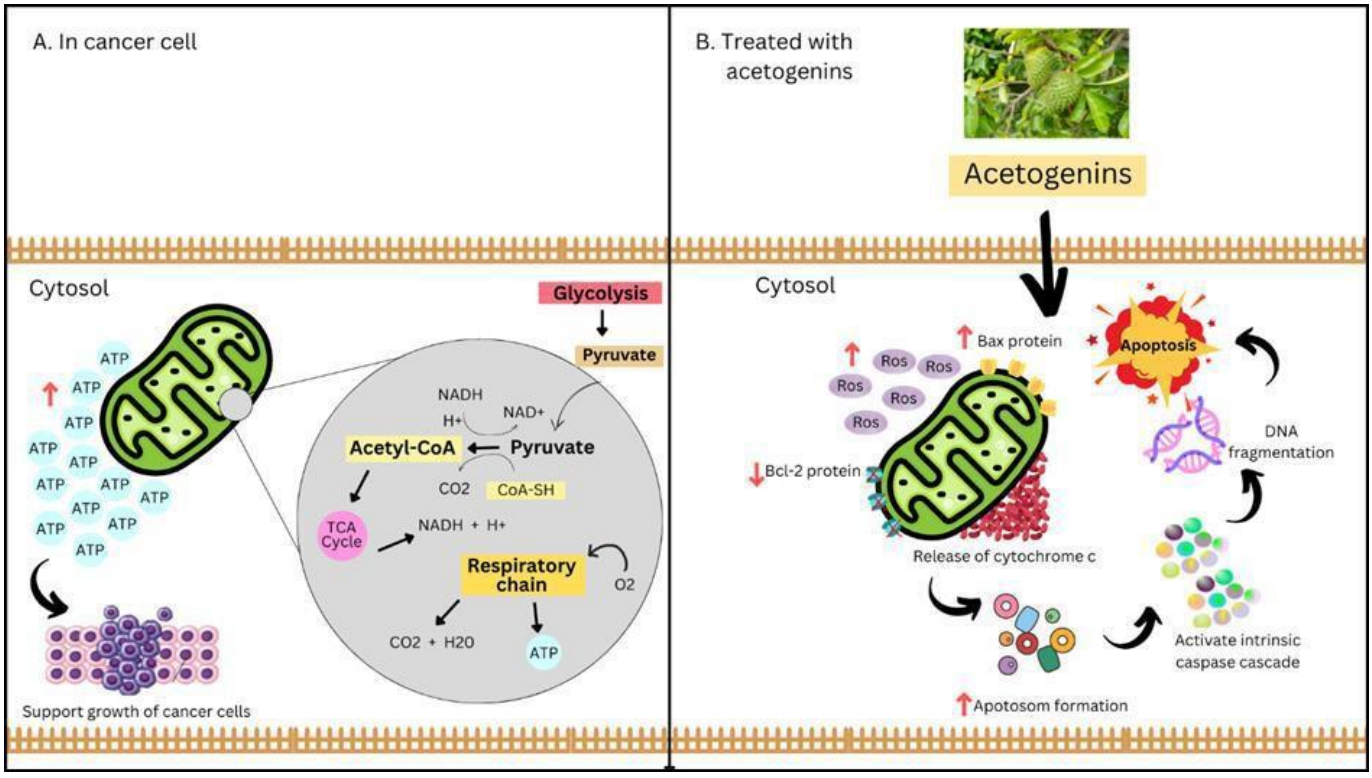


Figure 28: Altérations des activités mitochondriales dans les cellules cancéreuses et les conséquences suite au traitement par les acetogenins **(Zubaidi, Mohd Nani, et al., 2023).**
TCA:"Cycle de l'acide tricarboxylique" ou "Cycle de Krebs".

PARTIE PRATIQUE

Chapitre 4 : Matériel et Méthodes

1 Ethique

Ce travail comporte trois expérimentations animales effectuées sur trois périodes, elles ont respecté les règles de déontologie en expérimentation animale conformément à la directive 2010/63/UE pour les expérimentations animales et à celle de l'AASAE : Association Algérienne des Sciences de l'Expérimentation Animale (Agrément Numéro 45/DGLPAG/DVA.SDA.14).

2 Etapes et choix des expériences

Notre étude s'étale sur trois étapes illustrées dans la **figure 29** :

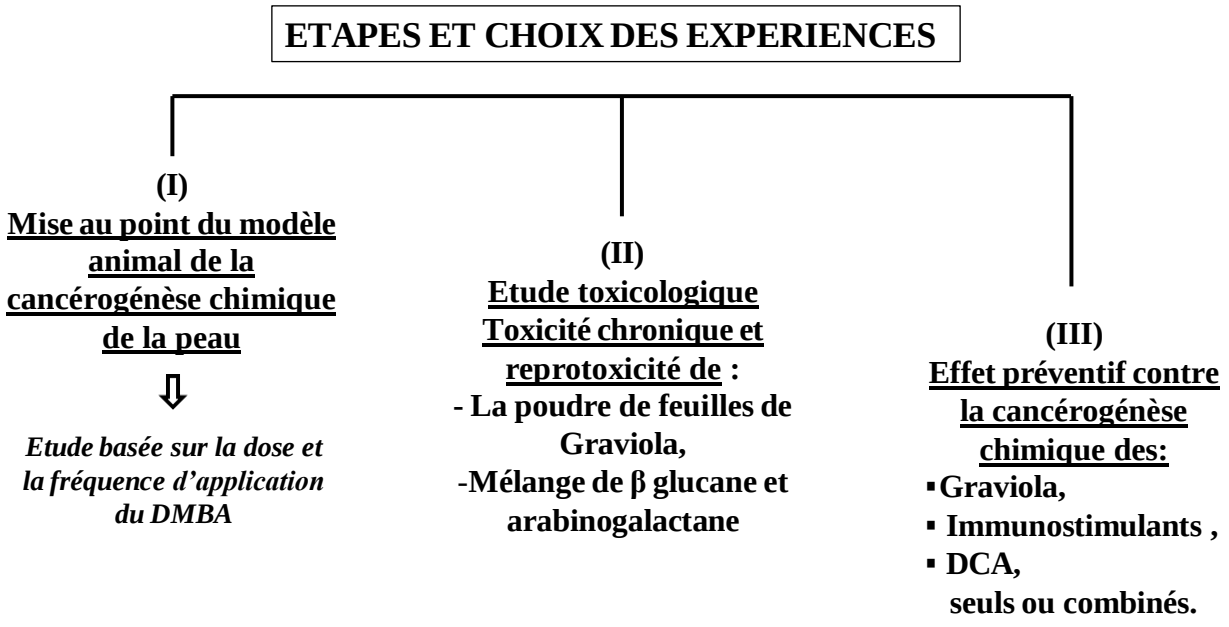


Figure 29: les étapes et les choix des expériences.

3 Mise au point du modèle animal de la cancérogenèse chimique expérimentale :

3.1 Objectif :

Cette étude a eu pour objectif de mettre au point un modèle animal expérimental d'un carcinome spinocellulaire. Le protocole de cancérogénèse chimique a été inspiré de la littérature Subramanian et al ; 4102 . Il consiste en l'application dorsale d'un agent initiateur (DMBA) et d'un promoteur (huile de croton), sur des souris males de la souche Swiss albinos. Nous avons évalué l'impact de la dose et de la fréquence d'application du DMBA sur le temps de latence, l'incidence ainsi que le développement des papillomes sur les plans morphologiques : nombre et volumes et histologique.

3.2 Animaux, conditions d'élevage et adaptation :

Trente souris Males de la souche Swiss Albinos, provenant de l'institut pasteur d'Alger âgés entre 3 à 4 semaines avec un poids corporel compris entre 21 et 25 g ont été équitablement dispatchées en cinq lots. Une période d'adaptation de 14 jours a précédé le début de l'expérimentation. Toutes les souris, mis à part celles du lot témoin, ont été placées individuellement dans des cages en polyéthylène et galva tapissées de copeaux de bois. Les souris ont été nourries avec un régime de granulés standard procurés chez l'ONAB (Annaba, Algérie) et de l'eau à volonté et maintenues dans des conditions de logement standard à une température de 25
± 4°C. Les souris ont été rasées deux jours avant l'application du DMBA.

3.3 Protocole expérimental :

3.3.1 Cancérogénèse chimique :

Après la période d'adaptation, le DMBA (Sigma chemicals, USA.Cat.No. D3254) dissout dans de l'acétone a été appliqué sur environ $3cm^2$ de la surface dorsale soigneusement rasée sous une haute chimique absorbante.

Les souris ont été observées chaque semaine pour surveiller le taux de mortalité et la peau a été palpée pour détecter la présence de papillomes. Le nombre et le volume des verrues ont été enregistrés à partir de la semaine de leur première apparition jusqu'à la semaine où ils n'étaient plus mesurables en raison de leur chevauchement.

La **Figure 30** montre les traitements appliqués aux cinq groupes de souris :

- **Control :**
  - ⇨ Une application topique et hebdomadaire de 100 µL d'acétone.
- **Groupe A :**
  - ⇨ **Initiation :** une seule application topique de 100 µg de DMBA/100 µL d'acétone (0,1 %, p/v).
  - ⇨ **Promotion :** deux semaines après l'application du DMBA, les souris ont reçu une application topique d'huile de croton à 1 % trois fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation.
- **Groupe B:**
  - ⇨ **Initiation :** une seule application topique de 200 µg de DMBA/100 µL d'acétone (0,2 %, p/v).
  - ⇨ **Promotion :** deux semaines après l'application du DMBA, les souris ont reçu une application topique d'huile de croton à 1 % trois fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation.
- **Groupe C :**
  - ⇨ **Initiation :** une seule application topique hebdomadaire de 100 µg de DMBA/100 µL d'acétone (0,1 %, p/v) pendant trois semaines consécutives.
  - ⇨ **Promotion :** deux semaines après la dernière application du DMBA, les souris ont reçu une application topique d'huile de croton à 1 % trois fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation.
- **Groupe D :**
  - ⇨ **Initiation :** une seule application topique hebdomadaire de 100 µg de DMBA/100 µL d'acétone (0,1 %, p/v) pendant quatre semaines consécutives.
  - ⇨ **Promotion :** deux semaines après la dernière application du DMBA, les souris ont reçu une application topique d'huile de croton à 1 % trois fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Après la première application de DMBA, les souris ont été placées sous une lumière jaune pour accélérer l'étape d'initiation (Subramanian et al., 2014a).

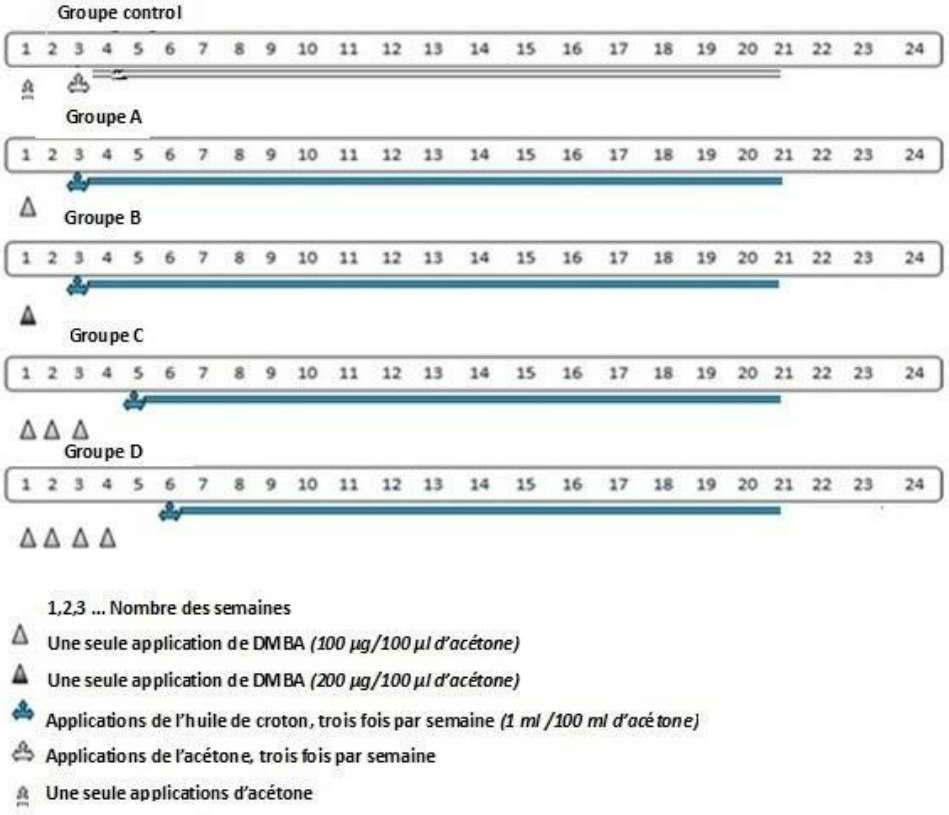


Figure 30: Schéma expérimental.

Chaque semaine, les paramètres de grandeurs des papillomes ont été mesurés avec un pied à coulisse. Le volume approximatif a été calculé en fonction de la forme de la verrue qui était généralement cylindrique selon les formules suivantes :

Formes cylindriques :

Volume (mm^3) = Hauteur × π/4 × (Diamètre)^2

Formes rectangulaires :

Volume (mm^3) = Longueur × Hauteur × Largeur

Vingt et une semaines après la première application du DMBA, toutes les souris ont été euthanasiées et une biopsie cutanée a été réalisée immédiatement après le sacrifice.

3.4 Étude histologique :

Des Biopsies cutanée ont été immédiatement fixées dans une solution de formol à 10 %. L'enrobage et la confection des coupes ont été obtenus suivant la technique décrites par (Hould, 1984).

- **Fixation**

La fixation des échantillons a été faite dans une solution de formol à 10%. Les prélèvements réalisés on été mis dans des cassettes spéciales à parois retournées afin de permettre le passage des liquides.

- **Enrobage et obtention des blocs**

La réalisation de coupes fines et régulières nécessite l'inclusion des échantillons dans un bloc de paraffine, comme suit :

- **Déshydratation :** Les échantillons sont déshydratés dans un automate qui permet leurs passages automatiques et progressifs dans des bains de méthanol puis d'éthanols pendant 24h.
- **Eclaircissement :** L'éthanol est remplacé par la paraffine. Il s'agit du xylène qui élimine l'éthanol et clarifie les tissus (trois bains de 30 minutes chacun).
- **Inclusion :** Après avoir imbibé le tissus dans des bains de paraffine liquide (portée à 56/58°C). il est par la suite enrobé par inclusion dans un bloc de paraffine fondue, qui, en se solidifiant, va permettre la réalisation de la coupe.

- **Confection des coupes :**

La réalisation des coupes minces de quelques microns (5µm en moyenne) a été possible grâce à un microtome (Leica RM2235). Ces dernières ont été étalées sur des lames porte-objet, déplissées et fixées par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

- **Coloration et montage :**

Réalisée par la technique à l'Hématoxyline-Eosine (Hématéine-Eosine) en suivant les étapes suivantes :

- Déparaffinage et hydratation des lames avec l'eau du robinet, suivi par un rinçage à l'eau distillée.
- L'incubation des lames pendant 15 minutes dans un bain d'Hématoxyline de Harris qui est un colorant cationique basique qui colore en bleu violacé les structures anioniques ou acides et donc basophiles, les noyaux.

- L'immersion des coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) pour les différencier suivi d'un rinçage des lames dans un bain d'eau du robinet. La différenciation doit être vérifiée par l'observation des coupes au microscope.
- Bleuissement des coupes dans un bain d'eau ammoniacale suivi d'une immersion dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui est un colorant acide qui colore en rose les structures basiques et donc acidophiles, le cytoplasme.
- Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.
- Enfin, les préparations sont séchées et observées au microscope optique.

4 Etude toxicologique :

Le choix porté sur les substances utilisées dans cette étude a été basé sur une étude bibliographique qui a rapporté d'une part, leur effet anticancérigène contre certains types de cancers, autres que ceux de la peau, et d'autre part leur statut controversé. Nous avons entrepris une étude approfondie pour évaluer l'éventuel effet toxique des substances qui ont été jugées peu ou insuffisamment étudiées. Ce chapitre se concentre spécifiquement sur l'évaluation de la toxicité chronique associée à la poudre de feuilles de Graviola (*Annona muricata*) ainsi qu'au mélange de bêta-glucane (provenant de Saccharomyces cerevisiae) et d'Arabinogalactane.

4.1 Animaux et conditions d'élevage :

Nous avons utilisé dix-huit souris albinos mâles de la souche Swiss albinos âgés de trois semaines de l'institut Pasteur d'Alger. A leur réception, les rongeurs pesaient entre 17 et 20 g. Les souris ont été placées dans une animalerie, logés et nourris comme précédemment décrit (**3.2**). Pendant la période d'adaptation de deux semaines, les souris ont été équitablement séparées en trois groupes et ont été pesés de manière hebdomadaire pendant toute la durée de l'expérimentation.

4.2 Annona Muricata (Graviola) :

Nous avons utilisé la poudre fine des feuilles de Graviola commercialisé, originaire du Perou et fabriquée en Allemagne **(figure 31)**. Le produit a été acheté à la pharmacie, lot C17030059 de la société Zein Pharma, posologie : 2 à 3 capsules de 500 mg par jour.

Figure 31: Emballage commercial de la poudre de feuilles de Graviola.

4.3 Les Immunostimulants :

L'extrait de β-glucane de la levure Saccharomyces cerevisiae et l'arabinogalactane (issu du mélèze) ont été obtenus chez Now Foods (lot n° 21046780740), dans l'Illinois, aux États-Unis **(figure 32)**.

Figure 32: Emballage commercial des Immunostimulants (β-glucane/arabinogalactane).

4.4 Composition des lots et traitement des souris :

- **Lot 1, témoin :** les souris ont reçu de l'eau par gavage gastrique, jusqu'à la fin de l'expérimentation.
- **Lot 2,** les souris ont reçu, par gavage gastrique, une dose 10 fois (10 X) plus élevée que la dose normale utilisée dans la pharmacopée traditionnelle de la poudre des feuilles de Graviola dissoute dans l'eau. X= 0,53 mg/souris soit 10*X= 5,3 mg/souris et cela en estimant un poids moyen de 25 g/souris (212 mg/Kg).
- **Lot 3,** les souris ont reçu, par gavage gastrique, une dose 10 fois (10 X) plus élevée que la dose normale utilisée dans la pharmacopée traditionnelle de la poudre du mélange d'immunostimulants (bêta-glucane de Saccharomyces cerevisiae et d'arabinogalactane) dissout dans l'eau. X=0,64 mg/souris soit 10*X= 6,4 mg/souris et cela en estimant un poids moyen de 25 g/souris (265 mg/Kg).

4.5 Sacrifice et prélèvement :

Après une période d'expérimentation de 13 semaines de la toxicité chronique **(*Notions - Comment évaluer un effet toxique ? - CNESST,* s. d.)** de la poudre de Graviola ainsi que la poudre de bêta-glucane et d'arabinogalactane, les souris ont été euthanasiées par décapitation et le prélèvement sanguin a été effectué immédiatement. Le sang a été recueilli dans deux tubes de polyéthylènes étiquetés. L'un sec et l'autre contenant l'anticoagulant EDTA. Les tubes secs ont été utilisés pour l'analyse des paramètres biochimiques, ceux de l'EDTA ont servi à la détermination de la formule de numération sanguine (FNS) **(figure 33).**

Période d'adaptation de deux semaines

Lot Témoin

Lot Traité Graviola

Lot Traité Immunostimulants

Gavage quotidien avec l'eau

Gavage quotidien avec la poudre de Graviola 212 mg/Kg

Gavage quotidien avec les Immunostimulants 265mg/kg

Pesée hebdomadaire des souris

Après sacrifice

- Coupes histologiques
- Paramètres Biochimiques
- FNS
- Paramètres de stress oxydatif

Figure 33: Schéma récapitulatif de l'expérimentation.

4.6 Dosage de quelques biomarqueurs plasmatiques biochimiques :

Le dosage des paramètres biochimiques de la toxicité chronique a été réalisé dans un système automatisé (MINDRAY).

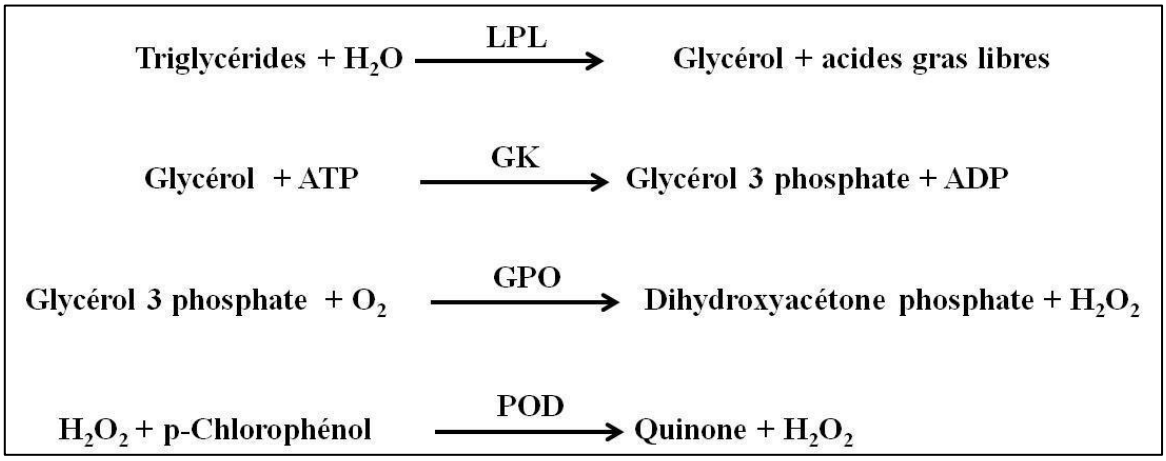
4.6.1 Glucose :

Le dosage du glucose plasmatique a été effectué par la méthode de glucose oxydase selon **Trinder, 1969.** La glucose oxydase catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique. Par la présence d'une peroxydase, le peroxyde d'hydrogène ainsi formé réagit avec le phénol et les quatre aminophenazones pour former un composé rose de quinonéimine, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon. Le calcul de la concentration se fait selon l'équation suivante :

Glucose (mg/dl) = (DO échantillon / DO étalon) * concentration de l'étalon (100 mg/dl)

4.6.2 Triglycérides :

Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acide gras libres par la lipoprotéine lipase (LPL). Après deux réactions, le glycérol est converti en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et en H_2O_2. Dans la dernière réaction, le H_2O_2 réagit avec quatre aminophénazones (4-Ap) et p-chlorophénol enprésence de la peroxydase (POD) + H_2O_2 **(Bucolo & David, 1973).**

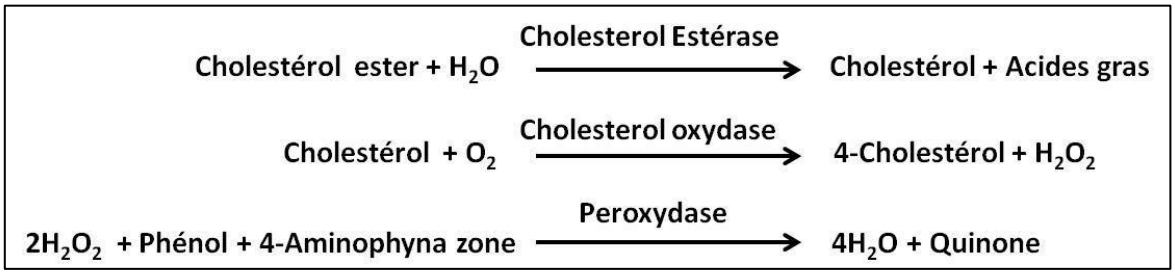


L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon. Le calcule de la concentration se fait selon l'équation suivante :

Triglycérides (mg/dl) = (DO échantillon / DO étalon) * 200

4.6.3 Cholestérol :

Le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. La cholestérol estérase hydrolyse les esters, le H_2O_2 est formé dans la réaction d'oxydation enzymatique du cholestérol sous l'action du cholestérol oxydase. Ce dernier réagit avec le phénol pour produire le quinonéimine, selon les réactions ci-dessous (Meiattini et al., 1978)**.** L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du chlore dans l'échantillon.



Le calcul de la concentration se fait selon l'équation suivante :

Cholestérol (mg/dl) = (DO échantillon / DO étalon) * 200

4.6.4 Aspartate Amino Transférase (ASAT ou TGO) :

Le dosage enzymatique se fait à l'aide du Kit de SPINREACT **(Kaplan A, 1984; Young, 1995)** selon les réactions suivante :

Réactif 1 : Tampon L-Aspartate **; Réactif 2 :** NADH, MDH, α- Ketoglutarate.

TGO : Transaminase Glutamo-Oxaloacétique,

MDH : Malate déshydrogénase,

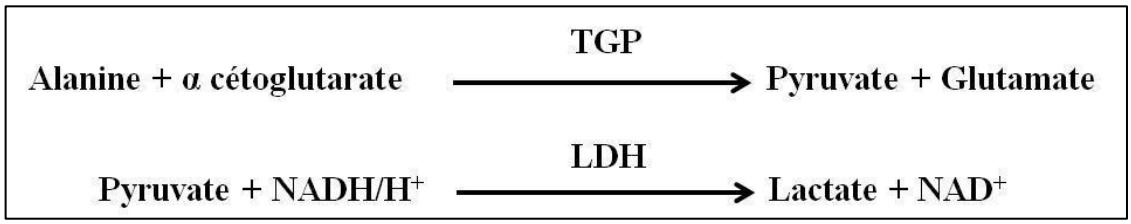
1ml de réactif est mélangé à 100µl de sérum et incubé pendant 1 min après quoi la lecture de l'absorbance (A) initiale se fait à 340nm dans un intervalle de 3 min.

Calculer la moyenne de l'augmentation d'absorbation par minute (ΔA/min).

Calcul : ΔA/min * 1750 = U/L de ASAT

4.6.5 Alanine Amino Transférase (ALAT ou TGP) :

Le dosage se fait à l'aide du Kit de SPINREACT **(Kaplan A, 1984; Young, 1995)** selon les réactions suivante :



Réactif 1 : tampon L-Alanine**,**

Réactif 2 : NADH, LDH, α- Kétoglutarate.

TGP : Transaminase Glutamo-Pyruvique,

LDH : Lactate déshydrogénase.

1ml de réactif est mélangé à 100µl de sérum et incubé pendant 1 min après quoi la lecture de l'absorbance (A) initiale se fait à 340nm dans un intervalle de 3 min.

Calculer la moyenne de l'augmentation d'absorbation par minute (ΔA/min).

Calcul : ΔA/min * 1750 = U/L d'ALAT

4.7 Dosage des paramètres de stress oxydatif :

4.7.1 Dosage des protéines totales :

La méthode de Bradford, (1976) est une technique spectrophotométrique employée pour mesurer la concentration de protéines en solution à l'aide du bleu de Coomassie G250. Ce réactif interagit avec les groupements amines ($–NH_2$) et cationiques des protéines pour former un complexe coloré en bleu. L'intensité de cette coloration bleue, qui reflète le degré d'ionisation du milieu acide, est directement proportionnelle à la concentration des protéines.

Pour préparer le réactif de Bradford : 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) sont dissous dans 50 ml d'éthanol (95%). Après deux heures d'agitation, 100 ml d'acide orthophosphorique (85%) sont ajoutés après quoi le volume est complété jusqu'à 1L avec de l'eau distillée. La solution est filtrée et conserver à 4°C, à l'abri de la lumière, pour une durée maximale d'un mois.

Pour le dosage des protéines totales, 5 ml de réactif de Bradford sont ajoutés à 0,1 ml de l'homogénat, après une légère agitation et une incubation de 5 minutes, la densité optique est mesurée à 595 nm contre à un blanc. La concentration des protéines est déterminée en comparant les résultats à une courbe étalon d'albumine sérique bovine (Cinque concentrations allant de 0 à 1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions **(figure 34)**.

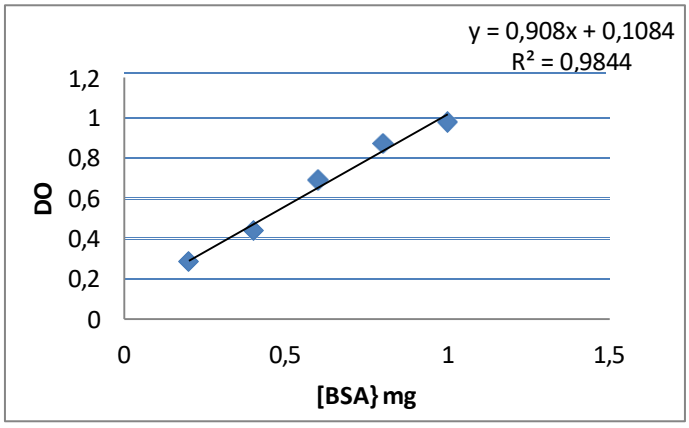


Figure 34: Gamme d'étalonnage de la BSA.

4.7.2 Activité de la Catalase (CAT) :

Dans les cellules eucaryotes, la CAT est principalement localisée dans les peroxysomes, qui contiennent de nombreuses oxydases produisant de l'H_2O_2. En cas de fortes concentrations en H_2O_2, elle catalyse sa conversion en eau et en dioxygène **(Minig, 2009)**, suivant la réaction :

$$\mathbf{2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O}$$

Le dosage de l'activité enzymatique de la CAT a été réalisé par spectrophotométrie en faisant réagir les quantités montrées dans le **tableau 3** :

Tableau 3: composition du milieu réactionnel pour le dosage de l'activité enzymatique de la CAT.

	Essai (µl)	Blanc (µl)
Tampon phosphate (PBS)	780	800
H_2O_2	200	200
Sérum Fd (1/50)	20	0
Total (µl)	1000	1000

Le mélange réactionnel est préparé dans une cuve en quartz, placée dans le spectromètre, et est soigneusement resuspendu à l'aide d'une micropipette. Les valeurs de la densité optique à 240 nm sont prélevées toutes les 15 secondes pendant une minute, car l'activité de la catalase diminue rapidement. L'activité de la catalase est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\textbf{Activité de CAT (µmol } H_2O_2\textbf{/min/mg de prot)} = \Delta \textbf{ DO } / \text{Ɛ} * l * X * Fd$$

- ΔDO : Variation de la densité optique par minutes.
- ε : Coefficient d'extinction d'H_2O_2 (0,043 $mM^{-1}cm^{-1}$).
- l : Largeur de la cuve.
- X : Quantité de protéines en mg/ml.
- Fd : Facteur de dilution pour le H_2O_2 dans la solution tampon (0,02)

4.7.3 Activité de la Glutathion Peroxydase (GPx) :

L'activité enzymatique de la GPx a été évaluée en utilisant la méthode décrite par Flohé & Günzler, 1984. Cette méthode repose sur la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH). Sous l'action de la GPx, deux molécules de glutathion réduit sont oxydé en glutathion-disulfure (GSSG) selon la réaction suivante :

$$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow GSSG + 2\ H_2O$$

0,4 ml de glutathion réduit (GSH) à une concentration de 0,1 mM et 0,2 ml d'une solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) ont été rajoutés à 0,2 ml d'homogénat. Le mélange a été incubé au bain-marie à 25°C pendant 5 minutes. 0,2 ml d' H_2O_2 à une concentration de 1,3 mM ont été rajoutés pour initier la réaction. Après 10 minutes d'incubation, la réaction a été arrêtée en ajoutant 1 ml de TCA (acide trichloroacétique) à 1%. Le mélange a été refroidi sur glace pendant 30 minutes, centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tours/minutes. 0,48 ml du surnageant a été prélevé. 2,2 ml de la solution tampon TBS et 0,32 ml de DTNB (Ellman's reagent) à une concentration de 1,0 mM ont été ajoutés. La densité optique à été mesurée à 412 nm après 5 minutes.

L'activité enzymatique du GPx est calculée selon l'équation :

$$\text{GPx (nmol /mg de prot)} = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) * 0{,}04}{\text{DO étalon}}$$

DO : Densité optique lue à 412 nm.
0.04 : Concentration de substrat (GSH).

4.7.4 Dosage du Malondialdéhyde (MDA) :

Le MDA se forme en tant que produit terminal lors de la dégradation des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres. Pour évaluer le niveau de peroxydation lipidique, La quantification du MDA est effectuée en utilisant la technique décrite par Buege & Aust, 1978.

Cette méthode repose sur la réaction de condensation du MDA en milieu acide et chaud avec l'acide thiobarbiturique, ce qui génère un pigment de couleur rose. Ce composé coloré est mesuré par spectrophotométrie d'absorption à une longueur d'onde de 530 nm **(figure35)**.

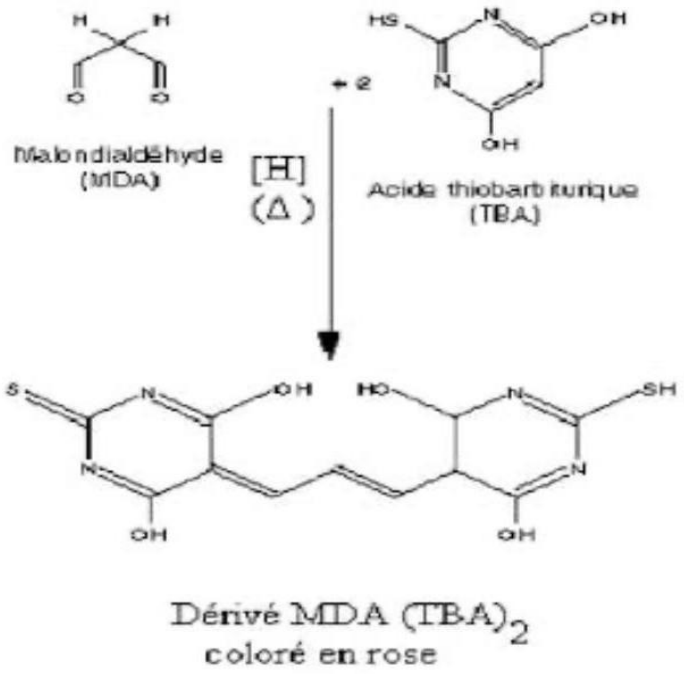


Figure 35: Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) et 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) sont ajoutés à 375 µl de l'homogénat., le mélange est vortexé puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 min. 400 µl du surnagent ont été prélevés, auxquels ont été rajoutés 80 µl de HCl (0.6 M). 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM) ont été rajoutés. Le mélange a été incubé au bain-marie à 80°C pendant 10 minutes et la densité optique a été mesurée à 530 nm contre le blanc réactif, La concentration de MDA est calculée selon la formule suivante :

$$\mathbf{C\ (nmol/mg\ protéines) = DO * 10^6 / Ɛ * X * l *}$$

- ⇨ C : Concentration MDA en nmoles/mg de protéines.
- ⇨ DO : Densité optique lue à 530 nm.
- ⇨ Ɛ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1.56 105 M^{-1} cm^{-1}.

- ⇨ l : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.
- ⇨ X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).
- ⇨ Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

4.7.5 Dosage du glutathion réduit (GSH) :

Le glutathion est un tripeptide composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il contient un groupement thiol (-SH) et est reconnu comme l'un des principaux composants du système antioxydant endogène. Le glutathion joue un rôle crucial dans la protection contre l'oxydation en agissant comme cofacteur pour des enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases et les glutathion transférases **(Khaldi, 2018).**

Le dosage du glutathion (GSH) est effectué selon la méthode décrite par **Weckbecker & Cory, (1988)**. Cette méthode repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique, qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion. Une déprotéinisation est réalisée pour isoler spécifiquement les groupements thiol (-SH) du glutathion D.

0,2 ml de la solution d'acide salicylique (0,25%) ont été rajoutés à 0,8 ml de l'homogénat. Le mélange a été agité et incubé pendant 15 minutes dans un bain de glace. Après une centrifugation à 1000 tours/minute pendant 5 minutes, 0,5 ml de surnagent ont été prélevés auxquels on a rajouté 1 ml du tampon Tris-EDTA, pH 9,6. 0,025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à une concentration de 0,01 M ont été ajouté au mélange. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, la DO a été mesurée à 412 nm contre un blanc.

La concentration de glutathion est calculée comme suit :

$$\text{GSH (nmol / mg protéine)} = \frac{\text{DO} * 1 * 1{,}525}{13100 * 0{,}8 * 0{,}5 * \text{mg protéines}}$$

- ⇨ DO : Densité optique.
- ⇨ 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- ⇨ 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).

- ⇨ 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.
- ⇨ 0.8 : Volume de l'homogénat.
- ⇨ 0.5 : Volume du surnageant.

4.8 Étude histologique : (*cf 3.4. Etude histologique*)

4.9 La reprotoxicité :

Dans le cadre de cette étude visant à évaluer la reprotoxicité potentielle du Graviola, vingt-quatre souris d'un poids moyen de 20 g, comprenant un nombre égal de mâles et de femelles, ont été obtenues auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Les souris ont été réparties en quatre groupes de six individus chacun. Deux de ces groupes ont servi de témoins, composés à la fois de mâles et de femelles, tandis que les deux autres groupes ont été traités avec une dose de Graviola correspondant à 10 fois la dose normalement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle, tel que défini pour cette étude toxicologique. Après une période d'adaptation d'une semaine, l'administration par voie gastrique de la poudre de Graviola a commencé pour les souris des groupes traités, tant mâles que femelles. Un mois après le début du traitement, les copulations ont été initiées entre les souris des groupes traités et les témoins. Les mâles ont été séparés des femelles une semaine après le début des copulations, tout en continuant l'administration gastrique du Graviola pour les groupes traités jusqu'à la mise bas des femelles. Ensuite, les souriceaux ont été comptés pour chaque lot **(figure 36).**

La même expérimentation visant à évaluer l'effet du mélange d'immunostimulants sur la fertilité a été menée sur des souris, suivant le même protocole que celui décrit précédemment pour le lot de Graviola.

Figure 36: Souriceaux nouveau-nés.

5 Etude de l'effet préventif des différents traitements contre la cancérogenèse chimique de la peau en application seules ou combinées :

Les substances testées dans notre recherche incluent la poudre des feuilles de Graviola, un mélange d'immunostimulants, et le dichloroacétate (DCA). Notre étude a été structurée en plusieurs volets : chaque substance a été testée individuellement pour évaluer ses effets spécifiques sur la carcinogenèse cutanée. De plus, un groupe a été traité avec une combinaison des trois substances afin de déterminer l'éventuelle synergie ou antagonisme entre ces agents.

5.1 Animaux et conditions d'élevage :

Pour chaque expérimentation, qu'il s'agisse d'évaluer les effets des substances seules ou combinées, les souris étaient réparties aléatoirement en quatre groupes de six souris chacun. Nous avons maintenu le même choix d'animaux et conditions d'élevage que dans le chapitre de l'étude de toxicité :

5.2 Effet du Graviola sur la cancérogénèse :

Pour cette partie, nous avons utilisé des feuilles de Graviola séchées a l'ombre et qui nous ont été procuré de la société Toundoubeer, Dakar, Sénégal **(figure 37)**.

Figure 37: Feuilles séchées d'Annona muricata (Graviola).

10g de feuilles de Graviola, sont broyées pour obtenir une poudre. Cette poudre est ensuite dissoute dans 100 ml d'eau distillée et agitée dans un bécher à 40°C pendant 24 heures. Après l'agitation, la solution est filtrée. Le filtrat est placé dans des cristallisoirs et séché dans une étuve à 40°C pendant 24 heures. Le résidu sec est ensuite raclé avec une spatule et pesé. Le rendement de l'extraction est de 1,7 g (17%). Nous avons utilisé 120 mg/kg (100% de feuilles). Pour une souris de 30 g, une solution de gavage de 3,6 mg/ml a été administrée trois fois par semaine **(Torres et al., 2012).**

5.3 Effet du mélange d'immunostimulants sur la cancérogénèse chimique :

Pour le gavage des souris, nous avons utilisé un mélange de cinq immunostimulants naturels : le bêta-glucane de Saccharomyces cerevisiae, l'arabinogalactane (figure 32), et une poudre composée de trois champignons Reishi (*Ganoderma lucidum*), Shiitake (*Lentinula edodes*), et Maitake (*Grifola frondosa*)) (figure 38). Nous avons administré une dose de 6,66 mg/Kg pour le mélange de bêta-glucane et d'arabinogalactane, ainsi qu'une dose de 6,66 mg/Kg pour le mélange des immunostimulants provenant des champignons.

Figure 38: Le mélange de trois immunostimulants issus de champignons**.**

5.4 Effet du dichloroacétate (DCA) sur la cancérogénèse chimique :

Les souris ont reçu, par gavage gastrique, une solution de 3 mg/ml de DCA trois fois par semaine pendant toute la période expérimentale. La dose administrée, correspondant à 100 mg /Kg est conforme à la dose clinique usuelle, qui varie entre 25 et 100 mg/kg/jour **(Ohashi et al., 2013).**

5.5 La combinaison :

Toutes les substances déjà utilisées individuellement précédemment ont été combinées en un seul traitement. Cette combinaison, comprenant le DCA, le mélange d'immunostimulants et le Graviola, a été administrée en respectant les doses respectives utilisées pour chaque substance lorsqu'elles étaient administrées seules.

5.6 Composition des lots et traitements des souris :

Soixante souris ont été équitablement réparties en dix groupes **(figure 39) :**

- ✓ **Lot témoin (T) :** les souris ont reçu 100 µl d'acétone ainsi que de l'eau physiologique par gavage gastrique trois fois par semaine pendant toute la durée de l'expérience.
- ✓ **Lot DMBA :** les souris ont été soumises au protocole de cancérogénèse chimique (0,1% de DMBA et 1% d'huile de croton) et ont reçu de l'eau physiologique par gavage gastrique pendant toute la durée de l'expérience.
- ✓ **Lot Graviola (Grav) :** les souris ont reçu une application cutanée de 100 µl d'acétone, et l'extrait de feuilles de Graviola par gavage gastrique.
- ✓ **Lot Immunostimulants (IS) :** les souris ont reçu une application cutanée de 100 µl d'acétone et le mélange d'immunostimulants par gavage gastrique.
- ✓ **Lot Dichloroacétate (DCA) :** les souris ont reçu une application cutanée de 100 µl d'acétone et la solution de DCA par gavage gastrique.
- ✓ **Lot combinaison des trois produits (COMB) :** les souris ont reçu une application cutanée de 100 µl d'acétone et le mélange de Graviola, IS et DCA.

- ✓ **Lot DMBA/Grav :** les souris ont été soumises au protocole de cancérogénèse chimique (DMBA/huile de croton) en parallèle, elles ont reçu la solution de l'extrait de feuilles de Graviola par gavage gastrique.
- ✓ **Lot DMBA/IS :** les souris ont été soumises au protocole de cancérogénèse chimique (DMBA/huile de croton) en parallèle, elles ont reçu le mélange d'immunostimulants.
- ✓ **Lot DMBA/DCA :** les souris ont été soumises au protocole de cancérogénèse chimique (DMBA/huile de croton) en parallèle, elles ont reçu la solution de DCA.
- ✓ **Lot DMBA/COMB :** les souris ont été soumises au protocole de cancérogénèse chimique (DMBA/huile de croton) en parallèle, elles ont reçu la combinaison des trois substances : Graviola, IS et DCA.

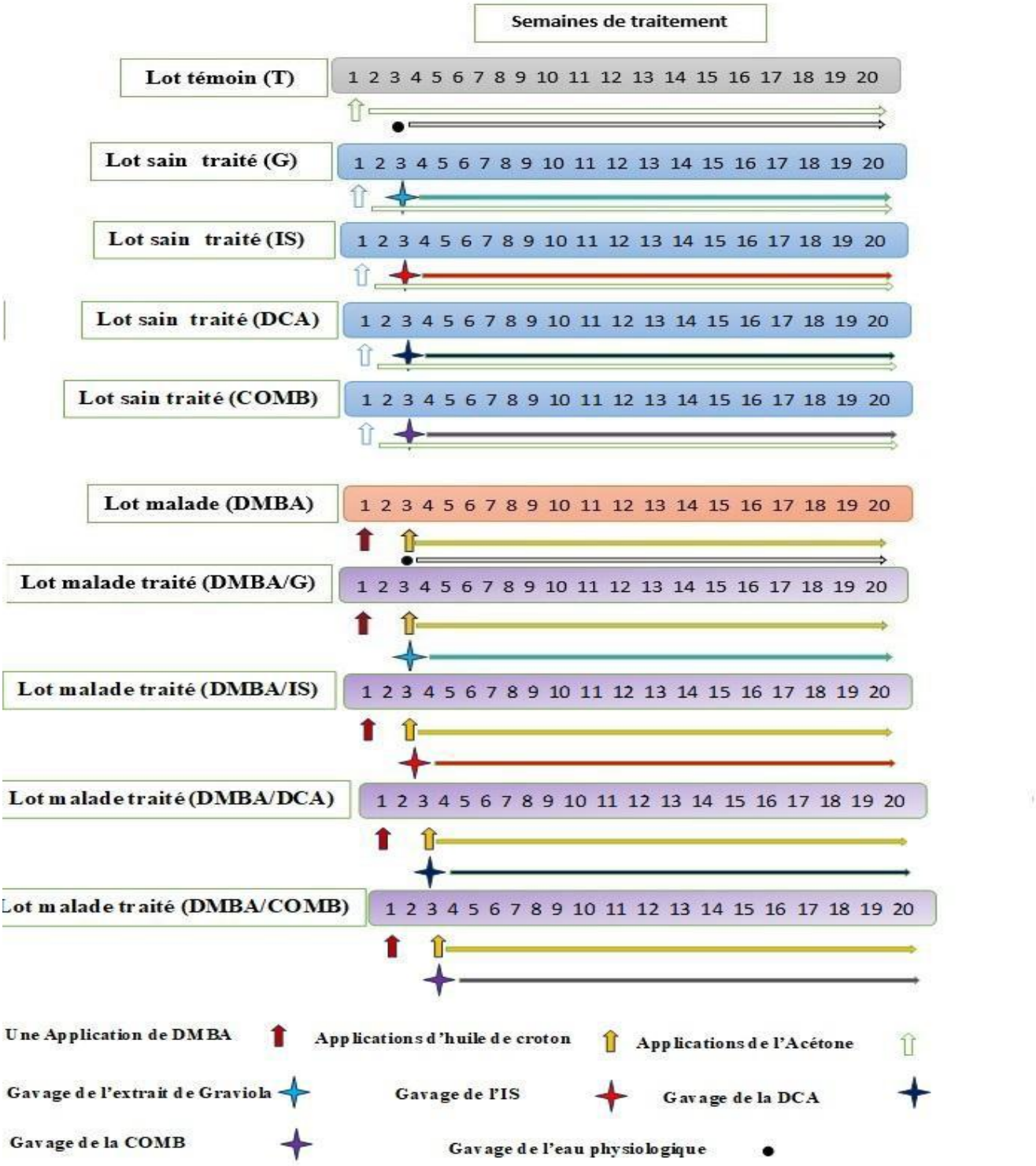


Figure 39: Schéma des traitements des différents lots de souris.

5.7 Biopsie, sacrifice et prélèvement :

5.7.1 Biopsie cutanée :

À la fin de la 18ème semaine de promotion, des biopsies cutanées sont réalisées sur des animaux vivants et anesthésiés afin de préserver l'intégrité des tissus et d'observer les éventuelles réactions inflammatoires. L'anesthésie générale est induite par injection intrapéritonéale de 100 µl d'une solution de phénobarbital à 20 mg/ml, ce qui permet d'éviter les réactions neuroendocriniennes et comportementales à la douleur susceptibles de perturber l'expérimentation. Une anesthésie profonde est atteinte deux à trois minutes après l'injection **(figure 40.A).** La biopsie est effectuée à l'aide d'une pince, d'un bistouri et de ciseaux chirurgicaux **(figure 40.B).**

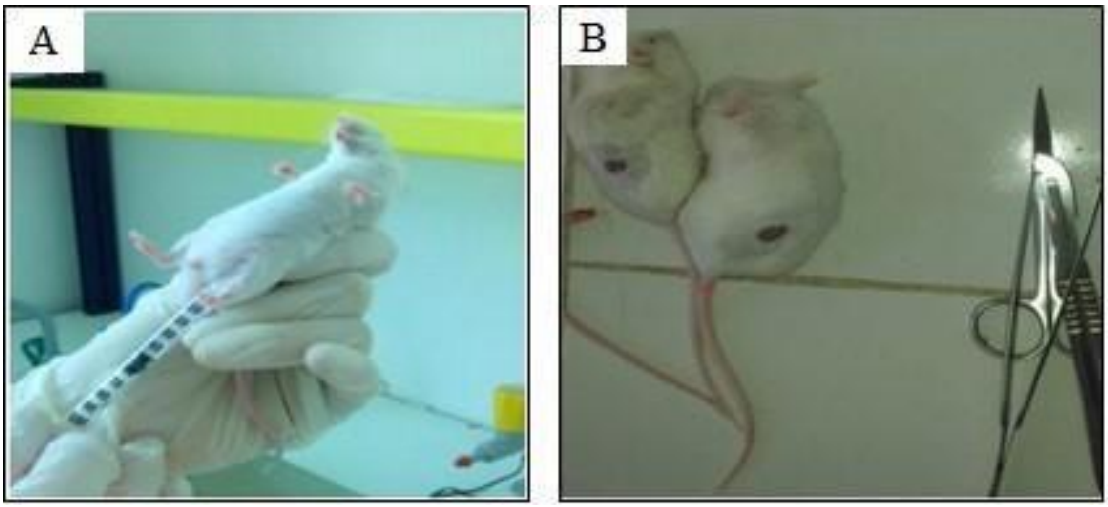


Figure 40 : A) Injection intrapéritonéale de l'anesthésie. **B)** Biopsie cutanée.

5.7.2 Sacrifice et prélèvement :

Après la biopsie, les souris ont été sacrifiées par décapitation. Le sang a été recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA, puis rapidement analysé à l'aide d'un analyseur hématologique pour réaliser la formule sanguine (FNS) (**ERMA Model PCE-210).** Les animaux sacrifiés ont ensuite été disséqués pour prélever le foie. Les organes prélevés ont été conservés au congélateur pour préparer des homogénats nécessaires à l'analyse des paramètres du stress oxydant ou dans le formol pour l'étude histologique.

5.7.2.1 La numération de la formule sanguines (FNS) :

Pour observer les variations du taux des cellules immunitaires et leur impact sur le fonctionnement de ce système, nous avons calculé le nombre des principales cellules immunitaires (globules blancs, monocytes et lymphocytes) connues pour leur rôle dans le cycle de l'immunité contre le cancer.

5.7.2.2 Préparation des homogénats des organes :

2 g de tissu hépatique ont été broyés à basse température (4°C) dans un tampon TBS [Tris (50 mM), NaCl (150 mM), pH = 7.4] à l'aide d'un broyeur. Après homogénéisation, les suspensions cellulaires ont été centrifugées à 9000 tours/min à 4°C pendant 15 minutes. Les surnageants (homogénats) ont été aliquotés dans des eppendorfs puis congelés à -20°C jusqu'à l'analyse.

5.8 Exploration des paramètres du stress oxydant :

5.8.1 Activité de la Superoxyde Dismutase (SOD):

La mesure de l'activité de la SOD est basée sur la méthode de Beyer & Fridovich, (1987), qui évalue l'inhibition de la photoréduction du nitro-bleu de tétrazolium (NBT) (Sigma N5514-10 TAB) par les anions superoxyde $O_2^{\cdot}$-. Ces anions sont générés par la méthionine et la riboflavine en présence de lumière et d'O_2 atmosphérique **(figure 41)**. La réduction du NBT produit une coloration bleu pourpre (bleu de formazan) qui absorbe à 560 nm. La présence de la SOD dans le milieu réactionnel empêche cette réduction en dismutant l'anion $O_2^{\cdot}$-, ce qui réduit la formation de bleu de formazan. L'inhibition de la photoréduction est proportionnelle à l'activité de la SOD. Le tableau 4 présente le protocole suivi pour la préparation des milieux réactionnels.

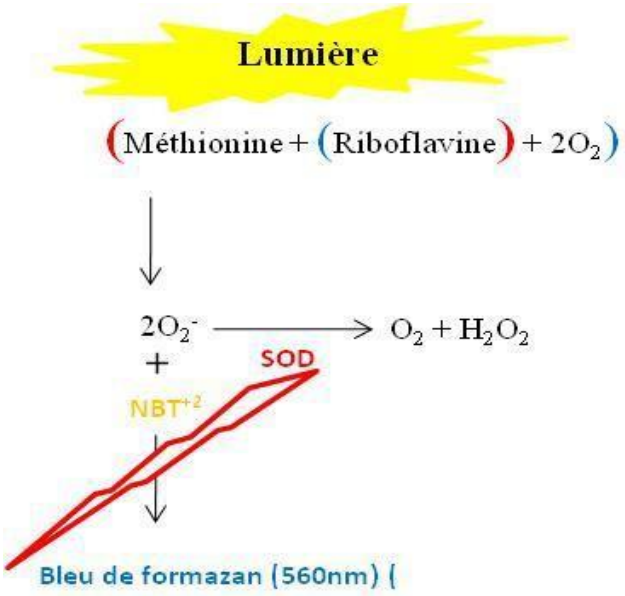


Figure 41: Schéma récapitulatif des interactions dans le milieu réactionnel pour mesure de l'activité de la SOD.

Tableau 4: Composition des milieux réactionnels utilisés pour le dosage de l'activité de la SOD.

	Lumière	**Lumière**	**Obscurité**
Tube	**Tube échantillon**	**Tube blanc (µl)**	**Tube blanc (µl)**
EDTA-Methionine	**500 µl**	**500 µl**	**500µl**
PBS	**446.1 µl**	**44.6 µl**	**44.6 µl**
Echantillon	**25 µl**	**/**	**/**
PBS	**475 µl**	**500 µl**	**500 µl**
NBT	**42.6 µl**	**42.6 µl**	**42.6 µl**
Riboflavine	**11.3 µl**	**11.3 µl**	**11.3 µl**
V final	**1500 µl**	**1500 µl**	**1500 µl**
	Mesure à 560 nm	**Mesuré le blanc**	**Calibrer l'appareil**

Une unité d'activité de la SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber la réduction du NBT de 50% dans les conditions spécifiées.

Y ⟶ 1 mg de protéine

50 ⟶ 50/Y mg de protéine

Ou Y représente le pourcentage d'inhibition /mg de protéine

50/Y mg de protéine ⟶ correspond à une unité SOD

1mg de protéine ⟶ correspond à : = (1×1) / (Y / 50) Unité SOD /mg de protéine.

L'activité SOD = % d'inhibition / mg de protéine :

$$Y = \left(\frac{(DO_B - DO_E)}{DO_B} * 100 \right) * \frac{20}{[\text{Protéines tot}]\ mg/ml} * Fd$$

Activité spécifique de SOD = Y/50 Unité SOD / mg de protéines

Fd : Facteur de dilution de l'échantillon.

5.8.2 Activité de la Catalase (CAT) : (cf. 4.7.2)

5.8.3 Activité de la Gluthation peroxydase GPx : (cf. 4.7.3)

5.9 Etude histologique (cf. 3.4)

5.10 Analyses statistiques :

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type pour chaque type d'échantillon étudié. Une analyse de variance a été faite avec comparaison des échantillons par un test *apostériori* PLSD de Fisher (Statview IV®, Abacus Concept Inc., Berkley, CA, USA). Les valeurs de probabilité $p \leq 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Chapitre 5 : Résultats et discussions

1 Mise au point du modèle animal de la cancérogenèse chimique :

1.1 Evolution des papillomes en nombre et en volumes :

Depuis le début de la promotion, Seuls les papillomes dont le diamètre ≥ 1 mm ont été pris en compte, les résultats sont présentés sous forme de graphiques qui expriment :

- ⇨ Le nombre de souris ayant développé des papillomes par lot,
- ⇨ Le nombre de papillomes par lot,
- ⇨ Le volume total des papillomes par lot.

Le ratio volume total/nombre de papillomes par groupe a été calculé et présenté dans le **tableau 5**.

A la fin de l'expérimentation, les souris appartenant au groupe contrôle n'ont développé aucun papillome. Les souris du groupe A ont développé un petit nombre de papillomes avec un ratio V/n de 1,5 alors que nous avons observé les nombre et volumes les plus élevés chez les souris du groupe B par rapport à tous les autres groupes avec un ratio V/n de 6,28. Les souris du groupe C ont montré un nombre et un volume total moyen, confirmé par un ratio V/n de 4,5. Les souris du groupe D ont montré un volume total très important des verrues affichant le plus grand ratio de 18,75. En effet, la moyenne des ratio calculée entre la 9ème et la 14ème semaine de l'expérimentation a montré une augmentation significative chez les groups B, C and D par rapport au groupe A. En outre, le ration V/n du groupe D est significativement plus élevé que celui du groupe C **(Figure 42).**

Tableau 5: le ratio V/n dans les diffèrent groups en fin d'expérimentation.

Group	Nombre (n) de papillomes par groupe	Volume total (V) de papillomes par groupe (mm^3)	Volume / nombre ratio (V/n)
contrôle	**0**	**0**	**0**
A	**6**	**9** (± 2,34)	**1.5**
B	**25**	**157** (± 3,65)	**6.28**
C	**16**	**72** (± 7,64)	**4,5**
D	**8**	**150** (± 18,27)	**18.75**

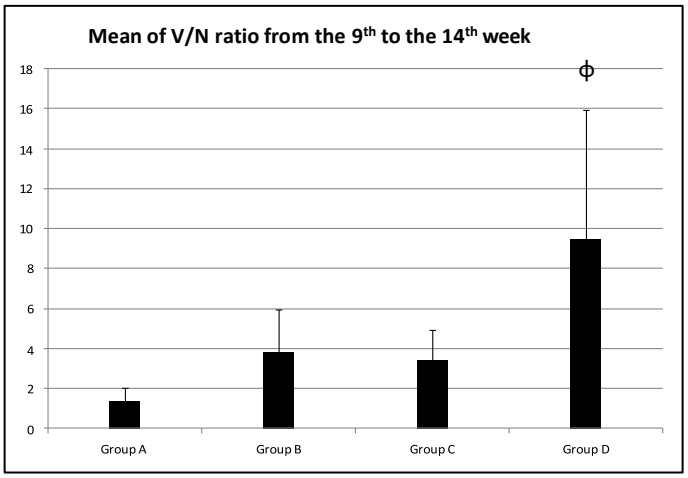


Figure 42 : Moyenne du ratio V/n entre la 9ème et la 14ème semaine de promotion.

#p≤0,05 vs groupe A; ##p≤0,01 vs groupe A; ϕp≤0,05 vs groupe C.

La **figure 43** exprime, le nombre de souris qui ont développé des papillomes/groupe (figure 43-A) et le nombre de papillomes développés/groupe **(figure 43-B)**. Pour tous les groupes, la première semaine correspond à la première application de DMBA, 100% des souris des groupes B, C et D ont développé des papillomes **(figure 43-A)**. Les souris du groupe B ont atteint en

premier ce pourcentage à la semaine 12, suivi par les souris du groupe D et C, aux semaines 15 et 16. Nous avons noté dans ce groupe une disparition des papillomes entre les semaines 13 et 14.

La **figure 43.B** montre qu'à la semaine 14, les souris du groupe B possèdent le nombre le plus élevé de papillomes, suivi par les souris des groupes C, D et A. en ce qui concerne la période de latence, les premiers papillomes sont apparus chez les souris du groupe D, à la semaine 6, suivi par les souris des groupes B et C, à la semaine 8, puis le groupe A, à la semaine 9.

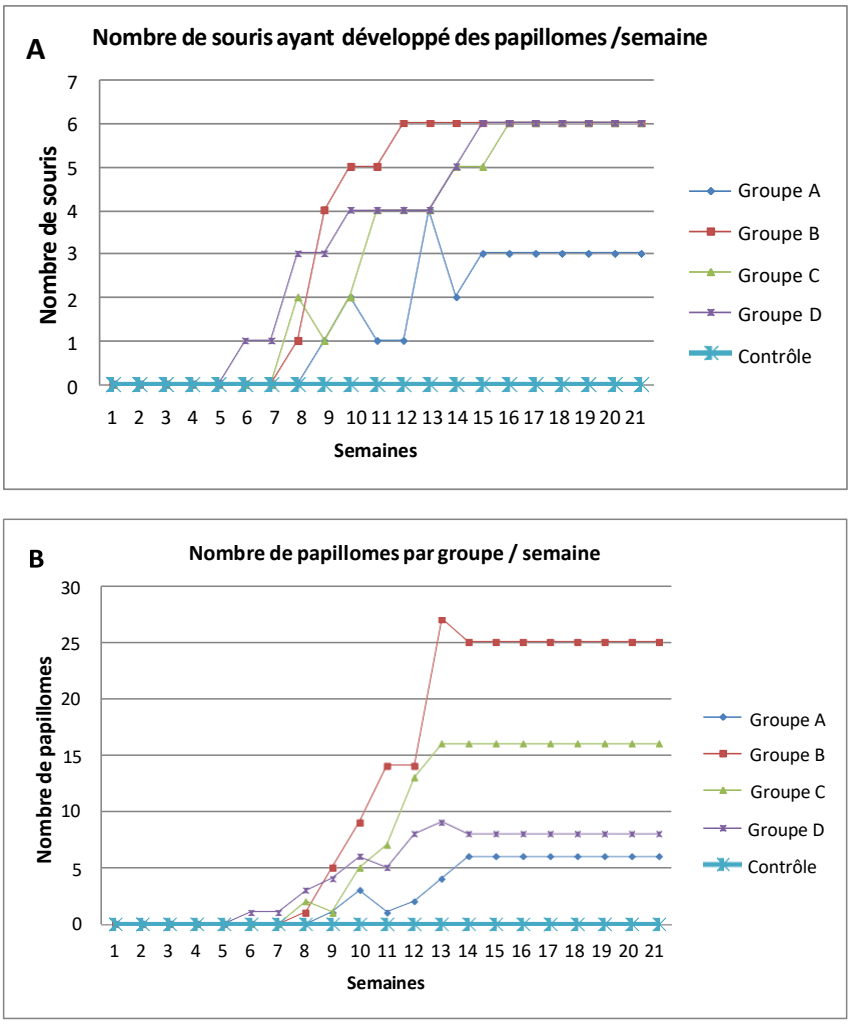
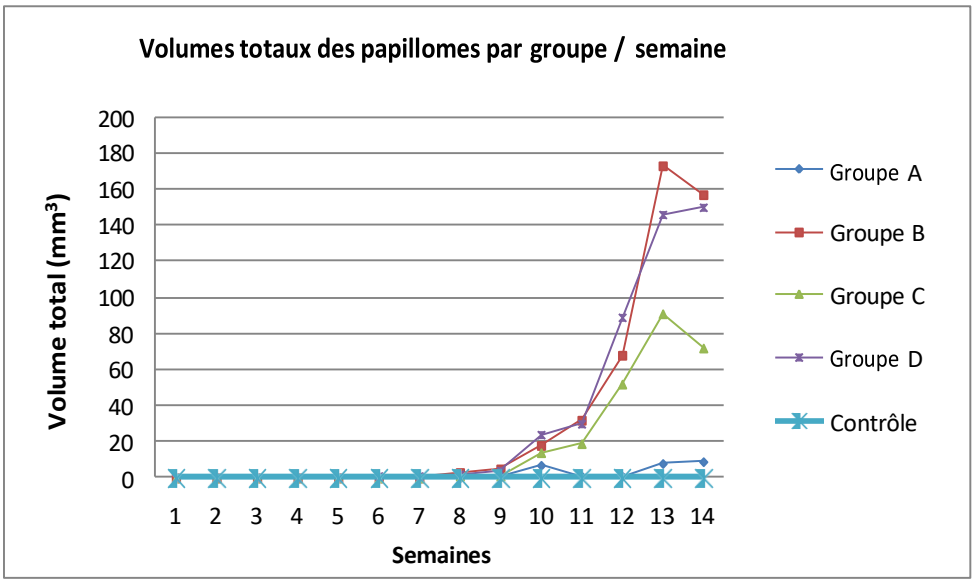


Figure 43 : (A) Le nombre de souris qui ont développé des papillomes dans les différents groupes au cours des 21 semaines d'expérimentation**. (B)** Variation hebdomadaire du nombre de papillomes.

Le **tableau 6** et la **figure 44** expriment les volumes totaux les papillomes par groupe au fil des semaines. Les papillomes n'ont plus été mesurés au-delà de la semaine 14 en raison de leur superposition. A partir de la 10ème semaine les volumes totaux des papillomes chez les souris des groupes B et D étaient significativement plus élevés que ceux du contrôle *(*p≤0,05)*. A la 11ème semaine, ces mêmes volumes étaient significativement plus élevés que ceux du groupe A *(#p≤0,05)*. A partir de la semaine 12, les volumes des groupes B, C et D étaient plus élevés comparativement au groupe A *(##p≤0,01 B vs A; #p≤0,05 C et D vs A)*. Cependant, nous avons observé qu'aux semaines 13 et 14 le niveau de signification entre les groupes B et A était plus important *(####p≤0,0001)*. Des différences significatives entre le groupe A et le contrôle ont été relevées à partir de la semaine 13 *(*p≤0,05)*. Il est important de noter que les papillomes des groups B et C ont éteint leurs valeurs maximales de volume total à la 13ème semaine avec 173 (±3,31) et 91 (±11,99) mm^3, respectivement. A la semaine 14, nous avons observé un léger déclin de ces volumes à 157 (±3,56) et 72 (±7,64) mm^3. Alors que dans le groupe D, le volume total augmente continuellement sans décliner. La même remarque a été portée sur le groupe A avec une importante diminution dans le volume des papillomes entre les semaines 10 et 11. Enfin, aux semaines 13 et 14, une différence significative dans le volume des papillomes a été relevée entre les groupes B et C *(ϕp≤0,05; ϕϕp≤0,01)*.

Tableau 6: Variation dans les volumes totaux des papillomes au cours des semaines.

Semaines	Groupe A (mm^3)	Groupe B (mm^3)	Groupe C (mm^3)	Groupe D (mm^3)	groupe contrôle (mm^3)
1	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
2	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
4	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
5	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
6	**0**	**0**	**0**	**1** (± 0,4)	**0**
7	**0**	**0**	**0**	**1** (± 0,4)	**0**
8	**0**	**3** (± 1,22)	**1** (± 0,26)	**2** (± 0,42)	**0**
9	**1** (± 0,4)	**5** (± 1,13)	**1** (± 0,4)	**4** (± 0,7)	**0**
10	**7** (± 1,83)	**18** (± 2,36) ****p≤0,05 vs Control***	**14** (± 3,66)	**24** (± 3,52) ****p≤0,05 vs Control***	**0**
11	**1** (± 0,4)	**32** (± 3,20) *****p≤0,01 vs control #p≤0,05 vs A***	**19** (± 3,25)	**30** (± 4,09) ****p≤0,05 vs control #p≤0,05 vs A***	**0**
12	**1** (± 0,4)	**68** (± 4,5) *****p≤0,01 vs control ##p≤0,01 vs A***	**52** (± 6,91) ****p≤0,05 vs control #p≤0,05 vs A***	**89** (± 11,85) ****p≤0,05 vs control #p≤0,05 vs A***	**0**
13	**8** (± 1,21) ****p≤0,05 vs Control***	**173** (±3,31) *******p≤0,0001 vs Control ####p≤0,0001 vs A ϕp≤0,05 vs C***	**91** (±11,99) ****p≤0,05 vs Control #p≤0,05 vs A***	**146** (± 18,86) ****p≤0,05 vs Control #p≤0,05 vs A***	**0**
14	**9** (± 1,37) ****p≤0,05 vs Control***	**157** (± 3,65) *******p≤0,0001 vs Control ####p≤0,0001 vs A ϕϕp≤0,01 vs C***	**72** (± 7,64) ****p≤0,05 vs Control #p≤0,05 vs A***	**150** (± 18,27) ****p≤0,05 vs Control #p≤0,05 vs A***	**0**



.

Figure 44 : Variation hebdomadaire du volume total de papillomes.

1.2 Analyse morphologique et histologique :

La **figure 45**, présente les photographies dorsales des souris accompagnées des images de coupes histologiques effectuées sur les biopsies cutanées dans les différents groupes.

Les souris appartenant au groupe contrôle présentent une surface dorsale saine avec une couleur et un aspect normal. Les coupes histologiques de ce groupe montrent une peau saine. Nous pouvons y observer les trois couches bien distinctes qui constituent la peau : l'épiderme (la couche la plus fine) le derme, plus épaisse, avec ses annexes pilosébacés et l'hypoderme (peuplé principalement de cellules graisseuses et musculaires).

Pour les groupes A, B, C et D, les flèches montrent des sites de lésions bourgeonnantes sur le dos de la souris. Le nombre et l'apparence morphologique de ces lésions change en fonction de la dose et de la fréquence de l'application du DMBA.

- ⇨ **Groupe A :** les souris présentent quelques papillomes, petits de taille, de couleur rosâtre et à contour régulier. Les coupes histologiques ont révélé une hyperplasie de bas grade (flèche bleue) avec une anisokaryose (cercles).

- ⇨ **Groupe B :** les souris ont développé plusieurs papillomes, plus volumineux, de forme circulaire, un contour régulier et une couleur rosâtre.
- ⇨ **Groupes C et D :** les papillomes observés étaient plus volumineux, de formes irrégulières avec une tendance à noircir chez les souris du groupe D.

Les souris des **groupes B et C** ont révélé le même schéma histologique avec un carcinome spinocellulaire in-situ caractérisé par une hyperplasie avec une dysplasie de haut grade. Le début de l'angiogénèse était clairement visible (flèches blanches).

Sur le plan histologique, les souris du **groupe D** ont montré un carcinome spinocellulaire mature caractérisé par une désorganisation de l'architecture tissulaire (flèches vertes) avec la présence de cellules atypiques et un stroma fibroinflammatoire. La nécrose tumorale (flèches rouges) et un embole néoplasique (flèche jaune) étaient également visibles.

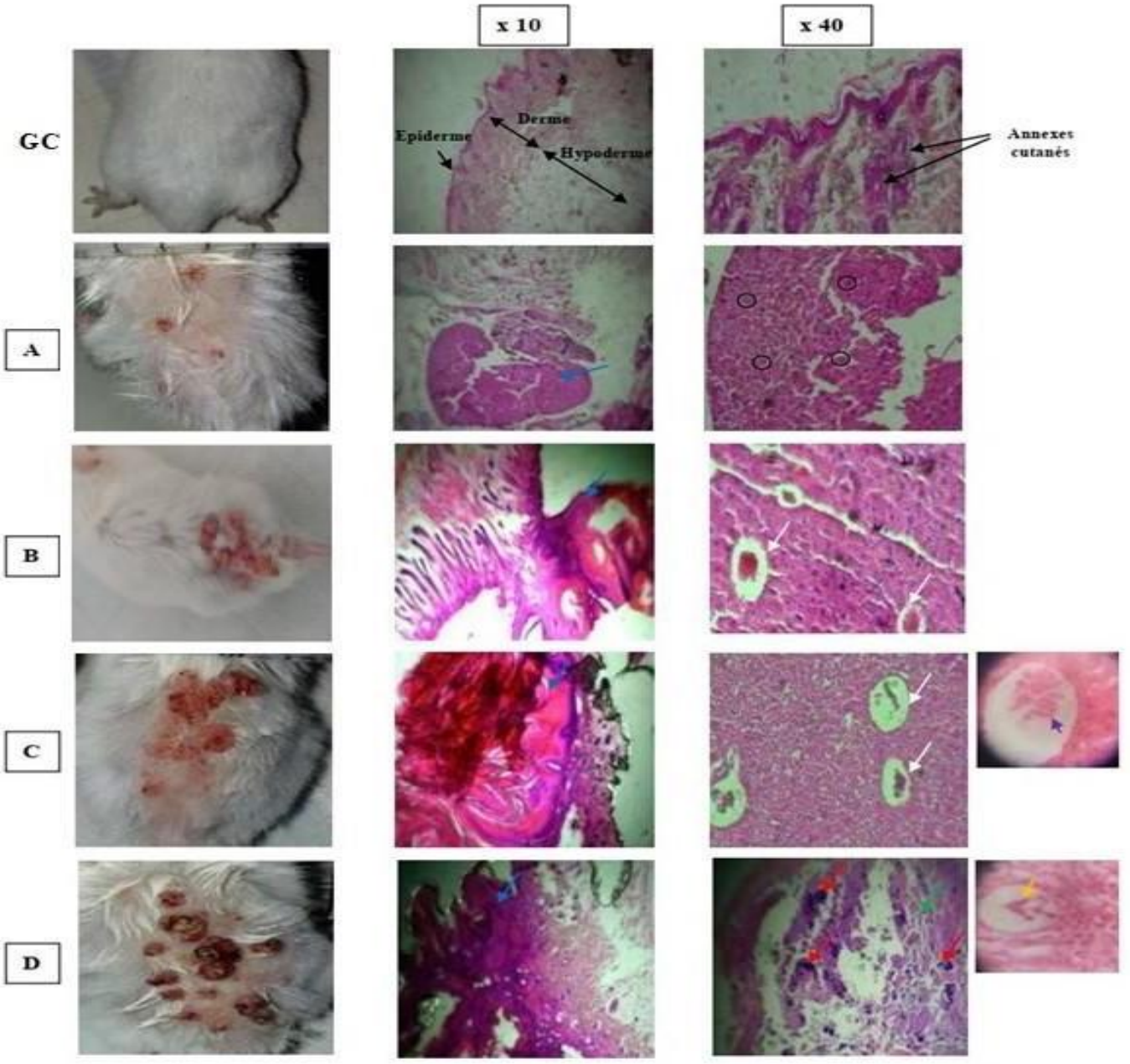


Figure 45: L'aspect morphologique et histologique de la zone dorsale et des coupes histologiques de peau des souris des différents groupes. **GC : groupe contrôle ; A : application unique de 100 µg DMBA /100 µl d'acétone ; B ; application unique de 200 µg de DMBA/100 µl d'acétone ; C : 100 µg DMBA / 100 µl d'acétone une fois par semaine pendant trois semaines consécutives ; D : 100 µg de DMBA / 100 µl d'acétone une fois par semaine pendant quatre semaines consécutives (Digital microscope OX-2000X, 1200W pixels - China).**

1.3 Discussion :

Un cancérogène est défini comme un agent qui provoque un néoplasme par un processus se déroulant en trois étapes : l'initiation (étape de la mutation génétique), la promotion (formation de tumeur bénigne par prolifération de la cellule initiée) et la progression (transformation de la tumeur bénigne en tumeur maligne indépendante du promoteur).

Le but de cette partie du travail a été de mettre au point un modèle animal de cancérogénèse chimique visant à induire un carcinome spinocellulaire chez des souris Swiss albinos. Comme méthodes d'investigation, nous avons procédé aux examens morphologiques et anatomopathologiques de la peau, le tout sur quatre protocoles expérimentaux utilisant le couple : DMBA comme initiateur et l'huile de croton comme promoteur de la cancérogénèse. Une question majeure dans la recherche en oncologie avec les modèles animaux, est de savoir si une augmentation de la concentration en cancérogène ou de la fréquence de son administration influence de manière significative le développement de la tumeur. La mise au point du protocole a donc été basée sur la variation de la dose ainsi que de la fréquence d'application du DMBA.

Nous avons constaté que contrairement au groupe témoin qui ne présentait aucune anomalie morphologique et histologique, le groupe A (100µg de DMBA) présentait un taux d'incidence des papillomes de 50 % accompagné d'un nombre et d'un volume de papillomes faibles, et donc d'un faible rapport V/n, mais aussi une période de latence élevée de 8 semaines. Ces résultats sont en accord avec ceux de Padmavathi et al, qui ont rapporté un taux d'incidence de 80% obtenu après l'utilisation de 100 µg de DMBA comme initiateur suivi d'une promotion hebdomadaire avec la même dose **(Padmavathi et al., 2005).** Les résultats de ce groupe soulignent donc l'insuffisance de la dose utilisée qui se trouve être en dessous de la dose seuil censée garantir un taux d'incidence de 100%. Dans le groupe B (200 µg de DMBA) nous avons constaté une diminution de la période de latence à 7 semaines au lieu de 8 pour le groupe A. Ce groupe a également atteint le nombre et le volume maximums de verrues par rapport à tous les autres groupes avec un rapport V/n de 6,28 ; il atteint un taux d'incidence de 100 % à la semaine 12. En comparant les groupes A et B, nous en avons déduit que l'augmentation de la dose de DMBA favorise la carcinogenèse ; par conséquent, la dose de 200 µg est certainement supérieure ou égale à la dose seuil. Des recherches similaires ont rapporté que l'initiation de la carcinogenèse cutanée avec une seule dose élevée de DMBA pourrait induire des tumeurs sur la peau après 10 à 20 semaines, même sans promotion **(Slaga, 1983).** Les résultats histologiques des groupes A et B ont conforté l'aspect morphologique.

En effet, la carcinogenèse était nettement plus avancée dans le groupe B qui présente un carcinome spinocellulaire in-situ comparativement au groupe A qui s'est arrêté au stade d'hyperplasie bénigne. Ceci confirme que l'augmentation de la dose permet d'atteindre un stade plus avancé de cancérogenèse en un temps plus court.

Concernant la fréquence d'application, la comparaison entre les groupes A, C et D a révélé une nette évolution de la carcinogenèse tant au niveau morphologique qu'histologique. Morphologiquement, le volume et le rapport V/n des papillomes augmentaient d'autant plus qu'on augmentait la fréquence d'application du DMBA (A < C < D). Les souris du groupe D comptent moins de papillomes par rapport à celles du groupe C, ceci est dû au chevauchement des verrues, ceci a été confirmé par le rapport V/n élevé. La période de latence et l'incidence diminuaient à mesure que la fréquence d'application augmentait (A > C > D). L'évaluation histologique a montré une évolution du grade de carcinogenèse avec l'augmentation de la fréquence d'application (A < C < D). Donc, l'augmentation de la fréquence d'application du DMBA a conduit à une évolution rapide du grade de la carcinogenèse. Ces résultats sont en accord avec ceux de Reddy & Fialkow, qui ont utilisé des marqueurs cellulaires chez la souris pour étudier le mécanisme de développement des papillomes. Ils ont montré que les souris traitées avec une administration hebdomadaire répétée de 200 µg de DMBA sans promotion par le TPA induisaient des papillomes qui provenaient de plus de cellules mutées. En revanche, les papillomes résultant d'une seule application de DMBA suivie d'une promotion par le TPA, ont été induits à partir d'une seule cellule ou de moins de cellules. Cela peut expliquer l'évolution plus rapide des tumeurs à mesure qu'on augmente la dose ou la fréquence de l'initiateur **(Reddy & Fialkow, 1983)**. D'autre part, il a été démontré que deux expositions des souris hybrides C57BL/C3H Ft au DMBA, avec un intervalle de 30 jours, entrainait une augmentation du nombre de tumeurs par rapport à une seule exposition au DMBA 1,5% suivi d'huile de croton. Cependant, il n'y a pas eu de modification appréciable du pourcentage de souris qui ont développé des tumeurs **(Vesselinovitch & Gilman, 1957)**. Conformément à ces résultats, Mughal et al. ont traité deux groupes de souris : le premier uniquement par des doses répétées de DMBA réparties sur 20 semaines, et le second avec une seule dose de DMBA suivie d'une application répétée de TPA sur 20 semaines. Le premier groupe a développé des tumeurs cutanées malignes incluant le fibrosarcome, tandis que le second a développé des tumeurs cutanées bénignes excluant le fibrosarcome. Par conséquent, les deux traitements ont conduit à la tumorigenèse, mais avec des grades différents **(Mughal et al., 2005)**.

Les groupes B et C ont montré des résultats morphologiques et histologiques similaires malgré le fait que la dose totale reçue dans le groupe C (300 µg) était supérieure à celle du groupe B (200 µg). Cela conforte l'idée que la concentration en cancérigène influence également le taux de cancérogenèse. Cependant, cette hypothèse devrait être confirmée en comparant le groupe D à un groupe traité avec une dose unique de 400 µg de DMBA.

Il a été constaté que la répartition d'une dose de DMBA en plusieurs applications était le facteur qui avait le plus grand effet tumorigène et cancérigène **(Iversen, 1991)**. De la même manière, de faibles doses de DMBA ont été utilisées comme cancérogène sur des souris SKH1-hr. Il a été déduit qu'outre la concentration du cancérigène, la fréquence de son application a une influence majeure sur les taux de formation des tumeurs cutanées **(Thomas et al., 2017).**

1.4 Conclusion :

A la base de ces résultats, nous concluons que la dose et la fréquence d'administration de l'initiateur influencent le déroulement de la carcinogenèse. Cependant, modifier la fréquence pourrait être un moyen plus efficace d'accélérer la carcinogenèse, compte tenu de l'évolution histologique de la tumeur.

La sélection de la dose idéale est une démarche délicate. Entre la dose de 100 µg et celle de 200 µg de DMBA, se trouve potentiellement une dose seuil qui induirait une cancérisation complète, avec 100% d'apparition des verrues.

En considérant cette hypothèse, pour la suite des travaux, nous avons choisi le modèle animal du groupes A, à savoir : 100µg DMBA/100µl acétone. Le but étant d'étudier les effets préventifs des biothérapies sur les tumeurs bénignes. La dose de 100 µg a été choisie pour sa relative modération, permettant une perception adéquate des effets anti-cancérogènes du traitement, tout en évitant un stade trop avancé de la cancérisation qui pourrait masquer les effets des traitements a faible pouvoir anticancérigène. D'autre part, ce modèle est celui qui se rapproche le plus de la réalité considérant les très faibles doses de DMBA auxquelles nous sommes exposés dans l'environnement.

Une dose unique de 200 µg de DMBA ou une application fractionnée en quatre fois de 100 µg de DMBA permet d'atteindre un stade de tumorigenèse plus avancé, franchissant l'étape de

la progression. Ces deux modèles sont donc mieux adaptés aux études expérimentales sur les carcinomes spinocellulaires proprement dit.

2 Etude toxicologique :

Pour vérifier les éventuels effets toxiques des traitements employés, nous avons effectué une étude de toxicité chronique sur :

- ⇨ La poudre de feuilles de *Annona Muricata* (Graviola) ;
- ⇨ Le mélange d'immunostimulants : bêta-glucane et Arabinogalactane.

Les deux substances ont été administrées par voie orale chez les souris Swiss albinos suivant le protocole précédemment décrit.

2.1 Variation du poids corporel :

Les résultats ne montrent aucune différence significative dans la variation du poids corporel du lot de souris traitées avec l'extrait brut du Graviola ou avec les immunostimulants par rapport au lot témoin **(Figure 46).**

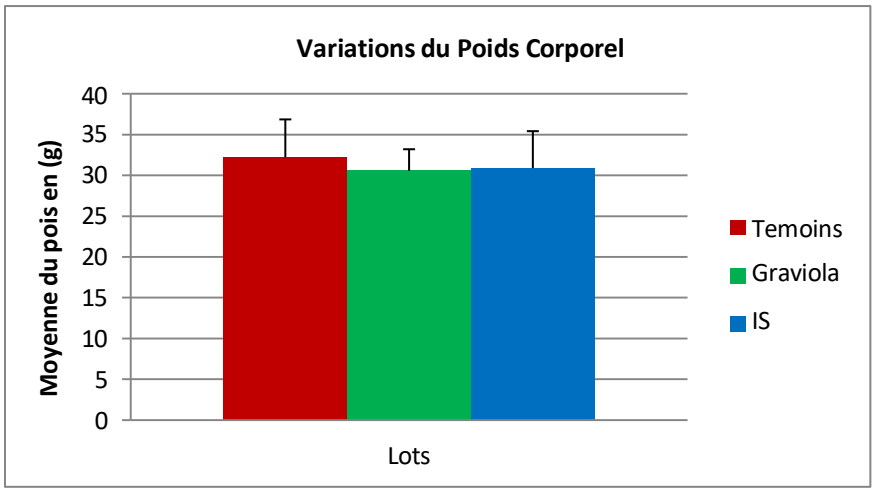


Figure 46: Variations du poids moyen des souris.

2.2 Formule de numération sanguine (FNS) :

Nous avons enregistré une augmentation hautement significative dans le pourcentage des lymphocytes (+25,24%) **(Figure 47)**. Le Graviola semble avoir un effet significatif sur le taux des globules rouges et des monocytes **(Figure 48)**. Nous avons constaté une augmentation significative de taux des monocytes (+40,47%) et des globules rouges (+53,38%), par rapport témoin. En ce qui concerne le lot traité avec les immunostimulants, nous avons observé une augmentation significative de taux des globules blanc (+24,88%) ainsi que celui des lymphocytes (+29,66%) comparativement au lot témoin.

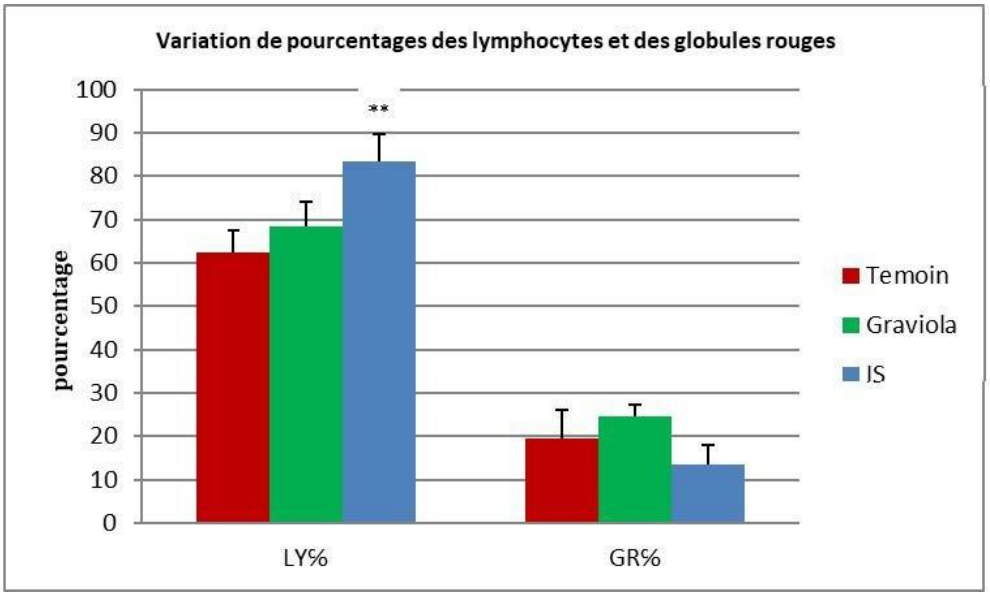


Figure 47: Variation de la formule de la numération sanguine des pourcentages de Globules Rouges et Lymphocytes. ***(**p ≤0,01 vs témoin)***.

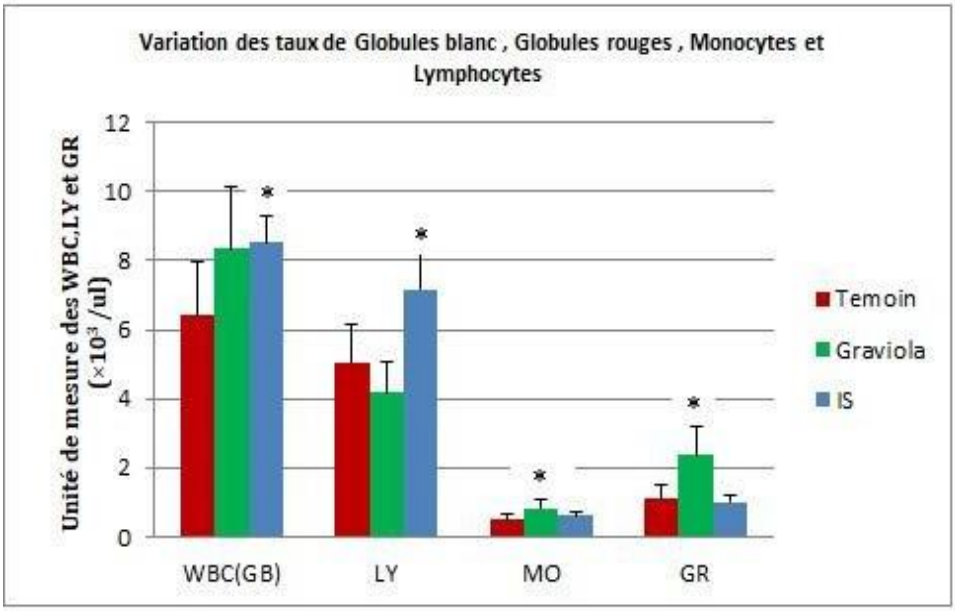


Figure 48: Variation de la formule de la numération sanguine des Globules Blanc, Globules Rouges, Monocytes et Lymphocytes ***(*p ≤0,05 vs témoin).***

2.3 Paramètres biochimiques :

2.3.1 Glycemie, cholesterol et triglycerides :

Les résultats de la **figure 49** révèlent une diminution hautement significative de la concentration plasmatique des Triglycérides sanguins (- 49,04%) chez les souris traitées avec le Graviola par rapport aux témoins. Nous avons également observé une diminution significative de la concentration plasmatique du cholestérol (- 45,06%) chez les souris traitées avec les immunostimulants par rapport au témoin. En revanche, aucune différence significative n'a été observée pour la glycémie entre les trois groupes.

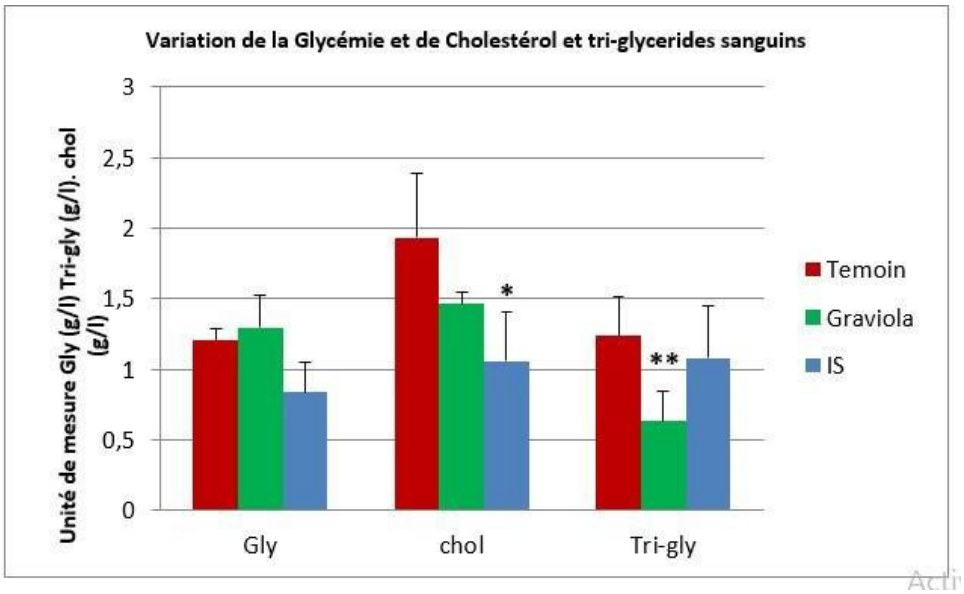


Figure 49: Variations du taux de la glycémie, du cholestérol et des triglycérides sanguins ***(*p ≤0,05 vs témoin, **p ≤0,01 vs témoin).***

2.3.2 Transaminases :

Aussi bien pour le Graviola que pour les immunostimulants, les résultats ne montrent aucune différence significative dans le taux de TGO (transaminase glutamique-oxaloacétique) entre les souris traitées et le témoin. En revanche, une diminution significative dans le taux de TGP (transaminase glutamique-pyruvique) a été notée chez les souris traitées avec les immunostimulant par rapport au témoin **(Figure 50).**

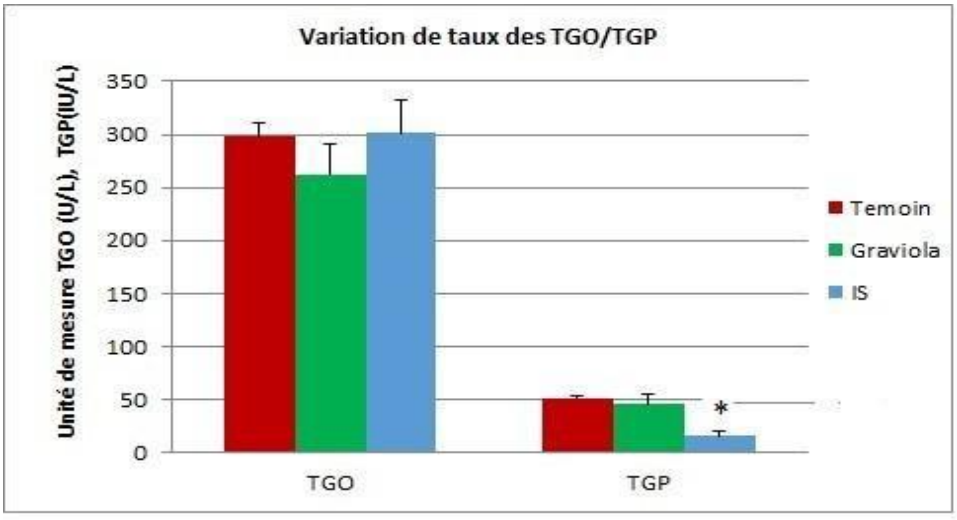


Figure 50: Variations des taux de TGO et TGP ***(*p ≤0,05 vs témoin)***.

2.4 Paramètres du stress oxydatifs :

2.4.1 Catalase (CAT):

L'histogramme de la **figure 51.A** révèle que le Graviola provoque une diminution significative dans l'activité de la CAT hépatique (-29.26%). En revanche, l'activité de la CAT cérébrale semble ne pas être affectée **(figure 51.B)**. Aucune différence significative n'a été relevée concernant l'activité de CAT chez les souris traitées par les immunostimulants.

2.4.2 Glutathion peroxydase (GPx) :

Nos résultats ont révélé une augmentation significative dans l'activité de la GPx hépatique (+53,18%) **(Figure 51.C)** et aucune différence dans l'activité de la GPx cérébrale **(Figure 51.D)** par rapport au témoin. Les immunostimulants entrainent quant à eux une augmentation significative dans l'activité de la GPx cérébrale (+50,34%) et aucune différence pour la GPx hépatique par rapport au témoin.

2.4.3 Malondialdéhyde (MDA) :

Le traitement des souris par la poudre des feuilles de Graviola n'entraîne aucune variation significative dans le taux du MDA dans les deux organes. En revanche, chez le lot traité par les immunostimulants, nous remarquons une élévation significative du taux de MDA au niveau de cerveau (+56,68%) **(Figure 52.B)**, alors qu'aucune différence significative n'a été relevée au niveau de foie **(Figure 52.A)**.

2.4.4 Glutathion réduit (GSH) :

Étant donné les indications issues de la littérature suggérant une réduction du taux de catalase au niveau du système nerveux alors que le GSH y est présent à des niveaux élevés, nous avons opté pour la quantification du taux de GSH à ce niveau pour évaluer le stress, en particulier pour la plante faisant l'objet de suspicions de maladies neurodégénératives dans plusieurs études. Nous avons constaté une diminution hautement significative de taux de GSH (-55,36%) au niveau

du cerveau chez les souris traitées par la poudre de Graviola comparativement au lot témoin **(Figure 52.C)**. Les immunostimulants en revanche, ne semblent pas avoir d'effet sur ce paramètre.

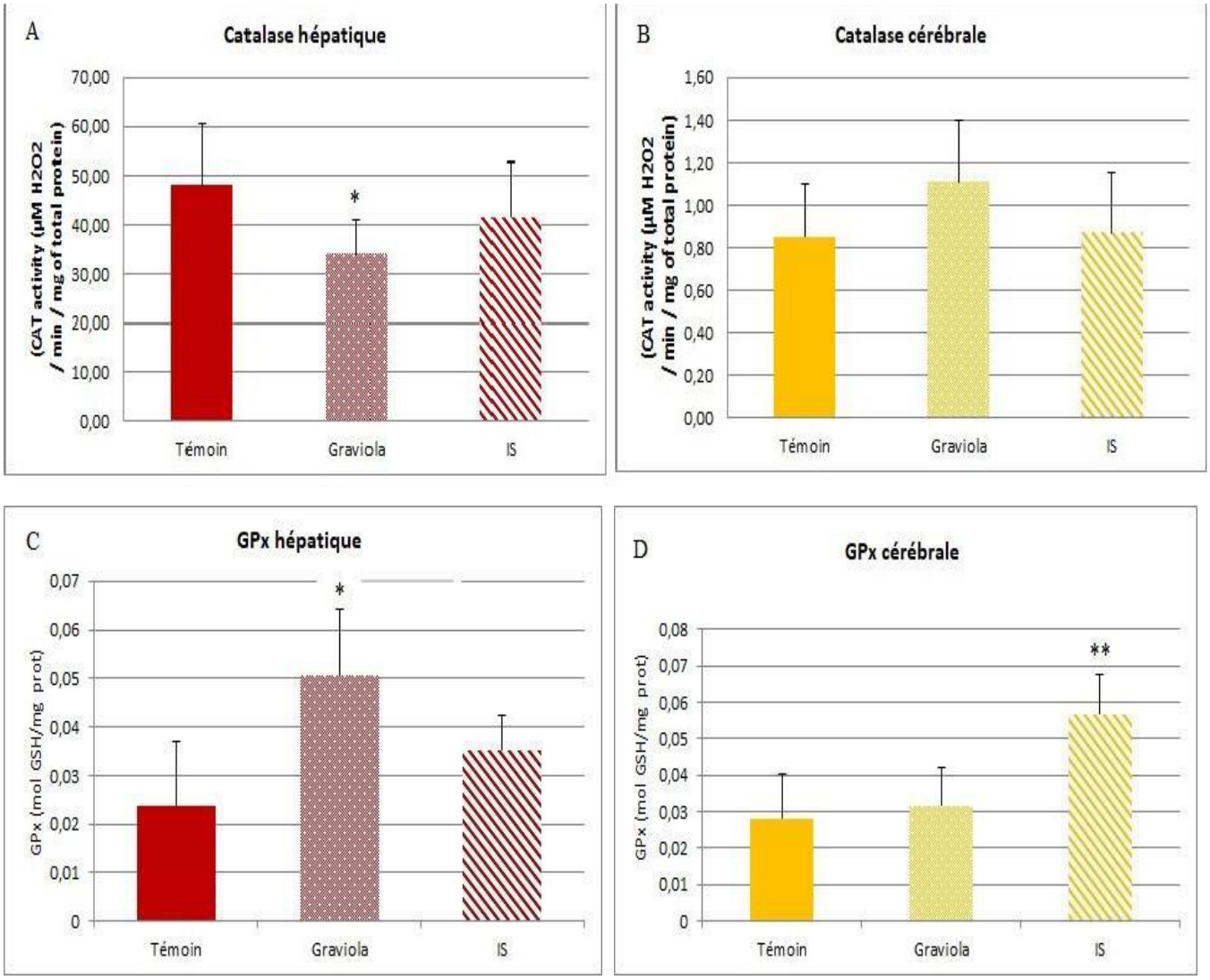


Figure 51: Variation des activités des enzymes du stress oxydant chez les souris traitées avec le Graviola ou avec les immunostimulants. **A)** Activité de la catalase hépatique. **B)** Activité de la catalase cérébrale. **C)** Activité de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique. **D)** Activité de la glutathion peroxydase (GPx) cérébrale ***(*p ≤0,05 vs témoin ; **p ≤0,01 vs témoin)***.

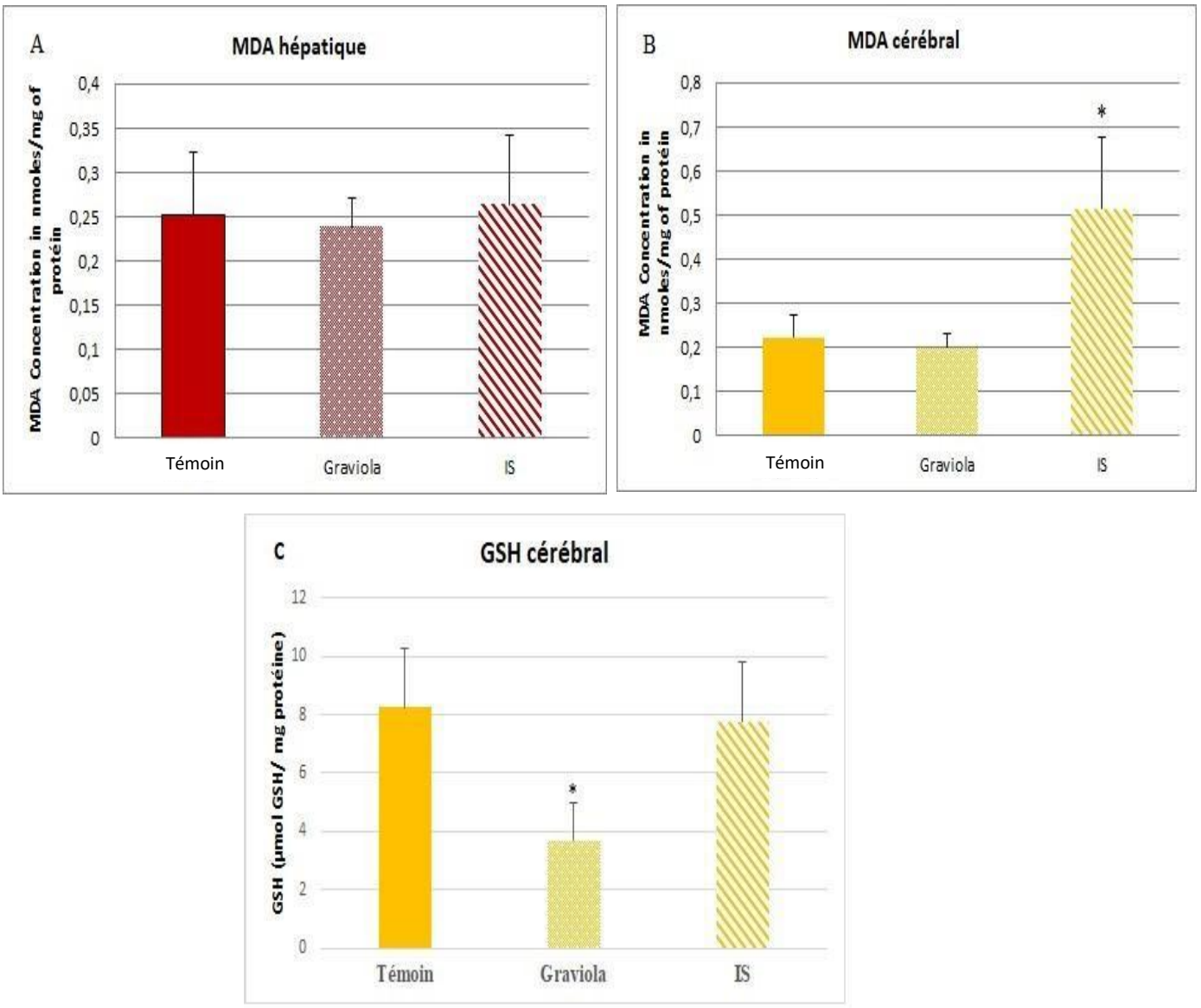


Figure 52: Variation des taux des marqueurs du stress oxydant chez les souris traitées avec le Graviola ou avec les immunostimulants. **A)** Concentration du MDA hépatique. **B)** Concentration du MDA cérébral. **C)** Concentration du GSH cérébral ***(*p ≤0,05 vs témoin*)**.

2.5 La Reprotoxicité :

2.5.1 Le Graviola :

Après trois semaines de copulation, 100% des femelles du groupe témoin étaient gestantes, tandis que 33,33% (2/6) seulement des femelles du groupe traité avec le Graviola l'étaient. Après la mise bas de toutes les souris, les nouveaux nés ont été comptés et les résultats présentés dans le **Tableau 7**.

Une diminution du nombre total de descendants par lot a été observée, avec une moyenne de 7,83 descendants dans le lot témoin (Lot T), tandis que ce nombre chute à seulement 6 dans le lot traité par le Graviola (Lot G).

2.6 Les immunostimulants :

Chez les souris traitées avec les immunostimulants, aucune différence significative n'a été observée, que ce soit en termes de nombre de femelles gestantes ou de la taille de la portée, par rapport au groupe témoin. 100% des souris traitées sont devenues gestantes et, après la mise bas, le nombre de descendants dans ce groupe était semblable à celui du groupe témoin**.**

Tableau 7: Résultats de la mise bas et pourcentage de Souriceaux.

	Lot T	Lot G	Lot IS	% G/T	% G/IS	% diminution par rapport au lot T	
						G	IS
Femelles pleines (Fp)	6	2	6	33,33	100	66,66	0
Nombre de souriceaux (Ns)	47	12	44	25,53	93,61	74,46	6,39
Ns males	23	9	21	39,13	91,30	60,86	8,7
Ns femelles	24	2	23	8,33	95,83	91,66	4,17
Ns/Fp	7,83	6	7,33				

2.7 Etude histologique :

2.7.1 Le Graviola :

Les coupes histologiques **(figure 53)** du foie dans les deux lots témoins et traités ont montré une architecture cellulaire normale avec cellules hépatiques distinctes encore intactes, les espaces sinusoïdales et veine centrale sont claires ; les coupes histologiques cérébrales révèlent une architecture globale normale ainsi que des cellules cérébrales saines dans les deux lots de souris témoins et traitées, Les coupes histologiques utérines ne révèlent pas de différences entre les lots traités et les témoins. Les variations d'épaisseur de l'endomètre utérin sont fréquemment observées chez les souris, qui présentent des cycles œstraux fréquents, contrairement aux cycles menstruels humains. Aussi, il n'y a pas de variations visibles au niveau du myomètre et du périmètre. Dans toutes les couches de l'utérus, aucune lésion ni infiltration de cellules immunitaires inflammatoires n'a été observée.

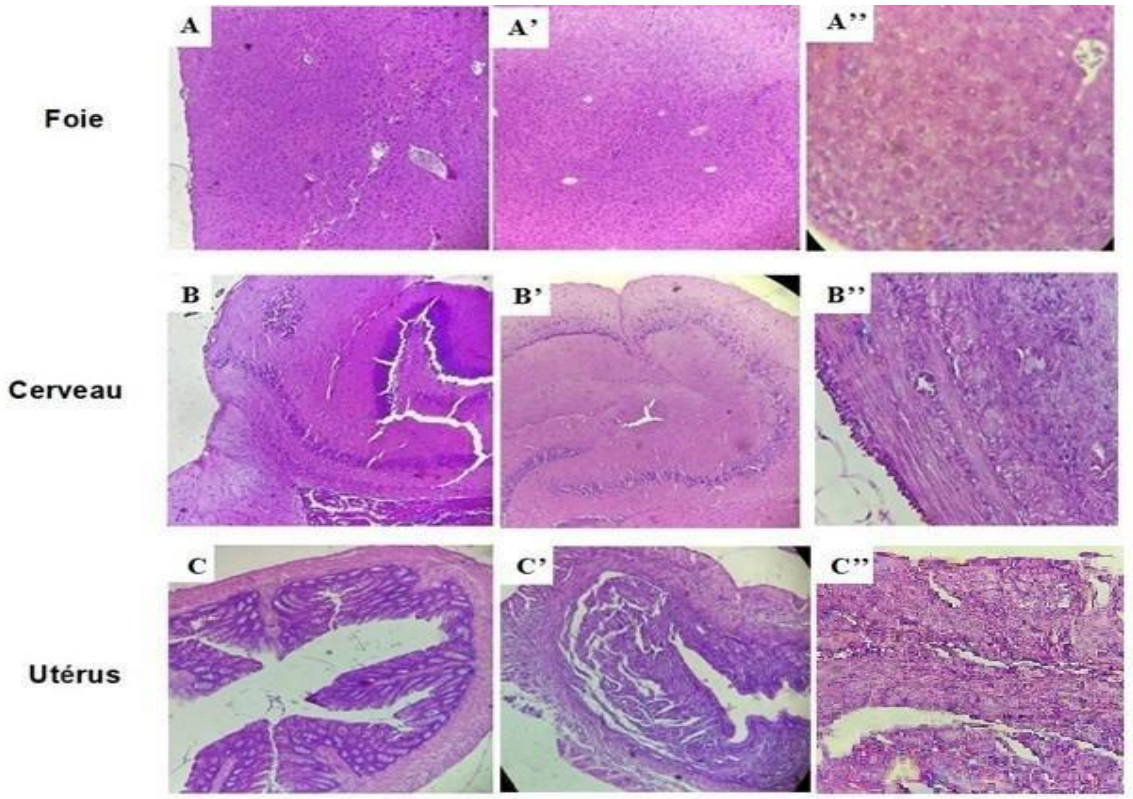


Figure 53 : Coupes histologiques du foie, du cerveau et de l'utérus chez le lot traité par la poudre des feuilles de Graviola : **A, B, C)** témoin (×10) ; **A', B', C')** traitée (×10) ; **A'', B'', C'')** traitée (×40). Microscope optique Leica (×10) et (×40).

2.7.2 Les immunostimulants :

Étant donné que les résultats de la reprotoxicité obtenus chez les souris traitées par les immunostimulants n'ont révélé aucun changement significatif en termes de nombre de portées et de nombre de descendants par rapport au groupe témoin, nous avons mené notre étude de l'éventuelle toxicité des immunostimulants au niveau du foie et du cerveau uniquement.

Les coupes histologiques **(figure 54)** n'affichent aucune altération ou lésion au niveau des tissus hépatiques ou cérébraux des souris traitées par les immunostimulants, comparativement au groupe témoin.

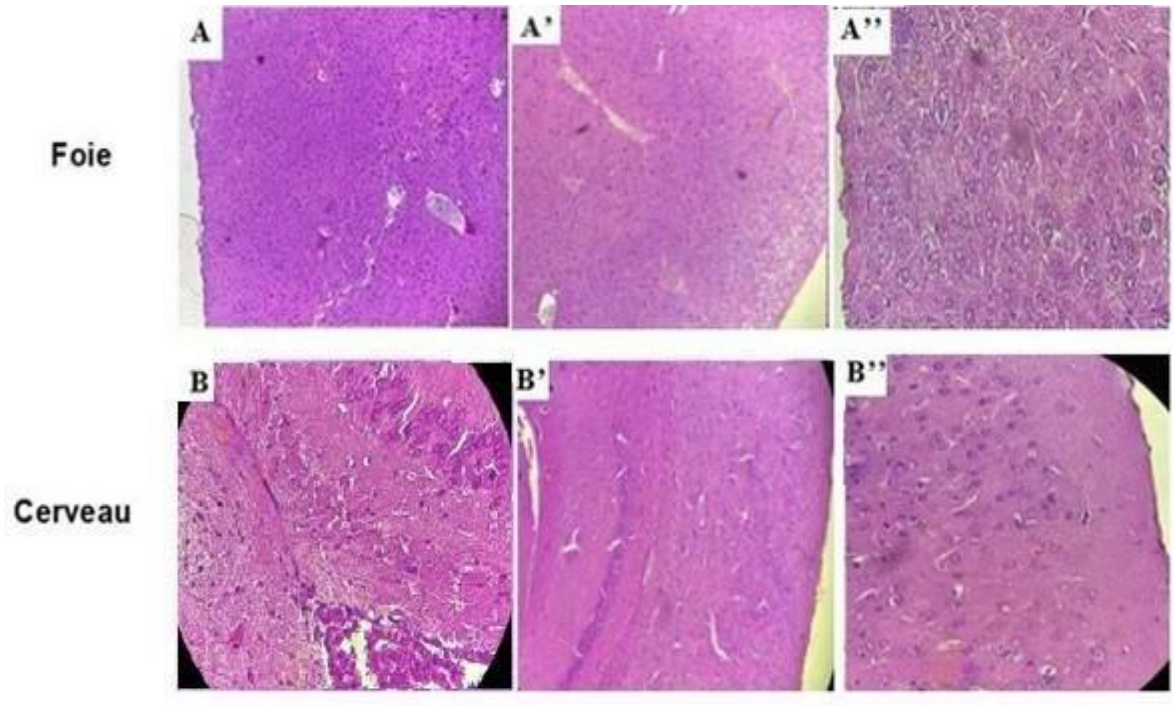


Figure 54 : Coupes histologiques du foie, du cerveau chez le lot traité par les immunostimulants : **A, B)** témoin (×10) ; **A', B')** traitée (×10) ; **A'', B'')** traitée (×40). Microscope optique Leica (×10) et (×40).

2.8 Discussion :

18 souris mâles de la souche Swiss albinos ont été soumises à une étude de la toxicité chronique de la poudre de feuilles de Graviola ainsi qu'au immunostimulants (bêta-glucane (provenant de Saccharomyces cerevisiae) et d'Arabinogalactane). Les animaux ont été pesés de manière hebdomadaire, après sacrifice, le dosage sérique des paramètres biochimiques (glycémie, cholestérol, triglycéride, TGO, TGP), les paramètres de stress oxydatif et la formule de numération sanguine FNS ont été effectué.

Dans l'ensemble, tant pour les animaux traités avec la poudre de Graviola que pour ceux ayant reçu les immunostimulants, aucun changement significatif n'a été observé dans leur comportement alimentaire ou global. De plus, aucune manifestation de maladie systémique n'a été

constatée, et aucun signe d'anomalie systémique n'a été relevé lors de l'examen histopathologique des organes internes.

2.8.1 Pour le Graviola

La détection d'alcaloïdes et de flavonoïdes (anthocyanes et leuco-anthocyanes) dans l'extrait d'*Annona muricata* suggère qu'ils ont le potentiel d'induire diverses activités biologiques, car les flavonoïdes, un groupe de composés phénoliques, sont impliqués dans plusieurs effets biologiques, comme leur action anti-inflammatoire, leur pouvoir antioxydant et leurs effets hépatoprotecteurs **(Arnaud et al., 2020; Ortuño et al., 2006)**.

Glycémie et poids corporel

Le Graviola est une espèce de plante tropicale connue pour ses fruits comestibles qui ont des vertus médicinales. Les utilisations médicinales traditionnelles du Graviola ont été identifiées dans les régions tropicales pour traiter diverses affections. En outre, les études cliniques soutiennent l'activité hypoglycémique des extraits éthanoliques des feuilles d'*Annona muricata* et certaines activités pharmacologiques comme les activités antioxydantes, antimicrobiennes, et hypotensives. Le Graviola a aussi des effets toxicologiques par exemple : effet neurotoxique **(Coria-Téllez et al., 2016; Ferreira et al., 2022).** Elle entraîne de nombreux effets secondaires, tels que des nausées et des vomissements graves, une néphrotoxicité aiguë et chronique **(Arroyo et al., 2009; Arthur et al., 2011; Coria-Téllez et al., 2018)**.

Dans notre étude, nous avons observé une légère perte de poids chez les souris traitées avec l'extrait brut de Graviola de 5,1% pour le lot chronique par rapport témoin. Nos résultats se rapprochent de ceux de **Sasso et al., (2019)** qui ont évalué les effets thérapeutiques de doses croissantes d'un extrait aqueux de Graviola (50, 100 et 150 mg/kg) sur des souris pendant 14 jours. Ils ont observé une perte de poids significative chez les souris traitées par rapport au témoin. Cela dit, aucune réduction de l'apport calorique n'a été observée chez les groupes traités avec l'extrait au cours de la période expérimentale. Ainsi, la réduction du poids ne semble pas être reliée à une consommation calorique plus faible **(Radapong et al., 2019).**

Dans la même étude, Sasso et al., 2019 ont observés une augmentation de l'adiponectine dans le groupe traité avec 50 mg/kg de l'extrait de Graviola par rapport aux autres groupes.

L'adiponectine est une protéine sécrétée par les adipocytes qui possède des effets anti-diabétiques, anti-athérogènes et anti-inflammatoires. Une expression accrue de cette protéine, peut prévenir et/ou contribuer au traitement des maladies métaboliques liées à l'obésité **(Scoditti et al., 2015).** Elle est Impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose. Les taux d'adiponectine sont inversement proportionnels aux réserves de graisses de l'organisme. Quand l'adiponectine augmente, l'insulinorésistance diminue ce qui favorise la perte de poids. D'ailleurs, plusieurs études ont montré qu'un taux élevé d'adiponectine est corrélé avec la diminution du risque de diabète de type II **(https://www.nutripro.nestle.fr/nutripro).**

Cette réduction du poids corporel pourrait s'expliquer par l'effet hypolipidémiant de la plante, comme en témoigne son impact réducteur sur le cholestérol et les triglycérides, comme illustré dans la **Figure 49.**

Notre étude a révélé une légère augmentation non significative de la glycémie (+7,08%) dans le lot traité par rapport au témoin. Ce résultat est en accord avec les résultats de **Radapong et al., (2019)** qui ont remarqué une légère augmentation de la glycémie dans une étude de toxicité chronique avec un extrait aqueux de l'*Annona muricata* chez les rats males.

À l'inverse la conclusion rapportée par une étude de **Adewole & Caxton-Martins, (2006)** qui a porté sur l'effet des extraits aqueux et méthanoïques des feuilles de Graviola (100 mg/kg) sur la morphologie des cellules β pancréatiques sur un modèle expérimental de rats diabétique, ont rapporté d'une part une activité hypoglycémiante des extraits de feuilles de Graviola et d'autre part une absence d'altérations des cellules β pancréatiques habituellement observées chez les rats diabétiques. La baisse du taux de sucre dans le sang grâce aux extraits d'A. muricata est associée à la présence de composés polyphénoliques **(Hernández Fuentes et al., 2022).**

Formule de numération sanguine (FNS)

Dans cette étude de toxicité chronique l'extrait de Graviola ne semble avoir aucun effet significatif sur le taux des cellules sanguines (Globule blancs, Lymphocytes, % Lymphocytes et % de Globules rouges) mais nous avons observé une augmentation significative dans le nombre des globules rouges (+53,38%) et de monocytes (+40,47%), ces résultats corroborent ceux de **Shukry et al., (2020)** qui montrent une élévation non significative dans le nombre de globules rouges et ce de globules blancs à la fois, chez des rat traités par une dose de 200 mg/Kg d'extrait sec de

Graviola pendant 8 semaines. Dans cette même étude, il a été observé que l'extrait de Graviola avait un effet prophylactique chez les rats traités au glutamate monosodique, une substance connue pour ses effets néfastes sur les paramètres hématologiques, induisant une leucopénie et une diminution du taux de globules rouges. En revanche, l'extrait de Graviola a significativement augmenté le nombre de ces cellules (GR et GB), les ramenant approximativement aux valeurs normales. Cela suggère que l'augmentation du nombre de globules rouges n'était pas due à une pathologie sous-jacente.

En outre, une étude de toxicité aiguë de **Naik et al., (2020)** ayant utilisé une dose de 500 mg/kg de l'extrait méthanolique des feuilles de Graviola, a révélé une augmentation non significative du taux de globules rouges, accompagnée d'une diminution du pourcentage de monocytes.

En revanche , L'étude de **AGU et al., (2017)** montre que l'administration des divers extraits des parties de la plante chez les animaux a entraîné une augmentation frappante et significative ($P<0.05$) du nombre de globules rouges par rapport aux témoins. Ces observations pourraient être attribuées à la quantité notable d'alcaloïdes, de flavonoïdes et de phénols présents dans les fractions foliaires et fruitières, qui agissent sur la moelle osseuse pour stimuler ou réguler la production de cellules sanguines.

Arthur et al ont évalué la toxicité aiguë et sub-chronique de l'extrait aqueux des feuilles de Graviola chez des souris Swiss albinos mâles et femelles. L'étude de toxicité a été réalisée en employant des doses croissantes d'extrait de feuilles de Graviola (100, 1000, 2500 et 5000 mg/kg). Les résultats ont montré que les plus fortes doses (2500 et 5000 mg/kg) de l'extrait induisaient une augmentation significative dans le taux de lymphocytes. Tandis qu'aucune différence significative n'a été relevé pour les autres doses. Par ailleurs, l'extrait aqueux des feuilles de Graviola n'a eu aucun effet significatif sur le taux des globules rouges, ceci est en accord avec nos résultats **(Arthur et al., 2011).**

Triglycérides / Cholestérol

Nos résultats ont révélé une diminution hautement significative du taux des Triglycérides sanguins (-49,03%) chez les souris traitées par rapport aux témoins. Nous avons également relevé

une légère diminution non significative dans le taux du cholestérol sanguin (-24,15%) chez les souris traitées par rapport aux témoins.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'Adeyemi et ses collègues qui ont évalué, pendant deux semaines, l'effet de l'extrait méthanoliques du Graviola *(*100 mg/kg) sur les changements du profil lipidique sérique dans un modèle de diabète expérimental induit par la streptozotocine chez des rat Wistar. Les résultats de l'analyse des lipides sériques ont révélé une activités anti-hyperlipidémiques qui se traduit par une réduction significative du taux de cholestérol total sérique et des triglycérides **(Adeyemi et al., 2008).**

Nos résultats sont également en accord avec ceux de Florence et al, qui ont évalué les effets hypoglycémiants et hypolipidémiant de doses croissantes (200, 400 et 800 mg/kg) de l'extrait aqueux de feuilles de Graviola sur un modèle expérimental de diabètes à l' streptozotocin chez des rats Wistar. Les résultats de cette étude montrent qu'après 4 semaines de traitement, les taux du cholestérol total et les triglycérides ont diminué de façon très significative chez tous les groupes traités **(Ahalya et al., 2014; Florence et al., 2014; Sovia et al., 2017).**

Sandhar et al, ont constaté que les flavonoïdes présents dans ces extraits jouent un rôle important dans l'effet hypolipidémiant. En outre, ils protègent des LDL (Low Density Lipoprotéine) contre les modifications oxydatives ce qui en fait un bon moyen pour prévenir les maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle et l'athérosclérose **(Sandhar et al., 2011).** En plus, Sovia et al., (2017) suggère que la présence de flavonoïdes, de tanins, de saponines, de phytostérols et de composés phénoliques dans l'extrait semble contribuer à l'effet hypoglycémiant et hypolipidémiant constaté dans son étude.

Les transaminases

Nos résultats n'ont révélé aucune variation significative dans les niveaux des transaminases (TGO et TGP) chez les souris qui ont reçu la poudre de Graviola par rapport au témoin, suggérant ainsi une absence d'atteinte de la fonction hépatique et donc l'innocuité de la dose de poudre de feuilles de Graviola administrée. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Zubaidi et al., qui ont effectué une étude de toxicité aiguë de l'extrait éthanolique des feuilles de Graviola (2000mg/Kg) chez les rats, les mesures des paramètres hépatiques transaminases et phosphatase alcaline ont été comparées à celles du groupe non traité. Les résultats n'ont montré aucune

différence statistiquement significative dans les marqueurs enzymatiques du foie entre les groupes témoins et traités **(Zubaidi, Qadi, et al., 2023).**

Contrairement a ces résultats , **Aivodji et al., (2018)**; qui ont étudié les éventuels effets toxiques de doses croissantes d'extrait éthanolique des feuilles de Graviola (50 100 et 200 mg / kg) sur le fonctionnement des reins et du foie chez le rat Wistar. Leurs résultats ont monté une augmentation significative de TGP avec une diminution significative de TGO, pour les trois doses étudiées. En revanche, ces travaux ont rapporté que des symptômes de toxicité dépendant de la dose pouvaient être observé, a titre d'exemple, une légère somnolence, problèmes respiratoires, accélération du rythme cardiaque entraînant des convulsions**.**

Les paramètres de stress oxydatif

Le Graviola a été étudié dans de nombreuses recherches et a montré divers bienfaits pour la santé. Il protège contre le stress oxydatif et améliore les enzymes antioxydantes comme la catalase, la glutathion peroxydase **(El-Shahat et al., 2021; Shukry et al., 2020; Zeweil et al., 2024) .** Certaines études ont mis en évidence une certaine toxicité associée à la plante, notamment en ce qui concerne sa neurotoxicité **(Coria-Téllez et al., 2018; Mutakin et al., 2022).**

Dans notre étude, nous avons observé une diminution significative de l'activité de la catalase hépatique. En revanche, aucune variation de cette activité n'a été constatée au niveau du cerveau. Cette observation pourrait s'expliquer par une possible concentration élevée de l'anion superoxyde (O^{2-}) entraînant une inhibition de l'activité de la catalase. Cette capacité de l'oxygène singulet à entraver l'action de la catalase ouvre la voie à une collaboration potentielle avec la superoxyde dismutase. Il est également plausible que cette altération de la capacité de la catalase à neutraliser le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) soit due à l'exposition à la plante *Annona muricata* **(Irshad & Chaudhuri, 2002; Kono & Fridovich, 1982)**.

Dans le même ordre d'idées, une altération de la catalase, ainsi que l'inhibition de son activité, pourraient entraîner une augmentation de la concentration de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans le milieu. Cela pourrait alors nécessiter l'implication de l'enzyme glutathion peroxydase (GPx) pour neutraliser le H_2O_2. En effet, nous avons constaté une augmentation de l'activité de la GPx au niveau du foie, tandis qu'aucun changement n'a été observé au niveau du cerveau.

Dans notre étude nous n'avons remarqué aucun changement significatif dans le taux de MDA que ce soit dans le foie ou dans le cerveau. Ceci pourrait être expliqué par l'absence de toute forme de lésions par peroxydation lipidique dû à la plante. Ce résultat va à l'encontre des conclusions de **Grover et al., (2009)**. Qui a trouvé que la dose de 300 mg/kg of extrait de graine d'*Annona squamosa* a provoqué une augmentation significative de la MDA chez plusieurs organes des rats.

Au niveau du cerveau, nous avons constaté une diminution hautement significative de taux de glutathion réduit (GSH), ce qui témoigne un niveau élevé de stress oxydatif dans cet organe, cet épuisement important de GSH cérébrale est du au perte de l'homéostasie redox suite l'augmentation des espèces réactifs d'oxygène (ERO) **(Conde de la Rosa et al., 2022).** Les troubles de la fonction du glutathion dans le cerveau sont liés à la diminution des neurones qui survient au fil du vieillissement ou dans des conditions neurologiques telles que la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson, l'accident vasculaire cérébral et la maladie d'Alzheimer **(Iskusnykh et al., 2022).** Nos résultats sont cohérents avec ceux de **(Grover et al., 2009).** Les chercheurs ayant étudié l'extrait de graines d'*Annona squamosa* ont constaté une diminution du taux de GSH dans le cerveau. Leur étude a également mis en évidence une génotoxicité associée à une concentration élevée de cet extrait. Cette génotoxicité semble être induite par les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Histologie

Les images des coupes histologiques ne révèlent aucune anomalie tissulaire hépatique ou cérébrale. Ceci appuis nos résultats hématologique et biochimiques ainsi que ceux de stress oxydatif. Nos résultats sont confortés par ceux de Chagonda et al, qui ont testé l'effet toxique de doses croissantes allant de 250 à 1000 mg/Kg pendant 28 jours de l'extrait de *A. stenophylla* appartenant a la famille des annonaceaes sur des rats Sprague Dawley. Ils ont en effet rapporté l'absence de toute lésion histologiques au niveau du foie et du pancréas **(Chagonda et al., 2015).** En revanche nos résultats histologiques relatifs au cerveau vont à l'encontre de certaines études épidémiologiques se doutant d'un possible rapport entre la consommation accrue du Graviola et la maladie neuro-dégénérative de Parkinson **(Lannuzel et al., 2006).** Peut-être faut-il prendre en

compte le facteur temps, car il se pourrait qu'aucune manifestation de la maladie de Parkinson ne soit observée après 3 mois d'expérimentation.

A l'encontre de nos résultats, Aivodji et al ont observé une atteinte hépatique à partir d'une dose de 100 mg/kg. Cette atteinte est accentuée dans une pycnose hépatique des noyaux à la dose de 200 mg/kg caractérisé par un effacement des limites cellulaires dans les hépatocytes sans modification de l'architecture **(Aivodji et al., 2018).** En revanche, **Menon et al., (2023)** ont montré que la poudre de pulpe de fruit de Graviola avait un effet protecteur important contre les lésions hépatiques aiguës induites par le paracétamol chez les rats. Ces effets semblent être dus au rétablissement de l'équilibre redox dans le foie et au maintien de son architecture chez les rats traités. De plus, il est envisagé que la pulpe de fruit du Graviola puisse influencer les enzymes du cytochrome P450.

Des recherches préliminaires ont montré que bien que les Acétogénines, comme l'Annonacine, aient la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique, la quantité d'Acétogénines atteignant le cerveau est limitée à des doses de 10 mg/kg **(Bonneau et al., 2015).** De même, quelques études ont révélé que l'Annonacine peut provoquer un état parkinsonien atypique en raison de son effet neurotoxique. Cela est attribuable au dépôt de ces composés dans les cellules du système nerveux, 'protéine tau**' (Champy et al., 2004; Escobar-Khondiker et al., 2007; Ferreira et al., 2022).** Dans notre étude, une immunohistochimie sur les coupes histologiques de cerveau aurait permis de mettre en évidence les enchevêtrements neurofibrillaires caractéristiques des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Ces enchevêtrements sont causés par l'agrégation anormale des protéines tau au niveau des neurones.

Usunomena, (2014) a suggéré que la capacité des extraits de feuilles de Graviola à moduler la toxicité aiguë du DMN (dimethylnitrosamine) au niveau du foie, pouvait être due à l'abondance de la plante en substances chimiques telles que les Acétogénines, les tanins, les phénols et les flavonoïdes qui renforcent les capacités endogènes des enzymes et les antioxydants non enzymatiques.

La reprotoxicité

L'expérimentation basée sur la reproduction a révélé une diminution importante du taux de portées chez les souris traitées avec le Graviola par rapport au témoin, De même, on observe une

réduction de la moyenne des descendants par lot (exprimée en tant que ratio Ns/Fp) dans le groupe traité par rapport au groupe témoin.. Cette diminution suggère une altération de la fertilité des souris, mâles, femelles ou les deux.

Aucun cas d'avortement n'a été observé, ceci concorde avec les résultats de l'étude menée par **(Damasceno et al., 2002)**, qui ont constaté l'absence d'avortement chez les rates gestantes ayant reçu des doses élevées de l'extrait d'*Annona squamosa* pendant les cinq premiers jours de la gestation.

Les coupes histologiques relatives aux utérus des souris ayant reçu le Graviola n'ont montré aucune anomalie architecturale par rapport aux témoins, ceci, malgré les résultats indiquant clairement une baisse de fertilité. Dans le même sens, **Damasceno et al., (2002)** n'ont observé aucune altération morphologique de l'endomètre utérin. Ceci suggère la possibilité que la plante ait causé une éventuelle reprotoxicité affectant d'autres organes que l'utérus, étant donné que les mâles et les femelles ont tous deux reçu la poudre de feuilles de Graviola. Nous avons relevé dans la littérature qu'il été possible que le Graviola ait un effet sur :

- **Les testicules** : Affectant la production et la qualité des spermatozoïdes **(Borg et al.,2010 ; Hou et al., 2021).** Bien que l'étude de **Eyeghre et al., (2023)** a contredit cette hypothèse en montrant que l'extrait de feuille éthanolique de Graviola pourraient avoir un impact positif sur la qualité du sperme et les niveaux hormonaux chez les sujets présentant une dysfonction testiculaire liée à l'arsenic trioxyde.
- **Les ovaires** : Perturbant la maturation des gamètes en perturbant la sécrétion hormonale **(Pelusi et al., 2008).**
- **L'hypothalamus et l'hypophyse** : Perturbant la régulation des hormones de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG), y compris la testostérone, l'hormone lutéinisante, l'hormone folliculo-stimulante... Chez les femelles, nous pouvons observer une perturbation de la folliculogenèse et l'ovogenèse, entraînant un échec de l'ovulation et du cycle utérin **(Piomboni et al., 2014).**
- **Les trompes de Fallope** : Provoquant une obstruction ou un dysfonctionnement **(Shen et al., 2020).**

Toutes ces hypothèses nécessitent des investigations supplémentaires pour déterminer les mécanismes précis par lesquels la Graviola affecte la fertilité.

2.8.2 Pour les immunostimulants :

La question de la toxicité des polysaccharides immunostimulants, notamment des bêta-glucanes, a fait l'objet d'un examen approfondi et de discussions au sein de la communauté scientifique. Les bêta-glucanes sont reconnus pour leur faible profil de toxicité, ce qui les rend prometteurs pour différentes applications thérapeutiques et suscite un intérêt soutenu dans la recherche **(Barton et al., 2016; EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2011).**

L'arabinogalactane a été largement accepté comme sûr et a été autorisé par la FDA (Food and Drug Administration, agence USA) pour une utilisation comme fibre alimentaire et dans diverses applications alimentaires **(*A Review of Larch Arabinogalactans | Clinical Education*, 2016).** Les données disponibles suggèrent que l'arabinogalactane présente une faible toxicité et est bien toléré par l'organisme humain. Les études menées sur les animaux ont démontré l'innocuité de l'arabinogalactane, que ce soit lors d'une administration intraveineuse unique (chez la souris, à une dose de 5000 mg/kg) ou lors d'études de toxicité à doses répétées (chez le rat, à une dose de 500 mg/kg/jour pendant 90 jours) **(Groman et al., 1994)**. De plus, aucune réaction indésirable n'a été constatée chez les rats et les souris soumis à un traitement à l'arabinogalactane au cours d'études prolongées.

Formule de numération sanguine (FNS)

Nous avons noté une augmentation significative du nombre de globules blancs (GB) et de lymphocytes (Ly) dans le sang des souris du lot traité par les beta-glucanes, accompagnée d'une augmentation hautement significative du pourcentage de lymphocytes (%Ly). Nos résultats sont cohérents avec plusieurs études évaluant la toxicité des bêta-glucanes provenant de diverses sources, qui ont généralement observé une augmentation légère mais non significative des taux de GB, Ly et % Ly mais aussi des changements non significatifs des taux des monocytes (MO) et des globules rouge (GR) **(S. N. Chen et al., 2011; Delaney et al., 2003)**. Aussi, des études cliniques effectues sur l'arabinogalactane n'ont pas montré de changement significatif dans les taux de GB,

mais ont observé une augmentation significative des taux de Ly **(Dion et al., 2016; L. S. Kim et al., 2002).** On peut suggérer que dans notre étude, une potentielle synergie entre les deux polysaccharides (bêta-glucane et arabinogalactane) pourrait expliquer ces augmentations significatives des cellules immunitaires. Ceci confirme l'activité immunomodulatrice de ce mélange d'immunostimulants naturels.

Glycémie et poids corporel

Dans notre étude, une légère diminution non significative du poids corporel a été observée chez les souris traitées par les immunostimulants par rapport au groupe témoin. Ces résultats concordent avec ceux de l'étude menée par **Williams et al., (1988)**, qui ont également constaté une légère diminution dans le poids corporel après 60 jours de la même expérience **(Canaan et al., 2021).**

Par ailleurs, notre étude a mis en évidence une légère baisse non significative du taux de glucose sanguin, ce qui est cohérent avec les observations de **Williams et al., (1988)** qui ont également constaté une diminution non significative de ce paramètre. En revanche, l'étude de **Túrmina et al., (2012)** a rapporté une diminution significative de la glycémie suite à l'administration par gavage de β-(1→6)-d-glucane de Lasiodiplodia theobromae pendent 28 jours chez les souris.

Triglycérides / Cholestérol

la prise de fibres alimentaires, en particulier celles provenant de sources céréalières riches en bêta-glucane, peut contribuer à abaisser le taux de cholestérol sanguin **(Brown et al., 1999).**

Nous avons observé que l'administration d'un mélange d'immunostimulants a entraîné une diminution significative du taux de cholestérol sanguin, tandis que le taux de triglycérides est resté inchangé. Nos résultats sont en accord avec l'étude clinique menée par **(Nicolosi et al., 1999)** portant sur le bêta-glucane de la levure boulangère, ainsi qu'avec ceux de **Jonker et al., (2010)** , montrant que l'administration de bêta-glucane d'orge (GlucagelTM) à des rats Wistar, à des niveaux alimentaires de 10 %, a entraîné une diminution significative de leurs taux de cholestérol sanguin, tandis que leurs taux de triglycérides ont demeuré stables. De plus, l'étude clinique menée par **Kim et al., (2002)** démontre qu'il n'y a aucun effet de l'arabinogalactane sur les paramètres lipidiques chez les personnes traitées avec des doses relativement élevées de ce polysaccharide,

Cela suggère que l'effet hypocholestérolémiant observé dans notre expérience est attribuable au bêta-glucane plutôt qu'à l'arabinogalactane.

Les β-glucanes visqueux modulent le cholestérol de l'hôte en influençant le métabolisme des acides biliaires. Ils interagissent avec les acides biliaires, les empêchant d'être réabsorbés dans l'iléon terminal, ce qui entraîne une augmentation de leur excrétion fécale. Cela stimule la synthèse de nouveaux acides biliaires à partir du cholestérol, contribuant ainsi à abaisser le taux de cholestérol LDL systémique **(Joyce et al., 2019).**

Les transaminases

Le traitement des souris par le mélange d'immunostimulants n'entraîne aucun changement significatif dans les niveaux de TGO hépatiques, alors qu'une diminution significative des niveaux de TGP est observée, Ce résultat est partiellement cohérent avec celui de **Babícek et al., (2007)** qui n'ont trouvé aucun changement significatif dans les niveaux de TGO, ainsi que dans les niveaux de TGP, pour toutes les doses de bêta-glucane levurien testées, Plusieurs études menées sur des bêta-glucanes de différentes origines appuient cette observation, ne montrant également aucun changement significatif dans ces deux paramètres **(S. N. Chen et al., 2011, 2018; Jonker et al., 2010).**

Vu le nombre très restreint des articles traitant la toxicité de l'arabinogalactane, et connaissant préalablement l'innocuité de ce traitement sur l'organisme, on peut suggérer que l'effet de ce mélange sur le taux de TGP est principalement dû au bêta-glucane. Une telle diminution pourrait refléter un éventuel effet protecteur de ce mélange d'immunostimulants sur le foie.

Les paramètres de stress oxydatif

Le bêta-glucane a été proposé comme régulateur de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD) et comme agent inhibiteur de la peroxydation lipidique dans diverses études animales, incluant des essais sur des rats et des lapins **(Pietrzycka et al., 2006; Toklu et al., 2006)**. En plus , l'arabinogalactane démontre une forte activité antioxydante et est prêt à devenir une source végétale sécuritaire d'antioxydants naturels, offrant ainsi un potentiel important dans le domaine de la biomédecine **(Zhang et al., 2023).**

Dans notre étude, aucun changement significatif n'a été observé dans l'activité des enzymes Catalase et GPx, ni dans le taux de MDA au niveau du foie, ces résultats sont en accord avec ceux de **Bobek & Galbavý, (1999)** qui n'ont constaté aucune variation dans les activités des enzymes antioxydantes dans le sang des lapins nourris avec un régime alimentaire contenant des champignons (*Pleurotus ostreatus*).

Cependant, au niveau du cerveau, une augmentation hautement significative de l'activité de GPx a été observée, ainsi qu'une augmentation significative du taux de MDA. En revanche, l'activité de la Catalase et le taux de GSH sont restés inchangés. De façon semblable à notre recherche, une étude a également signalé l'impact du beta-glucane de *Pleurotus ostreatus* sur la CAT et la SOD. Elle a noté une élévation de l'activité de la CAT dans les érythrocytes, ainsi qu'une augmentation de l'activités de la SOD dans le foie **(Bobek & Galbavy, 2001).** De la même manière, une étude menée par **Zhang et al., (2023)** a démontré que l'arabinogalactane pourrait induire une réduction des niveaux de MDA et une augmentation de l'activité de la SOD au sein des cellules in vitro**..** Ces observations suggèrent qu'il n'y a pas d'effet toxique global de notre mélange d'immunostimulants sur l'organisme, étant donné que le foie, principal organe de détoxification, ne montre pas de réaction significative. Toutefois, l'effet de ce mélange sur le cerveau est plus nuancé. Bien que l'augmentation notable de l'activité de la GPx cérébrale puisse être interprétée comme une tentative de l'organisme pour contrer les effets nocifs de ce mélange en neutralisant les radicaux libres et en réduisant les dommages oxydatifs, l'élévation des niveaux de MDA suggère que la production de radicaux libres dépasse la capacité de l'organisme à les neutraliser. Par conséquent, cela pourrait étayer l'hypothèse d'un effet pro-oxydant de notre mélange d'immunostimulants au niveau cérébral.

Une étude de **Campa-Córdova et al., (2002)** a constaté que la stimulation immunitaire induite par le β-glucane était assez efficace pour provoquer une augmentation de l'activité antioxydante de la SOD chez la crevette (Litopenaeus vannamei).

Histologie

Dans notre étude histologique, aucune altération ou lésion n'a été observée au niveau des tissus hépatiques ou cérébraux des souris traitées par les immunostimulants, comparativement au groupe témoin. Nos résultats concordent avec ceux de **Delaney et al., (2003)**,qui travaillais sur le beta glucane de l'orge, où les conclusions de la nécropsie et de l'histopathologie n'ont révélé

aucune altération associée au traitement dans les organes examinés, notamment le foie et le cerveau. Aussi, plusieurs études montrent l'effet prophylactique des beta-glucanes, notamment, les travaux de **Demirel Yılmaz et al., (2024)** qui ont éclairci les effets histologiques du cisplatine sur le foie, mettant en lumière une congestion sinusoïdale, une dégénérescence hydropique, une désorganisation des cordons hépatiques et une infiltration cellulaire mononucléée. Lorsque le β-glucane est associé au cisplatine, les dommages cellulaires hépatiques causés par ce dernier sont considérablement atténués.

La reprotoxicité

Nos résultats, qui ne montrent aucune différence entre le groupe témoin et celui traité par le mélange d'immunostimulants, nous permettent de conforter l'hypothèse de l'innocuité de ce mélange en termes de toxicité ou d'impact sur la fertilité, et ce, à une dose dix fois supérieure à la normale que nous venons d'utiliser dans cette étude.

2.9 Conclusion :

Le Graviola est une plante très utilisée en pharmacologie et en médecine traditionnelle. Elle possède un large spectre d'activités biologiques ; mais l'excès de la prise ou l'exposition trop prolongée peuvent entrainer des effets indésirables Cette étude a été menée dans le but d'évaluer la toxicité chronique d'un extrait brut de feuilles de Graviola sur des souris Swiss albinos.

À l'issue de ces travaux, nous concluons que l'extrait brut des feuilles de Graviola ne présente aucun signe de toxicité chez les souris, à l'exception d'une baisse de la fertilité qui pourrait être liée à une reprotoxicité de la plante. Cela dit, il faut garder à l'esprit la célèbre loi de toxicologie dite par Monsieur Paracelse : « Rien n'est poison, tout est poison ; seule la dose fait le poison ».

Pour la suite des travaux, qui consistera en l'étude de l'effet préventif du Graviola sur une cancérogénèse chimique de la peau, nous avons porté notre choix sur la dose thérapeutique utilisée en pharmacopée de 21,2 mg/Kg de L'extrait de poudre de Graviola, dose qui n'entrainerait aucun effet toxique qui viendrait affecter notre protocole sur la période d'expérimentation.

L'administration d'un mélange de β-glucane et d'arabinogalactane pendant 12 semaines à des souris à une dose de 256 mg/kg de poids corporel n'a montré aucun signe de toxicité. Cette observation est cohérente avec nos résultats histopathologiques et biochimique.

Plusieurs études ont affirmé que l'utilisation de β-glucanes, a montré des résultats prometteurs dans le contrôle glycémique (J. Chen & Raymond, 2008; Y.-W. Kim et al., 2005). Le mécanisme sous-jacent à la diminution des niveaux de glucose et de cholestérol chez les rats souffrant d'hypercholestérolémie reste peu compris. Cependant, il est suggéré que ces effets pourraient être attribués à une action biochimique corrective agissant sur les fonctions pancréatiques et hépatiques, comme en témoigne la baisse des activités des transaminases hépatiques (TGO et TGP) démontrée dans cette étude.

D'une manière générale, les réductions des niveaux de glucose, de cholestérol et de l'activité des transaminases hépatiques chez les souris en bonne santé suggèrent que les β-glucanes pourraient être explorés comme traitements préventifs et adjuvants dans diverses maladies chroniques dégénératives telles que le diabète, l'hypertension et la dyslipidémie.

3 Étude de l'effet préventif du Graviola, Dichloriacétate, immunostimulant en application seules ou combinées sur la cancérogenèse expérimentale de la peau :

Soixante souris ont été réparties en dix groupes. Un groupe témoin (T), un groupe soumis au protocole de cancérogénèse chimique (DMBA), quatre groupes recevant respectivement les traitements Graviola (Grav), Dichloroacétate (DCA), immunostimulants (IS) et la combinaison des trois traitements (COMB). Et enfin, quatre autres groupes recevant simultanément les traitements (Grav, DCA, IS et COMB) avec la cancérogénèse.

Nous avons mené une étude morphologique et anatomopathologique et une étude biochimique via l'étude des paramètres du stress oxydant.

3.1 Etude morphologique et anatomopathologique :

3.1.1 Témoin/DMBA :

Les souris du groupe DMBA ont révélé l'apparition de papillomes chez quatre souris sur six, soit 66,66 % du groupe. Les souris du groupe témoin quant à elles présentaient une peau saine, sans aucune formation ou protubérance. Nous avons pris des photographies du dos des souris appartenant aux groupes distincts et avons réalisé des biopsies cutanées peu de temps avant leur sacrifice.

La photographie présentée dans la **figure 55** met en évidence deux zones de lésions bourgeonnantes, mesurant respectivement (1x0,2x0,3) cm et (1x0,5x0,2) cm, sur le dos de la souris issue du groupe exposé au protocole de cancérogénèse (flèches jaunes). En revanche, les souris du groupe témoin ont présenté une surface cutanée saine, avec une couleur et un aspect, normaux.

L'examen anatomopathologique des échantillons de peau prélevés a permis d'identifier la nature des lésions en formation. Il s'agit de papillomes hyperplasiques bénins touchant les cellules épidermiques (flèche bleue, grossissement x10). Un agrandissement à x40 a permis d'observer les cellules en expansion, certaines ayant développé une hyperplasie, anisocytose et anisocaryose (flèches bleues). Les coupes histologiques de la peau des souris du groupe témoin ont révélé une

peau saine, sans signe d'hyperplasie. On peut y distinguer les trois couches caractéristiques de la peau : l'épiderme (la couche la plus superficielle), le derme (la couche la plus épaisse) avec ses annexes cutanées, et l'hypoderme (principalement constitué de cellules adipeuses et musculaires).

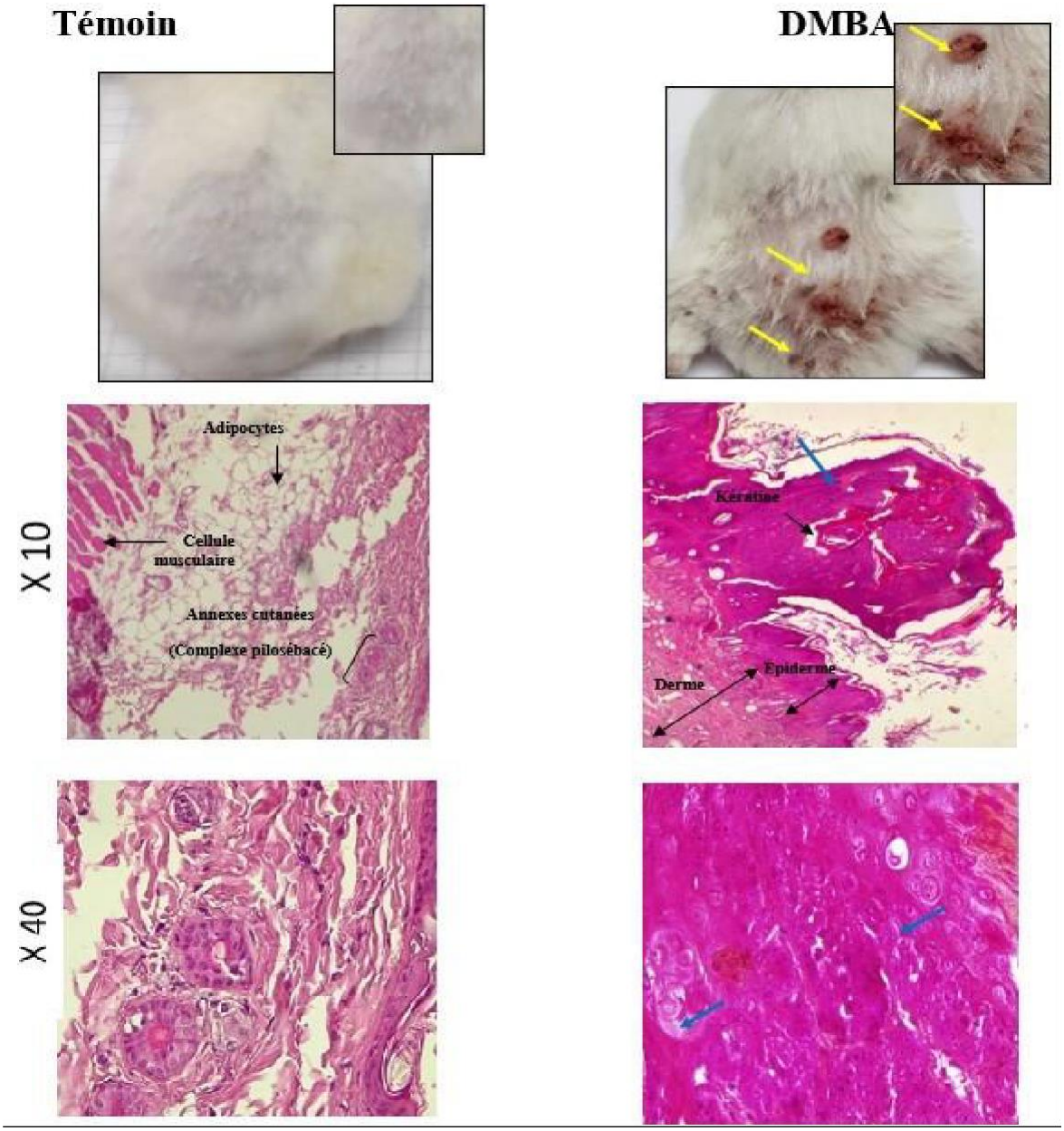


Figure 55: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots témoin et DMBA (coloration H & E, Microscope optique Leica, Germany. x10, x40).

3.1.2 Témoin-traitement :

Sur les plans morphologique et histologique, les souris appartenant aux groupes DCA, IS, Grav et COMB présentent des similitudes presque parfaites avec le groupe témoin affichant une peau saine avec une couleur et un toucher, normaux et absence totale de papillomes (figures de 56-59).

3.1.3 DMBA/traitement :

Les coupes histologiques **(figures de 56-59)** provenant des souris appartenant aux lots DMBA/DCA, DMBA/Grav, DMBA/IS et DMBA/COMB révèlent une surface cutanée saine caractérisée par une absence de papillomes chez 100% des souris contre le développement de papillome chez 66,6% des souris appartenant au lot DMBA seul. Tous les lots présentaient un toucher cutané normal sauf le lot DMBA/DCA qui présentait un toucher rugueux et une peau irritée.

L'analyse anatomopathologiques des échantillons provenant de ces groupes n'ont révélé aucun bourgeonnement de l'épiderme provenant d'une prolifération cellulaire anormale. Nous avons également observé une architecture tissulaire bien préservé et l'absence de cellules hyperplasiques. En outre, nous avons constaté la présence d'une forte réaction inflammatoire caractérisée par une infiltration polynuclées, lymphocytaire et plasmocytaire dans tous les groupes (flèches rouges).

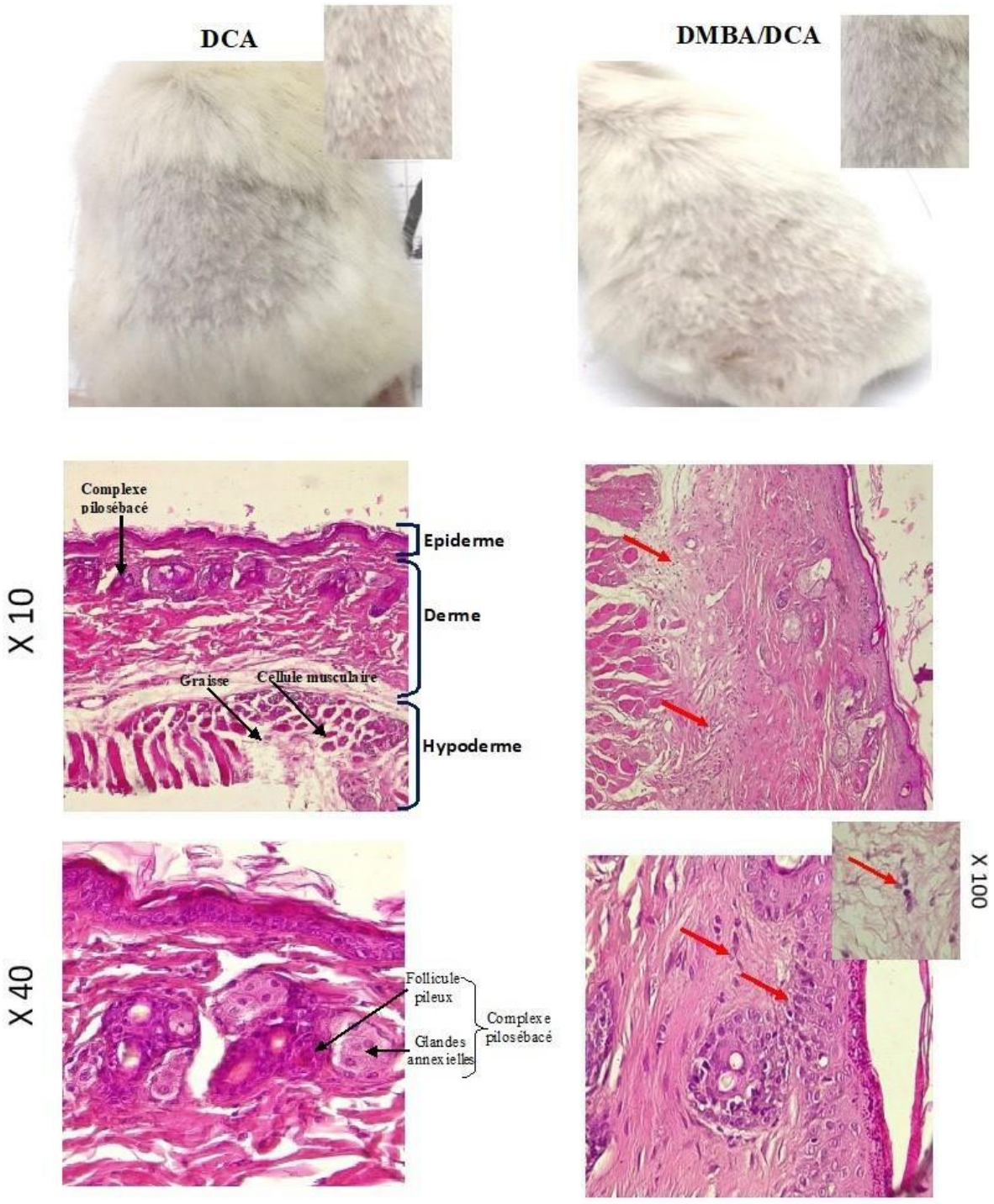


Figure 56: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots DCA et DMBA/DCA (coloration H & E, Microscope optique Leica, Germany. x10, x40, x100).

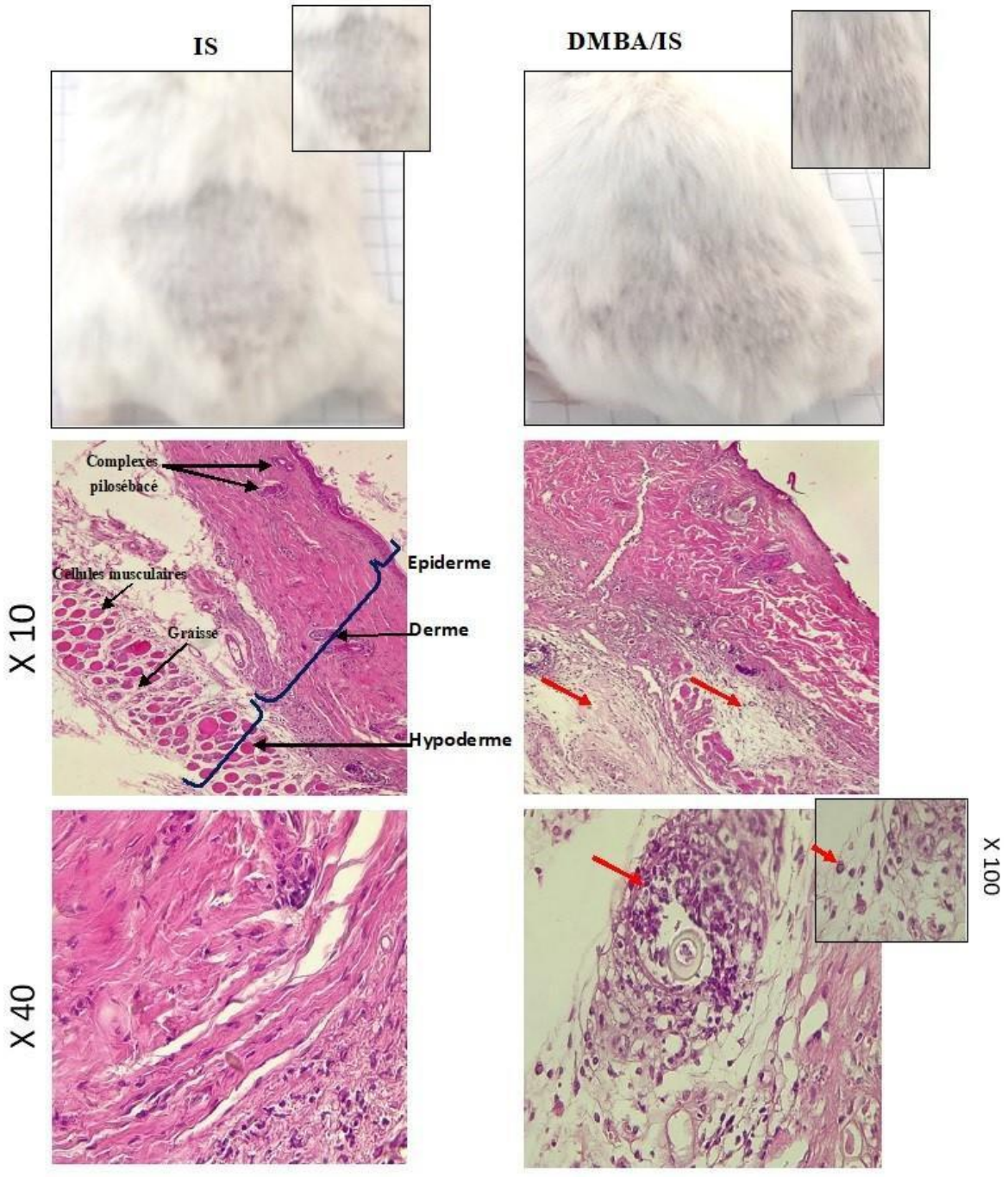


Figure 57: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots IS et DMBA/IS (coloration H & E, Microscope optique Leica, Germany. x10, x40, x100).

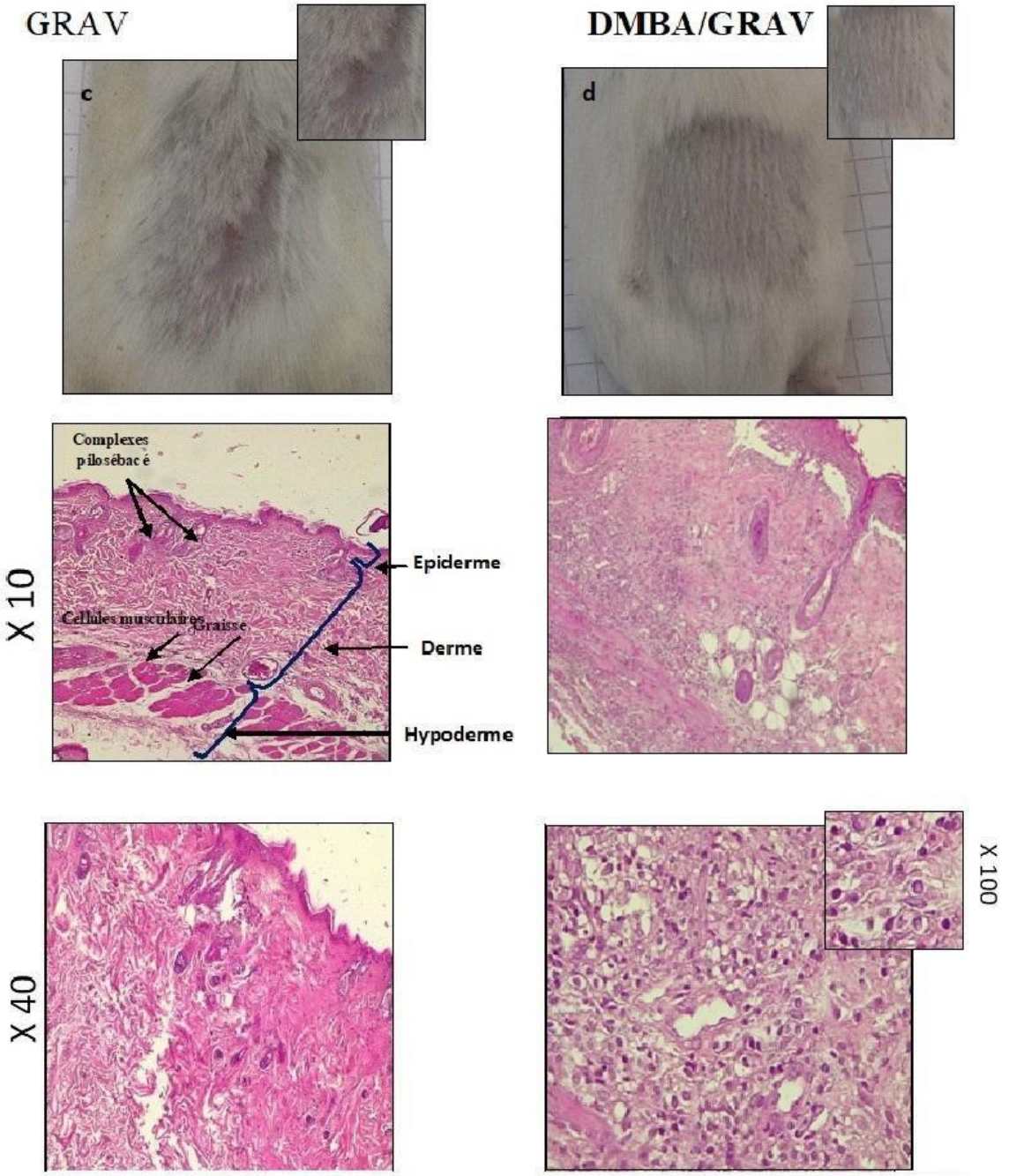


Figure 58: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots Grav et DMBA/Grav **(Coloration H & E, Microscope optique Leica, Germany. x10, x40, x100).**

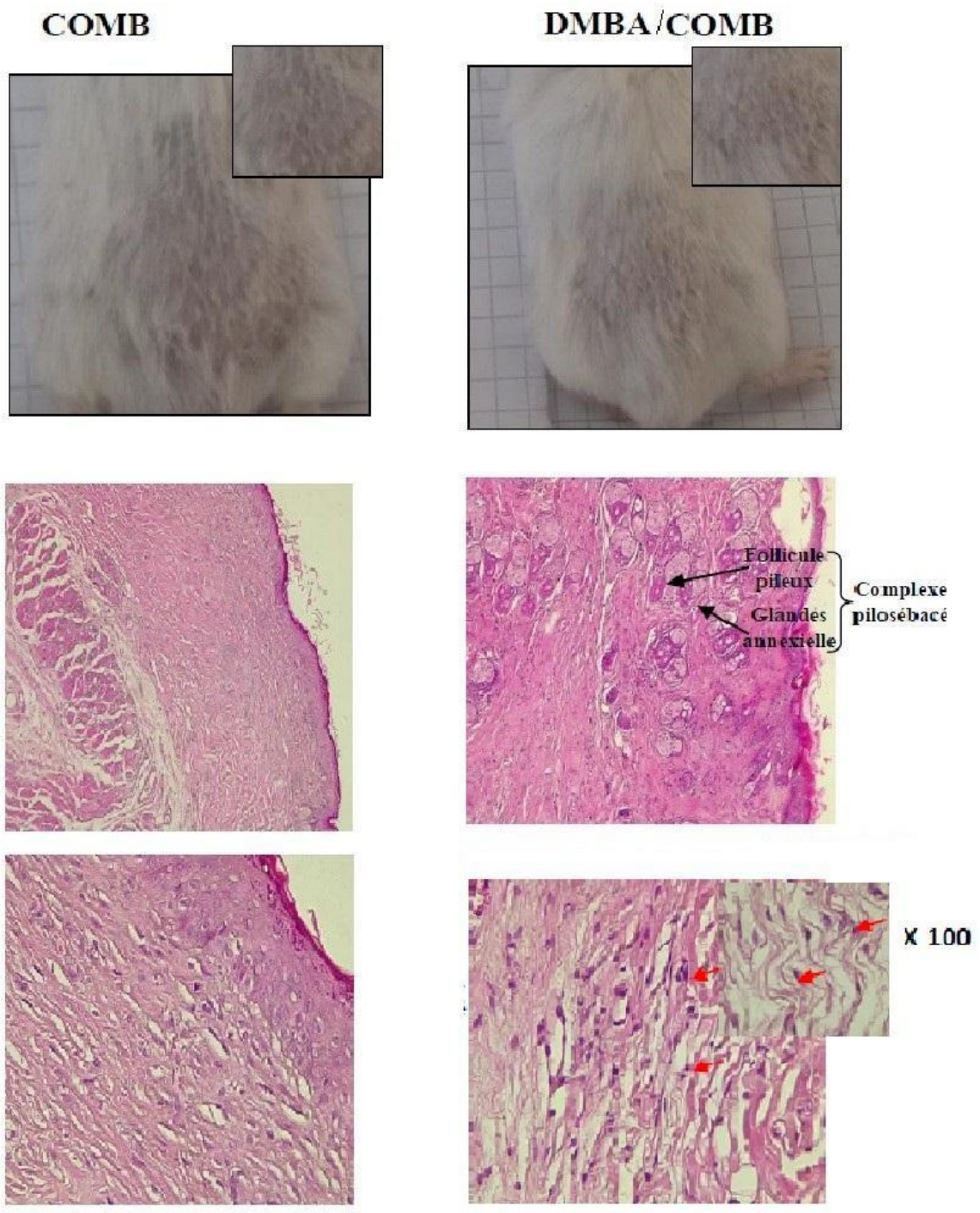


Figure 59: Photographies des régions dorsales et des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies cutanées sur souris issues des lots COMB et DMBA/COMB (coloration H & E, Microscope optique Leica, Germany. x10, x40, x100).

3.1.4 Discussion :

Nos résultats ont révélé 66,6% de souris ayant développé des hyperplasies bénignes après avoir été soumises à un protocole de cancérogénèse avec une application unique de 100µg de DMBA/100µl d'acétone suivi de 18 semaines de promotion rythmée par trois applications par semaine d'huile de croton.

Nos résultats concordent avec ceux de **Subramanian et al., (2014)**, qui ont observé des hyperplasies précancéreuses en utilisant le même protocole et sur la même période. En revanche, d'autres équipes ont obtenu un carcinome spinocellulaire en appliquant un protocole similaire avec les mêmes doses de DMBA/huile de croton pendant 15 semaines **(Agrawal & Pandey, 2013; Saini et al., 2010)**. Cette différence de résultat peut être expliqué par les travaux de **Andrieu, (1991)** qui ont rapporté que 18 semaines d'exposition à ce type de cancérogenèse chimique entraînent le développement d'une hyperplasie bénigne, et que la progression vers des stades plus avancés nécessitait au moins 24 semaines d'exposition. D'autre part, l'âge et le poids des souris sont des facteurs limitant pour le développement de l'hyperplasie. En effet, les cellules cibles de la mutation induite par le DMBA sont les cellules souches de la couche basale de l'épiderme. Le nombre de ces cellules est très élevé pendant l'embryogenèse, modéré chez les nouveau-nés et très faible chez les souris âgées **(DiGiovanni, 1992).**

Le DCA :

Les résultats morphologique et histologique du DCA ne montrent aucun effet histopathologique. Ces résultats concordent avec ceux de **Mather et al., (1990),** qui ont observé que l'administration de doses croissantes de DCA sur 90 jours à des rats ne provoque aucun effet histopathologique. Il est important de noter que le DCA est couramment utilisé en clinique pour traiter des troubles mitochondriaux. C'est un inhibiteur de la PDK, récemment identifié comme un agent non toxique capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses en réactivant la voie aérobie mitochondriale initialement inhibée pendant la cancérogénèse laissant place à la voie lactée anaérobie. En outre, Nos résultats sont en accord avec ceux de **Khan et al., (2017)** qui, dans une étude clinique, a étudié le cas d'un homme de 32 ans pour lequel une thérapie au DCA, sans traitement conventionnel concomitant, a entraîné la régression et la stabilisation d'un mélanome métastatique récurrent pendant plus de 4 ans, avec des effets secondaires insignifiants. Ce cas

démontre que le DCA peut être utilisé pour réduire la progression de la maladie et maintenir une stabilité à long terme chez les patients atteints de mélanome.

Les immunostimulants :

L'analyse histologique des lots de souris traitées avec des immunostimulants seuls (IS) ou en conjonction avec la cancérogénèse (DMBA/IS) ne montre aucun signe d'hyperplasie. Cependant, les souris du lot DMBA/IS présentent une réaction inflammatoire prononcée caractérisée par une infiltration plasmocytaire, granulocytaire et lymphocytaire selon l'analyse histologique. Cette réaction inflammatoire n'est déclenchée que lorsque les immunostimulants sont administrés en conjonction avec la cancérogénèse. Les résultats de l'étude de **Riabchinskaia, (1983)**, qui a évalué l'effet des immunostimulants sur l'activité anti-inflammatoire du Butadion (un anti-inflammatoire non stéroïdien de synthèse), sont en accord avec nos observations. En effet, ils ont constaté que les immunostimulants utilisés seuls comme témoin n'ont pas induit de réaction inflammatoire.

Le β-glucane a une activité anticancéreuse en favorisant l'activité cytolytique des macrophages contre les cellules tumorales in vitro. Son mécanisme d'action implique la stimulation des macrophages et la libération de médiateurs inflammatoires. En plus du β-glucane de levure, les polysaccharides des champignons ont également une activité antitumorale. L'arabinogalactane, un polysaccharide trouvé dans le mélèze, stimule la cytotoxicité des cellules tueuses naturelles (NK) et d'autres monocytes, améliore divers aspects du système immunitaire, et inhibe la métastase des cellules tumorales du foie **(Kobayashi et al., 2005; *Larch Arabinogalactan - Cancer Care of Western New York*, 2014).**

Le Graviola :

L'étude histologique des souris du lot DMBA/Graviola ne montre aucune hyperplasie ni prolifération anormale des cellules de l'épiderme. Ces résultats concordent avec ceux de **Hamizah et al., (2012)**, qui ont observé que l'extrait de feuilles de Graviola réduisait de manière significative le développement des tumeurs cutanées chez les souris exposées à une cancérogenèse chimique (DMBA/huile de croton). D'autre part, **Chamcheu et al.,(2018)** ont trouvé que le Graviola a des effets significatifs sur deux lignées cellulaires humaines de cancers de la peau non mélanomes, UW-BCC1 et A431. L'extrait de feuilles et de tiges de Graviola a démontré qu'il : (i)

supprime la croissance cellulaire, la motilité, la fermeture des plaies et la clonogénicité ; (ii) induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G_0 /G_1 ; (iii) provoque l'apoptose. Aussi, cet extrait module l'expression des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Les extraits de Graviola apparaissent comme des sources prometteuses pour de nouveaux agents chimiopréventifs et thérapeutiques contre les cancers de la peau non mélanomes.

La combinaison (COMB) :

Les analyses histologiques de ce lot ne montrent aucun signe de lésion épidermique. Cependant, elles révèlent une réaction inflammatoire intense. Les résultats morphologiques de la combinaison sont cohérents avec ceux obtenus précédemment avec les trois substances utilisées individuellement.

3.1.5 Conclusion :

L'étude de l'effet préventif de produits (Grav/IS/DCA) en applications seules ou combinée utilisée contre la cancérogénèse chimique de la peau en trois étapes utilisant le DMBA comme initiateur et l'huile de croton comme promoteur, nous a mené à conclure que le protocole de cancérogénèse choisi induit le développement d'hyperplasies bénignes chez 66,6% des souris. En outre, tous les traitements testés possèdent un effet préventif contre la cancérogénèse. Cependant les résultats morphologiques et histologiques indiquent que ces produits détiennent le même niveau d'inhibition contre la cancérogénèse chimique.

3.2 Le poids corporel :

Pour l'ensemble des expérimentations, qu'il s'agisse des groupes de traitement seul ou des groupes de traitement combiné, nous avons observé qu'il n'existe aucune différence significative de la moyenne du poids corporel sur une période de 11 semaines (dernières semaines de l'expérimentation) entre les différents groupes **(figure 60)**. Cela vaut tant pour les groupes de souris saines traités que pour les groupes de souris soumises à la cancérogénèse et simultanément traitées comparés aux groupes témoins.

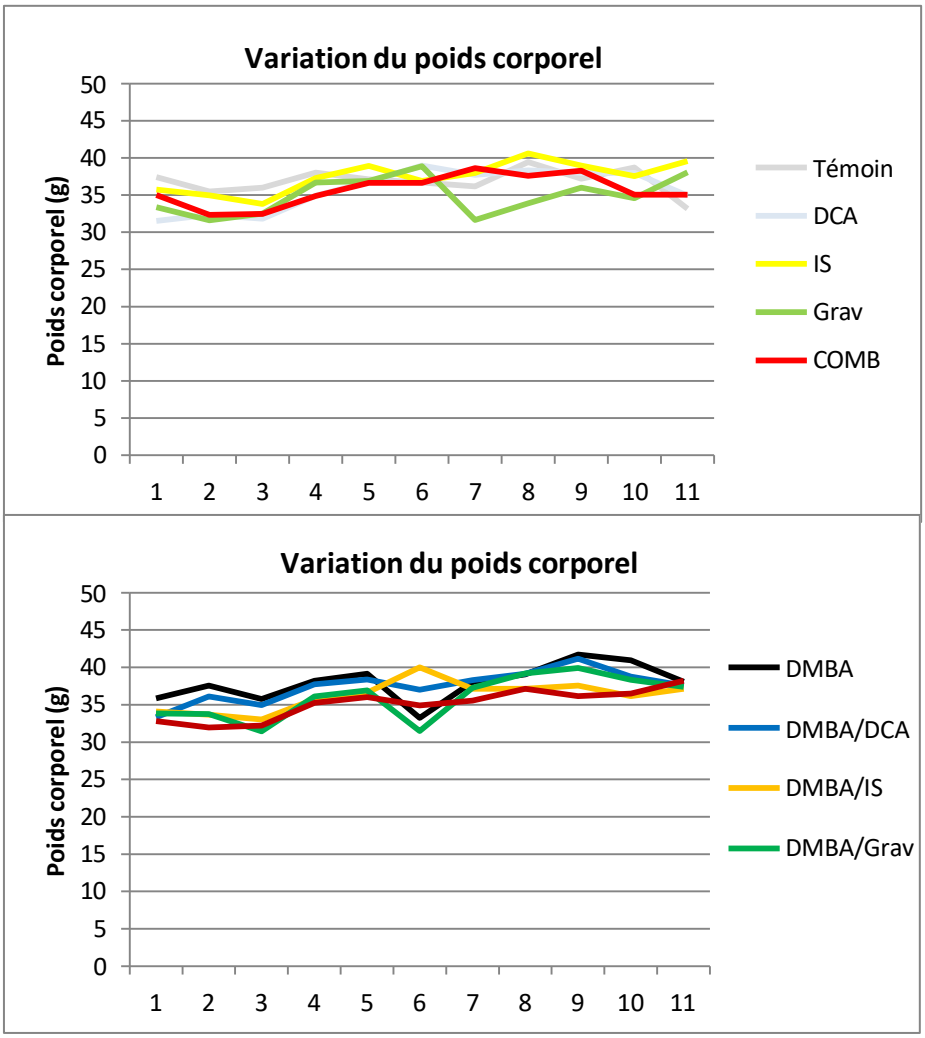


Figure 60: Variations du poids corporel des souris appartenant aux différents groupes expérimentaux.

3.3 La formule de numérotation sanguine (FNS) :

3.3.1 Comparaison des lots DCA, IS, Grav et COMB versus témoin :

Les résultats de la FNS (figure 61) ont montré une diminution hautement significative du taux de globules blancs et des monocytes chez les souris du lot traité par le DCA par rapport au lot témoin. Tous les autres traitements ne semblent avoir aucun impact sur le taux des différentes populations étudiées.

3.3.2 Comparaison du lot DMBA versus témoin :

Aucun changement significatif dans le taux des globules blancs n'a été observé entre le lot témoin et le lot DMBA.

3.3.3 Comparaison des lots DMBA/DCA, DMBA/IS, DMBA/Grav et DMBA/COMB versus le lot DMBA :

Une augmentation significative dans toutes les populations de globules blancs a été observée chez les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/COMB par rapport au lot DMBA.

Le lot DMBA/Grav ne semble pas différer du lot DMBA quant aux taux des populations de globules blanc.

3.3.4 Comparaison entre les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/Grav versus le lot DMBA/COMB :

Nous avons relevé une augmentation significative dans le taux de toutes les populations de globules blancs chez les souris du lot DMBA/COMB par rapport à celles du lot DMBA/Grav ainsi qu'une augmentation significative du taux de lymphocytes dans le lot DMBA/COMB par rapport au lot DMBA/IS. Aucune différence significative n'a été notée entre les lots DMBA/COMB et DMBA/DCA.

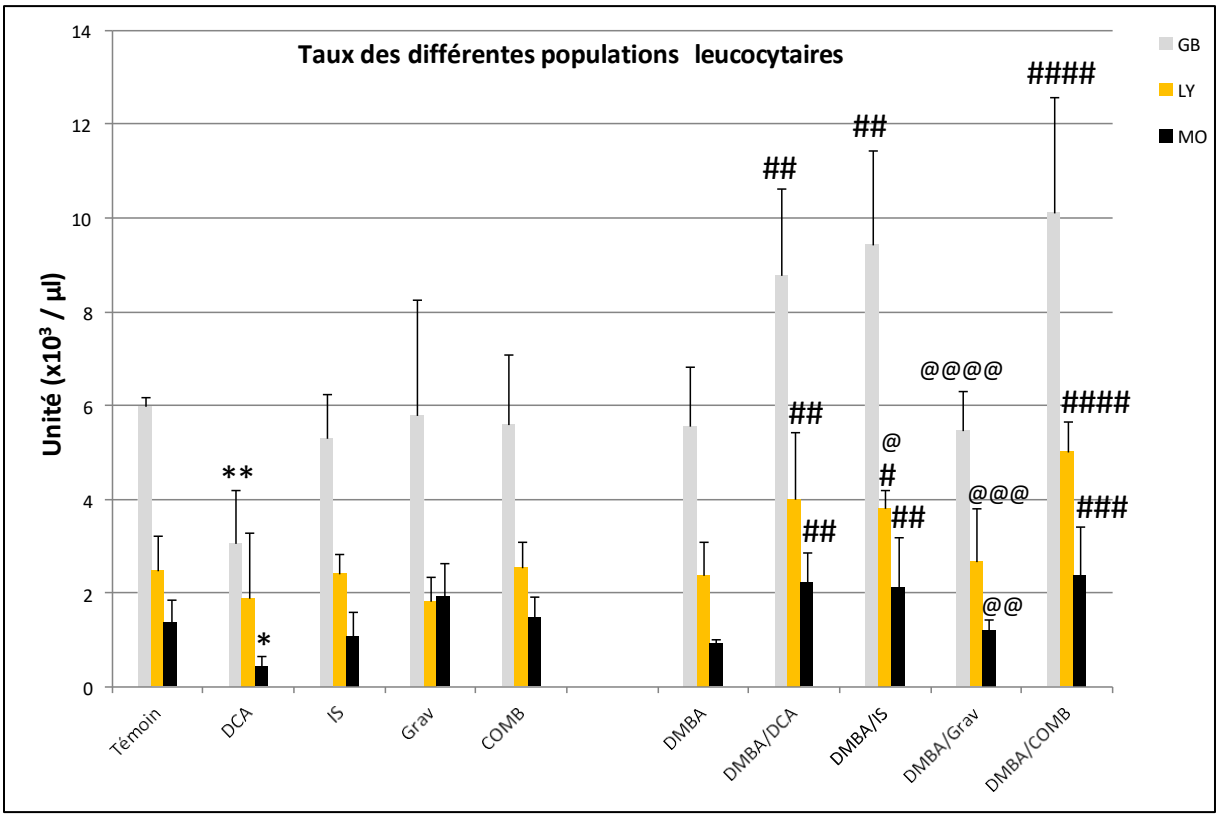


Figure 61: Numération de la formule sanguine effectuée sur sérum/EDTA. ***p<0,05, **p<0,01 versus témoin. #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001 versus DMBA., @p<0,05, @@p<0,01, @@@p<0,001, @@@@p < 0,0001 versus DMBA/COMB.***

3.3.5 Discussion :

Les résultats n'ont révélé aucun changement du poids corporel des souris entre les différents groupes. Cela indique clairement l'absence de tout signe de toxicité des doses utilisées pendant toute la durée de l'expérience. Ces résultats sont en accord avec nos études précédentes de la toxicité effectuées sur les IS et le Graviola. Pour le DCA, les études toxicologiques montrent également son innocuité. Selon l'expérience de **(Cicmanec et al., 1991),** l'administration de DCA à des doses de 0, 12.5, 39.5, et 72 mg/kg/jour chez les chiens pendant 90 jours n'a entraîné aucun changements significatifs du poids corporel.

Les paramètres sanguins revêtent une importance cruciale dans l'évaluation de la gravité d'une maladie et dans le rétablissement de la santé **(Adhvaryu et al., 2007).** De nombreuses conditions pathologiques, y compris le cancer, se manifestent par des variations des différentes populations cellulaires. Dans cette étude, la FNS a révélé des variations des paramètres hématologiques. Contrairement à **Sakai et al., (2004)**, qui ont rapporté qu'une induction expérimentale d'un carcinome spinocellulaire par le DMBA chez les souris pendant 24 semaines de traitement affecte les populations lymphocytaires dans le sang périphérique, la rate et le foie, nos résultats n'ont montré aucune différence dans les taux des différentes populations leucocytaires (GB, LY, MO) chez les souris traitées soumises au protocole de cancérogénèse (DMBA) par rapport au témoin. Nous pouvons croire que la dose de DMBA employée joue un rôle important dans le déclanchement de la réaction inflammatoire. Le choix que nous avons porté sur la dose relativement faible de l'initiateur peut être à l'origine de l'absence de réaction inflammatoire chez ces souris.

Nos résultats ont révélé une augmentation significative des GB et MO chez les souris du groupe DCA par rapport au témoin. Ce résultat peut s'appuyer sur les travaux de **Hassoun et al., (2010)** qui ont administré par voie orale différentes doses de DCA pendant 13 semaines à des souris mâles. Leur étude a révélé que le DCA entraînait une augmentation significative de la production de la cytokine inflammatoire TNF-α indiquant que le DCA peut entrainer une réaction inflammatoire et donc augmenter le taux des populations leucocytaire.

Une augmentation significative de toutes les populations leucocytaires a été observée chez les souris des lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/COMB par rapport au lot DMBA. L'induction de cette réaction immunitaire met en avant l'effet antitumoral de ces produits. En effet, outre leurs effets anticancéreux directs, les β-glucanes, présents dans les parois cellulaires des champignons, sont connus pour leurs propriétés immunomodulatrices, stimulant les cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques, ce qui améliore les performance de la barrière de défense immunitaire contre les cellules cancéreuses **(Noorbakhsh Varnosfaderani et al., 2024).** Nos résultats concordent avec ceux de Yoon et al., (2008), qui ont injecté à des souris des lignées cellulaires cancéreuses issues d'un carcinome colorectal (26-M3.1) et d'un mélanome (B16-BL6). L'administration de plusieurs doses de bêta- glucane à ces souris a inhibé les métastases des tumeurs de manière dose-dépendante. Les auteurs

ont rapporté que le bêta-glucane possède des propriétés antitumorales qui seraient dues à son pouvoir immunostimulant via l'activation des macrophages et des cellules tueuses naturelles.

Les souris du groupe DMBA/Grav ne montrent aucune signification quand au taux des populations leucocytaires par rapport à celles du groupe DMBA. Ceci indique que le Graviola n'induit pas de réaction inflammatoire et nous laisse penser que son effet préventif contre la cancérogénèse n'implique pas le système immunitaire inné. Par ailleurs, **Oluwayinka et al., (2021)** n'ont constaté aucune différence significative dans la population leucocytaire chez des poulets nourris avec 200 mg/kg d'extrait de Graviola par rapport à un groupe témoin. Nos résultats sont aussi comparables à ceux de **P & Durairaj, (2018)**, qui ont travaillé sur un modèle de tumeur induite par l'ascite lymphomateuse de Dalton. Ils ont constaté une augmentation significative du nombre total de globules blancs, de plaquettes, de lymphocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles chez les souris cancéreuse. Le traitement avec un extrait hydroéthanolique de feuilles de Graviolaa réduit le nombre total de ces cellules de manière significative démontrant la capacité remarquable de l'extrait de feuilles de Graviola à inverser les paramètres hématologiques.

L'augmentation de la population leucocytaire chez les souris traitées avec la combinaison des traitements simultanément à la cancérogénèse (DMBA/COMB) est plus importante que l'augmentation observé avec les trois traitements employés séparément et ce par rapport au groupe DMBA. Ce résultat est conforté par les résultats histologiques qui ont révélé une forte infiltration leucocytaire chez les souris du groupe DMBA/COMB par rapport aux autres groupes. Nous avons d'ailleurs relevé une différence significative entre le taux des leucocytes chez les souris du groupes DMBA/COMB et celles du groupe DMBA/Grav. Aussi une différence significative a été relevée pour le taux des Ly entre le groupe DMBA/COMB et DMBA/IS. Cette importante augmentation de la population leucocytaire observée après la combinaison des différentes substances suggère une éventuelle synergie ou cumulation d'effet entre les immunostimulants et le DCA. Cependant, l'hypothèse d'une possible toxicité due à l'accumulation de toutes les substances (DCA+IS+Grav) reste plausible.

3.4 Les paramètres du stress oxydatif :

3.4.1 La catalase (CAT) :

La variation de l'activité de la catalase est présentée dans l'histogramme de la **figure 62.**

3.4.1.1 Comparaison des lots DCA, IS, Grav et COMB versus témoin :

Nous avons observé une augmentation significative de l'activité de la CAT chez les lots DCA, IS, Graviola et COMB par rapport au lot témoin.

3.4.1.2 Comparaison des lots DMBA versus témoin :

Aucune différence significative n'a été relevée concernant l'activité de la CAT entre les souris des lots DMBA et témoin.

3.4.1.3 Comparaison des lots DMBA/DCA, DMBA/IS, DMBA/Grav et DMBA/COMB versus le lot DMBA :

Une diminution significative dans l'activité de la CAT a été relevée lorsque les souris sont traitées avec le DCA simultanément à la cancérogénèse. Aucune différence significative n'a été observée entre les autres groupes

3.4.1.4 Comparaison entre les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/Grav versus le lot DMBA/COMB :

Une augmentation significative de l'activité de la CAT a été relevée lorsque les substances sont combinées (DMBA/COMB) par rapport à DCA et IS seuls avec le DMBA.

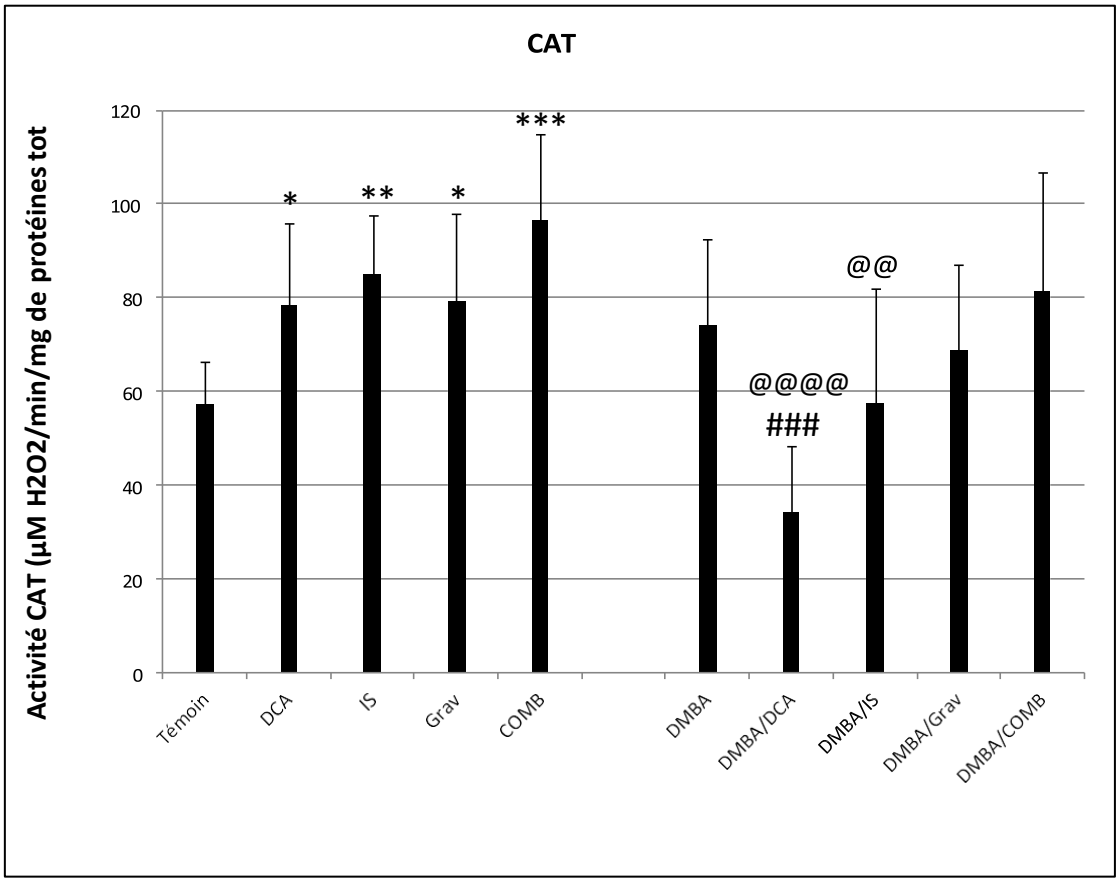


Figure 62: Variation de l'activité de la CAT hépatiques entre les différents groupes de souris.
p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus témoin ; #p<0,05, ###p<0,001 versus DMBA ; @@p<0,01, @@@p<0,001 versus DMBA/COMB.

3.4.2 La superoxyde dismutase (SOD) :

Les différentes variations de l'activité de la SOD sont présentées dans l'histogramme de la **figure 63.**

3.4.2.1 Comparaison des lots DCA, IS, Grav et COMB versus témoin :

Nous avons observé une diminution significative dans l'activité de la SOD chez les lots IS, Graviola et COMB par rapport au lot témoin. Aucune différence significative n'a été observée pour les souris qui ont reçu du DCA.

3.4.2.2 Comparaison des lots DMBA versus témoin :

La cancérogénèse entraine une diminution significative dans l'activité de la SOD en comparaison avec le témoin.

3.4.2.3 Comparaison des lots DMBA/DCA, DMBA/IS, DMBA/Grav et DMBA/COMB versus le lot DMBA :

Le traitement des souris avec le DCA et le Graviola simultanément avec la cancérogénèse restaure de manière significative l'activité de la SOD par rapport aux souris soumises à la cancérogénèse seule.

3.4.2.4 Comparaison entre les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/Grav versus le lot DMBA/COMB :

Le traitement des souris soumises à la cancérogénèse avec le Graviola restaure l'activité de la SOD de manière significative par rapport à la combinaison des traitements. Aucune différence significative n'a été relevée entre les autres groupes.

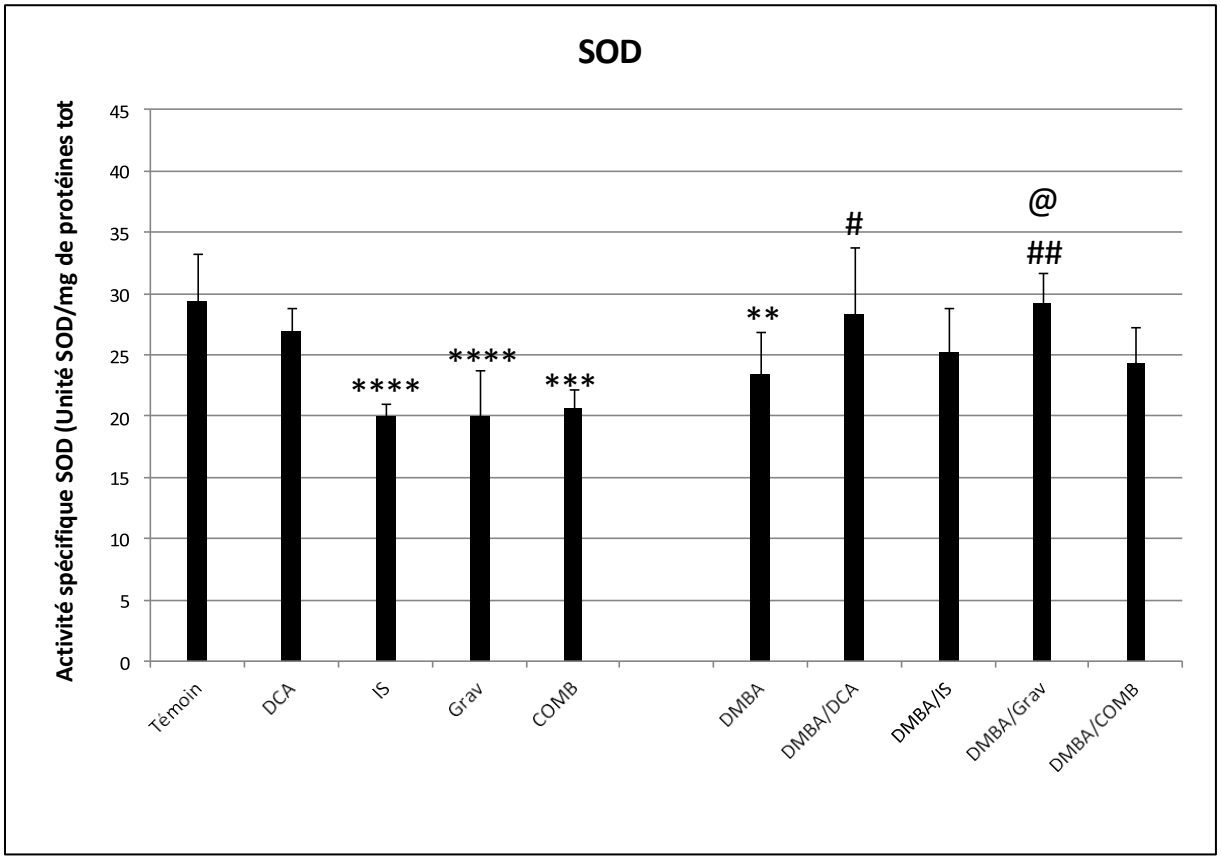


Figure 63: Variation de l'activité de la SOD hépatiques entre les différents groupes de souris. *****p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 versus témoin ; #p<0,05, ##p<0,01 versus DMBA. @p<0,05 versus DMBA/COMB.***

3.4.3 La GPx :

Les différentes variations de l'activité de la GPx sont présentées dans l'histogramme de la **figure 64.**

3.4.3.1 Comparaison des lots DCA, IS, Grav et COMB versus témoin :

Nous avons observé une diminution significative dans l'activité de la GPx chez les lots IS, Graviola et COMB par rapport au lot témoin. Aucune différence significative n'a été observée pour les souris qui ont reçu du DCA.

3.4.3.2 Comparaison des lots DMBA versus témoin :

La cancérogénèse entraine une diminution significative dans l'activité de la GPx en comparaison avec le témoin.

3.4.3.3 Comparaison des lots DMBA/DCA, DMBA/IS, DMBA/Grav et DMBA/COMB versus le lot DMBA :

Le traitement des souris avec le DCA les IS et le Graviola seules ou combinés simultanément avec la cancérogénèse diminue de manière significative l'activité de la GPx par rapport aux souris soumises à la cancérogénèse seule.

3.4.3.4 Comparaison entre les lots DMBA/DCA, DMBA/IS et DMBA/Grav versus le lot DMBA/COMB :

Aucune différence significative dans l'activité de la GPx n'a été relevée concernant ces groupes.

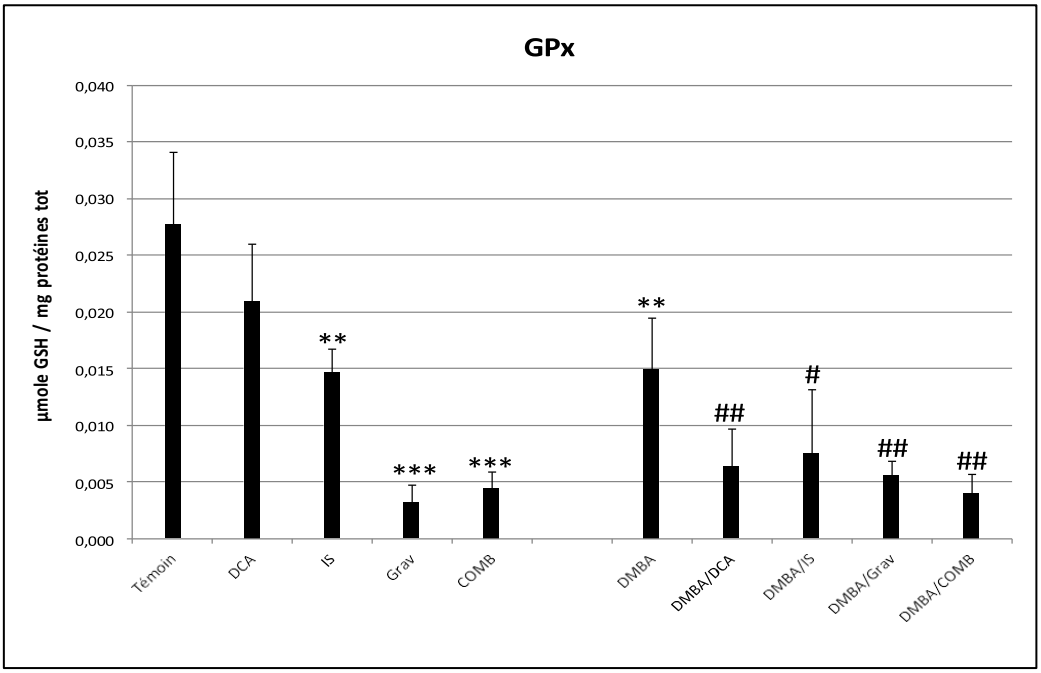


Figure 64: Variation de l'activité de la GPx hépatiques entre les différents groupes de souris. *****p<0,01, ***p<0,001 versus témoin ; #p<0,05, ##p<0,01 versus DMBA.***

3.4.4 Comparaison des activités enzymatiques de la SOD, CAT et GPx :

Le tableau 8 résume les variations des activités des SOD, CAT et GPx dans les groupes traités par rapport aux groupes témoin et DMBA. Nous pouvons observer que d'une manière générale, les traitements utilisés contre la cancérogénèse tendent à diminuer les activités de la SOD et la GPx et à augmenter l'activité de la CAT lorsqu'ils sont administrés seuls par rapport au témoin **(tableau 8.A)**. Ces traitements, lorsqu'ils sont administrés simultanément à la cancérogénèse chimique tendent à augmenter l'activité de la SOD et à diminuer les activités de la CAT et de la GPx **(tableau 8.B)**. Cette observation est valide principalement pour de groupe DMBA/DCA, où l'activité de la SOD augmente tandis que celles de la CAT et de la GPx diminuent, toutes les trois de manières hautement significatives.

Tableau 8: Variation des activités des enzymes antioxydantes A) chez les groupes témoins. B) chez les groupes soumis à la cancérogénèse.

A	DCA vs témoin	IS vs témoin	GRAV vs témoin	COMB vs témoin
SOD	↘ NS	↘ P≤ 0,0001	↘ P≤ 0,0001	↘ P≤ 0,001
CAT	↗ P≤ 0,05	↗ 0,01	↗ P≤ 0,05	↗ P≤ 0,001
GPx	↘ NS	↘ P≤ 0,01	↘ P≤ 0,001	↘ P≤ 0,001

B	DMBA vs témoin	DMBA/DCA vs DMBA	DMBA/IS vs DMBA	DMBA/GRAV vs DMBA	DMBA/COMB vs DMBA
SOD	↘ P≤ 0,01	↗ P≤ 0,05	↗ NS	↗ P≤ 0,01	↗ NS
CAT	NS	↘ P≤ 0,001	↘ NS	↘ NS	NS
GPx	↘ P≤ 0,01	↘ P≤ 0,01	↘ P≤ 0,05	↘ P≤ 0,01	↘ P≤ 0,01

3.4.5 Discussion :

Les résultats obtenus concernant le stress oxydatif doivent être considérés de manière globale, car ils offrent un aperçu préliminaire qui peut informer sur le comportement du stress oxydatif dans les cellules cancéreuses cutanées. Ces résultats peuvent fournir des indications approximatives sur les mécanismes systémiques de réponse au stress et servir de base pour des investigations plus ciblées et spécifiques à la peau.

Les ERO jouent un rôle dans la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques, y compris le cancer. Une corrélation positive a été observée entre une production excessive d'ERO et le cancer **(Li et al., 2013),** Cela est dû à un état oxydatif intense causé par un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les systèmes de défense antioxydants **(Federico et al., 2007)**. La complexité du rôle des ERO et des enzymes antioxydantes dans la tumorigenèse et la progression du cancer complique l'utilisation d'antioxydants et de pro-oxydants comme traitements. Cela souligne la nécessité de mener des études supplémentaires pour explorer la régulation et le rôle de ces enzymes antioxydantes dans le cancer.

Nos résultats ont révélé une diminution significative des activités enzymatiques de la SOD et de la GPx chez les souris soumises à la cancérogénèse comparativement aux souris témoins. Ce

résultat s'accorde avec celui de **Subramanian et al., (2014b),** qui ont également constaté une diminution dans l'activité de la SOD chez des souris développant une hyperplasie sous l'effet d'une cancérogénèse chimique employant le DMBA et l'huile de croton. De même, **Ogbu et al., (2020)** ont observé une diminution significative de l'activité de la GPx chez les rats souffrant d'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP). **Oberley & Buettner, (1979)** ont quantifié l'activité de la SOD-Mg dans plusieurs types de tumeurs et ont constaté qu'elle diminuait dans toutes les tumeurs examinées. En revanche des quantités abaissées de la SOD Cu-Zin ont été trouvées dans beaucoup, mais pas toutes les tumeurs.

La CAT réduit le peroxyde d'hydrogène produit par la SOD et le métabolise en eau. Nos résultats n'ont pas révélé de différence significative de l'activité de la CAT chez les souris soumises à la cancérogénèse (DMBA) par rapport aux souris du lot témoin. Ce résultat va à l'encontre de celui de **Subramanian et al., (2014b)** qui ont rapporté une diminution significative de l'activité de la CAT dans les mêmes conditions. Nous pouvons expliquer ce résultat par le fait que des quantités élevées de H_2O_2 intracellulaires entraînent une activation préférentielle de la CAT alors que de plus faibles niveaux seraient préférentiellement pris en charge par la GPx. En effet, nos résultats suggèrent la présence de faibles quantités de H_2O_2 chez ce lot compte tenu de la faible activité de la SOD.

Il est essentiel d'examiner comment la perte ou le gain de l'activité de la GPx affecte spécifiquement la neutralisation des oxydants et la signalisation redox dans le microenvironnement tumoral extracellulaire, et comment la GPx pourrait être ciblé pour des interventions thérapeutiques **(Chang et al., 2020).** Aussi**,** Le dosage de l'activité de la GPx, présente un avantage significatif dans le contexte du cancer. La GPx est anormalement élevé dans la plupart des types de cancer et joue des rôles complexes et dichotomiques en tant que suppresseur et promoteur de tumeur selon le type de cancer. Comprendre ces rôles est crucial pour déterminer son importance clinique en tant que biomarqueur pronostique potentiel et cible thérapeutique innovante **(Zhao et al., 2022).**

D'une manière générale les souris simultanément soumises aux différents traitements et à la cancérogénèse présentent une augmentation de l'activité de la SOD et une diminution des activités de la CAT et de la GPx par rapport aux souris du lot DMBA. Ceci concorde partiellement avec les travaux de **Subramanian et al., (2014b)** qui ont rapporté une restauration de l'activité de la SOD

en réponse à un traitement à l'acide galique contre une cancérogénèse chimique de la peau. L'activation des caspases et de la phosphorylation oxydative par le DCA entraîne une augmentation de la production des ERO. Il a été démontré qu'un niveau accru de ERO, en particulier l'H_2O_2, peut mettre un terme au développement tumoral et induire l'apoptose **(Bonnet et al., 2007)**. Cette hypothèse nous laisse penser que l'augmentation de l'activité de la SOD et la diminution des activités de la CAT et de la GPx dans les lots traités pourrait laisser s'accumuler le H_2O_2, ce qui pourrait conduire à l'activation des processus d'apoptose chez les cellules cancéreuses. En effet, ce phénomène est similaire à celui observé chez les cellules cancéreuses, où le passage vers la phosphorylation oxydative mitochondriale induit par le DCA entraîne une augmentation des ERO **(Haugrud et al., 2014; Zhou et al., 2019)**. L'augmentation des niveaux de H_2O_2 dans les cellules peut déclencher l'apoptose par plusieurs mécanismes : elle induit un stress oxydatif qui endommage les composants cellulaires, active les voies de signalisation apoptotiques, et perturbe les fonctions mitochondriales, menant à la mort cellulaire programmée **(Redza- Dutordoir & Averill-Bates, 2016).** Cela pourrait bien témoigner un état de stress oxydatif induit par nos substances étudiées. Cette hypothèse est confortée par nos observations histologiques. **Deepalakshmi et al., (2013)**, ont observé la même tendance chez les rates traitées par le DMBA pour induire le cancer du sein, et traitées par l'extrait éthanolique de champignon Reishi (Ganoderma lucidum)..

L'extrait éthanolique des feuilles de Graviola peut prévenir les lésions rénales, augmenter l'activité de la SOD et réduire le taux de MDA **(Sudanta et al., 2023)**. De même, Silihe et al., (2023) ont révélé une activité antioxydante du Graviola caractérisée par une augmentation des niveaux de GSH et de l'activités de la SOD, ainsi qu'une diminution des taux de MDA chez les rates traités par rapport à celles atteintes de cancer du sein induit par le DMBA. Ces résultats, qui suggèrent une forte activité antioxydante de l'extrait aqueux des feuilles de Graviola sont cohérents avec nos observations histologiques. Par ailleurs, il a été rapporté que le Graviola augmente la quantité de plusieurs enzymes capables de réduire les ERO cellulaires, notamment le monoxyde d'azote, le glutathion, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD).**(Gavamukulya et al., 2017; Zubaidi, Mohd Nani, et al., 2023).**

Par ailleurs, nos résultats révèlent une diminution significative de l'activité de la SOD et de la GPx chez tous les lots ayant reçu le traitement seul accompagné par une augmentation de

l'activité de la CAT. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'une étude menée sur des souris mâles (B6C3F1) ayant reçu une dose de 154 à 410 mg de DCA par kilogramme de poids corporel par jour pendant 13 semaines. Une augmentation de l'activité enzymatique de la CAT suggère leur rôle en tant que mécanisme protecteur contribuant à la survie des cellules en réponse à ces traitements **(Hassoun & Cearfoss, 2011)**. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Wang et al., (2020)** qui ont observé que l'exposition fœtale au DCA entraîne une forte réduction de l'activité de la SOD et des niveaux de GSH, tout en augmentant l'activité de la CAT dans l'hippocampe des souris. Ces constatations suggèrent que le mécanisme de neurotoxicité dans cette région pourrait être associé à des dommages oxydatifs. À l'encontre de nos résultats, **Hong et al., 2004,** ont rapporté une augmentation de l'activité de la SOD chez des souris traitées avec un extrait purifié de Maitake par rapport aux témoins. Cependant, nos résultats peuvent être expliqués par les travaux de **Homa et al., (2013),** qui ont testé l'effet d'une exposition dermique à un mélange d'immunostimulants, phorbol-12-myristate-13-acétate, lipopolysaccharides et concanavaline A, sur le ver de terre Eisenia andrei. Ils ont constaté que ces immunostimulants induisaient une diminution significative des ERO. On suppose donc que la diminution de l'activité de la SOD est due à la réduction de la production des ERO, en particulier l'anion superoxyde d'autant plus que la SOD constitue la première ligne de défense contre ces ERO. **Kim et al., (2009)** ont rapporté une augmentation de l'activité de la CAT sous l'effet du Beta-glucane, ce qui peut être due au propriétés antioxydantes de la Beta-glucane elle-même **(Z. Wang et al., 2008).**

3.4.6 Conclusion :

À la lumière de nos investigations, nous pouvons suggérer que les substances étudiées ont des effets sur les paramètres du stress oxydatif, les paramètres sanguins et la structure histologique chez les souris atteintes d'hyperplasie induite chimiquement par le DMBA. Globalement, une relation inverse entre les activités enzymatiques de la GPx, la SOD et de la CAT suggère un état de stress oxydatif, potentiellement induit par ces substances dans le but de freiner la cancérogénèse. Nous pouvons résumer que d'une manière générale, la cancérogénèse entraine la diminution des activités de la SOD et de la GPx et une augmentation de l'activité de la CAT. Le traitement avec les différentes substances séparées ou combinées entraine la restauration ou l'augmentation de l'activité de la SOD et la

diminution des activités de la CAT et de la GPx. Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence l'impact significatif des substances sur les paramètres sanguins, soulignant leur potentiel en tant qu'agents modulateurs du système immunitaire et inflammatoire. Enfin, l'analyse histologique confirme les effets thérapeutiques des substances tout en révélant leur influence sur les réponses inflammatoires et immunitaires. Ces observations soulignent l'importance de comprendre les multiples aspects des réponses biologiques aux traitements anticancéreux pour une approche plus efficace de la gestion du cancer de la peau.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES :

Les recherches menées dans le cadre de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'influence de la dose et de la fréquence d'administration sur le déroulement de la carcinogenèse. Il a été démontré que la modification de la fréquence d'administration pourrait être un moyen efficace d'accélérer la carcinogenèse, en particulier dans le contexte de l'évolution histologique de la tumeur. Par ailleurs, l'étude a souligné l'importance de la sélection de la dose idéale pour éviter l'atteinte d'un stade trop avancé de la tumeur qui pourrait masquer les effets des traitements à faible pouvoir anticancéreux.

En ce qui concerne l'utilisation de plantes en pharmacologie et en médecine traditionnelle, l'étude a révélé que l'extrait brut des feuilles de Graviola ne présente aucun signe de toxicité chez les souris, à l'exception d'une infertilité qui pourrait être liée à une reprotoxicité de la plante. De plus, l'administration d'un mélange de β-glucane et d'arabinogalactane a montré des résultats prometteurs dans le contrôle glycémique, suggérant que ces substances pourraient être explorées comme traitements préventifs et adjuvants dans diverses maladies chroniques dégénératives.

Enfin, l'étude a mis en évidence les effets variés des substances étudiées sur le stress oxydatif, les paramètres sanguins et la structure histologique chez les souris atteintes d'hyperplasies précancéreuses de la peau induit chimiquement par le DMBA. La combinaison des différents traitements semble avoir le même effet que les substances appliquées seules sur le plan morphologique et histologique. Toutefois, elle semble booster davantage la réponse immunitaire. Ces observations soulignent l'importance de comprendre les multiples aspects des réponses biologiques aux traitements anticancéreux pour une approche plus efficace de la gestion du cancer de la peau.

En somme, ces travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes de la carcinogenèse et ouvrent la voie à de nouvelles perspectives pour le développement de traitements anticancéreux plus efficaces et moins toxiques. Ils soulignent également l'importance de la prudence dans l'utilisation de plantes médicinales, en raison de leurs effets potentiels sur la fertilité. Enfin, ils mettent en évidence le potentiel des β-glucanes et de l'arabinogalactane comme agents thérapeutiques dans le traitement de diverses maladies chroniques.

Notre étude a permis d'effectuer un criblage exhaustif des différentes substances ayant un potentiel anticancéreux. En perspective, nous envisageons de reproduire cette expérience avec une carcinogenèse plus prononcée, en utilisant une dose de 200 microgrammes de DMBA. L'objectif serait de départager les substances en fonction de leur pouvoir anticancéreux le plus important. Ce criblage pourrait également être effectué sur d'autres substances, ce qui nous permettrait de sélectionner des substances clés. Nous envisageons également la possibilité de combiner ces substances et d'évaluer leur efficacité conjointe.

Il est également important de considérer le dosage d'autres paramètres spécifiques à la carcinogenèse, tels que les cytokines, les protéines, l'apoptose, et l'expression des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. L'étude des aspects toxicologiques des substances nous permettra d'estimer la possibilité de passer aux essais cliniques.

Notre étude s'est appuyée sur un nombre d'échantillons relativement restreint, et une détermination précise du taux d'infertilité serait mieux établie avec un échantillonnage plus important de souris. Aussi, des études plus approfondies seront nécessaires pour déterminer la cause et le mécanisme de la reprotoxicité de cette plante.

Enfin, notre objectif ultime est de trouver un traitement prophylactique pour cette maladie. Notre recherche est une étape cruciale vers la réalisation de cet objectif.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A Review of Larch Arabinogalactans | Clinical Education. (2016, septembre 15). https://www.clinicaleducation.org/resources/reviews/a-review-of-larch-arabinogalactans/

Abd-Ellatef, G.-E. F., Ahmed, O. M., Abdel-Reheim, E. S., & Abdel-Hamid, A.-H. Z. (2017). Ulva lactuca polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, *Volume 9*. https://doi.org/10.2147/bctt.s125165

Abdo, J. M., Sopko, N. A., & Milner, S. M. (2020). The applied anatomy of human skin : A model for regeneration. *Wound Medicine*, *28*, 100179. https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179

Abel, E. L., Angel, J. M., Kiguchi, K., & DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin : Fundamentals and applications. *Nature Protocols*, *4*(9), Article 9. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.120

Adelstein, D. J. (2003). Systemic chemotherapy for squamous cell head and neck cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *4*(12). https://doi.org/10.1517/14656566.4.12.2151

Adewole, S. O., & Caxton-Martins, E. A. (2006). Morphological changes and hypoglycemic effects of Annona muricata linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic β-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *African Journal of Biomedical Research*, *9*(3), Article 3. https://doi.org/10.4314/ajbr.v9i3.48903

Adeyemi, D., Komolafe, O., Adewole, S., & Obuotor, E. M. (2008). Anti Hyperlipidemic Activities Of Annona Muricata (Linn). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *7*. https://doi.org/10.5580/293b

Adhvaryu, M. R., Reddy, N., & Parabia, M. H. (2007). Effects of four Indian medicinal herbs on Isoniazid-, Rifampicin- and Pyrazinamide-induced hepatic injury and immunosuppression in guinea pigs. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *13*(23), 3199‑ 3205. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i23.3199

Agrawal, R. C., & Pandey, S. (2013). *Evaluation of Anticarcinogenic Activity of herbal Medicinal Plant Aloe vera in Swiss albino mice*. *3*(2).

AGU, K., Okolie, N., Eze, I., Anionye, J., & Falodun, A. (2017). Phytochemical analysis, toxicity profile, and hemomodulatory properties of Annona muricata (Soursop). *The Egyptian Journal of Haematology*, *42*, 36‑ 44. https://doi.org/10.4103/1110-1067.206431

Ahalya, B., Shankar, K. R., & Kiranmayi, G. V. N. (2014). Exploration of anti-hyperglycemic and hypolipidemic activities of ethanolic extract of Annona muricata bark in alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *25*, 21‑ 27.

Ahn, H., Jeon, E., Kim, J.-C., Kang, S. G., Yoon, S., Ko, H.-J., Kim, P.-H., & Lee, G.-S. (2017). Lentinan from shiitake selectively attenuates AIM2 and non-canonical inflammasome activation while inducing pro-inflammatory cytokine production. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-01462-4

Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., & Latgé, J.-P. (2009). Cell wall beta-(1,6)-glucan of Saccharomyces cerevisiae : Structural characterization and in situ synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(20), 13401‑ 13412. https://doi.org/10.1074/jbc.m807667200

Aivodji, N., Ahokpe, M., Behanzin, J., & Sezan, A. (2018). Evaluation of the toxicity of Annona muricata leaf extracts on liver and kidney function and investigation of acute and subacute toxicity in Wistar rats. *American Journal of PharmTech Research*, *8*.

Ajith, T. A., & Janardhanan, K. K. (2011). Phellinus rimosus (Berk.) pilat attenuates 7,12-dimethylbenz[a] anthracene induced and croton oil promoted skin papilloma formation in mice. *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*, *9*(3), 207‑ 215.

Alam, M., & Ratner, D. (2001). Cutaneous squamous-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, *344*(13), 975‑ 983. https://doi.org/10.1056/NEJM200103293441306

Al-Azawi, A. M., Sulaiman, S., Arafat, K., Yasin, J., & Attoub, S. (2021). Impact of Sodium Dichloroacetate Alone and in Combination Therapies on Lung Tumor Growth and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(22). https://doi.org/10.3390/ijms222212553

Andrieu, J.-M. (1991). *Biologie des cancers*. ELLIPSES.

Anjali, V. T., & Kaliyadan, F. (2022). Immunotherapy in skin cancers—A narrative review. *Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases*, *4*. https://doi.org/10.25259/jsstd_74_2021

Arnaud, K., Nicodème, C., Durand, D.-N., Martial, N., Basile, S., Haziz, S., Christine, N., Christian, K. A., Halfane, L., Victorien, D., Noumavo, P., & Lamine, B.-M. (2020). Antioxidant, Anti-Inflammatory Efficacy and HPLC Analysis of Annona muricata Leaves Extracts from Republic of Benin. *American Journal of Plant Sciences*, *11*(6), Article 6. https://doi.org/10.4236/ajps.2020.116057

Arroyo, J., Martínez, J., Ronceros, G., Palomino, R., Villarreal, A., Bonilla, P., Palomino, C., & Quino, M. (2009). Efecto hipoglicemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de Annona muricata L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclamida. *Anales de la Facultad de Medicina*, *70*(3), 163‑ 167.

Arthur, F., Terlabi, B., Larbie, C., & Woode, E. (2011). Evaluation of acute and subchronic toxicity of Annona Muricata (Linn.) aqueous extract in animals. *European Journal of Experimental Biology*, *1*, 115.

Athar, M. (2002). Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian Journal of Experimental Biology*, *40*(6), 656‑ 667.

Athar, M., Elmets, C. A., Bickers, D. R., & Mukhtar, H. (1989). A novel mechanism for the generation of superoxide anions in hematoporphyrin derivative-mediated cutaneous photosensitization. Activation of the xanthine oxidase pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, *83*(4), 1137‑ 1143. https://doi.org/10.1172/JCI113993

Aydın, M. Z., Süfer, Ö., Baktemur, G., Shimira, F., & Taşkın, H. (2021). Effect of Different Substrate Mixtures on Volatile Aroma Compounds and Antioxidant Activity of Maitake Mushroom. *Turkish Journal of*

Agriculture - Food Science and Technology, *9*(6), Article 6. https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i6.1037-1046.4116

Ayeka, P. A. (2018). Potential of Mushroom Compounds as Immunomodulators in Cancer Immunotherapy : A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/7271509

Babícek, K., Cechová, I., Simon, R. R., Harwood, M., & Cox, D. J. (2007). Toxicological assessment of a particulate yeast (1,3/1,6)-beta-D-glucan in rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *45*(9), 1719‑1730. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.013

Balakrishnan, V., Sindhu, G., Vinothkumar, V., Duraisamy, R., Sathiavakoo, V. A., Vasudevan, K., & Vennila, L. (2022). Anticancer and antioxidant profiling effects of Nerolidol against DMBA induced oral experimental carcinogenesis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *36*(6). https://doi.org/10.1002/jbt.23029

Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences*, *22*(3), Article 3. https://doi.org/10.1051/medsci/2006223266

Barton, C., Vigor, K., Scott, R., Jones, P., Lentfer, H., Bax, H. J., Josephs, D. H., Karagiannis, S. N., & Spicer, J. F. (2016). Beta-glucan contamination of pharmaceutical products : How much should we accept? *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *65*(11), 1289‑1301. https://doi.org/10.1007/s00262-016-1875-9

Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity : Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, *161*(2), Article 2. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1

Bickers, D. R., & Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *The Journal of Investigative Dermatology*, *126*(12), 2565‑2575. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700340

Bishayee, A., Mandal, A., Bhattacharyya, P., & Bhatia, D. (2015). Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. *Nutrition and Cancer*, *68*(1). https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1115094

Błaszczyk, K., Gajewska, M., Wilczak, J., Kamola, D., Majewska, A., Harasym, J., & Gromadzka-Ostrowska, J. (2018). Oral administration of oat beta-glucan preparations of different molecular weight results in regulation of genes connected with immune response in peripheral blood of rats with LPS-induced enteritis. *European Journal of Nutrition*, *58*(7). https://doi.org/10.1007/s00394-018-1838-3

Bobek, P., & Galbavý, S. (1999). [The oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) effectively prevents the development of atherosclerosis in rabbits]. *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*, *48*(5), 226‑ 230.

Bobek, P., & Galbavy, S. (2001). Effect of pleuran (beta-glucan from Pleurotus ostreatus) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *British Journal of Biomedical Science*, *58*(3), 164‑ 168.

Bohn, J. A., & BeMiller, J. N. (1995). (1→3)-β-d-Glucans as biological response modifiers : A review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, *28*(1), 3‑ 14. https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00076-3

Bollard, C. M., & Heslop, H. E. (2016). T cells for viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Blood*, *127*(26), 3331‑ 3340. https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-628982

Bonneau, N., Schmitz-Afonso, I., Brunelle, A., Touboul, D., & Champy, P. (2015). Method development for quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1004*, 46‑ 52. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.039

Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Bonnet, S., Harry, G., Hashimoto, K., Porter, C. J., Andrade, M. A., Thebaud, B., & Michelakis, E. D. (2007). A mitochondria-K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization

promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*, *11*(1), Article 1. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.020

Borg, C. L., Wolski, K. M., Gibbs, G. M., & O'Bryan, M. K. (2010). Phenotyping male infertility in the mouse : How to get the most out of a 'non-performer'. *Human Reproduction Update*, *16*(2), 205‑ 224. https://doi.org/10.1093/humupd/dmp032

Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Ready, N. E., Chow, L. Q., Vokes, E. E., Felip, E., Holgado, E., Barlesi, F., Kohlhäufl, M., Arrieta, O., Burgio, M. A., Fayette, J., Lena, H., Poddubskaya, E., Gerber, D. E., Gettinger, S. N., … Brahmer, J. R. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *373*(17), 1627‑ 1639. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643

Borrero, L. J. H., & El-Deiry, W. S. (2021). Tumor Suppressor p53 : Biology, Signaling Pathways, and Therapeutic Targeting. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, *1876*(1), 188556. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556

Boulais, N., & Misery, L. (2008). The epidermis : A sensory tissue. *European Journal of Dermatology: EJD*, *18*(2), 119‑ 127. https://doi.org/10.1684/ejd.2008.0348

Boutekdjiret, D. L., & Bouheraoua, D. A. (2021). *R E G I S T R E DES TUMEURS D'ALGER*. Institut National de Santé Publique. https://www.insp.dz/images/PDF/Les%20registres/TumeursAlger/R%20E%20G%20I%20S%20T%20R%20E%20des%20Tumeurs%20d'Alger%202021.pdf

Bouzidi, I. (2022). *Toxicité des pesticides et des hydrocarbures sur les bivalves marins : Impact de l'exposition aux nanoparticules métalliques* [These de doctorat, Mulhouse]. https://www.theses.fr/2022MULH5746

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), Article 1. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Braico, A., Máximo, D., Balogh, G. A., Braico, A., Máximo, D., & Balogh, G. A. (2017). Immunotherapeutic and Preventive Role of Purified Extract Rich in Beta-Glucans Derived from D-Fraction of Grifola frondosa Mushroom in Experimental Mice Biomodel of Mammary Carcinogenesis. In *Breast Cancer—From Biology to Medicine*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/66890

Bridgemohan, P., Mohammed, A., & Bridgemohan, R. S. H. (2015). Caribbean Soursop (Annona Muricata) Varieties II : Annonaceous Acetogenin Properties. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, *2*(1). https://doi.org/10.15171/ijpni.2015.17

Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research: MCR*, *21*(11), 1142‑ 1147. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411

Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W., & Sacks, F. M. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber : A meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *69*(1), 30‑ 42. https://doi.org/10.1093/ajcn/69.1.30

Bucolo, G., & David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*, *19*(5), 476‑ 482.

Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*, 302‑ 310. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6

Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., & Ascencio, F. (2002). Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (Litopenaeus vannamei). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *133*(4), 557‑ 565. https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00125-4

Campbell, C. W. (1985). Cultivation Of Fruits Of The Annonaceae In Florida. *21st Annual Meeting, September 8-13, 1985, Port of Spain, Trinidad and Tobago*, Article 261375. https://doi.org/10.22004/ag.econ.261375

Canaan, M. M., Reis-Canaan, J. C., Zangerônimo, M. G., Andrade, E. F., Gonçalves, T. M. S. V., Pereira, M. C. A., Lima, R. R., Pardi, V., Murata, R. M., & Pereira, L. J. (2021). Yeast Beta-Glucans Ingestion Does Not Influence Body Weight : A Systematic Review and Meta-Analysis of Pre-Clinical Studies. *Nutrients*, *13*(12), 4250. https://doi.org/10.3390/nu13124250

Cecil, A., & Brown, R. C. D. (2002). A permanganate mediated approach to the synthesis of cis-solamin. *Arkivoc*, *2001*(11). https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0002.b05

Chagonda, L. S., Tafadzwa, M., Dexter, T., Louis, G., Exnevia, G., Felicity, B., & Tapiwa, S. (2015). Acute and Sub-acute Oral Toxicity of Hydroethanolic Root Extract of Annona stenophylla Engl. And Diels in Sprague Dawley Rats. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, *5*(5), 349‑356. https://doi.org/10.1080/22311866.2015.1110501

Chaiswing, L., St Clair, W. H., & St Clair, D. K. (2018). Redox Paradox : A Novel Approach to Therapeutics-Resistant Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*, *29*(13), 1237‑1272. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7485

Chamcheu, J. C., Rady, I., Chamcheu, R.-C. N., Siddique, A. B., Bloch, M. B., Banang Mbeumi, S., Babatunde, A. S., Uddin, M. B., Noubissi, F. K., Jurutka, P. W., Liu, Y.-Y., Spiegelman, V. S., Whitfield, G. K., & El Sayed, K. A. (2018). Graviola (Annona muricata) Exerts Anti-Proliferative, Anti-Clonogenic and Pro-Apoptotic Effects in Human Non-Melanoma Skin Cancer UW-BCC1 and A431 Cells In Vitro : Involvement of Hedgehog Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1791. https://doi.org/10.3390/ijms19061791

Champy, P., Höglinger, G. U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévote, O., Medja, F., Lombès, A., Michel, P. P., Lannuzel, A., Hirsch, E. C., & Ruberg, M. (2004). Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats : Possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of Neurochemistry*, *88*(1), 63‑69. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02138.x

Chan, G. C.-F., Chan, W. K., & Sze, D. M.-Y. (2009). The effects of β-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, *2*, 25. https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-25

Chang, C., Worley, B. L., Phaëton, R., & Hempel, N. (2020). Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer. *Cancers*, *12*(8), 2197. https://doi.org/10.3390/cancers12082197

Chang, F.-R., & Wu, Y.-C. (2001). Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from*Annonamuricata*. *Journal of Natural Products*, *64*(7). https://doi.org/10.1021/np010035s

Chang, Y., Barrett, J. H., Bishop, D. T., Armstrong, B. K., Bataille, V., Bergman, W., Berwick, M., Bracci, P. M., Elwood, J. M., Ernstoff, M. S., Gallagher, R. P., Green, A. C., Gruis, N. A., Holly, E. A., Ingvar, C., Kanetsky, P. A., Karagas, M. R., Lee, T. K., Le Marchand, L., … Newton-Bishop, J. A. (2009). Sun exposure and melanoma risk at different latitudes : A pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *International Journal of Epidemiology*, *38*(3), 814‑ 830. https://doi.org/10.1093/ije/dyp166

Chaube, U., Vyas, V. K., & Bhatt, H. (2016). Design and synthesis of potent N-phenylpyrimidine derivatives for the treatment of skin cancer. *RSC Advances*, *6*(13). https://doi.org/10.1039/c5ra27017k

Chaveli-López, B. (2014). Oral toxicity produced by chemotherapy : A systematic review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. https://doi.org/10.4317/jced.51337

Chen, J., & Raymond, K. (2008). Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular Health and Risk Management*, *4*(6), 1265‑ 1272. https://doi.org/10.2147/vhrm.s3803

Chen, S. N., Chang, C. S., Chen, S., & Soni, M. (2018). Subchronic toxicity and genotoxicity studies of Antrodia mushroom β-glucan preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *92*, 429‑ 438. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.022

Chen, S. N., Nan, F. H., Chen, S., Wu, J. F., Lu, C. L., & Soni, M. G. (2011). Safety assessment of mushroom β-glucan : Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *49*(11), 2890‑ 2898. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.007

Choi, J., Yoon, S.-H., Kim, J.-E., Rhee, K.-H., Youn, H.-S., & Chung, M.-H. (2002). Gene-specific oxidative DNA damage in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *International Journal of Cancer*, *99*(4), 485‑ 490. https://doi.org/10.1002/ijc.10366

Chu, C. N., Hu, K., Wu, R. S. C., & Bau, D. T. (2021). Radiation-irritated skin and hyperpigmentation may impact the quality of life of breast cancer patients after whole breast radiotherapy. *BMC Cancer*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/s12885-021-08047-5

Cicmanec, J. L., Condie, L. W., Olson, G. R., & Wang, S. R. (1991). 90-Day toxicity study of dichloroacetate in dogs. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, *17*(2), 376‑ 389. https://doi.org/10.1016/0272-0590(91)90227-u

Cipolat, S., Hoste, E., Natsuga, K., Quist, S. R., & Watt, F. M. (2014). Epidermal barrier defects link atopic dermatitis with altered skin cancer susceptibility. *eLife*, *3*, e01888. https://doi.org/10.7554/eLife.01888

Conde de la Rosa, L., Goicoechea, L., Torres, S., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2022). Role of Oxidative Stress in Liver Disorders. *Livers*, *2*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/livers2040023

Coria-Téllez, A. V., Montalvo-Gónzalez, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2016). Annona muricata : A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, *11*(5), 662‑ 691. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004

Coria-Téllez, A. V., Montalvo-Gónzalez, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata:* A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, *11*(5), 662‑ 691. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004

Cranston, W. I. (1989). Thermoregulation and the Skin. In M. W. Greaves & S. Shuster (Éds.), *Pharmacology of the Skin I: Pharmacology of Skin Systems Autocoids in Normal and Inflamed Skin* (p. 213‑ 221). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73797-8_12

Croton tiglium L. | Plants of the World Online | Kew Science. (s. d.). Plants of the World Online. Consulté 20 février 2024, à l'adresse http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:343631-1

da Costa, J. M. C., Gouveia, M. J., Rinaldi, G., Brindley, P. J., Santos, J., & Santos, L. L. (2021). Control Strategies for Carcinogenic-Associated Helminthiases : An Integrated Overview. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.626672

Dalal, A. J., Ingham, J., Collard, B., & Merrick, G. (2018). Review of outcomes of 500 consecutive cases of non-melanoma skin cancer of the head and neck managed in an oral and maxillofacial surgical unit in a District General Hospital. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, *56*(9), 805‑ 809. https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2018.08.015

Damasceno, D. C., Volpato, G. T., Sartori, T. C. F., Rodrigues, P. F., Perin, E. A., Calderon, I. M. P., & Rudge, M. V. C. (2002). Effects of Annona squamosa extract on early pregnancy in rats. *Phytomedicine*, *9*(7), 667‑ 672. https://doi.org/10.1078/094471102321616508

Dao, V., Pandeswara, S., Liu, Y., Hurez, V., Dodds, S. G., Callaway, D., Liu, A., Hasty, P., Sharp, Z. D., & Curiel, T. J. (2015). Prevention of Carcinogen and Inflammation-Induced Dermal Cancer by Oral Rapamycin Includes Reducing Genetic Damage. *Cancer Prevention Research*, *8*(5). https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-14-0313-t

Davis, M. E., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics : An emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *7*(9), 771‑ 782. https://doi.org/10.1038/nrd2614

Dean, J. H., Ward, E. C., Murray, M. J., Lauer, L. D., & House, R. V. (1985). Mechanisms of dimethylbenzanthracene-induced immunotoxicity. *Clinical Physiology and Biochemistry*, *3*(2‑ 3), 98‑ 110.

DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, *2*(5), e1600200. https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200

Deepalakshmi, K., Mirunalini, S., Krishnaveni, M., & Arulmozhi, V. (2013). *In vitro* and *in vivo* antioxidant potentials of an ethanolic extract of *Ganoderma lucidum* in rat mammary carcinogenesis. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *11*(6), 621‑ 627. https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60072-2

Delaney, B., Carlson, T., Frazer, S., Zheng, T., Hess, R., Ostergren, K., Kierzek, K., Haworth, J., Knutson, N., Junker, K., & Jonker, D. (2003). Evaluation of the toxicity of concentrated barley β-glucan in a 28-day feeding study in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, *41*(4), 477‑ 487. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00298-3

Démarchez, M. (2015, octobre 25). *L'épiderme et la différenciation des kératinocytes*. https://biologiedelapeau.fr. https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article10

Demirel Yılmaz, B., Eren, B., Sağır, D., Başardı, A., & Mercan, S. (2024). Histological Evaluation of the Protective Role of β-glucan Against Cisplatin-Induced Hepatotoxicity. *Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Dergisi*. https://doi.org/10.55213/kmujens.1434724

de Sousa, O. V., Vieira, G. D.-V., de Jesus R G de Pinho, J., Yamamoto, C. H., & Alves, M. S. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of Annona muricata L. leaves in animal models. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(5), 2067‑ 2078. https://doi.org/10.3390/ijms11052067

Devanesan, P., Ramakrishna, N. V. S., Padmavathi, N. S., Higginbotham, S., Rogan, E. G., Cavalieri, E. L., Marsch, G. A., Jankowiak, R., & Small, G. J. (1993a). Identification and quantitation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chemical Research in Toxicology*, *6*(3). https://doi.org/10.1021/tx00033a018

Devanesan, P., Ramakrishna, N. V. S., Padmavathi, N. S., Higginbotham, S., Rogan, E. G., Cavalieri, E. L., Marsch, G. A., Jankowiak, R., & Small, G. J. (1993b). Identification and quantitation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chemical Research in Toxicology*, *6*(3). https://doi.org/10.1021/tx00033a018

Dichloroacetic Acid Formula : Definition, Concepts and Examples. (2020, janvier 23). *Toppr-Guides*. https://www.toppr.com/guides/chemistry-formulas/dichloroacetic-acid-formula/

DiGiovanni, J. (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacology & Therapeutics*, *54*(1), Article 1. https://doi.org/10.1016/0163-7258(92)90051-Z

Dion, C., Chappuis, E., & Ripoll, C. (2016). Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials. *Nutrition & Metabolism*, *13*(1), 28. https://doi.org/10.1186/s12986-016-0086-x

Dong, S., Guo, X., Han, F., Zhang, H., & Wang, Y. (2022). Emerging role of natural products in cancer immunotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *12*(3). https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.020

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011). Scientific Opinion on the safety of 'yeast beta-glucans' as a Novel Food ingredient. *EFSA Journal*, *9*(5), 2137. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2137

Einspahr, J. G., Bowden, G. T., & Alberts, D. S. (2003). Skin cancer chemoprevention : Strategies to save our skin. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, *163*, 151‑ 164; discussion 264-266. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55647-0_14

Elentner, A., Ortner, D., Clausen, B. E., Gonzalez, F. J., Fernández-Salguero, P. M., Schmuth, M., & Dubrac, S. (2015). Skin response to a carcinogen involves the xenobiotic receptor pregnane X receptor. *Experimental Dermatology*, *24*(11). https://doi.org/10.1111/exd.12766

El-Shahat, A., Refaat G., H., Ashraf M., M., & Madeha N., A.-S. (2021). Ameliorative Effect of Graviola Fruit Juice on the Damaged Tissues of Gamma-Irradiated Male Rats. *Pakistan Journal of Zoology*, *54*(2), 583‑ 590. https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20201113181133

Escobar-Khondiker, M., Höllerhage, M., Muriel, M.-P., Champy, P., Bach, A., Depienne, C., Respondek, G., Yamada, E. S., Lannuzel, A., Yagi, T., Hirsch, E. C., Oertel, W. H., Jacob, R., Michel, P. P., Ruberg, M., & Höglinger, G. U. (2007). Annonacin, a Natural Mitochondrial Complex I Inhibitor, Causes Tau Pathology

in Cultured Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *27*(29), 7827‑ 7837. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1644-07.2007

Eyeghre O. A, Dike C.C 2, Ezeokafor E.N, Oparaji K.C, Amadi C.S, Chukwuma C.C, Obianyo C.M, & Igbokwe V.U. (2023). The impact of Annona muricata and metformin on semen quality and hormonal profile in Arsenic trioxide-induced testicular dysfunction in male Wistar rat. *Magna Scientia Advanced Research and Reviews*, *8*(1), 001‑ 018. https://doi.org/10.30574/msarr.2023.8.1.0053

Fagan, J., Brooks, J., & Ramsey, M. L. (2024). Basal Cell Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470301/

Farhana, A. (2023). Enhancing Skin Cancer Immunotheranostics and Precision Medicine through Functionalized Nanomodulators and Nanosensors : Recent Development and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4). https://doi.org/10.3390/ijms24043493

Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, *121*(11), Article 11. https://doi.org/10.1002/ijc.23192

Ferreira, G. G., Quaresma, A. C. S., Brandão, D. L. do N., Marinho, A. M. do R., Siqueira, J. E. de S., Correa, K. L., Silva-Júnior, J. O. C., Percario, S., & Dolabela, M. F. (2022). Evaluation of Genotoxicity and Toxicity of Annona muricata L. Seeds and In Silico Studies. *Molecules*, *28*(1), 231. https://doi.org/10.3390/molecules28010231

Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, *105*, 114‑ 121. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1

Florence, N. T., Benoit, M. Z., Jonas, K., Alexandra, T., Désiré, D. D. P., Pierre, K., & Théophile, D. (2014). Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *151*(2), 784‑ 790. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.021

Gang, B. P., Dilda, P. J., Hogg, P. J., & Blackburn, A. C. (2014). Targeting of two aspects of metabolism in breast cancer treatment. *Cancer Biology &Amp; Therapy*, *15*(11). https://doi.org/10.4161/15384047.2014.955992

Gavamukulya, Y., Wamunyokoli, F., & El-Shemy, H. A. (2017). Annona muricata : Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *10*(9), 835‑ 848. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.009

George, V. C., Ragupathi, N. K. D., Rajkumar, V., Suresh, P. K., & Kumar, R. A. (2012). Quantitative Assessment of the Relative Antineoplastic Potential of the n-butanolic Leaf Extract of Annona Muricata Linn. In Normal and immortalized Human Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *13*(2). https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.2.699

Goldstein, J. M., Roth, E., Roberts, N., Zwick, R. K., Lin, S., Fletcher, S. A., Tadeu, A., Wu, C., Beck, A. P., Zeiss, C. J., Suárez-Fariñas, M., & Horsley, V. (2015). Loss of endogenous Nfatc1 reduces the rate of DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(20). https://doi.org/10.1091/mbc.e15-05-0282

Gordon, J. R. S., & Brieva, J. C. (2012). Images in clinical medicine. Unilateral dermatoheliosis. *The New England Journal of Medicine*, *366*(16), e25. https://doi.org/10.1056/NEJMicm1104059

Grijaldo, S. J., Alvarez, M. R., Heralde, F. M., Nacario, R. C., Lebrilla, C. B., Rabajante, J. F., & Completo, G. C. (2023). Integrating Computational Methods in Network Pharmacology and *In Silico* Screening to Uncover Multi-targeting Phytochemicals against Aberrant Protein Glycosylation in Lung Cancer. *ACS Omega*, *8*(23). https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07542

Groman, E. V., Enriquez, P. M., Jung, C., & Josephson, L. (1994). Arabinogalactan for hepatic drug delivery. *Bioconjugate Chemistry*, *5*(6), 547‑ 556. https://doi.org/10.1021/bc00030a010

Grover, P., Singh, S. P., Prabhakar, P. V., Reddy, U. A., Balasubramanyam, A., Mahboob, M., Rahman, M. F., & Misra, S. (2009). In vivo assessment of genotoxic effects of Annona squamosa seed extract in rats.

Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, *47*(8), 1964‑ 1971. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.013

Gruber, P., & Zito, P. M. (2024). Skin Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441949/

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and cancer : Have we moved forward? *Biochemical Journal*, *401*(1). https://doi.org/10.1042/bj20061131

Hamada, T., Ichimaru, N., Abe, M., Fujita, D., Kenmochi, A., Nishi-oka, T., Zwicker, K., Brandt, U., & Miyoshi, H. (2004). Synthesis and Inhibitory Action of Novel Acetogenin Mimics with Bovine Heart Mitochondrial Complex I. *Biochemistry*, *43*(12). https://doi.org/10.1021/bi030242m

Hamer, J. H. (1888). Croton Tiglium. *The Homoeopathic Physician*, *8*(6), 320‑ 324.

Han, E. H., Hwang, Y. P., Jeong, T. C., Lee, S. S., Shin, J.-G., & Jeong, H. G. (2007). Eugenol inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells : Bifunctional effects on CYP1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *FEBS Letters*, *581*(4). https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.044

Hassoun, E. A., & Cearfoss, J. (2011). Dichloroacetate- and Trichloroacetate-Induced Modulation of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase Activities and Glutathione Level in the livers of Mice after Subacute and Subchronic exposure. *Toxicological and Environmental Chemistry*, *93*(2), 332‑ 344. https://doi.org/10.1080/02772248.2010.509602

Hassoun, E. A., Kariya, C., & Williams, F. (2005). Dichloroacetate-induced developmental toxicity and production of reactive oxygen species in zebrafish embryos. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *19*(1). https://doi.org/10.1002/jbt.20051

Hassoun, E. A., Spildener, J., & Cearfoss, J. (2010). The Induction of Tumor Necrosis Factor-alpha , Supeoxide Anion, Myeloperoxidase, and Superoxide Dismutase in the Peritoneal Lavage Cells of Mice after Prolonged Exposure to Dichloroacetate and Trichloroacetate. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *24*(2), 136‑ 144. https://doi.org/10.1002/jbt.20322

Haugrud, A. B., Zhuang, Y., Coppock, J. D., & Miskimins, W. K. (2014). Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, *147*(3), 539‑ 550. https://doi.org/10.1007/s10549-014-3128-y

Heistein, J. B., Acharya, U., & Mukkamalla, S. K. R. (2024). Malignant Melanoma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470409/

Hennings, H., Glick, A. B., Greenhalgh, D. A., Morgan, D. L., Strickland, J. E., Tennenbaum, T., & Yuspa, S. H. (1993). Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *202*(1), 1‑ 8. https://doi.org/10.3181/00379727-202-43511a

Hernández Aragüés, I., Pulido Pérez, A., & Suárez Fernández, R. (2017). Inflammatory Skin Conditions Associated With Radiotherapy. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, *108*(3), 209‑ 220. https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.09.011

Hernández Fuentes, L. M., Montalvo González, E., García Magaña, M. de L., Anaya Esparza, L. M., Nolasco González, Y., Villagrán, Z., González Torres, S., Velázquez Monreal, J. J., & Morelos Flores, D. A. (2022). Current Situation and Perspectives of Fruit Annonaceae in Mexico : Biological and Agronomic Importance and Bioactive Properties. *Plants*, *11*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/plants11010007

Hernandez-Fuentes, G. A., García-Argáez, A. N., Peraza-Campos, A. L., Delgado-Enciso, I., Muñiz-Valencia, R., Martínez-Martínez, F. J., Toninello, A., Gómez-Sandoval, Z., Mojica-Sánchez, J. P., Via, L. D., & Parra-Delgado, H. (2019). Cytotoxic Acetogenins from the Roots of Annona purpurea. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8). https://doi.org/10.3390/ijms20081870

Higgins, S., Nazemi, A., Chow, M., & Wysong, A. (2018). Review of Nonmelanoma Skin Cancer in African Americans, Hispanics, and Asians. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]*, *44*(7), 903‑ 910. https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001547

Hodi, F. S., Wolchok, J. D., Schadendorf, D., Larkin, J., Long, G. V., Qian, X., Saci, A., Young, T. C., Srinivasan, S., Chang, H., Tang, H., Wind-Rotolo, M., Rizzo, J. I., Jackson, D. G., & Ascierto, P. A. (2021). TMB and Inflammatory Gene Expression Associated with Clinical Outcomes following Immunotherapy in Advanced Melanoma. *Cancer Immunology Research*, *9*(10), 1202‑ 1213. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0983

Homa, J., Zorska, A., Wesolowski, D., & Chadzinska, M. (2013). Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of Eisenia andrei. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, *183*(3), 313‑ 322. https://doi.org/10.1007/s00360-012-0710-7

Hong, F., Yan, J., Baran, J. T., Allendorf, D. J., Hansen, R. D., Ostroff, G. R., Xing, P. X., Cheung, N.-K. V., & Ross, G. D. (2004). Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *173*(2), 797‑ 806. https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.797

Hou, B., Wang, F., Liu, T., & Wang, Z. (2021). Reproductive toxicity of polystyrene microplastics : In vivo experimental study on testicular toxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*, *405*, 124028. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124028

Hould, R. (avec Collège d'enseignement général et professionnel). (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Décarie Maloine.

Howell, J. Y., & Ramsey, M. L. (2023). Squamous Cell Skin Cancer. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441939/

Hoyt, B., & Cohen, P. R. (2014). Radiation port cutaneous metastases : Reports of two patients whose recurrent visceral cancers presented as skin lesions at the site of previous radiation and literature review. *Indian Journal of Dermatology*, *59*(2). https://doi.org/10.4103/0019-5154.127680

Http://www.chemspider.com. (s. d.). *Journal of Heterocyclic Chemistry*. http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5739.html

Hu, X., Wang, L., Zhang, L., & Zhang, T. (2020). β-Elemene inhibits 7,12-dimethylbenz(a)anthracene/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin tumorigenesis through suppression of NF-κB-associated signaling events in the mouse skin model. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *34*(10). https://doi.org/10.1002/jbt.22550

Irshad, M., & Chaudhuri, P. S. (2002). KONO. *Indian Journal of Experimental Biology*, *40*(11), 1233‑ 1239.

Iskusnykh, I. Y., Zakharova, A. A., & Pathak, D. (2022). Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*, *27*(1), 324. https://doi.org/10.3390/molecules27010324

Iversen, O. H. (1991). The skin tumorigenic and carcinogenic effects of different doses, numbers of dose fractions amd concentrations of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in acetone applied on hairless mouse epidermis. Possible implications for human carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *12*(3), Article 3. https://doi.org/10.1093/carcin/12.3.493

Jacobo-Herrera, N., Pérez-Plasencia, C., Castro-Torres, V. A., Martínez-Vázquez, M., González-Esquinca, A. R., & Zentella-Dehesa, A. (2019). Selective Acetogenins and Their Potential as Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 783. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00783

James, W. D., Elston, D. M., Treat, J. R., & Rosenbach, M. A. (2019). *Andrews' Diseases of the Skin : Clinical Dermatology*. Elsevier.

Janick, J., & Paull, R. E. (2008). *The Encyclopedia of Fruit and Nuts*. CABI.

Jonker, D., Hasselwander, O., Tervilä-Wilo, A., & Tenning, P. P. (2010). 28-Day oral toxicity study in rats with high purity barley beta-glucan (Glucagel). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *48*(1), 422‑ 428. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.034

Joyce, S. A., Kamil, A., Fleige, L., & Gahan, C. G. M. (2019). The Cholesterol-Lowering Effect of Oats and Oat Beta Glucan : Modes of Action and Potential Role of Bile Acids and the Microbiome. *Frontiers in Nutrition*, *6*, 171. https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00171

Julie K. Karen & Ronald L. Moy. (2020). Le Carcinome Basocellulaire. *The Skin Cancer Foundation*. https://www.skincancer.org/international/le-carcinome-basocellulaire/

Justo, A. S., Lemes, B. M., Nunes, B., Antunes, K. A., Capote, A. C. M. O., Lipinski, L. C., Campagnoli, E. B., Emiliano, J., Meurer, E. C., Ezemma, O., Miot, H. A., Beltrame, F. L., & Wambier, C. G. (2021). Characterization of the Activity of Croton tiglium Oil in Hetter's Very Heavy Phenol-Croton Oil Chemical Peels. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]*, *47*(7), 944‑ 946. https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000002990

Kaplan A. (1984). *Bilirubin* (Clinical Chemistry, 1‑ 436, p. 1238‑ 1241).

Karampinis, E., Nechalioti, P.-M., Georgopoulou, K. E., Goniotakis, G., Roussaki Schulze, A. V., Zafiriou, E., & Kouretas, D. (2023). Systemic Oxidative Stress Parameters in Skin Cancer Patients and Patients with Benign Lesions. *Stresses*, *3*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/stresses3040054

Kath, F., & Kulicke, W.-M. (1999). Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast Saccharomyces cerevisiae. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, *268*(1), 59‑ 68. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-9505(19990701)268:1<59::AID-APMC59>3.0.CO;2-F

Kemp, C. J., Donehower, L. A., Bradley, A., & Balmain, A. (1993). Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell*, *74*(5), 813‑ 822. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90461-x

Khaldi, T. (2018). *EFFETS DES XÉNOBIOTIQUES CONTENUS DANS LE TABAC SANS FUMÉE (CHEMMA) SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE : IMMUNOTOXICITÉ ET PHYTOTHÉRAPIE (Nigella sativa)*. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33861.78569

Khan, A., Andrews, D., & Blackburn, A. C. (2016). Long-term stabilization of stage 4 colon cancer using sodium dichloroacetate therapy. *World Journal of Clinical Cases*, *4*(10). https://doi.org/10.12998/wjcc.v4.i10.336

Khan, A., Andrews, D., Shainhouse, J., & Blackburn, A. C. (2017). Long-term stabilization of metastatic melanoma with sodium dichloroacetate. *World Journal of Clinical Oncology*, *8*(4), 371‑ 377. https://doi.org/10.5306/wjco.v8.i4.371

Kim, L. S., Burkholder, P. M., & Waters, R. F. (2002). Effects of Low-Dose Larch Arabinogalactan From Larix Occidentalis : A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. *Complementary Health Practice Review*, *7*(3), 221‑ 229. https://doi.org/10.1177/153321010200700305

Kim, Y.-S., Ke, F., & Zhang, Q.-Y. (2009). Effect of beta-glucan on activity of antioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp. *Fish & Shellfish Immunology*, *27*(2), Article 2. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.006

Kim, Y.-W., Kim, K.-H., Choi, H.-J., & Lee, D.-S. (2005). Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from Agaricus blazei. *Biotechnology Letters*, *27*(7), 483‑ 487. https://doi.org/10.1007/s10529-005-2225-8

Kinnaird, A., Dromparis, P., Saleme, B., Gurtu, V., Watson, K., Paulin, R., Zervopoulos, S., Stenson, T., Sutendra, G., Pink, D. B., Carmine-Simmen, K., Moore, R., Lewis, J. D., & Michelakis, E. D. (2016). Metabolic Modulation of Clear-cell Renal Cell Carcinoma with Dichloroacetate, an Inhibitor of Pyruvate Dehydrogenase Kinase. *European Urology*, *69*(4), 734‑ 744. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.09.014

Kleiner, H. E., Vulimiri, S. V., Reed, M. J., Uberecken, and A., & DiGiovanni, J. (2002). Role of Cytochrome P450 1a1 and 1b1 in the Metabolic Activation of 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene and the Effects of Naturally Occurring Furanocoumarins on Skin Tumor Initiation. *Chemical Research in Toxicology*, *15*(2). https://doi.org/10.1021/tx010151v

Kobayashi, H., Yoshida, R., Kanada, Y., Fukuda, Y., Yagyu, T., Inagaki, K., Kondo, T., Kurita, N., Suzuki, M., Kanayama, N., & Terao, T. (2005). Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from Agaricus blazei Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in

mouse model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *131*(8), Article 8. https://doi.org/10.1007/s00432-005-0672-1

Kohlmeyer, J., Steimle-Grauer, S. A., & Hein, R. (2017). Cutaneous sarcomas. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, *15*(6), 630‑ 648. https://doi.org/10.1111/ddg.13249

Kojima, N., & Tanaka, T. (2009). Medicinal Chemistry of Annonaceous Acetogenins : Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Analogues. *Molecules*, *14*(9). https://doi.org/10.3390/molecules14093621

Kolarsick, P., Kolarsick, M., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, *3*(4), 203‑ 213. https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98

Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, *257*(10), 5751‑ 5754.

Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2017). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, *45*(6), 347‑ 351. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.03.004

Lan, Y., Zhu, D.-Y., Zhu, L., Hou, Y., Hou, L., Huang, X., Li, L., Wang, Y., Li, L., Zou, H., Wu, T., Yao, M., Wang, J., & Meng, X. (2019). Dichloroacetate Overcomes Oxaliplatin Chemoresistance in Colorectal Cancer through the miR-543/PTEN/Akt/mTOR Pathway. *Journal of Cancer*, *10*(24). https://doi.org/10.7150/jca.34650

Lannuzel, A., Höglinger, G. U., Champy, P., Michel, P. P., Hirsch, E. C., & Ruberg, M. (2006). Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonacae? *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, *70*, 153‑ 157. https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_24

Larch Arabinogalactan—Cancer Care of Western New York. (2014, septembre). https://www.cancercarewny.com/content.aspx?chunkiid=111700

Leclerc, D., Pham, D., Lévesque, N., Truongcao, M., Foulkes, W. D., Sapienza, C., & Rozen, R. (2017). Oncogenic role of PDK4 in human colon cancer cells. *British Journal of Cancer*, *116*(7). https://doi.org/10.1038/bjc.2017.38

Lee, D. H., Park, C. W., Lee, S. J., Park, H. R., Kim, S. H., Son, S. U., Park, J., & Shin, K. (2019). Anti-Cancer Effects of Panax ginseng Berry Polysaccharides via Activation of Immune-Related Cells. *Frontiers in Pharmacology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01411

Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell Wall Assembly in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(2), 317‑343. https://doi.org/10.1128/MMBR.00038-05

Levacher, C., & Melissopoulos, A. (2012). *La peau : Structure et physiologie (2° Éd.): Structure et physiologie* (2e édition). TECHNIQUE & DOC.

Li, C., Wu, X., Sun, R., Zhao, P., Liu, F., & Zhang, C. (2016). Croton Tiglium Extract Induces Apoptosis via Bax/Bcl-2 Pathways in Human Lung Cancer A549 Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, *17*(11), 4893‑4898. https://doi.org/10.22034/APJCP.2016.17.11.4893

Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, *6*, 19. https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19

Liu, J., Fu, M., Wang, M., Wan, D., Wei, Y., & Wei, X. (2022). Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics : Platforms and current progress. *Journal of Hematology &Amp; Oncology*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s13045-022-01247-x

Liu, Y., Cheng, X., Guo, L., Mao, C., Chen, Y., Liu, H., Xiao, Q., Jiang, S., & Yao, Z.-J. (2012). Identification of an Annonaceous Acetogenin Mimetic, AA005, as an AMPK Activator and Autophagy Inducer in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, *7*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047049

Lumpkin, E. A., & Caterina, M. J. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, *445*(7130), 858‑865. https://doi.org/10.1038/nature05662

Luu-dam, N. A., Le, C. V. C., Satyal, P., Le, T. M. H., Bui, V. H., Vo, V. H., Ngo, G. H., Bui, T. C., Nguyen, H. H., & Setzer, W. N. (2023). Chemistry and Bioactivity of Croton Essential Oils : Literature Survey and Croton hirtus from Vietnam. *Molecules*, *28*(5), 2361. https://doi.org/10.3390/molecules28052361

Ma, M., L, C., Ma, M., S, N., Y, L., M, S., H, X., B, A., F, F., Aa, M., W, W., A, J., M, N., Jh, L., & Q, Z. (2022). Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health : An overeview. *Chemosphere*, *296*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133948

Marieb Elaine N (avec Hoehn Katja, Desbiens Annie, Moussakova Linda, & Lachaîne René). (2015). *Anatomie et physiologie humaines / Elaine N. Marieb, Katja Hoehn ; adaptation française, Linda Moussakova et René Lachaîne [traduit de l'anglais par Annie Desbiens]* ([5e édition], adaptation de la 9e édition américaine). Pearson Éditions du Renouveau pédagogique.

Masuda, Y., Inoue, M., Miyata, A., Mizuno, S., & Nanba, H. (2009). Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosupression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *International Immunopharmacology*, *9*(5), 620‑626. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.02.005

Masuda, Y., Murata, Y., Hayashi, M., & Nanba, H. (2008). Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis : Involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *31*(6), 1104‑1108. https://doi.org/10.1248/bpb.31.1104

Masuda, Y., Nawa, D., Nakayama, Y., Konishi, M., & Nanba, H. (2015). Soluble β-glucan from Grifola frondosa induces tumor regression in synergy with TLR9 agonist via dendritic cell-mediated immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, *98*(6), 1015‑1025. https://doi.org/10.1189/jlb.1A0814-415RR

Mather, G. G., Exon, J. H., & Koller, L. D. (1990). Subchronic 90 day toxicity of dichloroacetic and trichloroacetic acid in rats. *Toxicology*, *64*(1), 71‑80. https://doi.org/10.1016/0300-483x(90)90100-u

Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., & Grupp, S. A. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained

remissions in leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *371*(16), 1507‑ 1517. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407222

Meiattini, F., Prencipe, L., Bardelli, F., Giannini, G., & Tarli, P. (1978). The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, *24*(12), 2161‑ 2165.

Menon, S., Al-Eisa, R., Hamdi, H., Lawrence, L., Syamily, P., Sivaram, V., Padikkala, J., Mathew, S., & Narayanankutty, A. (2023). Protective Effect of Annona muricata Linn Fruit Pulp Lyophilized Powder against Paracetamol-Induced Redox Imbalance and Hepatotoxicity in Rats. *Processes*, *11*, 276. https://doi.org/10.3390/pr11010276

Miller, E. C., & Miller, J. A. (1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, *47*(10), 2327‑ 2345. https://doi.org/10.1002/1097-0142(19810515)47:10<2327::aid-cncr2820471003>3.0.co;2-z

Minig, V. (2009). *Etude du mécanisme de régulation du gène et de l'importance biologique de la superoxyde dismutase à manganèse dans la croissance tumorale mammaire* [Phdthesis, Université Henri Poincaré - Nancy 1]. https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754332

Modi, B., Neustadter, J., Binda, E., Lewis, J. M., Filler, R., Roberts, S., Kwong, B. Y., Reddy, S., Overton, J. D., Galan, A., Tigelaar, R. E., Cai, L., Fu, P. P., Shlomchik, M. J., Kaplan, D. H., Hayday, A., & Girardi, M. (2012). Langerhans Cells Facilitate Epithelial DNA Damage and Squamous Cell Carcinoma. *Science*, *335*(6064). https://doi.org/10.1126/science.1211600

Mogensen, M., & Jemec, G. B. E. (2007). Diagnosis of Nonmelanoma Skin Cancer/Keratinocyte Carcinoma : A Review of Diagnostic Accuracy of Nonmelanoma Skin Cancer Diagnostic Tests and Technologies. *Dermatologic Surgery*, *33*(10). https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2007.33251.x

Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). Annona muricata (Annonaceae) : A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(7). https://doi.org/10.3390/ijms160715625

Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, *8*(23), 38022‑ 38043. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723

Mughal, M. S., Azizullah, & Ahmed, T. (2005). Carcinogenic effects of DMBA and TPA on skin of mice. *Biologia (Lahore)*, *51*(2), Article 2.

Mutakin, M., Fauziati, R., Fadhilah, F. N., Zuhrotun, A., Amalia, R., & Hadisaputri, Y. E. (2022). Pharmacological Activities of Soursop (Annona muricata Lin.). *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(4), 1201. https://doi.org/10.3390/molecules27041201

Naik, A. V., Dessai, S. N., & Sellappan, K. (2020). Antitumour activity of Annona muricata L. leaf methanol extracts against Ehrlich Ascites Carcinoma and Dalton's Lymphoma Ascites mediated tumours in Swiss albino mice. *The Libyan Journal of Medicine*, *16*(1), 1846862. https://doi.org/10.1080/19932820.2020.1846862

Nanba, H., Hamaguchi, A., & Kuroda, H. (1987). The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of Grifola frondosa (maitake). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *35*(3), 1162‑ 1168. https://doi.org/10.1248/cpb.35.1162

NEAGU, M., CARUNTU, C., CONSTANTIN, C., BODA, D., ZURAC, S., SPANDIDOS, D. A., & TSATSAKIS, A. M. (2016). Chemically induced skin carcinogenesis : Updates in experimental models (Review). *Oncology Reports*, *35*(5), 2516‑ 2528. https://doi.org/10.3892/or.2016.4683

Nicolosi, R., Bell, S. J., Bistrian, B. R., Greenberg, I., Forse, R. A., & Blackburn, G. L. (1999). Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *70*(2), 208‑ 212. https://doi.org/10.1093/ajcn.70.2.208

Nischal, U., Kc, null N., & Khopkar, U. (2008). Techniques of skin biopsy and practical considerations. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, *1*(2). https://doi.org/10.4103/0974-2077.44174

Nishigori, C., Hattori, Y., & Toyokuni, S. (2004). Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, *6*(3), 561‑ 570. https://doi.org/10.1089/152308604773934314

Noorbakhsh Varnosfaderani, S. M., Ebrahimzadeh, F., Akbari Oryani, M., Khalili, S., Almasi, F., Mosaddeghi Heris, R., Payandeh, Z., Li, C., Nabi Afjadi, M., & Alagheband Bahrami, A. (2024). Potential promising anticancer applications of β-glucans : A review. *Bioscience Reports*, *44*(1), BSR20231686. https://doi.org/10.1042/BSR20231686

Notions—Comment évaluer un effet toxique ? - CNESST. (s. d.). Consulté 9 mai 2024, à l'adresse https://reptox.cnesst.gouv.qc.ca/toxicologie/notions-toxicologie/Pages/08-comment-evaluer-effet-toxique.aspx

Nowotarski, S. L., Feith, D. J., & Shantz, L. M. (2015). Skin Carcinogenesis Studies Using Mouse Models with Altered Polyamines. *Cancer Growth and Metastasis*, *8*(Suppl 1), 17‑ 27. https://doi.org/10.4137/CGM.S21219

Nugraha, A. S., Haritakun, R., Lambert, J. M., Dillon, C. T., & Keller, P. A. (2019). Alkaloids from the root of Indonesian *Annona muricata* L. *Natural Product Research*, *35*(3). https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1638380

Oberley, L. W., & Buettner, G. R. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer : A review. *Cancer Research*, *39*(4), 1141‑ 1149.

Ogbu, P., Ugota, E., Onwuka, R., Ogbu, I., & Chinyere, A. (2020). Effect of acetogenin fraction of Annona muricata leaves on antioxidant status and some indices of benign prostatic hyperplasia in rats. *Redox Report*, *25*, 80‑ 86. https://doi.org/10.1080/13510002.2020.1804711

Ohashi, T., Akazawa, T., Aoki, M., Kuze, B., Mizuta, K., Ito, Y., & Inoue, N. (2013). Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity. *International Journal of Cancer*, *133*(5), 1107‑ 1118. https://doi.org/10.1002/ijc.28114

Oluwayinka, E., Okunuga, F., Oni, O., Olukunle, J., Akinkuotu, O., & Oluwayinka, O. (2021). Activities of aqueous extracts of soursop (Annona muricata) leaves on immune response, haematology and serum biochemistry of broiler chickens. *Nigerian Journal of Animal Production*, *44*, 110‑ 116. https://doi.org/10.51791/njap.v44i3.744

Orak, H. H., Bahrisefit, I. S., & Sabudak, T. (2019). Antioxidant Activity of Extracts of Soursop (Annona muricata L.) Leaves, Fruit Pulps, Peels, and Seeds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *69*(4). https://doi.org/10.31883/pjfns/112654

Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., García-Lidón, A., & Río, J. A. D. (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids : Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, *98*(2), 351‑ 358. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.017

P, N., & Durairaj, B. (2018). ANTITUMOR POTENTIAL OF HYDROETHANOLIC EXTRACT OF ANNONA MURICATA LEAVES AGAINST DALTON'S LYMPHOMA ASCITES-INDUCED TUMOR IN MICE. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *11*(3), 364. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i3.22807

Padmavathi, B., Rath, P. C., Rao, A. R., & Singh, R. P. (2005). Roots of Withania somnifera Inhibit Forestomach and Skin Carcinogenesis in Mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, *2*(1), Article 1. https://doi.org/10.1093/ecam/neh064

PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Skin Cancer Treatment (PDQ®) : Patient Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65824/

Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S. A., Haywood, P., Brown, C., & Ward, R. L. (2017). Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care : A prospective cohort study. *Plos One*, *12*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184360

Pelusi, C., Ikeda, Y., Zubair, M., & Parker, K. L. (2008). Impaired Follicle Development and Infertility in Female Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 in Ovarian Granulosa Cells1. *Biology of Reproduction*, *79*(6), 1074‑ 1083. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069435

Pietrzycka, A., Stepniewski, M., Waszkielewicz, A. M., Marona, H., Krzyzanowska, A., Kłosowska, K., & Solarz, O. (2006). Effect of Vita Glucan on some antioxidant parameters of the human blood. In vitro study. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, *63*(6), 547‑ 551.

Piomboni, P., Governini, L., Gori, M., Puggioni, E., Costantino-Ceccarini, E., & Luddi, A. (2014). New Players in the Infertility of a Mouse Model of Lysosomal Storage Disease : The Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis. *Frontiers in Endocrinology*, *4*, 204. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00204

PLAN NATIONAL CANCER 2015 2019. (2014). *OMS | MNT Acceuil*. https://extranet.who.int/ncdccs/data/plan national cancer 2015 2019

Porock, D., & KristJanson. (1999). Skin reactions during radiotherapy for breast cancer : The use and impact of topical agents and dressings. *European Journal of Cancer Care*, *8*(3). https://doi.org/10.1046/j.1365-2354.1999.00153.x

Puckett, Y., Wilson, A. M., Farci, F., & Thevenin, C. (2024). Melanoma Pathology. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459367/

Qorina, F., Arsianti, A., Fithrotunnisa, Q., & Tejaputri, N. A. (2019). Phytochemistry and Antioxidant Activity of Soursop (Annona Muricata) Leaves. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s6.33524

Radapong, S., Suppajariyawat, P., Sincharoenpokai, P., Chaorai, B., Phankhajon, K., Primprai, P., Aunkat, S., & Chansuvanich, N. (2019). Chronic toxicity of Annona muricata L. leaf extract. *Agriculture and Natural Resources*, *53*(1), 53‑ 60. https://doi.org/10.34044/j.anres.2019.53.1.09

Radiation : Ultraviolet (UV) radiation and skin cancer. (s. d.). Consulté 18 février 2024, à l'adresse https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-ultraviolet-(uv)-radiation-and-skin-cancer

Reddy, A. L., & Fialkow, P. J. (1983). Papillomas induced by initiation-promotion differ from those induced by carcinogen alone. *Nature*, *304*(5921), Article 5921. https://doi.org/10.1038/304069a0

Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1863*(12), 2977‑ 2992. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012

Riabchinskaia, L. (1983). *Anti-inflammatory activity of immunostimulants and their combinations with antiphlogistics*. *46*(2), 78‑ 82.

Rigel, D. S. (2011). *Cancer of the Skin*. Elsevier Saunders.

Robsahm, T. E., Karagas, M. R., Rees, J. R., & Syse, A. (2014). New malignancies after squamous cell carcinoma and melanomas : A population-based study from Norway. *BMC Cancer*, *14*(1), 210. https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-210

Roszczyk, A., Zych, M., Zielniok, K., Krata, N., Turło, J., Klimaszewska, M., Zagożdżon, R., & Kaleta, B. (2022). The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis. *Biomolecules*, *12*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/biom12121900

Roudi, R., Mohammadi, S. R., Roudbary, M., & Mohsenzadegan, M. (2017). Lung cancer and β-glucans : Review of potential therapeutic applications. *Investigational New Drugs*, *35*(4), 509‑ 517. https://doi.org/10.1007/s10637-017-0449-9

Saas, P. (1997). *Mécanisme d'action de l'immunotoxicité induite par les hydrocarbures polycycliques aromatiques* [These de doctorat, Metz]. https://www.theses.fr/1997METZ036S

Sahoo, B. M., Ravi Kumar, B. V. V., Banik, B. K., & Borah, P. (2020). Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) : Structures, Synthesis and their Biological Profile. *Current Organic Synthesis*, *17*(8), 625‑ 640. https://doi.org/10.2174/1570179417666200713182441

Saini, M., Goyal, P. K., & Chaudhary, G. (2010). Anti-tumor activity of Aloe vera against DMBA/croton oil-induced skin papillomagenesis in Swiss albino mice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, *29*(2), Article 2. https://doi.org/10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.v29.i2.60

Sakai, Y., Tanaka, M., & Shirakawa, M. (2004). Lymphocyte changes in peripheral blood, spleen, and liver in DMBA-induced squamous cell carcinoma of mouse cheek skin. *Odontology*, *92*(1), 36‑ 42. https://doi.org/10.1007/s10266-004-0041-6

Saliba, H., Heurtault, B., Bouharoun-Tayoun, H., Flacher, V., Frisch, B., Fournel, S., & Chamat, S. (2017). Enhancing tumor specific immune responses by transcutaneous vaccination. *Expert Review of Vaccines*, *16*(11). https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1382357

Saluk-Juszczak, J., Królewska, K., & Wachowicz, B. (2010). β-glucan from*Saccharomyces cerevisiae*as a blood platelet antioxidant. *Platelets*, *21*(6). https://doi.org/10.3109/09537101003780032

Sandhar, Kumar, B., Prasher, B., Tiwari, P, Salhan, M., & Sharma, P. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids,. *Internationale Pharmaceutica Sciencia*, 25‑ 41.

Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2009). Ganoderma lucidum : A Potent Pharmacological Macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *10*(8). https://doi.org/10.2174/138920109789978757

Sasso, S., Sampaio E Souza, P. C., Santana, L. F., Cardoso, C. A. L., Alves, F. M., Portugal, L. C., de Faria, B. B., da Silva, A. F., Motta-Castro, A. R. C., Soares, L. S., Bandeira, L. M., Guimarães, R. de C. A., & Freitas, K. de C. (2019). Use of an Extract of Annona muricata Linn to Prevent High-Fat Diet Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice. *Nutrients*, *11*(7), 1509. https://doi.org/10.3390/nu11071509

Scoditti, E., Massaro, M., Carluccio, M. A., Pellegrino, M., Wabitsch, M., Calabriso, N., Storelli, C., & De Caterina, R. (2015). Additive regulation of adiponectin expression by the mediterranean diet olive oil components oleic Acid and hydroxytyrosol in human adipocytes. *PloS One*, *10*(6), e0128218. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128218

Shafiee, M. J., & Wong, A. (2017). Discovery Radiomics via Deep Multi-Column Radiomic Sequencers for Skin Cancer Detection. *Journal of Computational Vision and Imaging Systems*, *3*(1). https://doi.org/10.15353/vsnl.v3i1.177

Shen, H., Cai, M., Chen, T., Zheng, D., Huang, S., Zhou, M., He, W., Li, Y., & Tan, Q. (2020). Factors affecting the success of fallopian tube recanalization in treatment of tubal obstructive infertility. *The Journal of International Medical Research*, *48*(12), 0300060520979218. https://doi.org/10.1177/0300060520979218

Shigdar, S., Schrand, B., Giangrande, P. H., & Franciscis, V. de. (2021). Aptamers : Cutting edge of cancer therapies. *Molecular Therapy*, *29*(8). https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.06.010

Shiitake Mushroom—A Comprehensive Guide. (2022, août 19). Doseology. https://doseology.com/en-intl/blogs/learn/shiitake-mushroom

Shukry, M., El-Shehawi, A. M., El-Kholy, W. M., Elsisy, R. A., Hamoda, H. S., Tohamy, H. G., Abumandour, M. M., & Farrag, F. A. (2020). Ameliorative Effect of Graviola (Annona muricata) on Mono Sodium Glutamate-Induced Hepatic Injury in Rats : Antioxidant, Apoptotic, Anti-inflammatory, Lipogenesis Markers, and Histopathological Studies. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, *10*(11), 1996. https://doi.org/10.3390/ani10111996

Silihe, K. K., Mbou, W. D., Ngo Pambe, J. C., Kenmogne, L. V., Maptouom, L. F., Kemegne Sipping, M. T., Zingue, S., & Njamen, D. (2023). Comparative anticancer effects of Annona muricata Linn (Annonaceae) leaves and fruits on DMBA-induced breast cancer in female rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *23*(1), 234. https://doi.org/10.1186/s12906-023-04073-x

Slaga, T. J. (1983). Overview of tumor promotion in animals. *Environmental Health Perspectives*, *50*, 3‑ 14.

Slaga, T. J. (1984). Multistage skin carcinogenesis : A useful model for the study of the chemoprevention of cancer. *Acta Pharmacologica Et Toxicologica*, *55 Suppl 2*, 107‑ 124. https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1984.tb02485.x

Slíva, D. (2003). Ganoderma Lucidum(Reishi) in Cancer Treatment. *Integrative Cancer Therapies*, *2*(4). https://doi.org/10.1177/1534735403259066

So, P.-L. (2007). *Skin Cancer (Biology of Cancer)*. Chelsea House Publications. https://www.biblio.com/book/skin-cancer-biology-cancer-po-lin/d/914034223

Sovia, E., Ratwita, W., Wijayanti, D., & Novianty, R. (2017). HYPOGLYCEMIC AND HYPOLIPIDEMIC EFFECTS OF ANNONA MURICATA L. LEAF ETHANOL EXTRACT. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *9*, 170. https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i3.16402

Stacpoole, P. W., Gilbert, L. R., Neiberger, R. E., Carney, P. R., Valenstein, E., Theriaque, D. W., & Shuster, J. J. (2008). Evaluation of Long-term Treatment of Children With Congenital Lactic Acidosis With Dichloroacetate. *Pediatrics*, *121*(5). https://doi.org/10.1542/peds.2007-2062

Stier, H., Ebbeskotte, V., & Gruenwald, J. (2014). Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutrition Journal*, *13*(1), 38. https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-38

Su, Z., Song, J., Wang, Z., Zhou, L., Xia, Y., Yu, S., Sun, Q., Liu, S.-S., Zhao, L., Li, S., Wei, L., Carson, D. A., & Lu, D. (2018). Tumor promoter TPA activates Wnt/β-catenin signaling in a casein kinase 1-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(32), E7522‑E7531. https://doi.org/10.1073/pnas.1802422115

Suárez-Arroyo, I. J., Acevedo-Díaz, A., Ríos-Fuller, T. J., Ortiz-Soto, G., Vallejo-Calzada, R., Reyes-Chea, J., Maldonado-Martínez, G., Schneider, R. J., & Martínez-Montemayor, M. M. (2022). Ganoderma lucidum enhances carboplatin chemotherapy effect by inhibiting the DNA damage response pathway and stemness. *American Journal of Cancer Research*, *12*(3), 1282‑1294.

Subramanian, V., Venkatesan, B., Tumala, A., & Vellaichamy, E. (2014a). Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. *Food Chem. Toxicol.*, *66*, 44‑55. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.017

Subramanian, V., Venkatesan, B., Tumala, A., & Vellaichamy, E. (2014b). Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *66*, 44‑55. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.017

Sudanta, I. M., Santoso, D., Sudiana, I. K., & Siswandono. (2023). Soursop leaves (Annona muricata Linn) ethanol extract prevents cisplatin-induced kidney injury of mice (Mus musculus) through SOD and MDA analysis. *Bali Medical Journal*, *12*(3), 2619‑2622. https://doi.org/10.15562/bmj.v12i3.4760

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209‑ 249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Sutendra, G., & Michelakis, E. D. (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Frontiers in Oncology*, *3*, 38. https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00038

Takahashi, S., Hongo, Y., Tsukagoshi, Y., & Koshino, H. (2008). Structural Determination of Montanacin D by Total Synthesis. *Organic Letters*, *10*(19). https://doi.org/10.1021/ol801576z

Tanaka, T., Shimizu, M., Kochi, T., & Moriwaki, H. (2013). Chemical-induced Carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, *5*(6), 203‑ 209. https://doi.org/10.1016/j.jecm.2013.10.009

Tataranni, T., Agriesti, F., Pacelli, C., Ruggieri, V., Laurenzana, I., Mazzoccoli, C., Sala, G. D., Panebianco, C., Pazienza, V., Capitanio, N., & Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate Affects Mitochondrial Function and Stemness-Associated Properties in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Cells*, *8*(5), 478. https://doi.org/10.3390/cells8050478

Tataranni, T., & Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate (DCA) and Cancer : An Overview towards Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, e8201079. https://doi.org/10.1155/2019/8201079

Telle-Hansen, V. H., Gaundal, L., Høgvard, B., Ulven, S. M., Holven, K. B., Byfuglien, M. G., Måge, I., Knutsen, S. H., Ballance, S., Rieder, A., Rud, I., & Myhrstad, M. (2022). A Three-Day Intervention With Granola Containing Cereal Beta-Glucan Improves Glycemic Response and Changes the Gut Microbiota in Healthy Individuals : A Crossover Study. *Frontiers in Nutrition*, *9*. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.796362

Thomas, G., Tuk, B., Song, J.-Y., Truong, H., Gerritsen, H. C., de Gruijl, F. R., & Sterenborg, H. J. C. M. (2017). Studying skin tumourigenesis and progression in immunocompetent hairless SKH1-hr mice using chronic 7,12-dimethylbenz(a)anthracene topical applications to develop a useful experimental skin cancer model. *Laboratory Animals*, *51*(1), Article 1. https://doi.org/10.1177/0023677216637305

Toklu, H. Z., Sener, G., Jahovic, N., Uslu, B., Arbak, S., & Yeğen, B. C. (2006). Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. *International Immunopharmacology*, *6*(2), 156‑ 169. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.07.016

Torres, M. P., Rachagani, S., Purohit, V., Pandey, P., Joshi, S., Moore, E. D., Johansson, S. L., Singh, P. K., Ganti, A. K., & Batra, S. K. (2012). Graviola : A Novel Promising Natural-Derived Drug That Inhibits Tumorigenicity and Metastasis of Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo Through Altering Cell Metabolism. *Cancer Letters*, *323*(1), 29‑ 40. https://doi.org/devan

Tran, H. V. (2007). *Caractérisation des propriétés mécaniques de la peau humaine in vivo via l'IRM* [Phdthesis, Université de Technologie de Compiègne]. https://theses.hal.science/tel-00207740

Trinder, P. (1969). Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, *6*(1), 24‑ 27. https://doi.org/10.1177/000456326900600108

Trouba, K. J., Hamadeh, H. K., Amin, R. P., & Germolec, D. R. (2002). Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, *4*(4), 665‑ 673. https://doi.org/10.1089/15230860260220175

Tsao, Y.-W., Kuan, Y.-C., Wang, J.-L., & Sheu, F. (2013). Characterization of a Novel Maitake (Grifola frondosa) Protein That Activates Natural Killer and Dendritic Cells and Enhances Antitumor Immunity in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(41), 9828‑ 9838. https://doi.org/10.1021/jf4031184

Tsoni, S. V., & Brown, G. D. (2008). β-Glucans and Dectin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1143*(1). https://doi.org/10.1196/annals.1443.019

Túrmina, J. A., Carraro, E., Alves da Cunha, M. A., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., Seidel dos Santos, F., Silva, L. A., & Malfatti, C. R. M. (2012). Toxicological Assessment of β-(1→6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. *Molecules*, *17*(12), 14298‑ 14309. https://doi.org/10.3390/molecules171214298

Turrens, J. F. (1997). Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Bioscience Reports*, *17*(1), 3‑ 8. https://doi.org/10.1023/A:1027374931887

Udani, J. K., Singh, B. B., Barrett, M. L., & Singh, V. J. (2010). Proprietary arabinogalactan extract increases antibody response to the pneumonia vaccine : A randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot study in healthy volunteers. *Nutrition Journal*, *9*(1), 32. https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-32

Usunomena, U. (2014). Protective effects of Annona muricata ethanolic leaf extract against Dimethylnitrosamine (DMN)-Induced Hepatotoxicity. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *9*. https://doi.org/10.9790/3008-09420106

Vabeiryureilai, M., Lalrinzuali, K., & Jagetia, G. C. (2019). Chemopreventive effect of hesperidin, a citrus bioflavonoid in two stage skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Heliyon*, *5*(10). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02521

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *266*(1‐ 2), 37‐ 56. https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89

Valle, A., Oliver, J., & Roca, P. (2010). Role of Uncoupling Proteins in Cancer. *Cancers*, *2*, 567‐ 591. https://doi.org/10.3390/cancers2020567

vélez-páez, j., villagómez, m., aguayo moscoso, s., velarde, g., gonzález, f., & páez, p. (2021). *lactato de la bioquímica a la medicina traslacional. segunda edición lactate from biochemistry to translational medicine. second edition*. https://doi.org/10.29018/978-9942-823-54-0

Veness, M. J., & Richards, S. (2003). Role of modern radiotherapy in treating skin cancer. *Australasian Journal of Dermatology*, *44*(3). https://doi.org/10.1046/j.1440-0960.2003.06711.x

Vesselinovitch, S. D., & Gilman, J. P. (1957). Factors modifying experimental epidermal carcinogenesis in mice. *Cancer Research*, *17*(1), Article 1.

Vetvicka, V., & Vetvickova, J. (2011). β(1-3)-D-glucan affects adipogenesis, wound healing and inflammation. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, *11*(3), 169‐ 175. https://doi.org/10.1007/s13596-011-0024-4

Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J. A., & Benzie, I. F. F. (2011). Ganoderma lucidum (Lingzhi or Reishi) : A

Medicinal Mushroom. In I. F. F. Benzie & S. Wachtel-Galor (Éds.), *Herbal Medicine : Biomolecular and Clinical Aspects* (2nd éd.). CRC Press/Taylor & Francis. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757/

Wahab, S. M. A., Jantan, I., Haque, M. A., & Arshad, L. (2018). Exploring the Leaves of Annona muricata L. as a Source of Potential Anti-inflammatory and Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00661

Wang, X., Wang, R., Jiang, K., Zhu, M., Guo, L., & Wu, C. (2022). PINCH-1 promotes IGF-1 receptor expression and skin cancer progression through inhibition of the GRB10-NEDD4 complex. *Theranostics*, *12*(6), 2613‑ 2630. https://doi.org/10.7150/thno.70744

Wang, Y., Jiang, W., Dong, Q., Zhao, Y., Chen, Y., Sun, C., & Sun, G. (2020). Fetal exposure to dichloroacetic acid and impaired cognitive function in the adulthood. *Brain and Behavior*, *10*(10), e01801. https://doi.org/10.1002/brb3.1801

Wang, Z., Guo, Y., Yuan, J., & Zhang, B. (2008). Effect of Dietary β-1,3/1,6-glucan Supplementation on Growth Performance, Immune Response and Plasma Prostaglandin E_2, Growth Hormone and Ghrelin in Weanling Piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *21*(5), 707‑ 714. https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70559

Wang, Z., & Zhang, X. (2017). Chemopreventive Activity of Honokiol against 7, 12— Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Mammary Cancer in Female Sprague Dawley Rats. *Frontiers in Pharmacology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00320

Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, *123*(3191), 309‑ 314. https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309

Wasson, R. G. (1968). *Soma : Divine Mushroom of Immortality* (First Edition). Harcourt Brace Jovanovich. https://www.thriftbooks.com/w/soma-divine-mushroom-of-immortality_r-gordon-wasson/468400/all-editions/

Weckbecker, G., & Cory, J. G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*, *40*(3), 257‑ 264. https://doi.org/10.1016/0304-3835(88)90084-5

Weston, A., & Harris, C. C. (2003). Multistage Carcinogenesis. In *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition*. BC Decker. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/

Williams, D. L., Sherwood, E. R., Browder, I. W., McNamee, R. B., Jones, E. L., & Di Luzio, N. R. (1988). Pre-clinical safety evaluation of soluble glucan. *International Journal of Immunopharmacology*, *10*(4), 405‑ 414. https://doi.org/10.1016/0192-0561(88)90127-0

Williams, F., Sickelbaugh, T. J., & Hassoun, E. A. (2006). Modulation by ellagic acid of DCA-induced developmental toxicity in the zebrafish (Danio rerio). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *20*(4). https://doi.org/10.1002/jbt.20135

Wolner, Z., Yélamos, O., Liopyris, K., Rogers, T., Marchetti, M. A., & Marghoob, A. A. (2017). Enhancing Skin Cancer Diagnosis with Dermoscopy. *Dermatologic Clinics*, *35*(4). https://doi.org/10.1016/j.det.2017.06.003

Wu, C.-E., Pan, Y.-R., Yeh, C.-N., & Lunec, J. (2020). Targeting P53 as a Future Strategy to Overcome Gemcitabine Resistance in Biliary Tract Cancers. *Biomolecules*, *10*(11). https://doi.org/10.3390/biom10111474

Yamagiwa, K. & Ishikawa, K. (1917). *Experimental study of the pathogenesis... - Google Scholar*. https://doi.org/10.3322/canjclin.27.3.174

Yang, C., Gundala, S. R., Mukkavilli, R., Subrahmanyam, V., Reid, M. D., & Aneja, R. (2015). Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (Annona muricata) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis*, *36*(6). https://doi.org/10.1093/carcin/bgv046

Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *37*, 266. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0909-x

Yoon, T. J., Kim, T. J., Lee, H., Shin, K. S., Yun, Y. P., Moon, W. K., Kim, D. W., & Lee, K. H. (2008). Anti-tumor metastatic activity of beta-glucan purified from mutated Saccharomyces cerevisiae. *International Immunopharmacology*, *8*(1), 36‑ 42. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.10.005

Young, D. S. (1995). *Effects of drugs on clinical laboratory tests* (4th ed). AACC Press.

Yuan, F., Bai, G., Chen, Y., Miao, Y., Chen, J., & Li, X. (2015). Structure-activity relationships of diverse ACGs against multidrug resistant human lung cancer cell line A549/Taxol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *25*(4), 787‑ 790. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.088

Yuan, K., & Zhang, Y. (2021). Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in Human Diseases. In C. Huang & Y. Zhang (Éds.), *Oxidative Stress : Human Diseases and Medicine* (p. 1‑ 26). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0522-2_1

Zeković, D. B., Kwiatkowski, S., Vrvić, M. M., Jakovljević, D., & Moran, C. A. (2005). Natural and modified (1—>3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*, *25*(4), 205‑ 230. https://doi.org/10.1080/07388550500376166

Zeweil, M. M., Khafaga, A. F., Mahmoud, S. F., Wasef, L., Saleh, H., Elrehim, Attaa. M. A., Bassuoni, N. F., Alwaili, M. A., Saeedi, N. H., & Ghoneim, H. A. (2024). Annona Muricata L. extract restores renal function, oxidative stress, immunohistochemical structure, and gene expression of TNF-α, IL-β1, and CYP2E1 in the kidney of DMBA-intoxicated rats. *Frontiers in Pharmacology*, *15*, 1348145. https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1348145

Zhang, S., Wang, S., Fan, Y., Liu, W., Zheng, Y., Wang, Z., Ren, S., & Li, W. (2023). Preparation of a new resource food-arabinogalactan and its protective effect against enterotoxicity in IEC-6 cells by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Biological Macromolecules*, *249*, 126124. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126124

Zhang, Y., Csanaky, I. L., Lehman-McKeeman, L. D., & Klaassen, C. D. (2011). Loss of Organic Anion Transporting Polypeptide 1a1 Increases Deoxycholic Acid Absorption in Mice by Increasing Intestinal Permeability. *Toxicological Sciences*, *124*(2). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr236

Zhao, Y., Wang, H., Zhou, J., & Shao, Q. (2022). Glutathione Peroxidase GPX1 and Its Dichotomous Roles in Cancer. *Cancers*, *14*(10), 2560. https://doi.org/10.3390/cancers14102560

Zhou, L., Liu, L., Chai, W., Zhao, T., Jin, X., Guo, X., Han, L., & Yuan, C. (2019). Dichloroacetic acid upregulates apoptosis of ovarian cancer cells by regulating mitochondrial function. *OncoTargets and therapy*, *12*, 1729‑ 1739. https://doi.org/10.2147/OTT.S194329

Zubaidi, S. N., Mohd Nani, H., Ahmad Kamal, M. S., Abdul Qayyum, T., Maarof, S., Afzan, A., Mohmad Misnan, N., Hamezah, H. S., Baharum, S. N., & Mediani, A. (2023). Annona muricata : Comprehensive Review on the Ethnomedicinal, Phytochemistry, and Pharmacological Aspects Focusing on Antidiabetic Properties. *Life*, *13*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/life13020353

Zubaidi, S. N., Qadi, W. S. M., Maarof, S., Mohmad Misnan, N., Mohammad Noor, H. S., Hamezah, H. S., Baharum, S. N., Rosli, N., Jam, F. A., Al-Olayan, E., Wang, C., Hellal, K., Buzgaia, N., & Mediani, A. (2023). Assessing the Acute Toxicological Effects of Annona muricata Leaf Ethanol Extract on Rats : Biochemical, Histopathological, and Metabolomics Analyses. *Toxics*, *11*(8), 688. https://doi.org/10.3390/toxics11080688

Annexes

ANNEXES

Préparation des solutions :

- ✓ **Solutions de DMBA et Huile de croton :**

  Pour une concentration de 100 µg/100µl d'acétone : 1mg de DMBA → 1ml acétone
  Pour une concentration de 200 µg/100µl d'acétone : 2mg de DMBA → 1ml acétone
  Pour une concentration de 1% d'huile de croton/acétone : 1ml huile de croton 100 ml acétone
- ✓ **TBS** ; Tris (50mM), NaCL (150mM) et pH 7,4 : Dissoudre 8,775 g NaCL dans 1L d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1L par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4.
- ✓ **Tampon phosphate (PBS)** : il a été préparé à partir deux solutions ;
  - Solution NaH_2PO_4 ($2H_2O$) à 0.2 M soit 6.24g/200ml H_2O.
  - Solution NaH_2PO_4 ($12H_2O$) à 0.2 M soit 14.32g/200ml H_2O.

  Mélanger 16ml de A + 84ml de B, après le PH doit être régler à 7.4.
- ✓ **H_2O_2 :** 50.2ml H_2O_2 30V + 49.8ml H_2O = 100ml H_2O_2

Pour les dosages des paramètres de stress oxydatif :

1. **Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

- ✓ **BSA (1 mg/ml) :** Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.
- ✓ **Réactif de Bradford :** Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95%). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

2. **Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)**

- ✓ **Tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4)**
  Solution A, dissoudre 6,24 g NaH_2PO_4 (2 H_2O) dans 200 ml d'eau distillée.
  Solution B, dissoudre 14.32 g Na_2HPO_4 (12 H_2O) dans 200 ml d'eau distillée.
  Mélanger 16 ml de la solution A avec 84 ml de la solution B

3. **Dosage de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)**

- ✓ **EDTA-Met (0,1 mM, 13 mM)** : dissoudre 50 mg EDTA Na_2 dans 50 ml tampon phosphate, prendre 11.16 ml de cette solution et ajouter 580 mg méthionine puis compléter avec 88,84 ml tampon phosphate.
- ✓ **NBT (75 µM) :** dissoudre 10,79 mg dans 5 ml tampon phosphate
- ✓ **Riboflavine (2 µM) :** dissoudre 0,1 mg dans 1 ml tampon phosphate

4. **Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)**

- ✓ **GSH (0.1 mM) :** Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.
- ✓ **TCA (1%) :** Dissoudre 1 g TCA dans 100 ml d'eau distillée.
- ✓ **DTNB (1,0 mM) :** Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

5. **Dosage du MDA**

- ✓ **TBS ; Tris (50mM), NaCL (150mM) et pH 7,4 :** Dissoudre 8,775 g NaCL dans 1L d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1L par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4.
- ✓ **TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) :** Dissoudre 20 g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution TCA 20% puis poser 1 g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20% et agiter à chaud.
- ✓ **HCl 0.6 M :** Prélever 51,56 ml d'HCl et compléter le volume à 1 L par l'eau distillée.
- ✓ **Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM) :** Dissoudre 3,149 g Tris dans 1 L d'eau distillée, puis poser 17,299 g TBA et compléter le volume à 1 L par la solution Tris (26 mM).

6. **Dosage du glutathione**

- ✓ **Tris (0,4 M), EDTA (0,02 M) et pH 9,6 :** Dissoudre 12,114 g Tris et 1,871 g EDTA dans 250 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6.
- ✓ **EDTA (0,02 M) :** Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750 ml d'eau distillée.
- ✓ **DTNB (0,01 M) :** Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.
- ✓ **L'acide salicylique (0,25%) :** Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

The Gulf Journal of Oncology

Indexed By PubMed and Medline Database

Issue 41, January 2023
ISSN No. 2078-2101

The Official Journal of the Gulf Federation For Cancer Control

Table of Contents

Original Articles

The Disruption of Mage-11 Gene via CRISPR/Cas9 Method Induced Apoptosis in the in vitro Model of Prostate Cancer 07
Leila Farhadi,Farzad Soleimani, ShohrehFakhari,Ali Jalili

How does Linkage to the National Death Index Affect Population-Based Net Survival Estimates for Women with Cervical Cancer in Saudi Arabia? 17
EmanAlkhalawi,ClaudiaAllemani, Ali Saeed AI-Zahrani,Michel P. Coleman

Progress Against Cancer in Kuwait: Trends in Incidence, Survival and Mortality 23
Alawadhi E,AI-Awadi A, Elbasmi A.Coleman MP, Allemani C

Oral Intake of Combined Natural Immunostimulants Suppresses the 7,12-DMBA/ Croton Oil Induced Two-step Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice 32
Mohammed Alxlellaoui,Assia Kadi, YaminaAbrazi,Yacine Kadi,Adnane Gary, HindKherfi,Zinelaabidine Cheraiet, MahfoudMesarah

Long-Term Outcomes of Limb-Salvage Surgery for Malignant Bone Tumors at a Single Institution in a Developing Country 42
AhmadShehadeh,MuhamadAl Qawasmi,AdibEdilbi, lyadSultan,TalebIsmael, SameerYaser,Alxlellatif Al Mousa

EGFR Mutation in Non-squamous Non-small-cell Lung Carcinoma (NS-NSCLC) in the Arab World: A systematic Review 54
Dany Nassar,ClaudiaChidiac, EliaIbrahim, Karl AbouZeid,Fady Haddad,HampigKourie

Elderly Patient Involvernent in The Decision-Making Process of Breast Cancer Management in Kuwait 62
AfrahAladwani,Faisal Alterkait,Alexander Mullen, EmadEldosouky

Transfer learning with different modified convolutional neural network models for classifying digital mammograms utilizing Local Dataset 66
Mohammed TareqMutar, Mustafa MaJid,MazinJudyIbrahim,Abo-Alhasan Hammed Obaid,AhmedZuhairAlsammarraie, EnamAltameemi,TaraFarouk Kareem

Association of Clinical Staging of OSMF with Habit of Smokeless Tobacco Consumption - Hospital Based Cross Sectional Study 72
EktaA Malvania,Shilpa J. Parikh,Vaishanavi Pathak,Pranay B. Nayi,Tadrushi A Gandhi,Nidhi N.Patel

Review Article

Salivary Lactate Dehydrogenase as a Potential Biomarker in Oral Potentially Malignant Disorders and Head & Neck Cancer-A Systematic Review and Meta-analysis 78
Lokesh Kumar S,ZameeraNaik,Vasanti Lagali-Jirge, Sndhar M, ArunPanwar,Vaishali Keluskar

Case Reports

Desmoid Tumor of the Rectus Abdominis with Urinary Bladder Involvement A Case Report and Review of Literature 100
MoathAlfentoukh, AbdulwahabSalih,Mukhtar E. Hassan,Osamah Alghamdi,KhadiJaA.Alkhawaia,MustafaA Ibrahim, ElsanousiIbrahimSabir

Pilomatrix Carcinoma-Rare Presentation of an Unusual Cutaneous Malignancy 107
RaJaAnand, Malik KanuJ,SundersinghShirley

Ghost Cell Odontogenic Carcinoma with Sarcomatous Transformation: Report of a Rare Case with Review of Literature 111
SitharaAravind, Jasmin Jose,SangeethaK Nayanar, SaJithBabuT P

Conference Highlights/Scientific Contributions

- **News Notes 117**
- **Advertisernents 120**
- **Scientific events in the GCC and the Arab World for 2022 ..... 121**

Original Article

Oral Intake of Combined Natural Immunostimulants Suppresses the 7,12-DMBA/ Croton Oil Induced Two-step Skin Carcinogenesisin Swiss Albino Mice

Mohammed Abdellaoui1, Assia Kadi[1], Yamina Abrazi[1], Yacine Kadi[2], Adnane Gary1,Hind Kherfi3, Zinelaabidine Cheraiet[4], Mahfoud Messarah[1]

[1] Laboratory of Biochemistry and Environnemental Toxicology, Badji Mokhtar University,Annaba, ALGERIA.
[2]Public hospital establishment, Skikda, ALGERIA.
[3] Department of Cytology and Pathological Anatomy,Beni-Mhafer Clinic,Annaba, ALGERIA.
[4]Sciences department. Faculty of sciences, Larbi Tebessi University,Tebessa,ALGERIA.

Abstract

Background: The immune system is cri1ical in fighting cancer, so is it possible that the natural stimulation of this system can slow down or stop the evolution of cancer? Our in vivo study aimed to evaluate the protectiveeffect of the combination of five types of immunostimulants,which are Beta-glucan and Arabinogalactanas polysaccharides and three mushroom extracts (Reishi, Maitake, and Shiitake}, on 7,12-Dimethyl Benz[a]anthracene (DMBA}/ Croton oil-inducedpapilloma in Swiss albinomice.

Methodology: We used blood count analysesto es1imate broadly the immunological reaction and biochemical techniques to determine the oxidative stress variations in the enzymatic activity of Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), and Glutathion peroxidase (GPx), which could have a preventive function against cancer development.

Results: The cutaneous application of the OMBA/Croton oil caused precancerous hyperplasia in squamous cells (papilloma) on the back of the mice. Tumor development was accompanied by a decrease in SOO and GPx activities. The treatment with the immunostimulants led to the total disappearance of the incidence of skin papillomas and also showed a nearly back to normal SOD activity but not CAT and GPx activities.The increase in the leverof immune cells (lymphocytes,monocytes,and white blood cells}reflected a clear enhancement of the immune system activity.

Discussion: The healthy epidermis observed withtreated mice simultaneously subjected to the cancerogenosis protocol suggests the inhibition of spinous cell proliferation leading to the total suppression of the hyperplasia. Moreover,the increasein thelevel of immune cells in this batch reflects an inflammatory reaction. Indeed,previous studies reported that immunostimulants, including Beta-glucaninvolve a release of some inflammatory mediators who would be at the origin of its anticancer ac1ivity. Cancerogenesis has clearly disrupted the activities of the antioxidant enzymes, but the relationship between the two process is often complex. Bibliographie data ledus to suggest that low catalytic activities of CAT and GPx observed in treated mice simultaneously subjected to the cancerogenesis protocol, would have induce an accumulation of H_20_2 which has often been described as an inducer of cancer cells apoptosis.

Conclusion: Immunostimulants used in our study could have an effective protec1ive effect against skin carcinogenesisvia the enhancement of the globalfunction of the immune system and modulation of the antioxidant defense.

Keywords: Immunostimulants, Beta-glucan, Arabinogalactan,Reishi,Maitake, Shiitake,DMBA, Croton oil, Oxidativestress,Carcinogenesis.

Abbreviations: C, control group; Oc, drug control group; Pc, positive control group; St, sick treated group;DMBA, 7,12 Dimethyl Benz[a]anthracene; NK, natural killer; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase, GPx, glutathione peroxidase; IS,immunostimulants;WBC,White blood cells; LY, Lymphocytes; MO, Monocytes; ROS, Reactive oxygen species; ONAB,Office national des aliments de bétail.

Correspondingauthor: Mohammed Abdellaoui, Laboratory of Biochemistry and Environnemental Toxicology,Badji Mokhtar University- BP: 12, Sidi Amar, Annaba-ALGERIA. Tel:+213775631848 email:abdellaoui.m2015@gmail.com.

Introduction

Cancer is among the most common diseases worldwide. Its incidence continues to increase mainly because of the changes in lifestyle and environment. Non-melanoma skin cancers (NMSC) (squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma) account for about a third of ail newly diagnosed malignancies in the United States, with the number approaching one million cases per year[1]. There are three steps in skin carcinogenesis. The iirst one, the initiation stage, involves carcinogen-induced genetic changes targeting genes like *c-Ha-ras.* The second step,the promotion,involves clonai expansion of the initiated cells to form visible premalignant lesions termed papillomas.Finally, the progression stage involves the conversion of papillomas to malignant tumors squamous cell carcinomas independent of the promotion [21]. 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) is the most active component of croton oil.Severa! studies have shown that> 90% of DMBA/TPA-induced papillomas harbor the identical CAA-to-CTA mutation in codon 61 in the Ha-ras gene, resulting in a Gln61Leu amino acid change[3]. DMBA is an important atmospheric pollutant. It cornes from the metallurgical industry, petroleum products,pesticides,and cigarette smoke. By atmospheric deposition,traces of DMBA can be found in various plant products[4]. Ali this makes it possible for it to corne into contact, voluntarily or not, with the skin. Skin cancer is a public health problem for which it is necessary to study not only the treatment methods but also the risk factors and the prevention of occurrence. In biotherapies, there is a multitude of non-toxic biological macromolecules that have antitumor properties [5]. Polysaccharides such as p-glucan are an important component of mushrooms and a major factor in their bioactive properties; these polysaccharides are able to trigger various cellular responses, such as the expression of cytokines and the variation of the activity of the antioxidant system. They could bind other conjugate molecules, such as proteins, whose conjugation always possesses strong antitumor activities[5]. Studies in the literature have reported that the effect of some therapeutic molecules differs according to their combination; some of them gain in effectiveness, while others, on the contrary, partially or totally lose their effect [7]

In our study, we evaluated the preventive effect of a combined immunostimulant composed of two polysaccharides (P-glucan + Arabinogalactan) and a mixture powder of three mushrooms [Reishi *(Ganoderma /ucidum}* + Maitake *(Grifolafrondosa)* + Shiitake *(Lentinula edodes}]* on a two-step chemically induced skin carcinogenesis using the well-known DMBNcroton oil protocol from the literature[4s].

Methodology

Chemicals

7,12-Dimethyl Benz[a]anthracene (DMBA) (Cat. No. G3463} and acetone were purchased from Sigma Aldrich, Saint Louis, USA. Croton oil was procured from Aroma essential oils, Haryana, India (Batch No.AECRE0/275/0717). p-glucan extract of the yeast Saccharomyces cerevlslae and Arabinogalactan (from Larch tree) were obtained from Now food ot# 21046780740},IL, USA. The immunostimulants Fengivivo (Reishi + Maitake + Shiitake extracted, respectively, from the following mushrooms, *Ganoderma /ucidum, Grifolafrondosa*, and *Lentinela edodes)* were procured from Vivophore, SPA Laboratories

FRATER-RAZES Algiers-Algeria.. Ali other chemicals used were of analytical grade.

Animais

Six week old (20-25 g} adult male Swiss albino mice were obtained from Pasteur institute, Algiers, Algeria and housed in polypropylene cages. The animais were maintained for two weeks of adaptation prior to the start of the experiment. Mice were fed with a commercially available standard pellet diet supplied by ONAB (Annaba, A!geria) and water ad libitum and maintained in standard housing conditions with a temperature of 24 ± 4 °C. Mice were shaved two days before the DMBA treatment.

This research was conducted in accordance with internationally accepted principles and ethics for the use and care of laboratory animais.

Experimental design

The induction of papillomas in mice by DMBN croton oil was carried out according to the method described by[9] with some modifications. We studied the potential chemopreventive effect of the mixture of some Immunostimulants, which are the 0-glucan (Beta-1,3/1,6-0-Glucan), Arabinogalactan, and a powder composed of three mushrooms, Reishi *(Ganoderma /ucidum)* + Maitake *(Grifolafrondosa}* + Shiitake *(Lentinula edodes'j.* We chose to use the therapeutic doses that are usually used in the respective pharmacopeia and the dose was selected on the basis of an average mice weight of 30g throughout ail the experiments. The mice were observed weekly based on mortality and weight gain/loss. No mortality was recorded during the whole experiment.

Animais were divided into four groups (six mice/group) as follows:

- Control group (Cl:Mice received only100 µl of acetone on their shaved back.
- Positive contrai group (Pc): Mice received a single dorsal dose of OMBA (100 µg/100 µl of acetone) as an initiation stage. After two weeks, mice received a dorsal application of croton oil (1% dissolved in acetone) 3 times a week as a promotion stage until the day of sacrifice.
- Orug control group (Oc}: Mice received a dose of 6.66 mg/kg of (-glucan --Arabinogalactan) and 6.66 mg / kg of a mixture of fungal IS powder (Reishi + Maitake + Shiitake) dissolved in drinking water by oral gavage three times a week from the second week of OMBA application on the Pc group until the day of sacrifice.
- Siek treated group (St}: Mice received the same back treatment as the positive control (Pc) group as well as the same treatment as the Orug control (Oc) group by oral gavage (Fig.1.)

Ouring the promotion,mice skins were checked weekly to record any appearance of papillomas. After 18 weeks of promotion, all the mice were sacrificed by decapitation. Skin tissue and liver were removed, and blood was collected inEOTA tubes for bloodcount analysis (by ERMA INC,Model:PCE-120N Machine).

For some of the mice that were chosen for a skin biopsy, general anesthesia was performed by intraperitoneal injection of Avertin. The biopsy was done using scalpel blades and surgical scissors. Then, the mice were sacrificed. Immediately after the blood sample collection, ail the sacrificed animais were dissected to remove the liver and then the skin biopsy samples, which were maintainedin a 10% formalin solution.

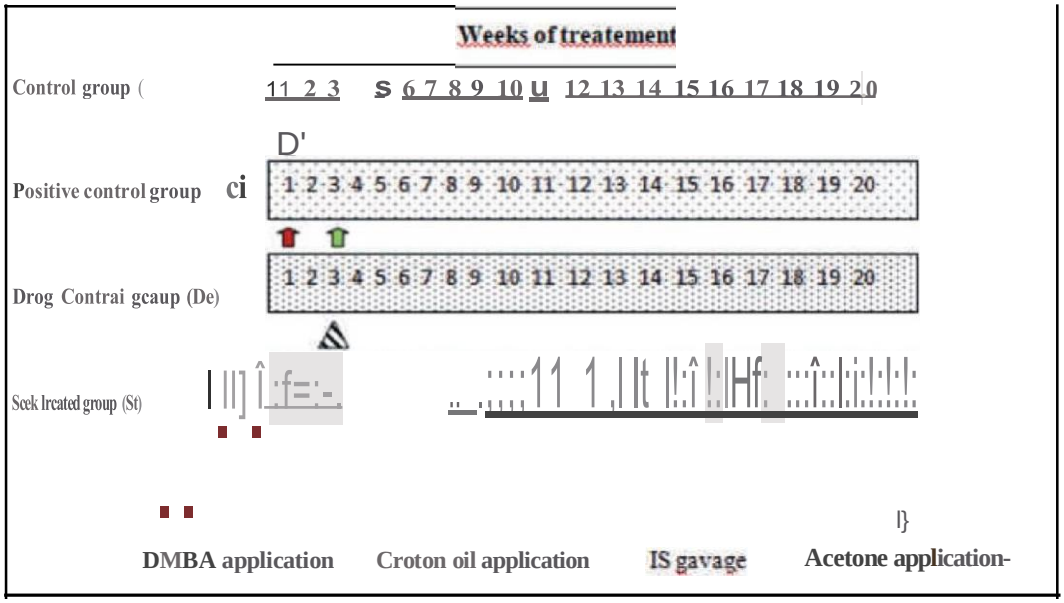
Histological evaluation

The skin sampies were immediately fixed in a 10% formol solution. Samples were dehydrated in a graded bath of ethanol followed by a lightening step with toluene and then included in paraffin (increased to 56/58°C). Sectioning of the samples into 5µm thick sections was carried out by using a microtome (Leica RM2235). The coloring step was performed according to the Hematoxylin-Eosin technique (Hematein-Eosin). Finally, the sections were observed and photographed with an optical microscope (Leica, Germany).

Tissue and sample preparation

Preparation of the liver homogenates

After being removed and washed in a 0.9% NaCI solution, two grams of each liver were ground at a low temperature (4°C) in 4 ml of phosphate butter solution (TBS, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4). After homogenization, the cell suspensions were centrifuged at 9000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatants were aliquoted and stored at -20°C for further use.



Rgure 1: Animal treatment schedules with DMBA (red arrows), Croton oil (green arrows), acetone (white arrows), and IS gavage (triangle). Mice received DMBA onelime only; however, Croton oil, acetone, and immunostimulants were given three limes a week until the 20th week.

Total protein assay

The total protein determination was carried out following [10], which is a spectrophotometric analytical technique used to determine the concentration of soluble proteins. A calibration curve of bovine serum albumin (BSA) was prepared in TBS butter; 50 µl of the 50-fold diluted sample was mixed with 2.5 ml of Bradford's solution.The mixture was vortexed, incubated for 5 min at room temperature inthe dark, and then the optical density (00) was measured at 595 nm.

Evaluation of oxidative stress parameters

Activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAD, and glutathione peroxidase (GPx) in liver homogenates were measured using reported protocols [11,12]

Statistical analysis

Results were expressed as a mean±SD for 6 mice of each group. Calculations were performed using Microsoft Ex:cel (2007) also Stat view IV®, Abacus Concepts Inc, USA, was used to analyze the data. $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

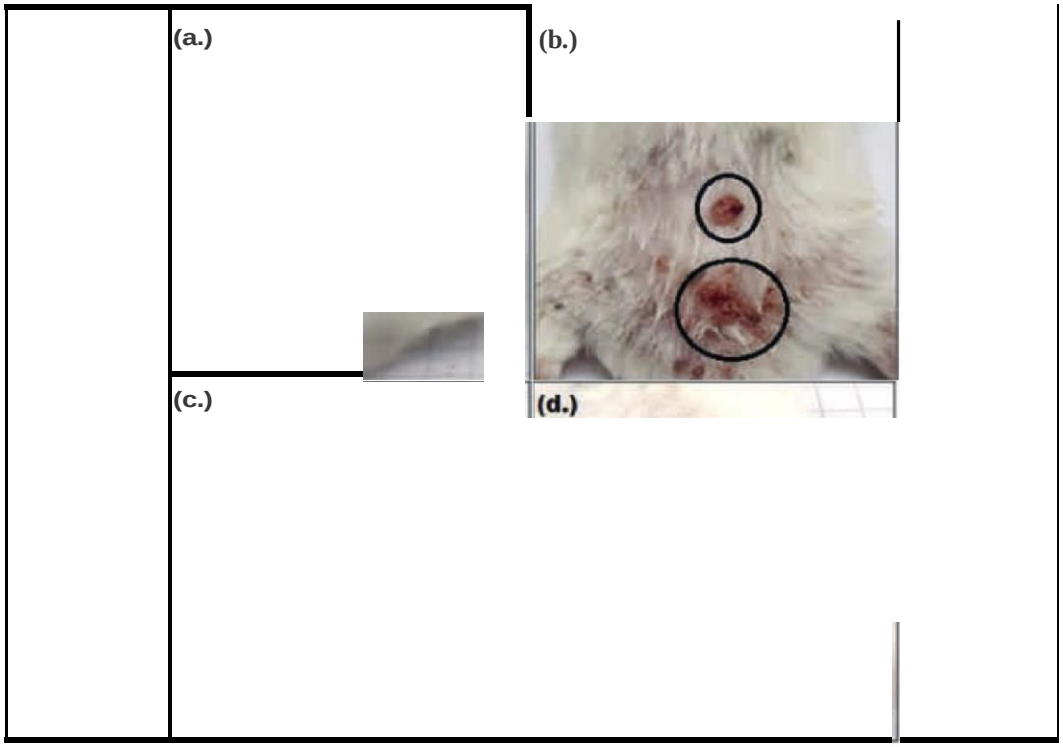
Consumption of IS over an 18-week period did not produce any observed health effects,such as an important weight change or mortality.

Tumor incidence

Fig. 2.(b) shows the representative photographs of papillomas in which we observed two large budding lesions on the back of lhe mice in the (Pc) group. The mice belonging to the (C) (Fig. 2(a)) and (De) (Fig. 2(c)) groups, on the contrary, showed a healthy skin surface with a normal color and appearance. The mice of the (St) group (Fig. 2.(d)) showed normal skinwith a slightly rough texture.

Four of the six mice in the (Pc) group carried a tumor of more than 1 mm in length, which corresponds to a percentage incidence of 70%. Meanwhile, the (St) group did not show any appearance of warts, and therefore, we noticed a total inhibition of the tumor incidence. We also did not observe any appearance of warts even less than 1 mm in length throughout the experiment in both the(C) and (De) groups.

Histopathological evaluation of



Rgure 2: Effect of the combined IS treatment on the tumor incidence in different groups of animais. (a)(C) group,(b) (Pc) group, (c) (De) group, and (d)(S1) group.

the skin papillomagenesis

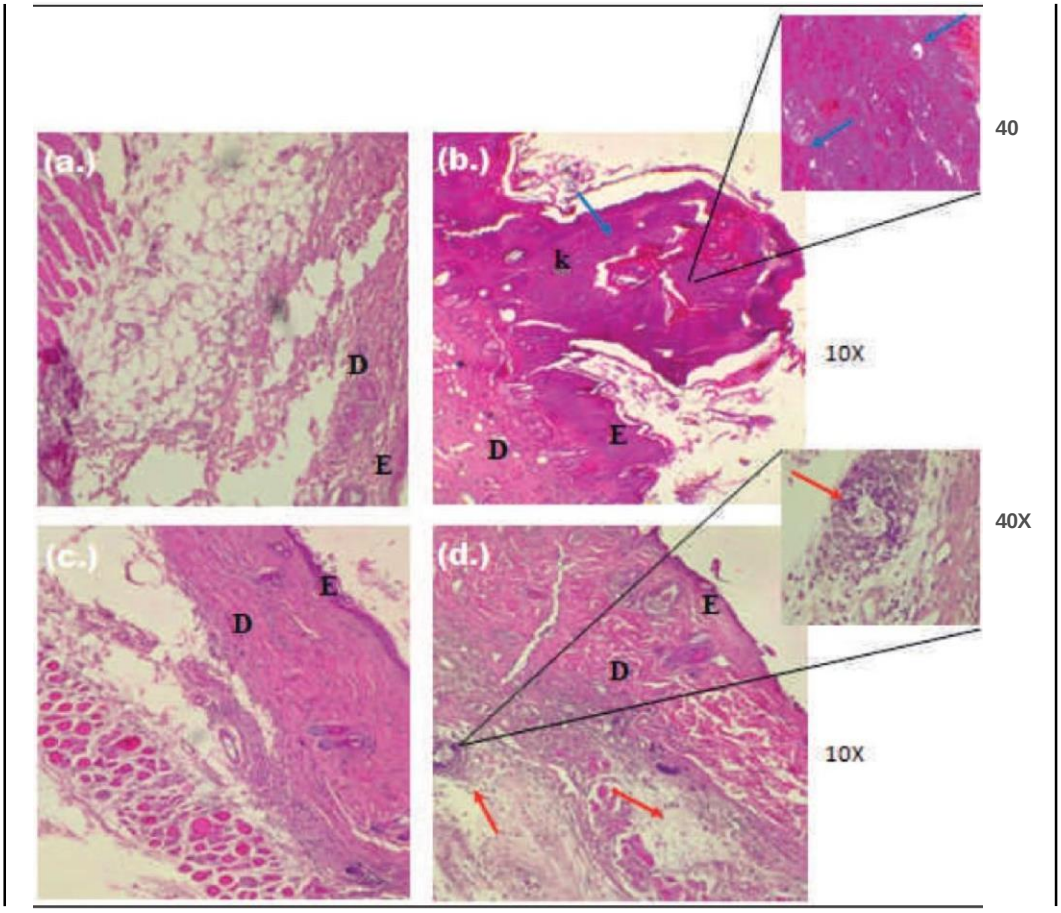
The histological skin sections of the mice in the (C} group (Fig. 3.(a)} and (Oc} group (Fig. 3.(c)} revealed intact skin layers with a normal structure of the epidermis. Meanwhile, the skin of the mice in the (Pc) group (Fig. 3.(b)} revealed that the budding lesions are papillomas expressing low grade hyperplasia with anisokaryosis, affecting the epidermis spinous cells (blue arrow, 10X). The 40X magnification allows for the observation of expanding cells (blue arrows). Histological sec1ions of the (St) group (Fig. 3.(d}) showed intact skin layers with a normal structure of the epidermis accompanied by a strong inflammatory reaction characterized by polynuclear, lymphocytic, and plasma B cell infiltration (red arrows).

Blood count analysis

Fig.4 shows that there are no significant differences in the levels of white blood cells (WBC}, lymphocytes (LV), or monocytes (MO) between the mice in the (C},(Oc), and (Pc) groups, whereas there is a significant increase in these latter blood cell species in comparison with the (St) group.

SOD, CAT and GPx activities

Fig. 5.(a) shows a significant and very significant decrease in SOO activity in mice subjected to chemically induced carcinogenesis (Pc group) (*p<0.05) and those receiving the combined IS (Oc group) (H*p<0.001), respectively, compared to the (C) group. Meanwhile,these was a significant increase in the SOO activity when mice subjected to chemically induced carcinogenesis were



Rgure 3: Histopathological analysis of Hematoxylin and eosin-stained sections of the skin of different experimental groups of animais, K: keratin, D: dermis,E: epidermis, blue arrow 1DX: benign hyperplastic papilloma,blue arrow 4DX: expanding cells, red arrows show immune cell in1iltration.Sectionsrepresent thefollowing groups, (a) (C) group, (b) (Pc) group,(c) (De) group and (d) (S1) group.(Leicaop11calmicroscope, Germany,Magnifications:1OX, 40X)

simultaneously treated with IS (St group) compared with those receiving only IS (Oc group) ($p<0.05). The GAT activity significantlyincreased in the (Oc) group compared to the (C) group (**p<0.01) (Fig. 5.(b)). This activity significantly decreased when the mice were subjected to the chemically induced carcinogenesis simultaneously with the combined IS treatment (St group} ($p<0.05). We observed a significant decrease in the GPx activity in both the (De) and (Pc) groups compared with the (C} group (**p<0.01). Interestingly, the mice subjected to chemically induced carcinogenesis and simultaneously treated with IS (St group) showed a significant decrease in the GPx activity compared with the (Oc) and the (Pc} groups ($p<0.05} (Fig. 5. (cl).

Discussion

We used a combined IS [p-glucan + Arabinogalactan + a mixture powder of three mushrooms: Reishi *(Ganoderma lucidum)*, Maitake *(Grifo/afrondosa)*, and Shiitake *(Lentinula edodes)]* in order to evaluate their preventive effect against a chemical carcinogenesis induced in vivo using the DMBA/croton oil protocol. The chosen IS are known in the literature by their proven anti-tumor effect but have never been studiedin combination.

In the (Pc) group, the histological results showed a development of budding lesions in 70% of mice. These low grade papillomas were characterized by a dysplasia and a hyperplastic character with anisokaryosis. Our results are in agreement with previous studies that have observed a development of hyperplasia in about 80% of mice after 12 weeks of DMBA/croton oil experimentation [13,1]. While other studies have found a 100% rate of skin papillomas usingthe same protocol[9]. We suggest thatthis may depend on several factors such as the strain,the age or the stress of the animals during the experimentation. In the (St) group, mice skin showed a healthy epidermis. This observation suggests the inhibition of spinous cell proliferation due to the simultaneous treatment with the combined IS, leading to total suppression of the epidermal hyperplasia. However, the (St) group, contrary to the (C) and (De) groups, which exhibited a normal skin, showed a strong inflammatory reaction characterized by granulocyte and lymphocyte infiltration. Many experimental studies have been carried out in order to find and better understand the possible anticancer effect of IS.Kobayashi et al., 2005but not against murine Lewis lung cancer 3LL cells, in vitro; (2 [1] reported that the anticancer activity of p-glucan was due to the fact that it potentiates the cytolytic activity of macrophages

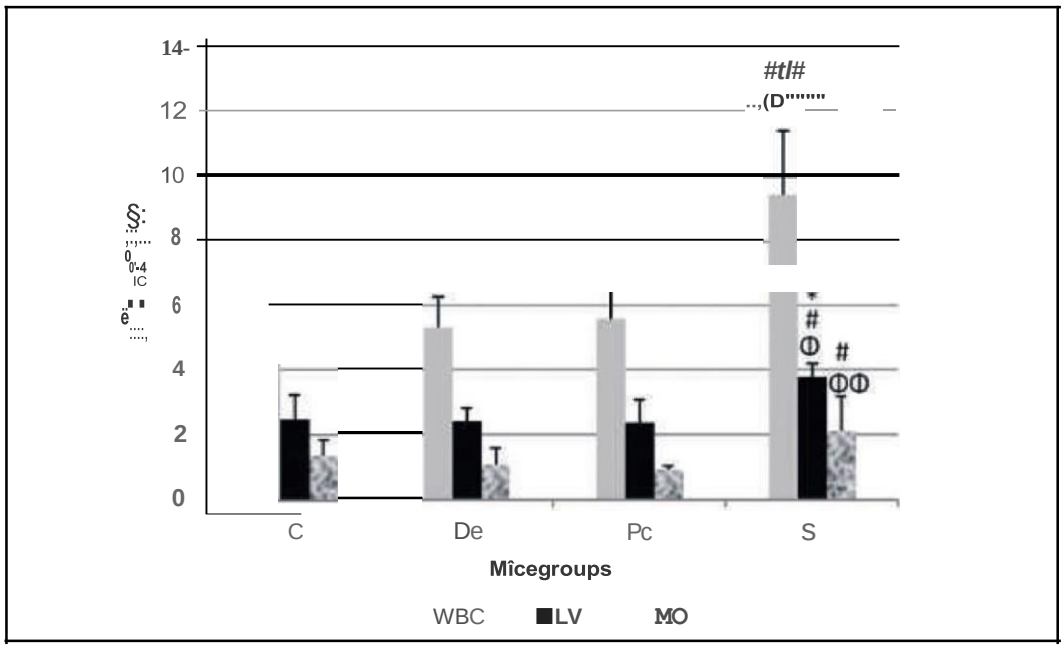
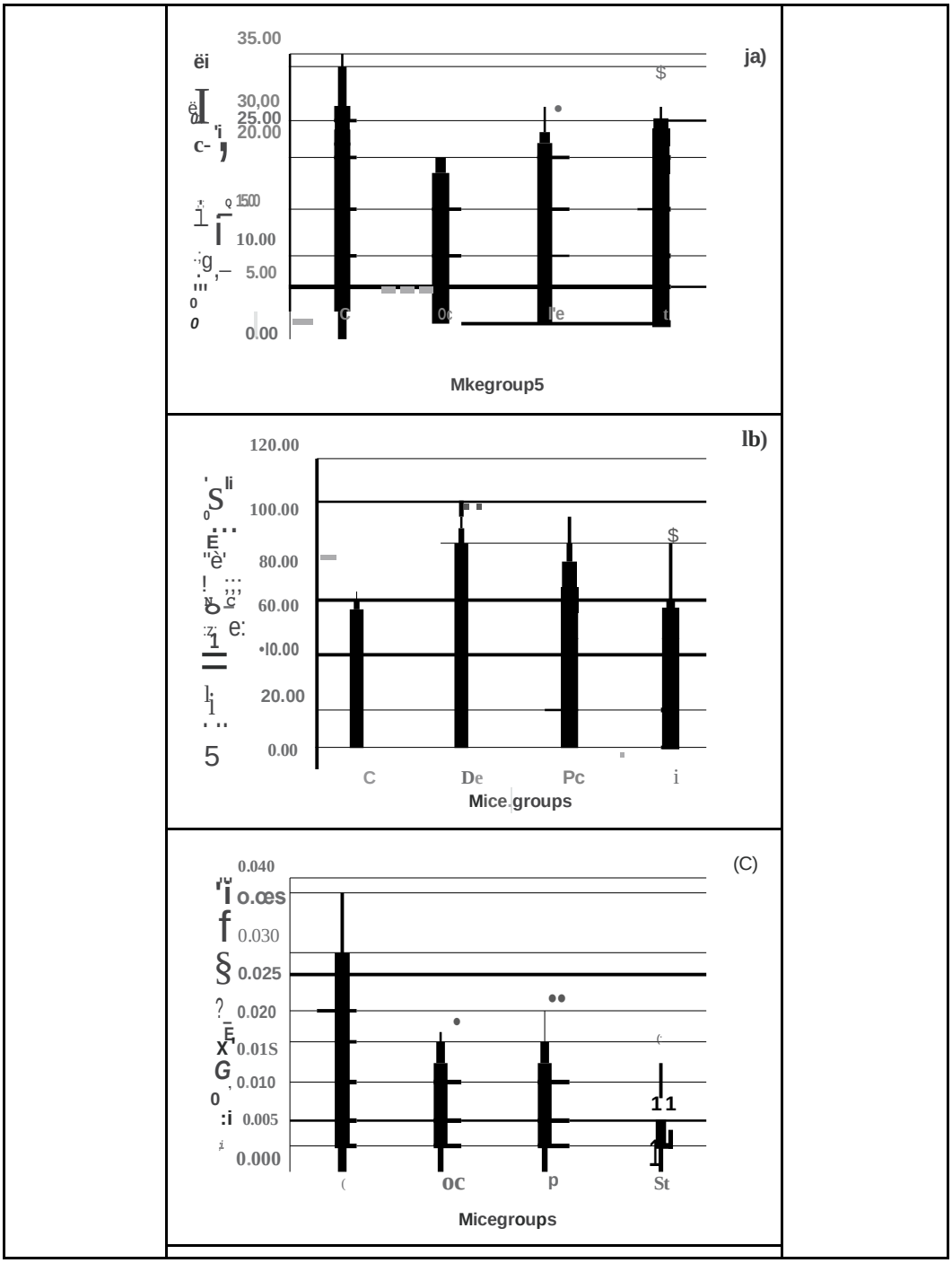


Figure 4: Blood count analysis in different experimental groups of mice. There was a highly signifieant increase in WBC, .. p <Ü(C vs St), ### p <0.001(De vs St) , p <0.001(Pc vs St).There was a signifieant inerease in LY, * p<0.05 (C vs St),# p<0.05 (De vs St), p<0.05 (Pc vs St). There was no significant increase in MO between the(C) and (St) groups,but a significant increase between (De) and(St)# p <0.05 and a highly significant increasebetween (Pe) and (St) p <0.01.Values are expressed as mean ± SD (n = 6 miee).



Rgure. 5: (a) SOD activity onliver, spectrometric measurement based on theNBT photo-reduction. "p<0.05 vs C ..... p<0.001 vs C, $p<0.05 vs De. (b) GAT activity on the liver, spec1rometric measurement based on1he H202 consump1ion speed .....p<0.01 vs C, $p<0.05 vs De. (c) GPx ac1ivity, spectrometric measurement based on reduction of H202 in thepresenceof reduced GSH. .. p<0.01 vs C, $p<D.05 vs De and Pc.Values are expressed as mean ± SD(n = 6 mice).

against tumor cells in vitro and its action mechanism involves macrophage stimulation and subsequent release of some inflammatorymediators. In addition to the yeasty p-glucan, the mushroom's polysaccharides are endowed with anti-tumor activity.

Arabinogalactan is a highly branched polysaccharide consisting of a galactan backbone with side-chains of galactose and arabinose sugars. Experimental studies have indicated that larch arabinogalactan can stimulate NK cell cytotoxicity and perhaps other WBC as well as enhance other functional aspects of the immune system and inhibit the metastasis of tumor cells of the liver[16].

The antioxidant power of both Reishi and Shiitake was proved in many studies. The Shiitake, administered alone[117] or combined withoxaliplatin,whichis a synthetic anticancer drug, has amitigating effect on hepatocellular carcinoma [1181].The Shiitakecontains several moleculeswith an anticarcinogenic effect, such as the Lentinan, krestin and beta-1,3-glucans [1191]. Reishi has several types of polysaccharidesincluding one designated as GL-1,which has been defined as a branched arabinoxyloglucan. This polysaccharide showed a tumor-suppressive activity in mice. Thiseffect may be due tothe macrophage activation inducing enhancement of phagocytosis,an increaseinthe NO release, and cytokines IL-6 and TNF-a production [19]. In Maitake mushroom, both fractions of P-D-glucan present a high antitumor activity, and especially the "D-(1-6)-0-Glucan Having P-(I-3)-Branched Chain" exhibited intense antitumor activity on Sarcoma 180/ ICR mice by improving the immune system by activating macrophages,T cells, and NK [20].

The results of the current in vivo study provided the evidence that our mixture of IS completely suppressed the development of papillomas on the back of micepreviously treated with DMBA/cotton oil by comparing them with the (Pc) group. In support of the literature, the tumor suppression observed in our study may be due to the immunostimulation of innate and adaptativecell immunity againsttumorpromotion.Indeed,histological results of the (St) group showed a strong inflammatory reaction. These results were confirmed by the blood accounting test. We found asignificant increase in thelevels ofWBC, MO and LV in the (St) group compared with the (Pc) group. This result agrees with those in many studies[21,221]which found that p-glucans were recognized by the innate immune system allowing modulation of the host's immune response. It is recognized by the receptors of innate immunity cells (pattern recognition receptors (PRRs) likethe CR3,TLR,and the best known,Dectin-1. Neutrophils, macrophages,and dendritic cells, among others, express several receptors able to recognize p-glucan in its various forms. It was reported that the p-glucan particulates bind to these receptors and induce the dendritic cells infiltration into the tumor.This can lead to delayed tumor progression [22]. Also,upon bindingp-glucan,innateimmunecells activate adaptive immunecells such as Band T lymphocytes or NK cells by secreting various cytokines, such as interleukins (IL-4, IL-6) and tumor necrosis factor-a (TNF-a) [12324]. Arnong the models explaining the action mode of the p-glucan is that of "two steps".The first step consists of the recognition of p-glucan by the PRRs of macrophages or dendritic cells. Then, they will be intemalized and degraded into fragments,which will be released so that, in the second step, they reach and attach themselvesto their targets, which are NK or granulocytes, to activate them [21]. Finaly, studies have reported that the chemopreventive effect of the mushroom's mixture could be mainly attributed to the presence of terpenes, polysaccharides and proteins that ensure its pharmaceutical properties are linked, among others, to their anti-inflammatory and antioxidant activities[119].

Although several antioxidants do inhibit skin tumor initiation by procarcinogens antioxidants, vitamins E and C, as well as many other antioxidants, are very effective inhibitors of skin tumor promotion[25]. Despite the reactive oxygen species (ROS) are known to cause DNA damages and increase mutagenesis, and thereby promote oncogenic transformation, the relationship between ROS and tumorigenesis is clearly complex and context-dependent. Chemical carcinogenesis leads to the excessive generation of ROS who favors the mutation of the Ha-ras gene, the main genetic transformation that induces the initiation of malignant cells in the skin of mice [25]. To fighting against oxidative stress, the organism possesses a whole arsenal of enzymes. The most important among them are SOD, GAT and GPx. The functioning of these enzymes can be affected by cancer which can disrupt their activities.

Our results showed a significant decrease in the SOD and GPx activities in both of the (De) and (Pc) groups compared with the (C) group. A significant increase in the GAT activity in the (De) group compared with the (C) group was observed. The decreased activity of SOD was reverted back to near normal levels in the (St) group compared with the (Pc) group, while the GPx activity still decreased significantly in the (St) group compared with the (Pc) group.

Usually, the activity of the antioxidant enzymes varies simultaneously [1271]. The decrease in SOD activity in the (De) group compared to the (C) group indicates a low production of H_2O_2 which may explain the simultaneous decreasein GPx activity.The elimination of H_2O_2 produced is therefore mainly dependent on the GAT, which may explain the increase in its activity.

Subramanian et al., 2014 [9], reported a decrease in both SOD and CAT activities in mice subjected to the same carcinogenesis protocol. These activities were significantly restored when mice were treated with gallic acid. A number of recent studies have suggested that neutralizing ROS can facilitate tumor progression and metastasis in multiple cancer types through distinct mechanisms [28]. Ooskey el al., 2016 [29] reported that cancers with a low catalytic activity of CAT are likely to be more sensitive and are more vulnerable to H_2O_2. Indeed, Bonnet et al., 2007 [30] reported that HA produced by SOD from a superoxide anion can induce apoptosis of cancer cells and inhibit tumor development. In support of these bibliographie data,we can suggest that the restored activity of SOD accompanied by the low catalytic activites of CAT and GPx in the (St) group would have induced an accumulation of H_2O_2 which would be at the origin of the inhibition of the carcinogenesis.

Conclusion

The combined DMBA/croton oil protocol induces 70% precancerous hyperplasia of epidermal cells within 18 weeks of experimentation. But obviously, the progression to a malignant tumor requires more time according to the literature.The combined IS [-glucan + Arabinogalactan +mixture powder of Reishi *(Ganoderma /ucidum),* Maitake *(Grifo/afrondosa),* and Shiitake *(Lentinula edodes)]* have immunomodulatory and chemopreventive effects against carcinigenesis. In addition, it seems to strongly involve enzymatic activities of SOD, CAT, and GPx, leading to the suppression of the promotion stage. This effect might be due to a synergistic action of various components present in the combined treatment.

Ethical Statement

This research was conducted in accordance with internationally accepted principles and ethics for the use and care of laboratory animais (Directive 2010/63/EU in Europe).

Funding and Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests or Conflict of Interest.

Funding: University funding.

References

1. Strickland FM. Immune regulation by polysaccharides: implications for skin cancer. Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology. 2001;63:132-40.
2. DiGiovanni J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. Pharmacology & Therapeutics. 1992;54:63-128.
3. Kemp C. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. Seminars in Cancer Biology. 2005;15:460-73.
4. Korinfsky JP, Plapler H, Moreno TR, Santos 1, Maria C. Induction of neoplastic cells in rat skin. Acta Cir Bras. 2014;29:104-1O.
5. Chen H, Li S. Polysaccharides from Medicinal Mushrooms and Their Antitumor Activities. In: Ramawat KG, Mérilion **J-M**, éditeurs. Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology. Cham: Springer International Publishing; 2015:1893-91O. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_3
6. Wang Q, Wang F, Xu Z, Ding Z. Bioactive Mushroorn Polysaccharides: A Review on Monosaccharide Composition, Biosynthesis and Regulation. Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry. 2017;22:955. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152739/
7. Tong J, Xie G, He J, Li J, Pan F, Liang H. Synergistic Antitumor Effect of Dichloroacetate in CombinatJon with 5-Fluorouracilin Colorectal Cancer. Journal of Biornedicine and Biotechnology. 2011;2011:740564.
8. Saito M, Kagawa N, Okumura K, Munakata H, Isogai E, Fukagawa T, et al. CENP-50 is required for papilloma development in the two-stage skin carcinogenesis model. Cancer Sei. 2020;111:2850-60.
9. Subramanian V, Venkatesan B, Tumala A, Vellaichamy E. Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil inducedtwo-step skin carcinogenesis by rnodulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. Food Chem Toxicol. 2014;66:44-55.
1O. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of rnicrograrn quantities of protein utilizingthe principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72:248-54.
11. Aebi H. [13] Catalase in vitro. In: Methods in Enzymology. Elsevier; 1984; 105:121-6. Disponible sur: https://1inkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163
12. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1984;105:114-21.
13. Padmavathi B,Rath PC,Rao AR,Singh RP. Rootsof Withania somnifera Inhibit Forestomach and Skin Carcinogenesis in Mice Vol. 2, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi; 2005:99-105. Disponible sur: https://www.hindawi.com/journals/ecam/2005/531268/
14. Saha P, Mandai S, Das A, Das PC, Das S. Evaluation of the anticarcinogenic activity of Swertia chirata Buch.Ham, an Indian medicinal plant, on DMBA-induced rnouse skin carcinogenesis model. Phytotherapy Research. 2004;18:373-8.

15. Kobayashi H,Yoshida R,KanadaY,Fukuda Y,YagyuT, Inagaki K, et al. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted !rom Agaricus blazei Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. J Cancer Res Clin Oncol. 2005;131:527-38.

16. Larch Arabinogalactan - Cancer Gare of Western New York . 2014. Disponible sur: https://www.cancercarewny.com/content.aspx?chunkiid=111700

17. Del BuonoA, Bonucci M, Pugliese S, D'ortaA,Fioranelli M. Polysaccharide trom lentinus edodes for integrative cancer treatment: immunomodulatory effects on lymphocyte population - WCRJ . 2016;3:652. Disponible sur: https://www.wcrj.neVarticle/652

18. Zhang Y, Li Q, Wang J, Cheng F, Huang X, Cheng Y, et al. Polysaccharide from Lentinus edodes combined with oxaliplatin possesses the synergy and attenuation effect in hepatocellular carcinoma. Cancer Let!. 2016;377:117-25.

19. Pinya S, Ferriol P, Tejada S, Sureda A. Chapter 5.3 - Mushrooms reishi (Ganoderma lucidum), shiitake (Lentinela edodes), maitake (Grifola trondosa). In: Nabavi SM, Silva AS, éditeurs. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements . Academic Press; 2019;1:517-26. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128124918000680

20. Kodama N, Komuta K, Nanba H. Effect of Maitake (Grifola frondosa) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients. J Med Food. 2003;6:371-7.

21. Chaichian S,Moazzami B, Sadoughi F,Kashani HH,Zaroudi M, Asemi Z. Functional activities of beta-glucans in the prevention or treatment of cervical cancer. Journal of Ovarian Research. 2020;13:24. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7057557/

22. Sze DM, Chan GC-F. Chapter 5 - Effects of Beta-Glucans on Different Immune Cell Populations and Cancers. In: Shyur L-F, Lau ASY, éditeurs. Advances in Botanical Research . Academic Press; 2012;62:179-96. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123945914000118

23. Guggenheim AG,Wright KM,Zwickey HL.Immune Modulation From Five Major Mushroorns: Application to Integrative Oncology. Integr Med (Encinitas). 2014;13:32-44.

24. Lee DH, Kim HW. Innate immunity induced by fungal !3-glucans via dectin-1 signaling pathway. Int J Med Mushrooms. 2014;16:1-16.

25. Slaga TJ. Inhibition of skin tumor initiation, promotion, and progression by antioxidants and related compounds. Critical Reviews in Food Science & Nutrition . 1995;35:51-7. Disponible sur: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399509527686

26. Bizub D, Wood AW, Skalka AM. Mutagenesis of the Ha-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. Proc Natl Acad Sei U S A. 1986;83:6048-52.

27. Kim Y-S, Ke F, Zhang Q-Y. Effect of beta-glucan on aciivity of antioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp. Fish Shellfish Immunol. 2009;27:336-40.

28. Cockfield JA, Schafer ZT.Antioxidant Defenses:AContext-Specific Vulnerability of Cancer Cells. Cancers (Basel). 2019;11:1208 Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721511/

29. Doskey CM, Buranasudja V, Wagner BA, Wilkes JG, Du J, Cullen JJ, et al. Tumor cells have decreased ability ta metabolize H202: Implications for pharmacological ascorbate in cancertherapy. Redox Biol. 2016;10:274-84.

30. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. Cancer Cell. 2007;11:37-51.

Democratic and People's Republic of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University Abderrahmane Mira of Bejaïa
Faculty of Nature and Life Sciences
جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa
Laboratory of Applied Biochemistry
Certificate of attendance
Awarded to
Prof./Dr./Mr./Mrs. ABDELLAOUI Mohamed
University of Annaba
For his worthy poster presentation on
Oral intake of Dichloroacetate (DCA) suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis in Swiss albino mice.
at the International Conference "SINAAN19" on
" Progress in Natural Antioxidants: sources, mechanisms of actions and valorization in health"
16-17 October 2019 University of Bejaia, Algeria.
Dr Atmani-Kilani Dina
Co-chairman
Dr Boudjouan Fares
Co-chairman
Pr Zebboudj Aicha
LBA Director

Ministry of Higher Education and Scientific Research | Higher School of Biological Sciences of Oran

HSBSO

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This Certificate is delivered to

Mohammed Abdellaoui

For attending the International Conference

BIOSCIENCES 2019 - BIOTECHNOLOGY AND CANCER – 7-8 December Oran, Algeria

With a Poster entitled

Oral intake of aqueous extract of Graviola (Annoneceas Muricata) dried leaves suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis in Swiss albino mice

الأستاذ: سعيدي جمال
مدير المدرسة العليا للعلوم البيولوجية بوهران بالنيابة

Prof. Saidi Djamel
Chair of the scientific committee