

Palais des Congrès de Grasse. 26, 27 et 28 mars 2010

Conférence

Evaluation de l'activité anti-mutagène / anti-génotoxique des huiles essentielles et leur potentiel anti-carcinogène¹

Abdesselam Zhiri & Dominique Baudoux

Pranarom International S.A. 37, Av. des Artisans. B-7822 Ghislenghien, Belgique

Web: www.pranarom.com. Mail: azhiri@pranarom.com. Tél.: +32 68 264 374

Résumé

L'objectif de notre travail¹ réside dans l'évaluation de l'activité anti-génotoxique et anti-mutagènes de plusieurs huiles essentielles et de leur action sur la mutagenèse induite par des mutagènes chimiques et nucléaires (Uréthane, Méthyle Methane Sulfonate 'MMS', les rayons ultraviolets C 'UVC'), le 8-méthoxypsoralène '8-MOP' activé UVA).

Nos études, par l'application de test SMART² et test Ames³, montrent clairement que les huiles essentielles étudiées (*Helichrysum italicum*, *Ledum groenlandicum*, *Ravensara aromatica*, *Cinnamomum camphora Ct.* *1,8-cinéole*, *Origanum compactum*, *Artemisia herba alba*, *Coriandrum sativum*, *Cinnamomum Loureirii*, *Artemisia dracuncululus*, *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinallis*, *Satureja montana...*) ne comportent pas de risques génotoxiques étant donné l'absence de mutagénicité^{4, 5, 6, 7} aux doses testées. Au contraire, certaines d'entre-elles présentent une capacité anti-génotoxique très marquée; elles réduisent significativement le taux de mutations induites par les mutagènes. L'interaction entre le cytochrome P-450, enzymes fondamentales de la biotransformation des xénobiotiques, d'une part et certains constituants de ces huiles d'autre part ainsi que leur effet anti-oxydant, offrent une explication valable de cette activité anti-génotoxique de ces huiles.

Nous avons montré que chez *Salmonella typhimurium* aucune huile n'induit significativement de mutations par réversion de l'histidine quelle que soit la souche, avec ou sans activation métabolique. De la même façon, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, aucune huile n'induit significativement de mutations ponctuelles par réversion de l'isoleucine-valine, ni de recombinaison intragénique, ni de recombinaison intergénique^{5, 6}. Par contre, certaines huiles essentielles s'avèrent cytotoxiques autant sur *S. typhimurium* que sur *S. cerevisiae*⁵. De plus, nous avons montré que certaines huiles induisent une apoptose dans les cellules de levure suite à l'endommagement de l'ADN par les radicaux.

Par cette conférence et à travers ces résultats encourageants, nous allons discuter l'opportunité qu'offrirait les huiles essentielles dans le domaine des anticancéreux et dans la prévention du cancer.

Introduction

Notre alimentation peut contenir des substances mutagènes et carcinogènes variables mais elle est également composée de substances anti-mutagènes et anti-carcinogènes. Les plantes médicinales et les huiles essentielles ne font pas exception.

Les relations existantes entre les propriétés mutagènes et carcinogènes des substances chimiques ont entraîné la mise au point d'une série de tests à court terme destinés à fournir une appréciation préalable des produits cancérogènes sur la base de leurs propriétés mutagènes. La toxicologie génétique étudie les effets des substances qui ciblent le matériel génétique d'un organisme par induction de diverses altérations d'ADN. Ces altérations ont des conséquences qui varient selon l'ampleur du dommage.

Parmi les organismes impliqués dans l'évaluation de l'altération génomique, *Drosophila melanogaster* représente un modèle biologique de choix. Ce choix est justifié par son cycle de vie court (9-11 jours à 25°C), son métabolisme complexe et son système de détoxification et de réparation de l'ADN qui la rapproche de ceux des mammifères. Le séquençage intégral du génome de *D. melanogaster* a montré qu'elle possède un grand nombre de gènes d'homologues impliqués dans les cancers et d'autres maladies humaines⁸. L'utilisation des tests de génotoxicité constitue un moyen rapide et efficace pour identifier et caractériser ces différentes substances. Le test de Mutations et de Recombinaisons Somatiques (SMART) des ailes de *Drosophila melanogaster* est l'un des tests les plus appliqués sur cet insecte. Lors de l'étude de la génotoxicité, les larves subissent un traitement chronique ou aigu par voie orale; l'anti-génotoxicité est réalisée par co-, pré- et post-traitement dans lesquels, l'agent anti-génotoxique est testé simultanément, avant ou après application d'un génotoxine de référence.

L'application de certains tests à court terme comme le test SMART a permis également de découvrir les propriétés anti-mutagènes de certaines huiles essentielles. Pranarôm et ses collaborateurs⁴ ont trouvé que les huiles essentielles d'*Helichrysum italicum*, de *Ledum groenlandicum*, de *Ravensara aromatica* et de leur mélange réduisent le taux de mutations induites par l'uréthane dans les souches de *Drosophila melanogaster*.

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

L'évaluation de l'activité génotoxique des produits naturels et surtout des huiles essentielles est devenue primordiale pour assurer l'absence de risques à long terme. Plusieurs tests sont destinés à ce contrôle. Le test d'Ames est considéré comme le test le plus simple, le plus rapide et le moins onéreux ; il est basé sur l'emploi de *Salmonella typhimurium* his-. L'addition d'une source de métabolisme exogène (S9-mix) permet la simulation du métabolisme *in vivo* à celui des mammifères. Cependant, l'extrapolation des résultats obtenus par ce test doit être faite avec précaution.

Dans un volet de nos recherches avec nos collaborateurs^{5, 6, 9}, nous avons vérifié le potentiel mutagène de trois huiles essentielles d'*Origanum compactum*, d'*Artemisia herba alba* et de *Coriandrum sativum*. Pour cela, nous avons adopté le test d'Ames qui utilise différentes souches de *Salmonella thyphimurium*. Ce test montre une grande efficacité dans l'évaluation de la mutagénicité et de l'anti-mutagénicité des produits; de plus, ce test présente une grande valeur prédictive de carcinogènes étant donné que des activités mutagènes peuvent être les prémices d'une carcinogénicité¹⁰.

Dans une autre partie de ces travaux de recherche⁹, nous avons étudié les éventuelles activités anti-mutagènes de ces trois huiles essentielles en utilisant la souche test de levure *Saccharomyces cerevisiae* D7 en phase stationnaire de croissance. Nous avons utilisé trois agents génotoxiques à action directe induisant différents types de lésions dans l'ADN: les rayons ultraviolets C (UVC), le 8-méthoxypsoralène (8-MOP) activé par les rayons ultraviolets A (UVA) et l'agent alkylant méthylméthane sulfonate (MMS). En résumé, nous avons remarqué que ces huiles exercent une véritable activité anti-mutagène aussi bien sur les mutations ponctuelles que sur les produits de recombinaison. Cette activité s'exerce sur les trois types de mutagènes très différents par les types de lésions qu'ils induisent et les mécanismes de réparation mis en jeu.

Wattenberg¹¹ a classé les agents chimio-préventifs en deux catégories: les agents bloqueurs et les agents supprimeurs. Les bloqueurs regroupent les inhibiteurs de la phase d'initiation du cancer soit en empêchant la formation des carcinogènes à partir des molécules précurseurs et des procarcinogènes, soit en évitant l'interaction des électrophiles avec l'ADN, l'ARN ou les protéines. Les supprimeurs sont ceux qui inhibent l'expression maligne des cellules initiées aussi bien au stade de promotion qu'au stade de progression. Kada et al¹² parlent, plutôt, des des-

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

mutagènes, qui inhibent le mutagène avant d'atteindre l'ADN et des bio-antimutagènes qui interfèrent avec le processus cellulaire de la fixation des lésions de l'ADN.

La prévention des cancers est possible, on estime que dans 80 à 90% des cas, le cancer peut être évité. Une alimentation variée et équilibrée, les plantes médicinales et les huiles essentielles sont une source de composés chimio-préventifs qui pourraient contrarier les effets négatifs des substances mutagènes et carcinogènes.

Résultats et discussions

I. Étude du potentiel anti-génotoxique et anti-mutagène des huiles essentielles par le test SMART des ailes de *Drosophila melanogaster*

L'étude de l'anti-mutagénicité des huiles essentielles et de leurs composants est d'une importance primordiale dans la recherche de médicaments anticancéreux ou dans la prévention du cancer. Ainsi, plusieurs huiles essentielles ont montré des effets antagonistes contre certains mutagènes. Trois huiles essentielles, issues d'*Helichrysum italicum*; *Ledum groenlandicum*; *Cinnamomum camphora* Ct. 1,8-cinéole et leurs mélanges ont été étudiés.

Dans le test de mutations et de recombinaisons somatiques (SMART) des ailes de *Drosophila melanogaster*, deux souches porteuses de deux marqueurs génétiques sur le chromosome III ont été utilisées : la souche *NORR/NORR* ; *NORR/NORR* ; *mwh/mwh* et la souche *NORR/NORR* ; *NORR/NORR* ; *flr³/TM3, Bd^s*.

L'effet génotoxique d'une dose donnée d'une huile essentielle est basé sur la comparaison des fréquences des clones par ailes des séries traitées par rapport à celles obtenues dans les séries de contrôle. L'analyse statistique est réalisée par le test χ^2 afin d'évaluer le degré de l'effet génotoxique et anti-génotoxique d'une huile essentielle.

Le premier travail consistait à déterminer d'abord pour chaque huile essentielle les doses toxiques afin d'en déduire à la fois le degré de toxicité et les doses à partir desquelles l'étude de la génotoxicité pourrait être réalisée. Aussi bien pour les trois huiles essentielles que pour leur mélange équiproportionnel, les doses retenues non toxiques sont en dessous de 2‰ où les taux de mortalité sont au tour de 5%. Les résultats de génotoxicité des trois huiles et celle de leur mélange ont été résumés dans le tableau 1 ci-dessous.

Le contrôle négatif qui correspond au solvant est représenté par le tween-80 à une concentration de 1‰. La fréquence des mutations totales obtenue (0.49) reste non significative lorsqu'on la compare au contrôle historique de notre laboratoire et qui correspond à l'eau (0.30). L'uréthane, un produit à fort pouvoir carcinogène et mutagène, choisi comme contrôle positif a été testé en concentration de 5 mM; il manifeste un effet hautement significatif pour les clones simples petits, simples grands ainsi que pour le total des clones ($p < 0.001$), alors que la fréquence des clones jumeaux est non significative. Les répétitions des essais avec l'uréthane donnent des fréquences homogènes, cependant les résultats n'ont pas été regroupés pour ne pas influencer le taux d'inhibition manifesté par chaque co-traitement.

Tableau 1 : Génotoxicité des différentes doses des trios huiles essentielles et leur mélange
Les valeurs avec différentes lettres sont significativement différentes

Concentrations (‰)	Nombre des ailes	Mutations par aile (Nombre de mutations)				Total des clones			
		Clones simples petits (1-2 cellules)		Clones simples grands (> 2 cellules)					
Contrôle (Twen-80)									
1 ‰	240	0.45	(107)	0.03	(07)	0.01	(03)	0.49 ^a	(117)
<i>Helichrysum italicum</i>									
1 ‰	80	0.51	(41)	0.03	(02)	00	(00)	0.54 ^a	(43)
2 ‰	80	0.45	(36)	0.01	(01)	00	(00)	0.46 ^a	(37)
3 ‰	80	0.34	(27)	0.04	(03)	00	(00)	0.38 ^a	(30)
<i>Ledum groenlandicum</i>									
1 ‰	79	0.51	(40)	0.05	(04)	0.01	(01)	0.57 ^a	(45)
2 ‰	77	0.58	(45)	0.03	(02)	0.00	(00)	0.61 ^a	(47)
<i>Cinnamomum camphora</i>									
<i>Ct. 1,8-cinéole</i>									
1 ‰	84	0.38	(32)	0.01	(01)	0.01	(01)	0.40 ^a	(34)
2 ‰	86	0.50	(43)	0.09	(08)	0.00	(00)	0.59 ^a	(51)
3 ‰	80	0.40	(32)	0.08	(06)	0.01	(01)	0.49 ^a	(39)
Mélange									
1 ‰	81	0.37	(30)	0.00	(00)	0.86	(07)	0.46 ^a	(37)
2 ‰	40	0.45	(18)	0.13	(05)	0.00	(00)	0.58 ^a	(23)
3 ‰	80	0.36	(29)	0.05	(04)	0.03	(02)	0.44 ^a	(35)

Les trois huiles essentielles (HE) ainsi que leur mélange ne montrent aucun effet génotoxique en doses comprises entre 1 et 3‰. Ceci concorde avec d'autres travaux réalisés sur certains constituants de ces huiles. Ainsi, le limonène et le cinéole ont été démontrés non génotoxiques par le test Ames. Par ailleurs des mêmes résultats ont été obtenus pour d'autres oligoéléments de ces huiles essentielles.

Les résultats de l'anti-génotoxicité contre l'uréthane sont donnés dans le tableau 2 et représentés dans la figure 1. La co-incubation de l'uréthane avec nos différentes huiles entraîne une réduction significative du taux de mutations. Cet effet pourrait être dû à l'action des éléments majeurs composants ces huiles. Selon la bibliographie, le limonène, l'alpha pinène et le 1,8-cinéole sont des inhibiteurs de la carcinogénèse mammaire induite par le 7,12 dimethylbenz[a]anthracene chez le rat. Le limonène contenu en concentrations variables dans les trois huiles, réduit aussi la carcinogénèse induite au niveau de la peau et de foie. Les taux d'inhibition relativement importants obtenus avec l'huile essentielle de *H. italicum* concordent avec l'effet anti-carcinogène de l'alpha-pinène présente dans cette huile à 29% (tableau 3).

Tableau 2 : Anti-génotoxicité des 3 HE et celle de leur mélange équipportionnel contre l'Uréthane

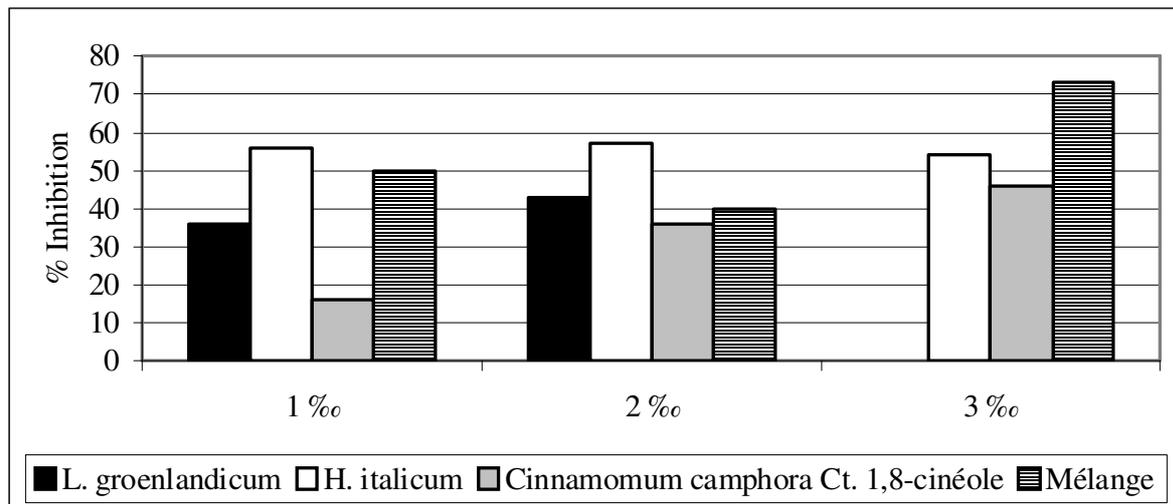
Concentrations (%)	Nombre des ailes	Mutations par aile (Nombre de mutations)					Total des clones [‡]	% inhibition *		
		Clone simple et petit (1-2 cellules)		Clone simple et grand (> 2 cellules)		Clone jumeau				
Tween-80 1‰	240	0.45	(107)	0.03	(07)	0.01	(03)	0.49	(117)	
Ure	81	1.00	(81)	0.58	(47)	0.05	(04)	1.63 ^a	(132)	
Ure et <i>H. it.</i> 1‰	81	0.59	(48)	0.11	(09)	0.03	(01)	0.72 ^b	(58)	56
Ure et <i>H. it.</i> 2‰	40	0.60	(24)	0.08	(03)	0.02	(01)	0.70 ^b	(28)	57
Ure et <i>H. it.</i> 3‰	32	0.69	(22)	0.06	(02)	0.00	(00)	0.75 ^b	(24)	54
Ure	81	1.00	(81)	0.58	(47)	0.05	(04)	1.63 ^a	(132)	
Ure et <i>L. gr.</i> 1‰	80	0.75	(60)	0.25	(20)	0.04	(03)	1.04 ^b	(83)	36
Ure et <i>L. gr.</i> 2‰	40	0.7	(28)	0.20	(08)	0.03	(01)	0.93 ^b	(37)	43
Ure	80	1.41	(113)	0.26	(21)	0.00	(00)	1.67 ^a	(134)	
Ure et <i>R. aro.</i> 1‰	80	1.13	(90)	0.23	(19)	0.04	(03)	1.40 ^a	(112)	16
Ure et <i>R. aro.</i> 2‰	82	0.85	(70)	0.21	(17)	0.01	(01)	1.07 ^b	(78)	36
Ure et <i>R. aro.</i> 3‰	57	0.82	(47)	0.09	(05)	0.00	(00)	0.91 ^b	(52)	46
Ure	78	1.63	(127)	0.36	(28)	0.01	(01)	2.00 ^a	(156)	
Ure et mélange 1‰	80	0.75	(60)	0.21	(17)	0.03	(0.3)	1.00 ^b	(80)	50
Ure et mélange 2‰	67	1.00	(67)	0.15	(10)	0.06	(04)	1.21 ^b	(81)	40
Ure et mélange 3‰	39	0.36	(14)	0.13	(05)	0.05	(02)	0.54 ^c	(21)	73

Ure : urethane, *H. it.* : *H. italicum*, *L. gr.*: *L. groenlandicum*, *R. aro.*: *Cinnamomum camphora* Ct. 1,8-cinéole

[‡] Pour chaque huile, Valeurs avec différentes lettres sont significativement différentes ($p < 0.05$)

* les taux d'inhibition sont calculés selon la formule: $(Ure - (Ure + HE/Ure) \times 100$

Figure 1: Effet inhibiteur des 3 HE et de leur mélange sur la génotoxicité de l'uréthane



L'interaction entre le cytochrome P-450, enzymes fondamentales de la biotransformation des xénobiotiques, d'une part et certains constituants de ces trois huiles essentielles d'autre part – comme les pinènes, le 1,8-cinéole, le myrcène, le caryophyllène... ainsi que leur effet antioxydant, offrent une explication valable de l'effet anti-génotoxique de ces huiles. Les résultats de nos travaux concordent avec ceux de certains auteurs^{13, 14}. Ils ont montré que l'alpha pinène, le limonène, le citronellal et la beta-myrcene inhibent l'activité du Cyp2B1 mono-oxygénase nécessaire pour l'activation des génotoxines chez le rat. La présence de plusieurs éléments qui ont été révélés anti-mutagènes dans ces huiles essentielles laisse suggérer l'effet synergique entre plusieurs inhibiteurs ou ce qu'on appelle la "chémo-prévention combinée". Cette synergie pourrait expliquer l'importance de l'inhibition observée dans le cas du mélange par rapport aux trois essences prises séparément.

Tableau 3: Effets anti-mutagènes, anti-génotoxiques et anti-carcinogènes des principaux constituants de ces trois huiles essentielles

	<i>H. italicum</i>	<i>L. groenlandicum</i>	<i>C. camphora Ct. 1,8-cinéole</i>	Effets Biologiques
Alpha-Pinène	28.67	0.94	4.51	Inhibe les CYP2B1 mono-oxygénases, anti-carcinogène contre DMBA
Sabinène	nd	1.44	12.99	Antioxydant
Limonène	1.75	36.16	2.67	Antimutagène contre l'acide 1-méthyle-1,2,3,4-tétra hydro-beta-carboline-3-carboxylique, carcinogène.
1,8 Cinéole = Eucalyptol	0.55	nd	56.45	Induit l'activité de P450
Camphène	0.28	0.35	0.22	Antioxydant
Gamma- Terpinène	0.37	0.62	1.30	Antioxydant

Myrcène	nd	0.45	1.35	Inhibiteur de l'aldose-réductase, antimutagène, antioxydant, Inhibe les échanges entre chromatides sœurs (SCE) induites par cyclophosphamide et AFB1, Inhibe les CYP450
α -Caryophyllène	8.83	nd	nd	Cytotoxique contre certaines cellules tumorales, antioxydant
Camphre	nd	nd	0.08	Prévention de Cancer, anti-irritant

II. Étude du potentiel anti-génotoxique et anti-mutagène des huiles essentielles chez *Salmonella thyphimurium* (TA98 et TA100) par le test d'Ames en présence et en absence d'activation métabolique (S9mix)

1. Mutagénicité

Dans cette partie, nous exposons nos résultats sur le potentiel mutagène de trois huiles essentielles d'*Origanum compactum*, d'*Artemisia herba alba* et de *Coriandrum sativum*. Pour cela, nous avons adopté le test d'Ames qui utilise différentes souches de *Salmonella thyphimurium*. Il faut souligner que certains produits chimiques et mélanges naturels ne peuvent exprimer leur activité génotoxique qu'après leur métabolisation dans le foie. Afin de simuler ce phénomène, nous avons utilisé la fraction microsomale d'extrait (riche en P450) de foie de rats traités par l'aroclor 1254.

Le protocole de la mutagénicité adopté dans cette étude est celui de « *Plate incorporation test* » qui consiste à incorporer simultanément la souche auxotrophe et l'huile essentielle diluée dans le DMSO et dans le cas de l'activation métabolique, la fraction microsomale S9mix et ses co-facteurs nécessaires. Les résultats de la mutagénicité des trois huiles essentielles sont regroupés dans les tableaux 4, 5 et 6.

Dans chaque expérience réalisée en absence de la fraction S9 comme en sa présence, nous avons introduit un contrôle négatif (DMSO) qui permet de contrôler le taux de mutation spontanée. La fréquence de mutation spontanée varie d'une souche à l'autre : elle caractérise les différentes

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

souches utilisées dans le test d'Ames. Durant ce travail, les moyennes des taux de mutations spontanées de la souche TA98 et TA100 sont respectivement $23,5 \pm 6,8$ et $124 \pm 14,9$ en absence de S9mix. Ces deux valeurs sont comprises dans la fourchette définie par les normes historiques du laboratoire. En présence de S9mix, on a observé une légère variation du taux de mutation spontanée mais qui reste proche des valeurs de référence du laboratoire.

Nous avons inclus dans ce test des contrôles positifs : Azide de sodium (AS), 2,4,7-trinitro-9-fluorène (2,4,7-TNF) et 2-aminofluorène (2-AF) afin de vérifier d'une part la validité des souches TA98 et TA100, de vérifier d'autre part l'efficacité des enzymes de métabolisation exogènes (S9mix) par 2-AF et enfin de montrer l'importance de certains mécanismes bien définis de la mutagenèse.

Tableau 4 : Mutagenicité de l'huile essentielle d'*O. compactum* dans les souches TA98 et TA100.

Concentration en $\mu\text{l}/\text{boîte}$	souches de <i>Salmonella typhimurium</i>			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	$23,5 \pm 6,8$	$17,8 \pm 3,7$	$124,0 \pm 14,9$	$125,0 \pm 9,1$
0,0005	$23,9 \pm 8,1$	nd	$120,6 \pm 10,7$	nd
0,001	$24,3 \pm 7,2$	nd	$113,2 \pm 15,2$	nd
0,005	$25,8 \pm ,6$	$17,1 \pm 2,9^{**}$	$117,1 \pm 16,5$	$109,3 \pm 9,3^*$
0,01	$23,5 \pm 8,6$	$18,0 \pm 4,1$	$117,3 \pm 19,6$	$116,6 \pm 7,2$
0,05	$23,4 \pm 8,5$	$17,3 \pm 3,2$	$128,4 \pm 14,6$	$109,0 \pm 11,4^*$
0,1	$22,2 \pm 7,2$	$16,1 \pm 7,0$	$113,4 \pm 19,9$	$99,0 \pm 14,4^{**}$
0,2	Toxique	$12,1 \pm 2,9^*$	Toxique	$95,8 \pm 12,1^{***}$
2,4,7-TNF (0,01 $\mu\text{g}/\text{boîte}$)	$250,3 \pm 77,5^{***}$	nd	nd	nd
2,4,7-TNF (0,02 $\mu\text{g}/\text{boîte}$)	$485 \pm 149,7^{***}$	nd	nd	nd
2-AF(25 $\mu\text{g}/\text{boîte}$)	nd	$154,3 \pm 19,5^{***}$	nd	$291,3 \pm 8,6^{***}$
AS (0.5 $\mu\text{g}/\text{boîte}$)	nd	nd	$462,2 \pm 74,3^{***}$	nd
AS (1 $\mu\text{g}/\text{boîte}$)	nd	nd	$727,1 \pm 59,1^{***}$	nd

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

Contrôle négatif: (dose 0) = 100 µl de DMSO; contrôle positif : 2,4,7-TNF : 2,4,7 trinitrofluorène ; 2-AF : 2-aminofluorène ; AS : azide de sodium. (nd) non déterminé. Les valeurs représentent la moyenne ± DS de trois boîtes/dose et en deux expériences indépendantes. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

La dose maximale testée dans les deux souches TA98 et TA100 est 0,2µl/ml, cette dose a montré une toxicité, c'est-à-dire la disparition du tapis d'auxotrophes, en absence de la fraction microsomale S9. La comparaison entre les nombres de révertants par boîte indique que l'huile essentielle d'*O. compactum* n'induit aucune mutation dans les conditions expérimentales de test quelle que soit la dose. L'huile essentielle d'*O. compactum* n'a révélé aucune activité mutagène, que ce soit en absence ou en présence de S9-mix à 10%.

Tableau 5: Mutagénicité de l'huile essentielle d'*A. herba alba* dans les souches TA98 et TA100.

Concentration en µl/boîte	souches de <i>Salmonella typhimurium</i>			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	23,5 ± 6,8	19,8 ± 5,2	124,0 ± 14,9	117,0 ± 9,5
0,005	26,2 ± 7,0	nd	118,5 ± 12,0	nd
0,01	23,9 ± 6,1	26,3 ± 2,8	116,7 ± 16,4	109,8 ± 5,7
0,05	26,0 ± 6,9	25,1 ± 6,0	123,2 ± 13,4	115,8 ± 14,1
0,1	26,5 ± 7,7	22,8 ± 5,4	115,7 ± 8,1	122,3 ± 7,0
0,5	25,0 ± 6,1	20,5 ± 3,9	104,2 ± 12,9	104,3 ± 9,7
1	18,9 ± 6,8	17,5 ± 3,3	82,4 ± 12,9	93,0 ± 12,9
2	Toxique	17,6 ± 2,6	Toxique	86,4 ± 19,2
2,4,7-TNF (0,01µg/boîte)	250,3 ± 77,5***	nd	nd	nd
2,4,7-TNF (0,02µg/boîte)	485 ± 149,7***	nd	nd	nd
2-AF(25µg/boîte)	nd	164,8 ± 15,2***	nd	283,5 ± 21,6***
SA (0.5µg/boîte)	nd	nd	462,2±74,3***	nd
SA (1µg/boîte)	nd	nd	727,1±59,1***	nd

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

Contrôle négatif: (dose 0) = 100 µl de DMSO; contrôle positif : 2,4,7-TNF : 2,4,7 trinitrofluorène ; 2-AF : 2-aminofluorène ; AS : azide de sodium. (nd) non déterminé. Les valeurs représentent la moyenne ± DS de trois boîtes/dose et en deux expériences indépendantes. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Cette huile essentielle est testée à des doses allant de 0,005 µl/ml jusqu'à 2 µl/ml, cette dernière dose (10 fois plus élevée que celle d'*O compactum*) montre aussi une toxicité en absence de la fraction S9mix. Après traitement à différentes doses, le nombre de révertants/boîte reste sans aucune augmentation significative qui pourrait indiquer un potentiel mutagène. L'huile essentielle d'*A. herba alba* ne produit ni substitution de paires de bases chez la souche TA 100 ni de mutation par décalage du cadre de lecture chez la souche TA98 avec ou sans activation métabolique. Ces résultats sont donc en accord avec les résultats obtenus sur certains ingrédients de cette huile¹⁵.

Nous n'avons trouvé aucune autre indication dans la bibliographie sur la mutagénicité du thuyone sous forme de ses deux isomères α et β qui constituent la grande part de l'huile essentielle d'*A. herba alba*.

Tableau 6: Mutagénicité de l'huile essentielle de *C. sativum* dans les souches TA98 et TA100.

Concentration en µl/boîte	souches de <i>Salmonella typhimurium</i>			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	23,5 ± 6,8	19,8 ± 5,2	124,0 ± 14,9	111,67 ± 10,7
0,001	24,9 ± 7,6	nd	116,1 ± 14,1	
0,005	28,8 ± 6,5	20,3 ± 4,8	121,7 ± 11,3	97,67 ± 4,8***
0,01	24,9 ± 7,4	22 ± 4,3	117,1 ± 15,8	120,6 ± 9,3
0,05	27 ± 4,7	21,1 ± 2,9	112,5 ± 11,8	104,17 ± 9,9
0,1	24,6 ± 8,0	23,8 ± 3,7	115,5 ± 14,9	105,50 ± 10,3
0,5	19,0 ± 5,6	22,1 ± 4,5	90,78 ± 7,01***	89,00 ± 14,3*
1	Toxique	18,1 ± 3,8	Toxique	80,50 ± 7,8***
2,4,7-TNF (0,01 µg/boîte)	250,3 ± 77,5***	nd	nd	nd
2,4,7-TNF (0,02 µg/boîte)	485 ± 149,7***	nd	nd	nd
2-AF(25 µg/boîte)	nd	164,8 ± 15,2***	nd	284,1 ± 25,4***
SA (0.5 µg/boîte)	nd	nd	462,2 ± 74,3***	nd
SA (1 µg/boîte)	nd	nd	727,1 ± 59,1***	nd

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

Contrôle négatif: (dose 0) = 100 µl de DMSO; contrôle positif : 2,4,7-TNF : 2,4,7 trinitrofluorène ; 2-AF : 2-aminofluorène ; AS : azide de sodium. (nd) non déterminé. Les valeurs représentent la moyenne ± DS de trois boîtes/dose et en deux expériences indépendantes. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Comme pour les deux premières huiles essentielles, celle de *C. sativum* est testée avec une série de concentrations allant de 0,001 µl/ml jusqu'à 1 µl/ml. Cette dose maximale (5 fois plus que celle d'*O. compactum* et 2 fois moins que celle d'*A. herba alba*) est toxique sans l'addition de S9mix et moins toxique en sa présence. La variation du nombre de révertants est indépendante de la dose et on n'observe aucune augmentation significative du nombre de révertants / boîte. On peut noter une diminution du nombre de révertants surtout en ce qui concerne la souche TA100 avec ou sans S9mix, ceci dû à une cytotoxicité débutante. L'huile essentielle testée n'a montré aucune activité mutagène ni en absence ni en présence d'activation métabolique. Aux concentrations utilisées chez les souches TA98 et TA100, on peut confirmer que cette huile essentielle est exempte de toute activité mutagène qu'elle soit directe ou indirecte par le biais de la fraction S9mix.

Chiang *et coll.*¹⁶ ont trouvé que certains monoterpènes ont un effet contre la leucémie et le lymphome humains, le linalol se révélant le plus efficace contre le lymphome histiocytaire à cellules U937 et contre le lymphome de Burkitt à cellules P3HR1. De même, les graines de coriandre ont un effet anti-carcinogène contre le 1,2-diméthyl hydrazine (DMH) qui induit le cancer du colon chez le rat¹⁷.

2. anti-mutagénicité et anti-génotoxicité

Les effets anti-mutagènes des produits naturels dans les systèmes cellulaires pro- et eucaryotiques sont souvent associés à des activités anti-oxydantes et anti-métaboliques. Après traitements par des mutagènes, les agents les plus protecteurs réagissent directement avec le mutagène, ou interfèrent avec les radicaux libres, inhibent la métabolisation via le cytochrome P450 ou encore inactivent des métabolites actifs. Les plantes et les huiles essentielles en tant qu'ingrédients dans la nourriture et les préparations médicinales sont susceptibles d'exercer des activités anti-mutagènes qui pourraient expliquer leurs effets bénéfiques chez l'humain^{18, 4, 5, 6}. Certains composants d'huiles essentielles ont manifesté des propriétés anti-mutagènes dans des cellules bactériennes et eucaryotes^{18, 4, 5, 6}.

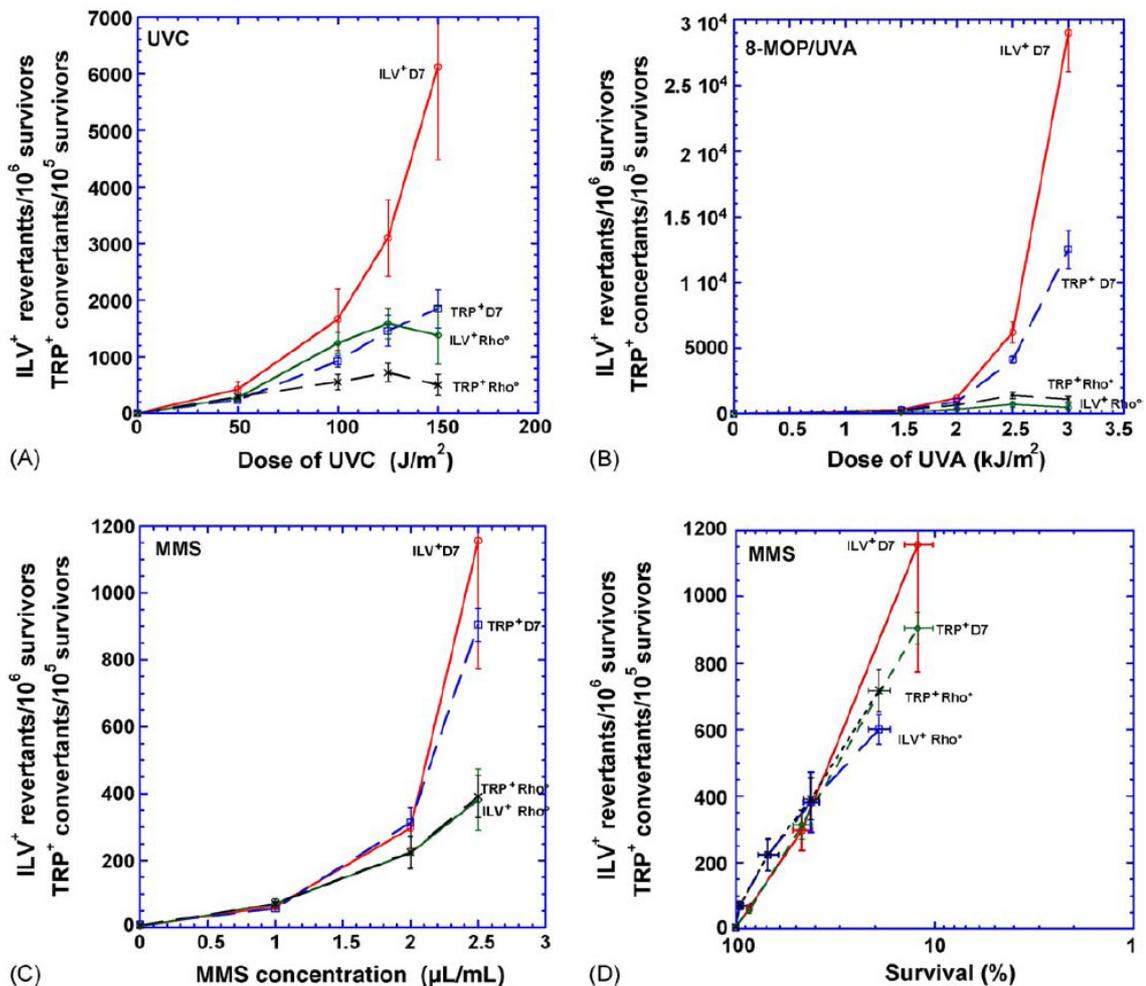
Dans nos travaux, nous avons essayé de déterminer les éventuelles activités anti-mutagènes des huiles essentielles en utilisant la souche test de levure *S. cerevisiae* D7 en phase stationnaire de

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

croissance. Nous avons utilisé trois agents génotoxiques à action directe induisant différents types de lésions dans l'ADN: les rayons ultraviolets C (UVC) qui induisent des pontages intra-brin comme les dimères de pyrimidines et les photoproduits 6-4 (Cadet et coll. 2005), le 8-méthoxypsoralène (8-MOP) activé par les rayons ultraviolets A (UVA) induisant des mono-adduits et des pontages inter-brins et l'agent alkylant méthylméthane sulfonate (MMS) produisant des méthylations de purines (7-méthylguanine, 3-méthyladénine) et des sites alcalilabiles et thermolabiles. Ces trois mutagènes sont connus pour être de bons inducteurs d'événements génétiques nucléaires dans la souche D7.

Nous avons constaté que les huiles *O. compactum*, *C. camphora* et *A. herba alba* exercent une véritable activité anti-mutagène aussi bien sur les mutations ponctuelles que sur les produits de recombinaison. Cette activité s'exerce sur trois types de mutagènes très différents par les types de lésions qu'ils induisent et les mécanismes de réparation mis en jeu :

- Les UVC induisent des dimères de pyrimidines et des photoproduits 6-4 réparés par excision de nucléotides
- Le 8-MOP activé par les UVA induits des monoadditions et des pontages inter-brins réparés après formation de cassures double brin intermédiaires par des processus de recombinaison
- Le MMS produit des alkylation de bases réparées par excision de bases.



Induction of ILV+ revertants and TRP+ mitotic gene convertants by UVC (A), 8-MOP/UVA (B) and MMS (C and D) in D7 (Rho+) and a rho0 derivative of D7 as a function of dose or concentration, and survival for MMS. With UVC, the differences between D7 and rho0 for ILV+ and TRP+ are significant for the last two doses ($p < 0.01$); with 8-MOP/UVA, for ILV+ the differences are significant at all doses ($p < 0.001$) and for TRP+ they are significant for the two last doses ($p < 0.001$); with MMS, the differences are significant for the last two doses for ILV+ and TRP+ ($p < 0.05$). F. Bakkali et al. / *Mutation Research* 606 (2006) 27–38

On est donc en droit de penser que cette activité mutagène peut s'appliquer à d'autres huiles essentielles, à d'autres mutagènes et à d'autres types de mutations. Des agents possédant de telles caractéristiques, à savoir absence de mutagénicité, cytotoxicité cellulaire due principalement à des effets radicalaires causés par un endommagement des mitochondries et de l'ADN mitochondrial et enfin une induction d'apoptose et de nécrose non négligeable, sont fort susceptibles d'exercer une activité anti-mutagène. En effet, trois huiles essentielles, *Origanum compactum*, *Artemisia herba alba* et *Cinnamomum camphora*, ont montré une activité anti-mutagène très nette par deux mécanismes différents selon l'agent mutagène utilisé ; cette activité dépend principalement de l'agent mutagène, c'est-à-dire du type de lésions induit dans l'ADN, plutôt que de l'huile essentielle. Pour terminer, les huiles essentielles étudiées ne montrent aucun effet mutagène,

cependant leur effet anti-mutagène est bien clair ; ce qui peut être exploité dans la recherche de leurs activités anti-carcinogènes.

Conclusion

Si les premières études sur la toxicité des huiles essentielles et de leurs composants ont confirmé l'absence de la génotoxicité de la majorité d'entre elles, nous avons vite remarqué que leur potentiel anticancéreux est considérable. L'huile essentielle de *Myrica gale* L (avec ses molécules majoritaires : myrcène, limonène, α -phellandrène et β -caryophyllène) manifeste une activité anti-cancérogène dans les lignées cellulaires de cancer du poumon (lignée A-549) et dans le cancer du colon (lignée DLD-1)¹⁹. L'huile essentielle de *Nigella sativa* montre une activité antiproliférative, inhibe la cancérogenèse induite par le 1,2-diméthylhydrazine et prévient l'incidence de cancer du colon chez le rat F344²⁰. Les huiles essentielles d'*Ocimum sanctum*, de *Citrus citratus*, d'*Alpinia officinarum*, de *Lavendula angustifolia*, de *Vetiveria zizanioides*, de *Zingiber montanum*, de *Piper nigrum*, de *Cymbopogon nardus*, de *Curcuma longa*, d'*Ocimum basilicum*, de *Citrus hystrix*, de *Piper betel*, d'*Albizia lebbek*, d'*Ocimum americanum*, de *Mentha spicata* et de *Psidium guajava*, ont montré leur potentiel inhibiteur de la prolifération des cellules de la leucémie murine (lignée murine leukemia, P388) et des cellules de cancer épidermique (human mouth epidermal carcinoma, KB)²¹.

D'autres études portant spécialement sur certains composés d'huiles essentielles ont montré leur potentiel anti-cancérogène dans plusieurs tests *in vitro* et *in vivo*. Yoo et coll²². ont montré que l'eugénol extrait de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* inhibe la croissance des cellules cancéreuses (HL-60) ; son mécanisme d'action met en jeu la production d'espèces réactives d'oxygène, le relargage des cytochromes C, la fragmentation de l'ADN et l'induction d'apoptose. Le géraniol inhibe également la prolifération des cellules du cancer du colon, il induit une dépolarisation de la membrane, interagit avec les canaux ioniques et interfère avec les voies de signalisation. Carnesecchi et coll²³. ont démontré également dans une étude *in vivo* et *in vitro* que le géraniol inhibe la synthèse d'ADN et réduit le volume des tumeurs du colon.

D'autres constituants des huiles essentielles comme le farnésyle (C15) ou le géranyl-géranyl (C20) peuvent inhiber la modification post-traductionnelle (farnésylation) nécessaire au pouvoir transformant du gène *ras*^{24, 25} et prévenir la formation de tumeurs. Un autre mécanisme récemment découvert est celui de l'inhibition de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* par le β -eudesmol (abondant dans l'huile essentielle de *Centaurea mucronifera*)²⁶.

Suite à cette présentation et à travers tous ces résultats, nous pensons qu'il est temps de parier suffisamment sur l'opportunité qu'offriraient les huiles essentielles dans le domaine des anticancéreux et dans la prévention du cancer.

Références Bibliographiques

¹Cet exposé est le fruit de plusieurs de projets de recherche menés par Pranarom International en collaboration avec des universités belge, espagnole, française et marocaine. C'est une synthèse de trois thèses de doctorat et de plusieurs publications.

²Test SMART = Somatic Mutation and Recombination Test. Test de Mutations et de Recombinaisons Somatiques des yeux et des ailes de *Drosophila melanogaster*.

³Test Ames = Test, inventé par Bruce Ames, permettant de déterminer le potentiel mutagène des produits.

⁴M. Idaomar, R. El Hamss, F. Bakkali, N. Mezzoug, A. Zhiri, D. Baudoux, A. Munoz-Serrano, V. Liemans, A. Alonso-Moraga, [Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*](#), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 513, Issues 1-2, 15 January 2002, Pages 61-68.

⁵F. Bakkali, S.Averbeck, D.Averbeck, A. Zhiri, M. Idaomar. [Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*](#), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 585, Issues 1-2, 1 August 2005, Pages 1-13.

⁶F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, A. Zhiri, D. Baudoux, M. Idaomar, [Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast \(*Saccharomyces cerevisiae*\) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS](#), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 606, Issues 1-2, 14 July 2006, Pages 27-38.

⁷N. Mezzoug, A. Elhadri, A. Dallouh, S. Amkiss, N.S. Skali, J. Abrini, Zhiri, D. Baudoux, B. Diallo, M. El Jaziri, M. Idaomar. [Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents](#). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 629, Issue 2, 18 May 2007, Pages 100-110

⁸Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E. et coll., (2000). [The genome sequence of *Drosophila melanogaster*](#). *Science*, 287: 2185-2195.

⁹F. Bakkali, Etude du potentiel cytotoxique, génotoxique et anti-génotoxique des certaines huiles essentielles en relation avec leurs propriétés anti- et pro- oxydantes chez *Salmonella typhimurium* et

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

Saccharomyces cerevisiae. Thèse de doctorat, Spécialité: Toxicologie Génétique. 26 Décembre 2005.
Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences, Tétouan, Maroc

¹⁰Bogen K.T. (1994) Applicability of alternative models of revertant variance to Ames-test data for 121 mutagenic carcinogens. *Mutat. Res.*, 322: 265-273.

¹¹Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 1985 ; 45: 1-8.

¹²Kada T, Inoue T, Namiki N. Environmental desmutagens and antimutagens In: Klekowski EJ Eds. *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, New York: Praeger, 1982: 137-151.

¹³De-Oliveira A.C., Ribeiro-Pinto L.F., Paumgarten J.R. (1997). In vitro inhibition of CYPB1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol. Lett.*, 92:39-46.

¹⁴Kauderer B., Zamith, F.J. Paumgarten, Speit G. (1991). Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells in vitro, *Environ. Mol. Mutagen.*, 18 : 28-34.

¹⁵Gomes-Carneiro M.R., Felzenszwalb I. and Paumgarten F.J.R. (1998) Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutat. Res.*, 416: 129–136.

¹⁶Chiang L.C., Chiang W., Chang M.Y., Ng L.T. and Lin C.C. (2003) Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. *Am. J. Clin. Med.*, 31: 37–46.

¹⁷Chithra V. and Leelamma S. (2000) Coriandrum sativum — effect on lipid metabolism in 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer. *J. Ethnopharmacol.*, 71: 457-463.

¹⁸Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Inter. J. Food Microbio*, 94: 223-253.

¹⁹Sylvestre M., Legault J., Dufour D. and Pichette A. (2005) Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12: 299-304.

²⁰Salim E.I. and Fukushima S. (2003) Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer.*, 45:195-202.

²¹Manosroi J., Dhumtanom P. and Manosroi A. (2005) Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines *Cancer Letters*, In Press, Corrected Proof.

²²Yoo C.B., Han K.T., Cho K.S., Ha J., Park H.J., Nam J.H., Kil U.H. and Lee K.T. (2005) Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.*, 225 : 41-52.

²³Carneseccchi S., Bras-Gonçalves R., Bradaia A., Zeisel M., Gossé F., Poupon M.F. and Raul F. (2004) Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.*, 215 : 53-59.

12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales

²⁴Mazières J., Pradines A. and Favre G. (2003) *Les inhibiteurs de farnésyl transférase: une cible peut en cacher une autre. Médecine/sciences, 19 : 211-6.*

²⁵Kloog Y. and Cox A.D. (2004) *Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. Seminars in Cancer Biol., 14: 253-261.*

²⁶Tsuneki H., Ma E.-L., Kobayashi S., Sekizaki N., Maekawa K., Sasaoka T., Wang M.-W. and Kimura I. (2005) *Antiangiogenic activity of β -eudesmol in vitro and in vivo. Eur. J. Pharmacol., 512 : 105-115.*